



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**"DESARROLLO DE UN METODO DOT-ELISA PARA
LA DETECCION DE ANTICUERPOS EN AMIBIASIS"**

Tesis que presenta

MARGARITA RAQUEL VALADEZ SANCHEZ

Para obtener el grado de

B I O L O G O



Los Reyes Iztacala, Edo. Méx., Noviembre de 1988.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en el laboratorio y bajo la dirección del Dr. Rubén López-Revilla.

Dedico esta tesis a mis padres Juan y Raquel quienes me han dado su amor, apoyo y aliento en todo momento.

A Gerardo y Rocío por sus consejos y estímulo durante mi formación profesional y por ser un gran ejemplo para mí.

A Daniel y Patricia por su cariño y apoyo.

A mis compañeros y amigos.

A todos aquellos que de alguna manera me
han alentado a seguir adelante.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS , XIV

LISTA DE TABLAS , XVI

LISTA DE FIGURAS , XVII

AGRADECIMIENTOS , XX

RESUMEN , XXII

I. INTRODUCCION , I

A. Parasitismo y parásitos , I

B. Protozoarios parásitos , 2

C. Amibas , 3

1. Generalidades , 3

2. Entamoeba histolytica , 6

a. Estructura , 6

b. Ciclo de vida , 8

D. Amibiasis , 13

1. Inmunidad , 13

a. Inmunidad humoral , 15

b. Inmunidad celular , 18

2. Epidemiología , 21

3. Tratamiento y prevención , 24

4. Métodos de diagnóstico de laboratorio , 25

a. Diagnóstico microscópico , 27

b. Diagnóstico serológico, 28

II. OBJETIVOS, 35

A. Objetivo general, 35

B. Objetivos particulares, 35

III. MATERIALES, 36

A. Reactivos, 36

B. Composición y preparación de soluciones, 37

1. Amortiguadores para la cromatografía en
L-fenilalanina-Sepharose, 37

a) Tris-base 1 M, 37

b) Sulfato de amonio 2.5 M, 37

c) Tris-acetatos 0.004 M, pH 7.6 con sulfato de
amonio 1 M, 37

d) Tris-acetatos 0.032 M, pH 7.6 con sulfato de
amonio 0.8 M, 38

e) Tris-acetatos 0.024 M, pH 7.6 con sulfato de
amonio 0.6 M, 38

f) Tris-acetatos 0.05 M, pH 8 con NaCl 0.25 M, 38

g) Tris base 0.25 M, pH 10.5, 38

h) Tris-acetatos 0.04 M, pH 8 con sulfato de amonio
2.5 M, 38

2. Amortiguadores para la cromatografía en
DEAE-celulosa, 38

a) PBS 0.015 M, pH 8, 39

b) PBS 0.3 M, pH 4.8 , 39

3. Amortiguadores y soluciones para PAGE-SDS

Soluciones para los geles y las cámaras
electroforéticas: 39

a) Acrilamida-Bis , 39

b) Tris-HCl 3 M, pH 8.3-8.9, 39

c) Tris-HCl 0.49 M, pH 6.8 , 40

d) SDS al 10% , 40

e) TEMED , 40

f) Persulfato de amonio (PA) , 40

g) Amortiguador de corrida 10X, pH 8.3 , 40

Soluciones para preparar las muestras y teñir los
geles: 41

a) Azul de bromofenol al 0.2% , 41

b) Amortiguador de muestras 2X , 41

c) Colorante de Fairbanks , 41

d) Solución desteñidora rápida, 41

e) Acido acético al 7.5% , 42

Soluciones y reactivos de uso general: 42

a) HCl 5 N , 42

b) Glicerol al 50% , 42

c) EDTA al 1% , 42

d) Agar al 1% , 42

e) Reactivo de Bradford , 43

4. Soluciones para la titulación de los antisueros , 43

a) Tris-HCl 15 mM, pH 8 , 43

- b) PBS 15 mM, pH 8, 43
 - c) NaCl 0.1 M, 43
 - d) Azul de Coomassie al 0.5% y ácido acético al 7%
5. Amortiguadores para el acoplamiento de IgG a Sepharose 4B, 43
- a) HCl 1 mM, 43
 - b) NaHCO₃ 0.1 M con MgCl₂ 0.5 M, pH 8.3, 44
 - c) Tris-glicina 0.1 M, pH 8.6, 44
 - d) Acetatos 0.1 M, pH 4, 44
 - e) Tris-HCl 0.1 M con NaCl 0.5 M, pH 7.4, 44
 - f) PBS 15 mM con NaCl 0.5 M, pH 7.4, 44
6. Amortiguadores para la purificación de IgG con IgG, mediante cromatografía de afinidad, 44
- a) PBS 0.015 M con NaCl 0.15 M, pH 7.4, 45
 - b) Glicina-HCl 0.1 M, pH 2.8, 45
7. Amortiguadores para la inmunoelectroforesis en geles de agarosa, 45
- a) Tris-HCl 15 mM, pH 8, 45
 - b) Azul de bromofenol al 1% en Tris-HCl 15 mM, pH 8, 45
8. Preparación de soluciones para el acoplamiento de la peroxidasa (HRP) con glutaraldehído, 45
- a) PBS 0.1 M, pH 8 con sulfato de amonio al 1.25%, 45
 - b) NaCl 0.15 M, pH 7.0, 46
 - c) Amortiguador de carbonato-bicarbonato 1 M, pH 7.5, 46
 - d) L-lisina 0.2 M, pH 7.0, 46

9. Soluciones para la adsorción del primer anticuerpo a membranas de nitrocelulosa, 46
- a) Amortiguador de muestras [KCl 120 mM/NaCl 20 mM/NaHCO₃ 2 mM/MgCl 2mM/Tris 5 mM, pH 7.4/Triton X-100 al 0.7% (vol/vol)], 46
 - b) Solución fijadora, 47
 - c) Tris-salino, pH 7.4, 47
 - d) Solución bloqueadora, 47
 - e) PBS 15 mM, pH 7.4, 47
10. Soluciones para la determinación de las condiciones de reacción de la peroxidasa (HRP), 47
- a) Solución A. Amortiguador de trietanolamina (TEA) salino, pH 7.5, 47
 - b) Solución B. 4-Cloro-1-Naftol (4-Cl-1-N), 48
 - c) Mezcla de reacción (MR), 48
11. Soluciones para la cosecha y fijación de amibas,
- a) Medio TYI, 48
 - b) NaCl 0.1-Glicina 0.1 N, pH 7.4, 48
 - c) Tris-salino con NaN₃ al 0.2% (TBS), 48
 - d) BSA al 5% en TBS, 49
12. Soluciones para el dot-ELISA, 49
- a) BSA al 1% en TBS, 49
 - b) TBS, 49
 - c) Mezcla de reacción (MR) diluída 1:8 en TEA-salino, 49
- C. Material biológico, 49

IV. METODOS, 50

A. Purificación de IgG sérica humana (IgGH), 50

1. Obtención del suero, 50
2. Corte con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M, 50
3. Cromatografía en L-fenilalanina-Sepharose, 51
4. Diálisis y liofilización, 52
5. Cromatografía en dietil-amino-etil (DEAE) celulosa, 52
6. Diálisis, liofilización y almacenamiento, 53
7. Cuantificación de proteínas, 53
8. PAGE-SDS, 54
 - a) Formación del gel separador (inferior), 54
 - b) Formación del gel concentrador (superior), 56
 - c) Preparación de la cámara electroforética, 58
 - d) Preparación de las muestras, 59
 - e) Corrida electroforética, 60
 - f) Tinción de los geles, 60
 - g) Secado de los geles, 61

B. Inmunización de conejos, 61

1. Dosis y vía, 61
2. Esquema de inmunizaciones y sangrados, 61
3. Titulación de los antisueros, 62
 - a) Preparación de los geles de agarosa al 1.5%, 63
 - b) Recubrimiento de los portaobjetos con agarosa, 63
 - c) Perforación de los geles, 66
 - d) Preparación de las muestras para la

- immunodifusión, 67
- e) Lavado de los geles, 67
- f) Tinción de los geles, 67
- C. Purificación de IgG de conejo anti IgGH (IgG α IgGH), 67
 1. Acoplamiento de IgGH a Sepharose, 67
 2. Purificación de anticuerpos de conejo dirigidos contra IgGH, mediante cromatografía de afinidad, 67
 3. Pureza de la IgG α IgGH obtenida por cromatografía de afinidad, 68
 - a) Inmunolectroforésis en geles de agarosa, 68
 - b) PAGE-SDS, 69
- D. Acoplamiento de la peroxidasa de rábano (HRP) a la IgG, 70
- E. Adsorción del primer anticuerpo (IgGH) a membranas de nitrocelulosa, 71
- F. Búsqueda de las condiciones de reacción de la peroxidasa de rábano (HRP) con 4-Cloro-1-Naftol (4-Cl-1-N), 72
- G. Dot-ELISA con IgGH, 73
 1. Fijación del primer anticuerpo, 73
 2. Unión del segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa ("conjugado"), 74
 3. Reacción de la peroxidasa, 74
- H. Dot-ELISA con Entamoeba histolytica, 75
 1. Preparación del antígeno amibiano, 75
 - a) Cosecha de amibas, 75
 - b) Fijación de las amibas con glutaraldehído, 76

2. Inmovilización del antígeno, 76
 3. Unión de los anticuerpos, 78
 4. Reacción enzimática, 78
- V. RESULTADOS, 80
- A. Purificación del "primer anticuerpo" (IgG serica humana), 80
 1. Cromatografía en L-fenilalanina-Sepharose, 80
 2. Cromatografía en DEAE-celulosa, 82
 3. Rendimiento de la IgGH purificada, 82
 4. Pureza electroforética de la IgGH, 86
 - B. Producción de anticuerpos de conejo anti IgGH, 86
 1. Dosis, vía, adyuvantes, inmunizaciones y sangrados, 86
 2. Titulación del antisuero, 88
 - C. Purificación del "segundo anticuerpo" (IgG de conejo anti IgGH), 90
 1. Cromatografía de la IgG del suero de conejo, 90 dirigido contra IgGH (IgG α IgGH), 90
 2. Análisis de la IgG α IgGH por IEF, 92
 3. Análisis de la IgG α IgGH por PAGE-SDS, 95
 - D. Adsorción del primer anticuerpo (IgGH) a membranas de nitrocelulosa, 95
 - E. Determinación de las condiciones de reacción de la HRP con 4-Cl-1-N, 95
 1. Efecto de la concentración de 4-Cl-1-N, 95
 2. Efecto de la concentración de enzima, 98

- 3. Efecto del tiempo de incubación, 98
 - F. Dot-ELISA con IgGH, 101
 - 1. Condiciones del ensayo, 101
 - 2. Sensibilidad y especificidad, 101
 - a) Sensibilidad, 101
 - b) Especificidad, 102
 - G. Dot-ELISA con Entamoeba histolytica, 102
- VI. DISCUSION, 107
- A. Purificación del primer anticuerpo, 107
 - B. Producción y purificación del segundo anticuerpo, 108
 - C. Acoplamiento de la IgG α IgGH con peroxidasa, 109
 - D. Condiciones de reacción y actividad específica de HRP, 110
 - E. Dot-ELISA con IgGH, 110
 - F. Dot-ELISA con E. histolytica, 111
- VII. CONCLUSIONES, 115
- A. Purificación del primer anticuerpo (IgGH), 115
 - B. Producción del segundo anticuerpo, 115
 - C. Determinación de las condiciones de reacción de la HRP, 115
 - D. Dot-ELISA con IgGH, 116
 - E. Dot-ELISA con E. histolytica, 116
- VIII. REFERENCIAS, 118

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ab. Anticuerpo
- ACF. Adyuvante completo de Freund
- AIF. Adyuvante incompleto de Freund
- Ag. Antígeno
- BSA. Albúmina sérica bovina
- 4-Cl-1-N. 4-Cloro-1-Naftol
- CF. Fijación del complemento
- C3d. Fragmento C3d de la proteína C3 del sistema del complemento
- CNBr. Bromuro de cianógeno
- CIE. Contrainmunolectroforésis
- DEAE. Dietil-amino-etil
- DEAE-c. DEAE-celulosa
- DO. Densidad óptica
- Dot-ELISA. Ensayo en forma de mancha de inmunoabsorbente conjugado a una enzima
- EDTA. Etilendiamino tetracetato disódico
- Eh. Entamoeba histolytica
- ELISA. Enzyme-linked immunosorbent assay, equivalente a ensayo de inmunoabsorbente conjugado a una enzima
- HRP. Peroxidasa de rábano
- IDG. Inmunodifusión en geles de agar

IEF. Inmunoelectroforesis
Ig. Inmunoglobulina
IgA. Inmunoglobulina A
IgAsH. Inmunoglobulina A secretoria humana
 α IgG. Anti-inmunoglobulina G
IgG. Inmunoglobulina G
 α IgGH. Anti-inmunoglobulina G humana
IgGH. Inmunoglobulina G humana
IgM. Inmunoglobulina M
IgG α IgGH. Inmunoglobulina G de conejo anti inmunoglobulina
G humana
IH. Hemaglutinación indirecta
L-Fer-S. L-Fenilalanina acoplada a Sepharose
MIF. Factor de inhibición de la migración de los macrófagos
MR. Mezcla de reacción
PA. Persulfato de amonio
PAGE-SDS. Electroforesis en gel de poliacrilamida con
dodecil sulfato de sodio
PBS. Salino amortiguado con fosfatos
SDS. Dodecil sulfato de sodio
SH. Suero humano
SHT. Suero humano total
TBS. Amortiguador Tris-salino
TEA. Trietanolamina
TEMED. N,N,N',N'-Tetrametilendiamina
TYI. Medio basal para el cultivo axénico de E. histolytica

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Formación del gel separador (inferior) de poliacrilamida-SDS según el tipo de cámara de electroforesis, 55

Tabla 2. Formación del gel concentrador (superior) de poliacrilamida-SDS según el tipo de cámara de electroforesis, 57

Tabla 3. Volumen (ml) de amortiguador según el tipo de cámara de electroforesis, 58

Tabla 4. Tiempo de corrida electroforética según el tipo de cámara de electroforesis, 60

Tabla 5. Purificación de IgG sérica humana, 85

Tabla 6. Títulos comparativos obtenidos con ELISA clásico y Dot-ELISA en sueros de pacientes sanos y con absceso hepático amibiano (AHA) en curso, 106

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Morfología comparada de amibas y representación esquemática de sus núcleos, 5
- Figura 2. Representación esquemática de trofozoítos, prequistes y quistes de Entamoeba histolytica, 7
- Figura 3. Ciclo de vida de Entamoeba histolytica, 9
- Figura 4. Amibiasis, curso de la infección, 12
- Figura 5. Amibiasis, sitios de lesión, 14
- Figura 6. ELISA (Ensayo de inmunoabsorbente conjugado a una enzima), 32
- Figura 7. Plantillas para la formación de pozos y surcos en geles de agarosa, 65
- Figura 8. Perfil cromatográfico del suero humano normal en L-Fenilalanina-Sepharose, 81
- Figura 9. Purificación de la IgGH por cromatografía en

DEAE-celulosa, 83

Figura 10. Inmunolectroforésis de la IgG sérica humana obtenida por cromatografía en DEAE-c, 84

Figura 11. Electroforésis en gel de poliacrilamida-SDS de las fracciones obtenidas durante la purificación cromatográfica de la IgG, 87

Figura 12. Punto de equivalencia del antisuero de conejo dirigido contra IgG humana, 89

Figura 13. Purificación de anticuerpo de conejo anti IgGH por cromatografía de afinidad, 91

Figura 14. Análisis de la IgG α IgGH por inmunolectroforésis, 93

Figura 15. Análisis de la IgG α IgGH por PAGE-SDS, 94

Figura 16. Adsorción cuantitativa del primer anticuerpo (IgGH) a membranas de nitrocelulosa, 96

Figura 17. Efecto de la concentración de 4-Cl-1-Naftol sobre la velocidad de reacción de la HRP, 97

Figura 18. Efecto de la concentración de la HRP sobre la velocidad de reacción, 99

Figura 19. Efecto del tiempo de incubación sobre la reacción enzimática de la HRP, 100

Figura 20. Dot-ELISA con antígeno de trofozoítos de E. histolytica, 105

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de una manera muy especial al Dr. Rubén López-Revilla por su excelente asesoramiento, consejos y por su amistad durante la realización de la presente tesis.

Al M en C Roberto Quezada-Calvillo quien con su paciencia me enseñó a desenvolverme dentro del laboratorio y me dió un gran aporte teórico.

A Fernando Navarro-García por su amistad y por haber sido un magnífico compañero de trabajo de quien aprendí mucho.

Con cariño a todos los miembros del laboratorio: Adrián, Crescencio, Rodolfo, Lucía, Tere, Rafael, Lucinda, Samuel, Pilar, Jaime, Sandra, Ofelia, Lourdes y Gela.

A la Dra. Yolanda López Vidal del Depto. de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición, quien donó gentilmente los sueros de pacientes con absceso hepático amibiano para la realización de los experimentos.

Al Sr. Marco Antonio Galicia por la elaboración de figuras y al Sr. Gustavo Juárez Vergara por la elaboración de

fotografías y transparencias que se presentan en esta tesis.

También quiero hacer patente mi agradecimiento al Fondo de Becas de la compañía Beckman Instruments de México por haberme apoyado económicamente durante mi estancia en este Centro de Investigación.

RESUMEN

La amibiasis, producida por las formas móviles (trofozoitos o amibas) del protozoario parásito E. histolytica, es una de las principales infecciones que afectan a la población de nuestro país. No existen datos precisos sobre la epidemiología de la amibiasis. Parte de la falta de esta información se debe a la carencia de métodos de diagnóstico confiables, técnicamente simples, baratos, prácticos y cuyos reactivos y equipo estén al alcance de laboratorios de pocos recursos. El propósito del presente proyecto de investigación fue montar y estandarizar el método dot-ELISA para la detección de anticuerpos antiamibianos, que satisfaga los requerimientos mencionados para el diagnóstico serológico de amibiasis. Para montar el sistema dot-ELISA llevamos a cabo varias etapas: 1) Purificación de inmunoglobulina G sérica humana (IgGH) por cromatografía hidrofóbica y de intercambio iónico, para 2) inmunizar conejos y producir un antisuero, que 3) purificamos por cromatografía de afinidad en una columna acoplada a IgGH y obtener los anticuerpos de conejo anti IgGH (IgG α IgGH), para 4) acoplarlos a la enzima peroxidasa de rábano (HRP); 5) El antígeno amibiano se obtuvo de E. histolytica cultivada axénicamente en nuestro laboratorio y 6) se adsorbió a membranas de nitrocelulosa que sirvieron de

soporte en la prueba. Definimos las siguientes condiciones del ensayo: a) cantidad de antígeno inmovilizado; b) dilución y volumen del suero problema; c) concentración y volumen de la IgGCoIgGH conjugada con peroxidasa y d) el tiempo de la reacción enzimática. Una vez optimizado el sistema dot-ELISA, definimos su sensibilidad y especificidad y lo comparamos con el método de ELISA clásico. Usamos cuatro sueros de personas sanas y otros cuatro de personas con absceso hepático amibiano, los cuales habían sido previamente titulados por el método de ELISA clásico. Encontramos que los sueros de personas sanas (controles negativos), desarrollaron color en los primeros pozos hasta las diluciones 1:100 y 1:200, por lo que los inversos de tales diluciones (100-200) fueron consideradas como los títulos al punto final de los sueros normales. Los cuatro sueros restantes (controles positivos), desarrollaron color en las diluciones 1:600 (dos), 1:800, y 1:12400, respectivamente. Los títulos obtenidos para los sueros positivos y negativos con nuestro método correspondieron aproximadamente a los que habían sido obtenidos previamente con un ELISA clásico en el que se usaron diluciones seriadas de 5 en 5. Concluimos que nuestro sistema Dot-ELISA permite titular de manera rápida y confiable a los anticuerpos séricos anti Entamoeba histolytica, empleando como antígeno en cada ensayo 3×10^4 amibas estables indefinidamente que se encuentran fijadas con glutaraldehído y adsorbidas a un

área circular de 4 mm de diámetro en una membrana de nitrocelulosa, el segundo anticuerpo diluído 1:300 y la mezcla de reacción incubada en presencia de BSA al 1% para eliminar reacciones positivas falsas y el fondo inespecífico. Es un método rápido (toma alrededor de 2 horas) y se lleva a cabo a temperatura ambiente. La titulación al punto final de los sueros probados se lee directamente, sin necesidad de equipo adicional. Su sensibilidad y especificidad son similares a los del ELISA clásico y por lo tanto mayores que las de otros métodos serológicos que se emplean rutinariamente para el diagnóstico, como la contrainmunolectroforésis y la fijación del complemento.

I. INTRODUCCION

A. Parasitismo y parásitos (Brown y Neva, 1983 y Donaldson, 1979)

La parasitología estudia a los organismos llamados parásitos que habitan temporal o permanentemente, sobre o dentro, y a expensas de otros organismos vivos (huéspedes) con los cuales interaccionan.

En la simbiosis hay una asociación permanente de dos organismos que no pueden existir independientemente. En el mutualismo, ambos organismos son beneficiados y en el comensalismo una de las partes es beneficiada y la otra no.

El término parásito es sin embargo aplicado al organismo que se asienta en el huésped y se alimenta del mismo, obtiene y recibe todo el beneficio de la asociación.

El huésped puede o no sufrir desordenes orgánicos o funcionales causados por el parásito. Un ectoparásito vive fuera (infestación) y un endoparásito vive dentro del huésped (infección). Un parásito es facultativo cuando puede tener una existencia libre o parasítica, y obligado cuando reside permanentemente y es completamente dependiente del huésped. Un parásito es incidental cuando se establece en un

huésped en el cual no vive ordinariamente. Un parásito temporal es libre parte de su existencia y recurre a su huésped intermitentemente para obtener alimento. Un parásito permanente se asienta sobre o dentro del huésped en su madurez o su vida entera. Un parásito patógeno causa daño por sus actividades mecánicas, traumáticas o tóxicas. Un parásito coprozoico es una especie foránea que pasa a través del tracto alimentario sin infectar al huésped.

La transmisión de parásitos incluye tres factores: 1) una fuente de infección, 2) un modo de transmisión, y 3) la presencia de un huésped susceptible. El efecto combinado de estos factores determina la prevalencia del parásito en un tiempo y lugar determinados. La incidencia de las infecciones por parásitos de humanos se incrementa cuando las condiciones ambientales favorecen la existencia extracorpórea del parásito y por la carencia de higiene y saneamiento en las comunidades.

B. Protozoarios parásitos

Los protozoarios son organismos unicelulares que viven aislados o en colonias. Cada protozoario es una unidad completa capaz de llevar a cabo todas sus funciones, tal como un organismo superior que contiene diversos tipos de células especializadas. La mayoría de los protozoarios son de vida libre, pero algunos se han adaptado para vivir en

algún huésped. Sus órganos de locomoción son prolongaciones del ectoplasma conocidos como pseudopodos (formas temporales), cilios, flagelos y membranas ondulantes (formas permanentes) (Brown y Neva, 1983). Los protozoarios se alimentan por englobamiento hacia su interior de partículas sólidas formando "vacuolas alimenticias" y también por absorción. Ciertos parásitos que son activos en un estado, disminuyen su actividad cuando se encierran en sí mismos en una pared resistente y dura y forman el llamado quiste (Donaldson, 1979). La pared del quiste es una cubierta ectoplásmica.

El endoplasma granular contiene uno o varios núcleos. Puede contener también vacuolas alimenticias, vacuolas de reserva, partículas del exterior, vacuolas contráctiles (que regulan la presión osmótica y eliminan el material de desecho) y cuerpos cromatoides. La membrana nuclear engloba un retículo fino y cromatina concentrada en pequeñas masas (Brown y Neva, 1983).

Los modos de reproducción de los protozoarios son muy diversos, e incluyen la fisión binaria, la multiplicación sexual y asexual (Donalson, 1979).

C. Amibas

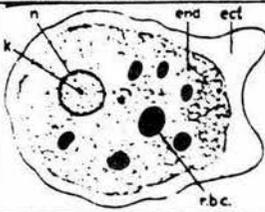
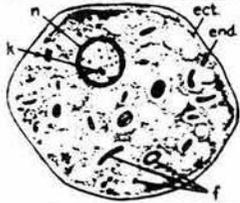
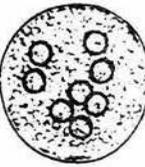
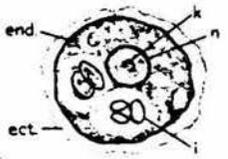
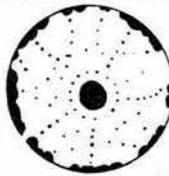
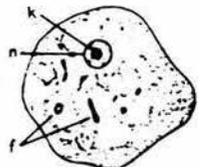
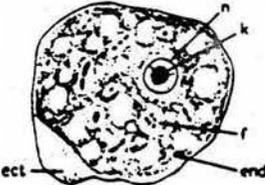
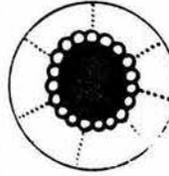
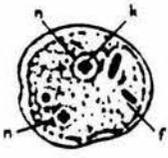
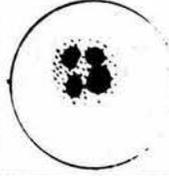
1. Generalidades

Las amibas son protozorios entre los cuales están incluidas muchas especies de vida libre que son probablemente las formas animales mas primitivas (Brown y Neva, 1983).

Las seis especies de amibas parásitas del hombre son: 1) Entamoeba histolytica, 2) Entamoeba coli, 3) Entamoeba gingivalis, 4) Dientamoeba fragilis, 5) Endolimax nana y 6) Iodamoeba butschlii. Todas viven en el intestino grueso excepto E. gingivalis, que habita en la boca. Sólo una especie, E. histolytica, es patógena para los humanos. Dieritos protozoarios de vida libre (Naeqleria y Acanthamoeba spp) son parásitos accidentales de humanos. D. fragilis no es patógena. Entamoeba polecki es un parásito del cerdo raramente incidental en el hombre y que puede tener vida libre como Entamoeba moshkovskii (Brown y Neva, 1983).

La clasificación de las especies del género Entamoeba esta basada en el número de núcleos en sus quistes maduros (que pueden ser 1, 4, 8). E. coli pertenece al grupo con ocho núcleos y E. polecki, al grupo con un sólo núcleo. En el grupo con quistes tetranucleados, E. histolytica puede ser diferenciada de E. hartmani por el diámetro del quiste que tiene menos de 10 µm, además de tener otras diferencias morfológicas determinadas genéticamente y no ser patógena; a E. hartmani se le ha denominado también "raza enana" (Markell y Voge, 1981) (Fig. 1).

Fig. 1. Morfología comparada de amibas y representación esquemática de sus núcleos. Trfozoítos y quistes de Entamoeba histolytica, E. coli, E. gingivalis, Endolimax nana, Iodamoeba butschlii y Dientamoeba fragilis, ect, ectoplasma; end, endoplasma; f, vacuolas alimenticias; i, inclusión del núcleo; k, cariosoma; n, núcleo; rbc, eritrocitos (Tomado de Brown y Neva, 1983).

	TROFOZOITO	QUISTE	NUCLEO
ENTAMOEBIA HISTOLYTICA			
ENTAMOEBIA COLI			
ENTAMOEBIA GINGIVALIS			
ENDOLIMAX MANA			
IODAMOEBIA BÜTSCHLI			
DIENTAMOEBIA FRAGILIS			

2. Entamoeba histolytica

E. histolytica --que taxonómicamente se sitúa en la superclase Sarcodina, clase Rhizopodea, subclase Lobosia, orden Amoebidae, familia Entamoebidae, género Entamoeba, especie histolytica--causa colitis amibiana, disentería amibiana, ameboma y absceso hepático amibiano (Brown y Neva, 1983).

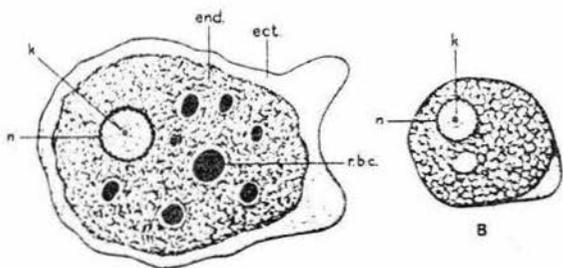
En 1875 Lösch descubrió a E. histolytica en las heces de un paciente con disentería y produjo lesiones intestinales experimentales en perros. Sin embargo, la asociación del parásito con la disentería no fue establecida sino hasta las investigaciones de Kartulis en 1887. En 1901 Councilman y Lafleur probaron la etiología amibiana en los abscesos hepáticos. En 1903 Walker y Sellards establecieron definitivamente la patogenicidad de E. histolytica cuando hallaron quistes en pacientes (Brown y Neva, 1983).

a. Estructura

E. histolytica puede ser observada en las heces como a) trofozoíto, b) prequiste y c) quiste (Fig. 2).

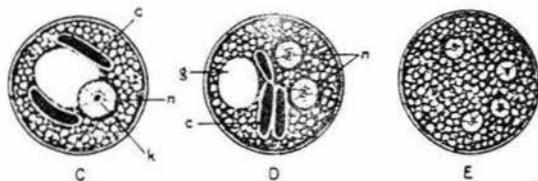
Los trofozoítos de E. histolytica (formas móviles y no infectantes) se distinguen de otras amibas intestinales por características morfológicas que sirven para el diagnóstico. El tamaño puede ser de 10-60 μm pero la mayoría tienen de

Fig. 2. Representación esquemática de trofozoítos, prequistes y quistes de Entamoeba histolytica. A. Trofozoíto que contiene eritrocitos en digestión. B. Prequiste. C. Quiste uninucleado joven. D. Quiste binucleado. E. Quiste maduro tetranucleado. c, cuerpos cromatóides; ect, ectoplasma; end, endoplasma; g, vacuola de glucógeno; k, cariosoma; n, núcleo; rbc, eritrocito (Tomado de Brown y Neva, 1983).



A

B



C

D

E

X 2000

15-30 μm .

Los quistes (formas inmóviles e infectantes) son redondos u ovoides, ligeramente asimétricos y de 10-12 μm de diámetro. El quiste inmaduro tiene un solo núcleo que ocupa un tercio de su diámetro y cuando ha madurado contiene cuatro pequeños núcleos.

Los trofozoítos de E. histolytica se localizan en la mucosa en la luz del colon, especialmente en las regiones cecal y sigmoidorrectal. Se multiplican por fisión binaria y el núcleo parece dividirse por mitosis. La reproducción ocurre también en el quiste, del que emergen ocho amebas como resultado del exquistamiento. E. histolytica tradicionalmente ha sido considerada anaerobia porque crece en tensiones bajas de oxígeno, pero en realidad es microaerofílica.

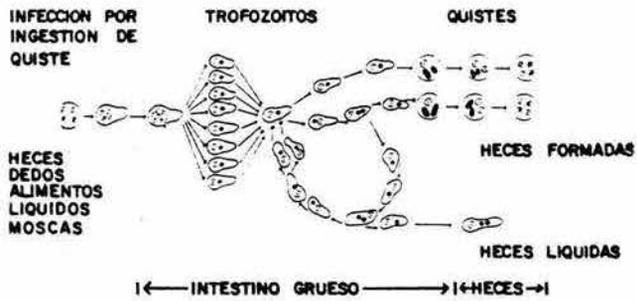
La ameba ingiere eritrocitos y fragmentos de tejido por englobamiento con sus pseudópodos. Puede ingerir también bacterias y otros elementos particulados contenidos en la luz del intestino.

Los trofozoítos sobreviven fuera del cuerpo por muy poco tiempo; en cambio el quiste puede vivir dos días a 37°C y más de 60 días a 0°C y muere a temperaturas extremas, como -28°C y 50°C.

b. Ciclo de vida (Fig. 3)

Fig. 3. Ciclo de vida de Entamoeba histolytica (Tomado de Brown y Neva, 1933).

ENTAMOEBA HISTOLYTICA



Los quistes formados en la luz del intestino grueso pasan hacia las heces y son inmediatamente infectantes. Cuando son ingeridos resisten al jugo gástrico y pasan hacia el intestino delgado.

Ahí, bajo la influencia de los jugos digestivos neutros o alcalinos y la actividad de las amibas que contienen, la pared del quiste se desintegra, liberando el metaquiste tetranucleado, que inmediatamente se divide en ocho pequeños trofozoitos uninucleados. Estas pequeñas amibas se mueven a lo largo del intestino grueso, donde en condiciones apropiadas crecen e invaden la mucosa y la submucosa (Brown y Neva, 1933).

Cuando hay diarrea, las amibas son expulsadas al exterior y pueden ser encontradas en evacuaciones fluídas frescas. Si no hay diarrea, las condiciones son más favorables para el enquistamiento. La amiba que se enquista primero se hace esférica, secreta una pared y su núcleo se divide para dar un quiste tetranucleado maduro.

Los pacientes con amibiasis intestinal pueden dividirse en dos grupos: a) los que tienen ataque (clínico severo o crónico) y b) los que no muestran evidencia clínica de la infección (portadores asintomáticos).

Los quistes son transmitidos al hombre a través del agua y vegetales contaminados con heces infectivas, a través de comida contaminada, por las manos sucias de quien prepara

los alimentos, por moscas (en las que se han encontrado quistes en las heces, vómitos y cuerpos) y por contacto directo con portadores (Brown y Neva, 1983). Un individuo infectado puede excretar más de 45 millones de quistes por día (Ravdin y Guerrant, 1982).

La amibiasis intestinal puede cursar con diarrea de gravedad variable (que puede llegar a producir la muerte), alternando con períodos de constipación y puede ser acompañada de cólicos, meteorismo y en ocasiones mareos y vómitos. En la infección se pueden producir pequeñas úlceras en la mucosa del colon, que algunas veces sanan espontáneamente, pero en otros casos llegan a confluir y perforar las capas más profundas (Fig. 4).

La amibiasis extraintestinal es la invasión de tejidos no intestinales por los trofozoítos y ocurre secundariamente a la ulceración intestinal. La diseminación de los trofozoítos es generalmente por vía sanguínea; el órgano más comúnmente afectado es el hígado, debido a que recibe la sangre colectada del intestino por las venas mesentéricas que confluyen en la vena porta que desemboca en el hígado. La infección hepática produce múltiples zonas de necrosis que al confluír forman los mal llamados abscesos. El tamaño de las lesiones varía desde puntos del tamaño de cabezas de alfiler, hasta abscesos únicos que abarcan casi el 90% del hígado. Aunque con baja frecuencia, la amibiasis hepática puede diseminarse a otros órganos como los pulmones y el

Fig. 4. Amibiasis, curso de la infección (Tomado de Brown y Neva, 1983).



cerebro ya sea por extensión directa a través del diafragma en la infección pulmonar, o por vía hematológica en la infección cerebral (Brown y Neva, 1983).

Pueden ocurrir con menos frecuencia lesiones cutáneas, abscesos anorrectales y ulceraciones genitales (Fig. 5).

D. Amibiasis

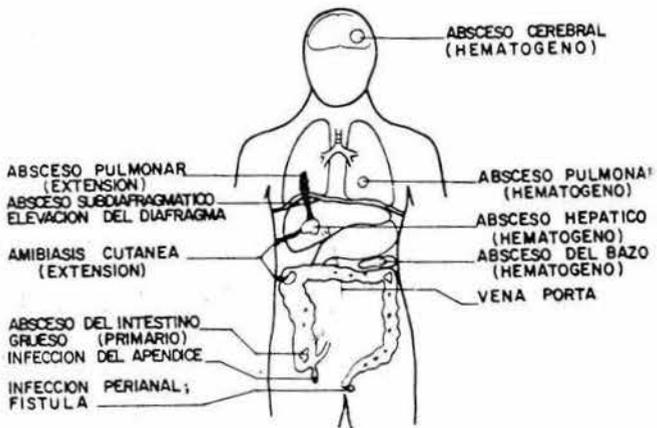
1. Inmunidad

La exposición de los organismos a sustancias que les son ajenas (antígenos) generalmente resulta en la activación de uno o más de los mecanismos de defensa basados en el sistema inmune (Benacerraf y Unanue, 1979). Por lo tanto, es de esperar que la infección intestinal o extraintestinal por E. histolytica induzca una respuesta inmune.

Los estudios en este campo usando animales como modelos de infección han dado evidencia de que sí hay respuesta inmune en la amibiasis. Sin embargo, este tipo de estudios no ha podido aclarar la respuesta inmune por completo ya que se ha estudiado principalmente la amibiasis extraintestinal caracterizada por respuestas inmunes sistémicas, pero la inmunidad local y celular han sido poco estudiadas (Trissl, 1982).

El cultivo de E. histolytica en medio axénico ha permitido separar los antígenos amibianos y estudiar sus

Fig. 5. Amibiasis, sitios de lesión (Tomado de Brown y Neva, 1933).



características inmunogénicas. Estos antígenos son usados como células enteras o como homogenados, en forma soluble, o como fracciones particuladas para inducir la respuesta inmune experimentalmente (Trissl, 1982).

Los antígenos de la superficie del parásito han sido evidenciados por varios métodos: por la inmovilización de trofozoítos con suero inmune, por inmunofluorescencia, por aglutinación y por la lisis de las amibas mediada por anticuerpos y complemento (Trissl, 1982).

Los antígenos de superficie de la amiba contienen carbohidratos capaces de unirse a concanavalina A. El papel de estos antígenos en la respuesta inmune todavía no se ha aclarado, debido a la gran capacidad de recambio de la membrana por el trofozoíto. Por diversos estudios se han identificado numerosos antígenos precipitables de E. histolytica que contribuyen a la respuesta inmune del huésped (Trissl, 1982).

a. Inmunidad humoral

La reacción inmune humoral se ha identificado por la presencia de anticuerpos específicos circulantes a las dos semanas de la infección amibiana, principalmente IgG de la subclase 2 (Sepúlveda, 1982).

La caracterización de la respuesta humoral y la identificación de anticuerpos circulantes específicos tiene

dos aplicaciones prácticas: el diagnóstico de la amibiasis invasora y la seroepidemiología de la infección amibiana. Los anticuerpos específicos se han encontrado en más del 90% de los pacientes que sufren absceso hepático amibiano o formas severas de amibiasis (Sepúlveda, 1982).

Los anticuerpos son producidos regularmente en la amibiasis sintomática pero son también frecuentes en la amibiasis asintomática. La amibiasis invasora provoca títulos mucho más altos que la amibiasis no invasora. Estos títulos altos tienden a bajar, pero persisten títulos relativamente bajos por meses o años, lo que lleva a falsos positivos en estudios hechos sobre todo en zonas endémicas debido a la alta incidencia de la enfermedad y al número considerable de portadores asintomáticos (Trissl, 1982).

Otro factor que contribuye a la defensa local contra E. histolytica es la secreción intestinal de inmunoglobulina A, o IgA (Sepúlveda, 1982). Estos coproanticuerpos, en contraste con los anticuerpos séricos, persisten solamente por un corto tiempo. La IgA inhibe la absorción intestinal de antígenos y juega un importante papel en la defensa local contra enterobacterias, particularmente Vibrio cholerae y Escherichia coli enterotoxigénica. Además, han sido encontrados coproanticuerpos en el 80% de los pacientes con amibiasis intestinal (Muñoz-Espinoza y col., 1986).

Existen informes contradictorios sobre la determinación de IgM específica durante la enfermedad amibiana. Los

estudios más recientes sugieren que la presencia simultánea de IgG e IgM específicas denotan infección reciente y activa de absceso hepático, mientras que la presencia de IgG específica con IgM negativa sugiere ausencia de infección activa (Muñoz-Espinoza y col., 1986).

E. histolytica es capaz de activar tanto la vía clásica como la vía alterna del sistema del complemento en presencia o ausencia de anticuerpos, siendo mayor la activación por la vía clásica (Ortiz-Ortiz y col., 1978; Calderón y Schreiber, 1985; Meri y col., 1985). La activación del complemento provoca la lisis de los trofozoítos *in vitro*. En la amibiasis invasora los niveles del complemento o sus componentes están disminuídos desde antes de la infección, lo que permitiría que ocurriera la invasión tisular. Se ha encontrado que los niveles de C3d, producto de la activación del complemento, tienen una correlación directa con la evolución del padecimiento, siendo más rápida y adecuada la recuperación de los pacientes con niveles altos de C3d (Muñoz-Espinoza y col., 1986). La liberación de los productos quimiotácticos del complemento podría inducir la migración de células fagocíticas al sitio de activación por el parásito, produciendo de esta manera la infiltración de células polimorfonucleares y macrófagos en las reacciones inflamatorias de las lesiones (Calderón y Tovar-Gallegos, 1980).

In vitro, las cepas más virulentas del parásito pueden

llegar a tener resistencia a la lisis por complemento activado por las dos vías, lo que puede explicar en parte su capacidad de evadir la acción del complemento (Calderón y Tovar-Gallegos, 1980).

b. Inmunidad celular

Una gran proporción de pacientes con absceso hepático amibiano activo no dan una respuesta cutánea positiva a preparaciones antigénicas estandarizadas de E. histolytica. El número de células T circulantes, medido por la técnica de rosetas resultó normal en estos pacientes. Durante la fase inicial del absceso hepático los pacientes sí dieron reacción positiva. Las reacciones cutáneas fueron positivas en la mayoría de los pacientes un mes después de la convalecencia clínica (Diamanstein y col., 1980).

La tasa de transformación de los linfocitos inducida por concanavalina A en pacientes con absceso hepático no dio diferencias significativas con los individuos normales aunque los valores fueron ligeramente bajos en el primer grupo (Diamanstein y col., 1980).

En general la prueba del MIF dio resultados similares a los obtenidos con la prueba cutánea en los casos de amibiasis invasora en humanos. Los resultados fueron generalmente negativos durante las fases iniciales de la infección hepática y positivos después del tratamiento del

absceso hepático. Se han encontrado anticuerpos específicos en el comienzo y durante estados subsecuentes de la enfermedad en pacientes con reacciones intradérmicas y MIF. En amibiasis experimental, la respuesta inmune celular se encontró también durante las fases iniciales del absceso hepático inducido. En tales condiciones, las reacciones serológicas fueron positivas (Diamanstein y col., 1980).

Se ha demostrado que la administración de drogas inmunosupresoras favorece el desarrollo de absceso hepático inducido en hamsteres. Además, sólo el ratón inmunosuprimido con suero antilinfocítico desarrollo lesiones después de la inoculación intracecal con amibas virulentas. Por otro lado, extractos acuosos de E. histolytica o fracciones antigénicas, indujeron la transformación blastogénica de linfocitos en pacientes con absceso hepático, sugiriendo la sensibilización de linfocitos T por antígenos amibianos. Diamanstein y col. (1980) han reportado la actividad mitogénica de extractos de E. histolytica en linfocitos murinos.

Al igual que con los linfocitos, la inoculación de hamsteres con suero de conejo anti-macrofagos antes de la inoculación intrahepática de trofozoítos produce un aumento en el número y tamaño de los abscesos hepáticos secundarios (Ghadirian y col., 1983). También se ha observado una disminución en la fagocitosis de bacterias por monocitos de hamsteres con absceso hepático (Capin y col., 1980).

Se ha sugerido que hay al menos un factor quimiotáctico para monocitos humanos en los sobrenadantes de cultivos axénicos de E. histolytica y se ha descrito la producción por los trofozoítos de inhibidores de la migración de los monocitos (Kretschmer y col., 1986).

Los leucocitos polimorfonucleares parecen ser el primer tipo celular que se encuentra en las reacciones inflamatorias durante las etapas tempranas de la formación de abscesos hepáticos en hamsteres y cobayos (Canales y col., 1986). Posiblemente esta infiltración se debe a los factores quimiotácticos liberados por la activación del complemento (Quezada-Cavillo, 1987).

Los polimorfonucleares pueden lisar a los trofozoítos de E. histolytica si la relación amibas-polimorfonucleares es apropiada. Esta capacidad lítica de los polimorfonucleares no requiere suero inmune, sino más bien depende de la cepa amibiana (Guerrant y col., 1981; López-Osuna y col., 1986).

Otro factor que ha sido estudiado es la liberación de histamina, que tiene un importante papel regulador de la respuesta inflamatoria. Se ha encontrado que la liberación de histamina por leucocitos de pacientes con absceso hepático es estimulada con extractos de trofozoítos y ocurre con dosis menores de extractos que en los leucocitos de sujetos sanos. Por lo tanto, hay hipersensibilidad inmediata en los pacientes con amibiasis invasora, lo cual podría

contribuir a la modulación de la respuesta inflamatoria (Gil-Recasens y col., 1982). La liberación de histamina inhibe en los polimorfonucleares la quimiotaxis, la fagocitosis y la secreción de enzimas así como la producción de linfocinas por células T y la secreción de anticuerpos antiambianos específicos (Campos-Rodríguez y col., 1986).

2. Epidemiología

La infección causada por E. histolytica ocurre en todo el mundo. No es una parasitosis exclusivamente tropical porque ha sido encontrada en todos los climas incluyendo las zonas subpolares (Sepúlveda, 1982).

La infección por E. histolytica es muy común, pero la alta incidencia endémica es usualmente encontrada en comunidades pobres con saneamiento inadecuado. Muchos de los individuos son portadores sanos del protozoario como comensal ya que en ellos E. histolytica no induce signos o síntomas; pero como patógeno causa la amibiasis invasora, la cual varía en prevalencia de lugar en lugar (Martínez-Palomo, 1986).

Se consideran altas zonas endémicas de amibiasis a México, India, el Medio Oriente y Sudamérica (Ravdin y Guerrant, 1982).

La incidencia global de la infección por E. histolytica en el mundo ha sido estimada como de 12%. La prevención de

las epidemias es difícil debido a la resistencia de los quistes, que pueden ser eliminados por filtración del agua pero no se mueren con el cloro que se agrega normalmente al agua potable (Martínez-Palomo, 1986).

El modo de transmisión más común es por alimentos y de persona a persona, sobre todo si quien prepara los alimentos no tiene la precaución de lavarse las manos después de defecar. Existe también el problema del riego de hortalizas con aguas negras, lo que contribuye a que la infección se incremente. Otros posibles medios de contaminación son las cucarachas y las moscas que acarrean en sus cuerpos los quistes que adquieren directamente de las heces y luego depositan sobre los alimentos. En este aspecto el fecalismo es otro factor que agrava el problema. La infección amibiana se encuentra frecuentemente en instituciones mentales, militares, etc. La amibiasis puede ser transmitida sexualmente, especialmente entre homosexuales (Martínez-Palomo, 1986)

En México la amibiasis es tan frecuente que constituye un importante problema de salud pública. La infección se encuentra extendida en todo el país pero sin relación con el clima, sin una clara variación estacional y predomina en zonas mal saneadas donde hay hacinamiento, y en grupos de bajo nivel socioeconómico y baja escolaridad (Gutiérrez, 1986).

Al respecto, los problemas que existen en México son

fundamentalmente de tipo ambiental y específicamente la forma de abastecimiento de agua potable (la cual es deficiente en algunas zonas), la eliminación de las excretas y basura y la higiene personal y de alimentos (Gutiérrez, 1986).

Se estima que en México hay un paciente con amibiasis invasora por cada cinco o seis portadores asintomáticos. La diarrea y la disentería amibiana son más frecuentes en niños que en adultos (Sepúlveda, 1982).

La frecuencia de la amibiasis en México no se ha precisado bien por razones que se enumeran a continuación. Las encuestas que se han realizado en muestras de población no son representativas de la población general ni comparables entre sí. Hay errores frecuentes en la identificación de los quistes por mala capacitación técnica del personal y la utilización de técnicas parasitológicas con sensibilidad diversa. Por otra parte, los estudios realizados no han resuelto una serie de problemas que plantean los portadores de quistes, tales como la duración natural del estado del portador y la posibilidad de convertirse en enfermo; el riesgo que representa para sus contactos intrafamiliares y para la comunidad, y la necesidad o la futilidad de administrar fármacos para su tratamiento (Gutiérrez, 1986).

En un estudio de 439 casos de disentería en niños de la ciudad de México, se encontró que el 47% era causado por

amibas; el 46% tenía desnutrición severa y sólo el 5.5% de los niños estaba bien alimentado. En una serie de 1153 niños con diarrea en dos hospitales pediátricos en México, el 2.2% tenía amibiasis. La incidencia de amibiasis intestinal en niños de 1-4 años es del 45%. En estudios hechos en pacientes con diarrea o disentería se diagnóstico amibiasis en el 13.8% (Martínez-Palomo, 1986). Las formas severas de amibiasis son 10 veces más frecuentes que el absceso hepático amibiano (Gutiérrez, 1986). Los estudios más recientes hechos en México acerca de la incidencia del absceso hepático revelaron que es muy alta y se ha encontrado en el 2% de todos los adultos de clase humilde. Los abscesos hepáticos son tres veces mas frecuentes en hombres de 20 a 40 años de edad que en mujeres de las mismas edades. Durante el siglo pasado, cuando la quimioterapia no era aún accesible, la mortalidad por absceso hepático era del 80%. Aunque estos indices han bajado ultimamente por los avances en el diagnóstico y tratamiento, la malnutrición, particularmente en niños es un factor que contribuye al incremento de la mortalidad.

3. Tratamiento y prevención

El tratamiento de la enfermedad producida por E. histolytica es usualmente farmacológico, aunque en algunas circunstancias se recurre a métodos quirúrgicos para salvar

la vida del paciente.

Los agentes amebicidas han sido clasificados según su sitio de acción. Para la amibiasis intestinal: metronidazol, iodoquinol, fumarato de diloxamida y sulfato de paromomicina. Para la extraintestinal: metronidazol, clorhidrato de emetina, dihidroemetina y fosfato de cloroquina (Martínez-Palomo, 1986).

El efecto de la quimioterapia en la amibiasis intestinal incluye: 1) el alivio del ataque agudo, 2) la destrucción de los trofozoítos en la luz intestinal y 3) el control de la infección bacteriana secundaria (Brown y Neva, 1983).

La infección puede ser prevenida y controlada por medidas inespecíficas de largo plazo como el suministro de agua potable, prácticas higiénicas personales más cuidadosas y desarrollo social y económico general. Las medidas específicas incluyen estudios de la comunidad con vigilancia de las condiciones locales con respecto a la amibiasis, diagnóstico rápido y tratamiento adecuado de los pacientes con amibiasis invasora en los servicios de salud, desde los centros locales hasta hospitales grandes; finalmente, la vigilancia y control de las situaciones que podrían favorecer la diseminación de la enfermedad, tales como agua contaminada e insectos (Brown y Neva, 1983).

4. Métodos de diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la amibiasis requiere la diferenciación de otras disenterias y enfermedades intestinales y de abscesos hepáticos de origen bacteriano y hepatitis viral, quiste hidatídico, infecciones de la vejiga y enfermedades pulmonares malignas. El diagnóstico clínico se basa en la historia endémica del área, síntomas y signos gastrointestinales, la exploración física, la sigmoidoscopia y la radiología (Brown y Neva, 1983).

Con la sigmoidoscopia es posible reconocer lesiones petequiales granulares o ulcerativas y puede ser suplementada por el examen microscópico de especímenes aspirados. La radiografía es usada en la detección de irregularidades o áreas localizadas en colitis, deformaciones cecales y amebomas en la amibiasis intestinal, así como anomalías definidas en el diafragma causadas por los abscesos hepáticos y pulmonares (Brown y Neva, 1983).

En la época actual, el problema fundamental consiste en el diagnóstico de la amibiasis de manera errónea en un número elevado de casos. Esto se debe tanto a la imposibilidad de practicar exámenes de laboratorio en todos los pacientes en los que se sospecha la amibiasis, como a la mala calidad de dichos exámenes. En estas circunstancias, se tiende a diagnosticar amibiasis en una proporción muy elevada de casos de disentería o de diarrea con sangre

(Gutiérrez, 1986).

a) Diagnóstico microscópico

El diagnóstico de laboratorio de la amibiasis puede hacerse mediante la identificación del parásito en las heces o tejidos, ya sea por microscopía o por cultivo.

La identificación microscópica depende de la buena recolección del material y su exámen inmediato en frotis o cortes cuidadosamente preparados. No siempre es fácil el diagnóstico; requiere exámenes repetidos, especialmente en los casos crónicos. Puede ser negativo por mala técnica, búsqueda insuficiente, confusión de E. histolytica con otros protozoarios, células o artefactos (Brown y Neva, 1983), o por la confusión de los quistes con los de otras especies. Además, requiere personal técnico con suficiente experiencia, con el que no se cuenta en cantidad suficiente. El resultado negativo no descarta la posibilidad de amibiasis intestinal aguda y extraintestinal, que son las formas clínicas más graves y en las que pueden no existir quistes en las heces (Seehan y col.; 1979 y Lin y col., 1981).

Los principales métodos de diagnóstico microscópico en la amibiasis son cuatro: 1) Exámen de las heces por preparación en fresco (frotis directos) usado en amibiasis aguda con heces líquidas. 2) Tinción con yodo y colorantes

supravitales para examinar quistes, en los que sobresale la cromatina teñida de amarillo y masas de glucógeno de color pardo y con el cual los trofozoítos se destruyen; con colorantes supravitales los quistes aparecen como objetos claros, translúcidos, brillantes, pálidos, color azul-verde contra un fondo rosa. 3) Preparaciones permanentes teñidas con colorantes tricrómicos (técnica de Lawless), o con hematoxilina, que permite diferenciar diversas especies mediante estudio detallado de estructuras; requiere fijación y tinción. Con la tinción de Lawless los trofozoítos y quistes aparecen de color azul o púrpura al igual que con la tinción tricrómica de Wheatley. Con estas técnicas se estudian heces sólidas para el diagnóstico de amibiasis crónica y la búsqueda de portadores. 4) Métodos de concentración (coproparasitoscópicos); por flotación de quistes o huevos, según las diferencias de densidad de ciertas soluciones químicas; es recomendable la flotación inmediata con sulfato de zinc; la sedimentación, que es menos eficaz que la flotación, se recomienda para la concentración de esquistosomas y operculados.

En la amibiasis intestinal los mejores resultados en el diagnóstico se obtienen combinando los métodos descritos (Lynch y col., 1982).

b) Diagnóstico serológico

Los métodos serológicos se basan en la detección inmunoquímica de anticuerpos específicos contra los trofozoítos del parásito (Seehan y col., 1979). En las infecciones extraintestinales, los títulos de anticuerpos antiambianos aumentan considerablemente en el suero y llegan a ser mucho mayores que los que se encuentran en las infecciones intestinales. Por ello los métodos serológicos son fundamentales para la detección de las formas extraintestinales.

Si las enfermedades parasitarias no son detectadas por exámenes parasitológicos, entonces las pruebas serológicas son de gran ayuda en el diagnóstico.

Las pruebas serológicas que más se han empleado en amebiasis son las siguientes seis:

1. La reacción de fijación del complemento (CF): Es la técnica más antigua y generalmente ha sido remplazada por otras técnicas (Kagan y Norman, 1976).
2. Hemaglutinación indirecta (IH): Consiste en la aglutinación (de eritrocitos o esferas de látex recubiertas con antígeno amebiano) por suero sanguíneo que contiene anticuerpos antiambianos presentes en personas infectadas por el parásito. Este método es muy simple, de buena sensibilidad, no requiere equipo especial y toma poco tiempo. Sin embargo, las preparaciones de eritrocitos o

esferas de látex recubiertas con antígeno amibiano no son fáciles de obtener comercialmente, además de que su calidad es variable y su vida media muy corta (Voller y De Savigni, 1981; Pappas y col., 1983; Sanjai y col., 1985). En este método se obtienen gran número de falsos positivos (Martínez-Palomo, 1986).

3. Inmundefusión en geles de agar (IDG): Es un método sencillo que requiere poco equipo y sus resultados pueden ser obtenidos en tiempos relativamente cortos (24 horas). Tiene el inconveniente de que no se dispone comercialmente de preparaciones antigénicas adecuadas de calidad consistente por lo que resulta poco confiable y es poco usado (Juniper y col., 1972 y Sanjai y col., 1985).

4. Inmunofluorescencia indirecta (IFA): Es muy sensible para detectar IgG e IgM específicas contra E. histolytica. Su mayor desventaja es la imposibilidad de su automatización ya que no existe un equipo especial para su realización, depende del manejo de quien lo realiza y es una prueba cara y difícil de realizar en laboratorios sencillos (Martínez-Palomo, 1986).

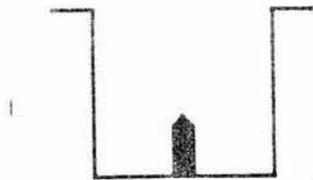
5. Contraimmunoelectroforésis (CIE): Es frecuentemente usada para el diagnóstico serológico de amibiasis en laboratorios bien equipados (Trujillo y col., 1982). Su sensibilidad es

comparable a la IH, pero además de equipo de electroforesis requiere preparaciones atigénicas de calidad consistente y elevada (Pappas y col., 1983). Por ello es adecuada sólo para laboratorios con buenos recursos y acceso a preparaciones antigénicas apropiadas, las cuales son relativamente escasas en México (Juniper, 1972; Sepúlveda y Sanjai, 1985). La CIE es útil para diagnosticar infecciones recientes de amibiasis invasora (Martínez-Palomo, 1986); además, la presencia de niveles de anticuerpos medibles después de la eliminación del parásito ha sugerido que la positividad depende del tipo de anticuerpos presentes y del número de infecciones previas (Krupp y Powell, 1971).

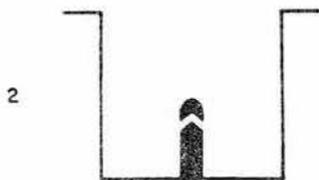
6. Ensayo de inmunoabsorbente conjugado a una enzima (ELISA): Es una prueba que se ha venido desarrollando ultimamente con éxito para el diagnóstico de amibiasis y ha sido usada para la detección de diversos antígenos o anticuerpos. Esta prueba tiene alta sensibilidad, permite detectar IgG e IgM y así diferenciar entre infecciones recientes o pasadas; es técnicamente sencilla y requiere poco tiempo y materiales, pero para realizarla es indispensable el equipo de colorimetría empleado en la lectura de sus resultados (Sanjai y col., 1985).

La prueba de ELISA se lleva a cabo en placas de poliestireno para microtitulación y consiste en las siguientes etapas (Fig. 6):

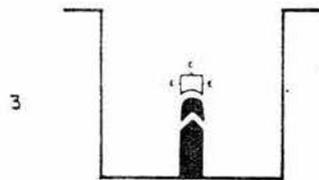
Fig. 6. ELISA (Ensayo de inmunoabsorbente conjugado a una enzima) (Tomado de Voller y col., 1979).



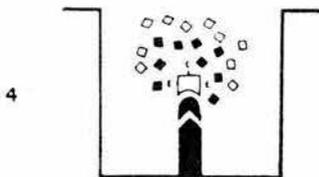
ANTIGENO ADSORBIDO A LA PLACA



EL PRIMER ANTICUERPO UNIDO AL ANTIGENO



EL SEGUNDO ANTICUERPO UNIDO AL PRIMER ANTICUERPO



LOS SUBSTRATOS REACCIONAN CON LA ENZIMA

a) El antígeno (E. histolytica) es adsorbido a los pozos de las placas de microtitulación y se bloquean los sitios que hubieran quedado libres (i.e., no cubiertos de antígeno) con albúmina sérica bovina (BSA) que luego se lava.

b) Se añade el suero a probar en la dilución deseada, el cual es incubado y luego lavado. El primer anticuerpo queda unido a la superficie del antígeno.

c) Un segundo anticuerpo (p. ej. Ig de conejo anti IgG humana) acoplado a peroxidasa es añadido y reconoce al primer anticuerpo. El segundo anticuerpo que no quedo unido se lava.

d) Finalmente se agregan los substratos de la enzima, que reaccionan y desarrollan color cuya intensidad depende de la cantidad de peroxidasa unida indirectamente (Voller y col., 1979).

La técnica es cualitativa por la visualización directa de los resultados, o cuantitativa si se mide con el colorímetro (Martínez-Palomo, 1986).

7. El método dot-ELISA: La técnica de ELISA ha sido adaptada para la detección de anticuerpos séricos contra antígenos de Leishmania donovani inmovilizados en membranas de

nitrocelulosa (Pappas y col., 1983). Dicha adaptación substituye a las placas de microtitulación y al colorímetro especial por membranas de nitrocelulosa como soporte del antígeno del parásito, que permite hacer pruebas individuales o masivas para estudios seroepidemiológicos sin desperdicio de material. Los resultados que se obtienen consisten en precipitados depositados en el fondo blanco de las membranas, generados por productos insolubles de la reacción de las enzimas unidas al segundo anticuerpo (que se asoció antes al primer anticuerpo que reconoce al parásito y cuyo título se desea conocer).

La sensibilidad de la prueba de dot-ELISA para L. donovani es tan alta como la del metodo ELISA original, que detecta 0.1-1 ng de anticuerpos; también es comparable en sensibilidad al radioinmunoensayo. Por otra parte, la estabilidad de las preparaciones antigénicas es mayor, la realización de las pruebas requiere menos equipo, material y tiempo. El papel de nitrocelulosa con el antígeno adsorbido es preservado por tiempo indefinido en recipientes herméticos y las manchas del precipitado permanecen perfectamente visibles.

El método dot-ELISA, por lo tanto, promete ser útil tanto para estudios seroepidemiológicos, como para estudios de diagnóstico individual en los laboratorios clínicos (Krupp, 1977; Hernández y col., 1982; Pappas y col., 1984 y 1985).

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar el método dot-ELISA para el diagnóstico serológico de la amibiasis.

Objetivos particulares:

1. Montar y estandarizar el método dot-ELISA para la detección de anticuerpos anti-E. histolytica en humanos.
2. Comparar la sensibilidad y especificidad del método dot-ELISA con ELISA clásico.

III. MATERIALES

A. Reactivos

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de JT Baker de México: fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, ácido clorhídrico, cloruro de sodio, hidroxido de sodio, ácido acético, azida de sodio, hidroxido de potasio, ácido fosfórico, metanol, acetona, alcohol isopropílico, urea, etilen-diamino-tetracetato disódico (EDTA), glicerol, trietanolamina (9468) y NaN_3 (5-VO 22).

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO., EUA): agarosa tipo II (A-6877), azul brillante de Coomassie R (B-0630), azul de bromofenol (B-6131), albúmina sérica bovina (BSA) fracción V (A-4503), trizma base (T-1503), L-fenilalanina (P-2126), glicina (G-7126), Sepharose 4B 200 (24F-0334), L-lisina (L-55011), Sephadex G-200, N N N' N'-tetrametiletildiamina (TEMED) (T-8133), persulfato de amonio (S-0626), peroxidasa de rábano tipo IV (P 8250), 4-Cloro 1-Naftol (C-8890), Tritón X-100 (T-66-78).

El sulfato de amonio provenia de Merck (México); los adyuvantes completo e incompleto de Freund fueron de Difco Laboratories (Detroit, Mich, EUA); DEAE-celulosa (7392),

acrilamida (1153) y N'N'-metilen-bis-acrilamida de Eastman Kodak Co. (Rochester, NY, EUA); persulfato de amonio (161-0700) y dodecil-sulfato de sodio (SDS), de BDH Chemicals Ltd. (Poole, Inglaterra); papel filtro No. 1 de Whatman (Nueva Jersey, EUA); membranas de diálisis Spectrapore de Spectrum Medical Industries, Inc. (Los Angeles, Cal., EUA); glutaraldehído de Merck de México; y el papel de nitrocelulosa BA 85 (Mod D-3354) de 102 X 133 mm y 0.45 μ m de poro, de Schleicher & Schuell Inc. Alemania Federal.

B. Composición y preparación de soluciones

1. Amortiguadores para la cromatografía en L-fenilalanina-Sepharose

a) Tris-base 1 M. Se disolvieron 12.1 g de trizma-base en 100 ml de agua bidestilada.

b) Sulfato de amonio 2.5 M. Se disolvieron 82.5 g de sulfato de amonio en 250 ml de agua bidestilada.

c) Tris-acetatos 0.04 M, pH 7.6 con sulfato de amonio 1 M. Se mezclaron 10 ml de Tris 1 M y 100 ml de sulfato de amonio 2.5 M en 200 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.6 con ácido acético y se aforó a 250 ml.

d) Tris-acetatos 0.032 M, pH 7.6 con sulfato de amonio 0.8 M. Se mezclaron 8 ml de Tris 1 M y 80 ml de sulfato de amonio 2.5 M en 200 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.6 con ácido acético y se aforó a 250 ml.

e) Tris-acetatos 0.024 M, pH 7.6 con sulfato de amonio 0.6 M. Se mezclaron 6 ml de Tris 1 M y 60 ml de sulfato de amonio 2.5 M en 200 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.6 y se aforó a 250 ml.

f) Tris-acetatos 0.05 M, pH 8 con NaCl 0.25 M. Se disolvieron 125 ml de tris base y 3.66 g de NaCl en 200 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 8 con ácido acético y se aforó a 250 ml.

g) Tris-base 0.25 M, pH 10.5. Se disolvieron 62.5 ml de Tris 1 M en 200 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 10.5 y se aforó a 250 ml.

h) Tris-acetatos 0.04 M, pH 8 con sulfato de amonio 2.5 M. Se mezclaron 2 ml de Tris 1 M y 16.5 g de sulfato de amonio en 40 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 8 y se aforó a 50 ml.

2. Amortiguadores para la cromatografía en DEAE-celulosa

a) PBS 0.015 M, pH 8. Se mezclaron 1.05 ml de KH_2PO_4 1 M y 6.45 ml de K_2HPO_4 1 M en 400 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 8 y se aforó a 500 ml.

b) PBS 0.3 M, pH 4.8. Se disolvieron 5.2 ml de H_2PO_4 en 150 ml de agua bidestilada dentro de la campana extractora, se ajustó el pH a 4.8 con hidróxido de potasio 5 N y se aforó a 250 ml.

3. Amortiguadores y soluciones para el PAGE-SDS

Soluciones para los geles y las cámaras electroforéticas:

a) Acrilamida-Bis. Se pesó la acrilamida (30.0 g) y la bisacrilamida (0.4 g) usando cubrebocas debido a su toxicidad. Se disolvieron en 70 ml de agua, se filtró con papel Whatman No. 1 y se aforó a 100 ml. Se guardó la solución en una botella de polipropileno cubierta con papel aluminio y se almacenó a 4°C.

b) Tris-HCl 1 M, pH 8.8-9.0. Se disolvió el Tris (36.3 g) con 30 ml de agua, se añadió el EDTA 0.2 M, pH 8 (5.3 ml) y el glicerol al 50% (10 ml) y se ajustó el pH con HCl 1 N (aprox. 40 ml). Se aforó la solución a 100 ml, se colocó en una botella de polipropileno y se almacenó a 4°C.

c) Tris-HCl 0.49 M, pH 6.8. Se disolvió el Tris (5.98 g) con 30 ml de agua, se añadió el EDTA 0.2 M, pH 8 (4 ml), se ajustó el pH con HCl 5 N (aprox. 6 ml) y se aforó a 100 ml. Se guardó la solución en una botella de polipropileno y se almacenó a 4°C.

d) SDS al 10%. Se disolvieron 10 g de SDS (pureza electroforética) en 70 ml de agua y se aforó a 100 ml con cuidado de no hacer espuma. Se guardó la solución a temperatura ambiente en una botella lechera.

e) TEMED. Se distribuyeron muestras de 0.1 ml en tubos Eppendorf de 0.5 ml. Se cerraron perfectamente, se sellaron con parafilm y se almacenaron a 4°C.

f) Persulfato de amonio (PA) al 10%. Se colocaron muestras de 0.1 g de PA en tubos Eppendorf de 1.5 ml que se taparon y se almacenaron en un desecador con sílica a 4°C. Se disolvió cada muestra con 1 ml de agua inmediatamente antes de usar la solución (El PA se inactiva rápidamente una vez disuelto o húmedo).

g) Amortiguador de corrida 10X, pH 8.3. Se mezclaron Tris base (30 g) y glicina (144 g) con 100 ml de la solución d, 500 ml de agua y 40 ml de EDTA 0.2 M, pH 8, se ajustó el pH

a 8.3 y se aforó 1000 ml. Se guardó la solución en una botella de polipropileno a temperatura ambiente.

Soluciones para preparar las muestras y teñir los geles:

a) Azul de bromofenol al 0.2%. Se disolvieron 0.020 g de azul de bromofenol con 10 ml de agua y la solución se guardó en un tubo Pyrex de 10 X 125 ml (con tapón de rosca) a -20°C.

b) Amortiguador de muestras 2X. Se mezclaron 5 ml de Tris HCl 0.49 M, pH 6.8, 2 ml de SDS al 10%, 2 ml de glicerol al 50%, 0.5 ml de azul de bromofenol al 0.2% y 0.9 ml de agua. Se distribuyó en muestras de 1 ml en tubos Eppendorf y se almacenaron a -20°C.

c) Colorante de Fairbanks. Se mezclaron 225 ml de alcohol isopropílico, 50 ml de ácido acético glacial y 25 g de azul brillante de Coomassie R con 300 ml de agua y se aforó a 500 ml, se filtró a través de papel Whatman No. 1 y se guardó la solución a temperatura ambiente en una botella de polipropileno.

d) Solución desteñidora rápida. Se mezclaron 50 ml de ácido acético glacial y 225 ml de alcohol isopropílico con 200 ml de agua y se aforaron a 500 ml. Se guardó la solución a

temperatura ambiente en una botella de polipropileno.

e) Acido acético al 7.5%. Se mezclaron, en la campana extractora, 37.5 ml de ácido acético con 300 ml de agua y se aforó a 500 ml. Se guardó la solución a temperatura ambiente en una botella de polipropileno.

Soluciones y reactivos de uso general:

a) HCl 5 N. En la campana extractora se añadieron 42 ml de HCl concentrado a un matríz que contenía 40 ml de agua y se aforó a 100 ml.

b) Glicerol al 50%. Se mezclaron 50 ml de glicerol y 50 ml de agua y se almacenó la solución en una botella lechera a temperatura ambiente.

c) EDTA al 1%. Se disolvieron 74 g de EDTA con 70 ml de agua, se ajustó el pH a 8 con HCl 1 N y se aforó a 100 ml. Se guardó la solución en una botella lechera.

d) Agar al 1%. Se añadió 1 g de bacto agar a 70 ml de Tris-HCl 3 M, pH 8.8-9.0, se fundió en el horno de microondas y se aforó a 100 ml con el mismo amortiguador. Se guardó a temperatura ambiente en un frasco de vidrio.

e) Preparación del reactivo de Bradford. Se disuelven 100 mg de azul de Coomassie R, 50 ml de alcohol etílico, 100 ml de ácido fosfórico y agua bidestilada hasta completar 1000 ml. La mezcla se filtró a través de papel Whatman No. 1.

4. Soluciones para la titulación de los antisueros

a) Tris-HCl 15 mM, pH 8. Se pesaron 0.181 g de Tris base y se disolvieron en 60 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 8 con HCl 1 N y se aforó a 100 ml.

b) PBS 15 mM, pH 8. Se disolvieron 2.58 ml de K_2HPO_4 y 0.42 ml de KH_2PO_4 en 100 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 8 y se aforó a 200 ml.

c) NaCl 0.1 M. Se disolvieron 2.9 g de NaCl en 500 ml de agua bidestilada.

d) Azul de Coomassie al 0.5% y ácido acético al 7%. Los mismos que se usaron en la tinción de geles de poliacrilamida.

5. Amortiguadores para el acoplamiento de IgGH a Sepharose 4B

a) HCl 1 mM. Se agregaron 0.10 ml de HCl 1 N a 100 ml de

agua bidestilada y se aforó a 250 ml.

b) NaHCO₃ 0.1 M con NaCl 0.5 M, pH 8.3. Se disolvieron 1.46 g de NaCl y 0.37 g de NaHCO₃ en 40 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 8.6 con NaOH 1 N y se aforó a 50 ml.

c) Tris-glicina 0.1 M, pH 8.6. Se mezclaron 3.75 g de glicina y 25 ml de Tris base 1 M en 40 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 8.6 con NaOH 1 N y se aforó a 50 ml.

d) Acetatos 0.1 M, pH 4. Se disolvieron 25 ml de ácido acético 1 M y 7.31 g de NaCl en 200 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 4 y se aforó a 250 ml.

e) Tris-HCl 0.1 M con NaCl 0.5 M, pH 8. Se disolvieron 7.31 g de NaCl y 25 ml de Tris base 1 M en 250 ml de agua bidestilada.

f) PBS 15 mM con NaCl 0.5 M, pH 7.4. Se disolvieron 2.28 ml de K₂HPO₄ 1 M y 1.46 ml de KH₂PO₄ 1 M y 2.19 g de NaCl en 200 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 1 N y se aforó a 250 ml.

6. Amortiguadores para la purificación de IgG α IgGH, mediante cromatografía de afinidad

a) PBS 0.015 M con NaCl 0.15 M, pH 7.4. Se disolvieron 2.28 ml de K_2HPO_4 1 M con 1.46 ml de KH_2PO_4 1 M y 2.19 g de NaCl en 200 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.4 con KOH 1 N y se aforó a 250 ml.

b) Glicina-HCl 0.1 M, pH 2.8. Se disolvieron 1.87 g de glicina en 200 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 2.8 con HCl 1 N y se aforó a 250 ml.

7. Amortiguadores para la inmunoelectroforésis en geles de agarosa

a) Tris-HCl 15 mM, pH 8. Se disolvieron 2.71 g de Tris 1 M en 1000 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 8 con HCl y se aforó a 1500 ml.

b) Azul de bromofenol al 1% en tris-HCl 15 mM, pH 8. Se peso un gramo de azul de bromofenol y se disolvió en 100 ml de tris-HCl 15 mM, pH 8.

8. Preparación de soluciones para el acoplamiento de la peroxidasa (HRP) con glutaraldehído

a) PBS 0.1 M, pH 8.6 con glutaraldehído al 1.25%. Se mezclaron 4.32 ml de KH_2PO_4 1 M 0.67 ml de K_2HPO_4 en

40 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 8.6 y se agregaron 2.5 ml de glutaraldehído al 25% en la campana extractora y se aforó a 50 ml.

b) NaCl 0.15 M, pH 7.0. Se disolvieron 17.53 g de NaCl en 2000 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 9.5 y se aforó a 50 ml.

c) Amortiguador de carbonato-bicarbonato 1 M, pH 9.5. Se mezclaron 2.1 g de NaHCO_3 y 2.65 g de Na_2CO_3 en 40 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 9.5 y se aforó a 50 ml.

d) L-lisina 0.2 M, pH 7.0. Se disolvieron 1.42 g de L-lisina en 40 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.0 y se aforó a 50 ml.

9. Soluciones para la adsorción del primer anticuerpo a membranas de nitrocelulosa

a) Amortiguador de muestras [KCl 120 mM/NaCl 20 mM/NaHCO₃ 2 mM/MgCl₂ 2 mM/Tris 5 mM, pH 7.4/Triton X-100 al 0.7% (vol/vol)]. Se mezclaron los siguientes componentes: 2.23 g de KCl, 0.29 g de NaCl, 0.04 g de NaHCO_3 , 0.10 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.25 ml de Tris base en 200 ml de agua bidestilada y se ajustó el pH a 7.4.

b) Solución fijadora. Se mezclaron 10 ml de ácido acético, 25 ml de isopropanol y se aforó a 100 ml con agua bidestilada.

c) Tris-salino, pH 7.4. Se mezclaron 5.84 g de NaCl y 25 ml de Tris base 1 M en 450 ml de agua bidestilada, se ajustó a pH 7.4 con HCl 1 N y la solución se aforó a 500 ml con agua bidestilada.

d) Solución bloqueadora. Se disolvieron 2.5 g de BSA en 50 ml de Tris-salino, pH 7.4.

e) PBS 0.015 M, pH 7.4. Se mezclaron 3.25 g de NaCl, 1.4 g de K_2HPO_4 en 400 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH con NaOH 1 N y se aforó a 500 ml con agua bidestilada.

10. Soluciones para la determinación de las condiciones de reacción de la peroxidasa (HRP)

a) Solución A. Amortiguador de trietanolamina (TEA) salino, pH 7.5. Se disolvieron 1.875 g de NaCl, 700 μ l de TEA, 25 mg de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 200 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.5 y se aforó a 250 ml.

b) Solución B. 4-Cloro-1-Naftol (4-Cl-1-N). Se mezclaron 30 mg de 4-Cl-1-N en 10 ml de etanol y se almacenó enseguida a

4°C en un frasco ámbar.

c) Mezcla de reacción (MR). Se mezclaron 8 ml de la solución A, 4 ml de la solución B y 8 µl de H₂O₂ (al 30%), se ajustó el pH a 7.3-7.4 y se almacenó a 4°C en un frasco ámbar. La mezcla debe prepararse antes de usarse; no se debe almacenar.

11. Soluciones para la cosecha y fijación de amibas

a) Medio TYI. Se mezclaron los sig. componentes en 100 ml de agua caliente (60°): 9.15 g de Peptona Biotriptasa, 2.85 g de Glucosa, 0.55 g de NaCl, 0.30g g de L-Cisteína, 0.06 g de Ac. Ascórbico, 0.18 g de KH₂PO₄, 0.30 g de K₂HPO₄ y 0.007 g de Citrato Férrico Amoniacal. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N, se aforó a 250 ml, se distribuyó en alícuotas de 11 ml, se esterilizó a 15-20 lbs/pulg² por 15 min y se almacenó en la obscuridad a temperatura ambiente.

b) NaCl 0.1-Glicina 0.1 M, pH 7.4. Se disolvieron 1.87 g de Glicina y 1.46 g de NaCl en 200 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.4 y se aforo a 250 ml.

c) Tris-salino con NaN₃ al 0.2% (TBS). Se disolvieron 5.84 g de NaCl, 25 ml de Tris base en 250 ml de agua bidestilada y 0.2 ml de azida de sodio, se ajustó el pH a 7.4 y se aforó

a) 500 ml.

d) BSA al 5% en TBS. Se disolvieron 1.5 g de BSA en 30 ml de agua bidestilada.

12. Soluciones para el dot-ELISA

a) BSA al 1% en TBS. Se disolvió 1 ml de BSA al 5% en 4 ml de TBS.

b) TBS. Como se describió antes.

c) Mezcla de reacción (MR) diluída 1:8 en TEA-salino. Como se describió antes.

C. Material biológico

Se utilizaron antisueros dirigidos contra fracciones del suero humano normal enriquecidas en IgA e IgG, que fueron obtenidas previamente en nuestro laboratorio por el M en C Roberto Quezada-Calvillo. Tres conejos Nueva Zelanda jóvenes para la inmunización con IgGH. Cuatro sueros de pacientes con absceso hepático amibiano en curso y cuatro sueros de pacientes sin infección previa, gentilmente donados por la Dra. Yolanda López Vidal del Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición.

IV. METODOS

A. Purificación de IgG sérica humana (IgGH)

1. Obtención del suero

La IgG se obtuvo a partir del suero humano normal (SHN) obtenido de sangre venosa que se colocó en tubos Falcon cónicos de 50 ml sin anticoagulante. La sangre se dejó coagular durante 24 horas a 4°C; al cabo de este tiempo se desprendió el coágulo de las paredes del tubo con una varilla de vidrio delgada y se centrifugó en una centrífuga clínica refrigerada IEC-5000 (cabezal No. 269) por 15 min a 2500 rpm. El suero sobrenadante se retiró cuidadosamente con una pipeta Pasteur y se almacenó a -20°C en tubos Falcon cónicos de 50 ml con tapón de rosca hasta el momento de ser usado.

2. Corte con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M

Para eliminar las proteínas no deseadas del SHN se usó una solución de Tris-acetato 0.04 M pH 8 adicionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 M. Se mezclaron 6 ml de suero con 4 ml de dicha solución (concentración final de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5

M). La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente y se centrifugó 2 veces 10 min a 15600 X g en una microcentrífuga Eppendorf-5412 en tubos de 1.5 ml. El sobrenadante se colectó y se guardó a -20°C hasta el momento de ser usado.

3. Cromatografía en L-Fenilalanina Sepharose

Para purificar la IgG sérica, el sobrenadante de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M se sujetó a cromatografía en una columna de L-Fenilalanina Sepharose 4B de 16 ml de lecho, previamente equilibrada con Tris-acetatos 0.04 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M, pH 7.6 (Doellegast y Plaut, 1976). Se depositaron aproximadamente 10 ml de la muestra en el lecho de la columna que fue eluída (a 30 ml por hora mediante una bomba peristáltica Buchler) con el amortiguador que se usó para equilibrarla. Las fracciones se colectaron en tubos de ensayo de vidrio de 10 X 100 mm mediante el colector de fracciones Ultra-Rac-7000. Se registró la densidad óptica a 280 nm de las fracciones eluídas con un registrador Uvicord II-8300.

Se continuó eluyendo la proteína con los siguientes amortiguadores sucesivos: 1) Tris-acetatos 0.032 M, pH 7.6 con sulfato de amonio 0.8 M, 2) Tris-acetatos 0.024 M, pH 7.6 con sulfato de amonio 0.6 M, 3) Tris-acetatos 0.5 M, pH 8.0 con NaCl 0.25 M y 4) Tris 0.25 M, pH 10.5. La IgG se obtuvo en las fracciones eluídas con el tercer amortiguador.

4. Diálisis y liofilización

Las fracciones con IgG eluidas con el tercer amortiguador del párrafo anterior se reunieron y se dializaron contra cuatro litros de agua bidestilada durante 48 horas a 4°C empleando bolsas de diálisis de 25 mm de diámetro; el dializado se congeló por inmersión del recipiente que lo contenía en una mezcla de acetona-etanol (1:1) con hielo seco y luego se desecó por liofilización durante 8 horas. El material liofilizado se resuspendió en 5 ml de amortiguador de fosfatos 15 mM, pH 8 y se almacenó en un vial de plástico con tapón de rosca a -20°C para luego ser sometido a cromatografía en DEAE-celulosa.

5. Cromatografía en dietil-amino-etil (DEAE) celulosa

Para aumentar la pureza de la IgG obtenida mediante la cromatografía en L-Fenilalanina Sepharose, ésta se recromatografio en una columna de DEAE-celulosa (Fahey y Terry, 1978).

Se colocaron 5 ml de la muestra sobre una columna de 15 ml de lecho previamente equilibrada con PBS 0.015 M, pH 8 y se continuó eluyendo con el mismo amortiguador. La proteína eluida se colectó en fracciones de 46 gotas mediante el colector de fracciones Ultra-Rac a una velocidad de 30

ml/hora regulada por una bomba peristáltica. En el Uvicord se registró la densidad óptica a 280 nm de las fracciones eluidas. Una vez recuperada la IgG, la columna se lavó con PBS 0.01 M, pH 7.6 para eliminar los contaminantes que pudieran acompañarla.

6. Diálisis, liofilización y almacenamiento

Las fracciones que contenían la IgG se reunieron, se dializaron y se liofilizaron como se indicó antes.

La proteína liofilizada se resuspendió en 2 ml de PBS 15 mM, pH 8 y se almacenó en tubos Eppendorf de 1.5 ml a -20°C.

7. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas fue medida por el método de Bradford (1979).

La medición fue hecha en celdillas de cuarzo de 1 cm de vía óptica. La concentración de las proteínas fue determinada por interpolación en una curva estándar de absorción de luz de 595 nm, obtenida con soluciones de concentración conocida de BSA, disuelta en el mismo amortiguador de las soluciones problema.

Para la medición de proteínas por este método, se mezclaron 40 µl de la solución problema de proteínas con 2

ml del reactivo de Bradford, en tubos de vidrio de 10 x 100 mm por duplicado y se midió la absorción de luz de 595 nm.

8. PAGE-SDS

a) Formación del gel separador (inferior)

Se armó la cámara para formar el gel con la pareja de placas de vidrio y se sellaron los bordes laterales e inferior aplicando (con una pipeta Pasteur) agar al 1% fundido, primero en la base y luego en los lados de la cámara.

Se marcó con un plumón indeleble el nivel que debería alcanzar el gel separador en las placas de vidrio. Se mezclaron en un tubo de ensayo las soluciones en el orden anotado en las columnas de la Tabla 1, para formar los geles separadores que tuviesen el volumen apropiado, según el equipo de electroforésis usado. Antes de agregar el TEMED (solución E) y el persulfato de amonio (solución F), se agitó y desgasificó la mezcla en la línea de vacío por 1 min.

Tabla 1. FORMACION DEL GEL SEPARADOR (INFERIOR) DE
POLIACRILAMIDA-SDS SEGUN EL TIPO DE CAMARA DE ELECTROFORESIS

Cámara	Soluciones (ml)							Total
	A	B	B	H ₂ O	Begas.	E	F ^a	
Mini Ephantec	2.00	1.53	0.025	2.40	↓	0.003	0.054	6.0
Bio-Rad Mod. 220	8.00	6.10	0.10	9.70		0.012	0.12	24.0
Bio-Rad Protean II	11.0	8.40	0.13	13.30		0.017	0.16	33.0
Bio-Rad Mod. 221	20.00	15.25	0.24	24.20		0.030	0.30	60.0

^aagregarlo al final, para iniciar la polimerización

Con una pipeta de 10 ml se añadió la mezcla cuidadosamente en el espacio contenido entre las placas de vidrio, evitando la formación de burbujas. Inmediatamente después, se vació cuidadosamente (con una pipeta Pasteur) agua por uno de los extremos de las placas, para evitar el contacto del gel con el aire (el oxígeno inhibe la polimerización). Se esperó a que el gel polimerizara (20 min). Se eliminó (por inversión de la cámara, tomándola con el soporte) el agua que fue colocada sobre el gel separador y se lavó el borde superior de este gel dos veces con agua. Se secó el exceso de agua con papel sanitario evitando tocar el gel.

b) Formación del gel concentrador (superior)

Se mezclaron en un tubo de ensaye las soluciones en el orden anotado en las columnas de la Tabla 2. Antes de agregar el TEMED (solución E) y el persulfato de amonio (solución F) se agitó y desgasificó en la línea de vacío por 1 min.

Se agitó suavemente y se colocó inmediatamente la mezcla del gel separador, hasta llenar el espacio que quedaba entre las placas de vidrio;

Tabla 2. FORMACION DEL GEL CONCENTRADOR (SUPERIOR) DE POLIACRILAMIDA-SDS SEGUN EL TIPO DE CAMARA DE ELECTROFORESIS

Cámara	Soluciones (ml)							Total
	A	C	B	H ₂ O	Begas.	E	F*	
Mini Ephortec	0.35	0.26	0.02	1.25	↓	0.001	0.01	2.0
Bio-Rad Mod. 220	1.50	1.17	0.09	6.11		0.004	0.045	9.0
Bio-Rad Protean II	1.75	1.30	0.10	6.80		0.005	0.05	10.0
Bio-Rad Mod. 221	2.63	1.95	0.15	10.2		0.007	0.075	15.0

*Agregarlo al final, para iniciar la polimerización

Se colocó el peine entre las placas, introduciendolo en la mezcla un poco inclinado para desplazar hacia arriba las burbujas que pudieran quedar bajo el borde inferior de los dientes, donde se forman las hendiduras del gel superior, procurando que los extremos del peine llegaran hasta 1 cm por arriba del gel separador. La polimerización de este gel también ocurrió en 20 min.

c) Preparación de las cámaras electroforéticas

Mientras se formaba el gel concentrador (superior), se preparaba el volumen apropiado de amortiguador de corrida 1X, para lo cual se tomaba en cuenta la cámara;

Cámara	Amortiguador de corrida 1X (ml)
Mini Ephortec	300
Bio-Rad Mod. 220	1500
Bio-Rad Protean II	2300
Bio-Rad Mod. 221	2000

Se quitó el peine de las placas sin deformar los carriles. Antes de quitar el peine se marcó sobre la placa de vidrio el fondo de cada carril con un marcador indeleble. Con el empaque de hule y las abrazaderas se montaron las

placas de vidrio con los geles dentro del tanque de electroforésis.

Se llenó la parte superior del tanque de electroforésis con el amortiguador 1X y se verificó que no hubiese fuga del amortiguador hacia la parte inferior del tanque.

Con una pipeta Pasteur se lavó tres veces con el amortiguador de corrida cada una de las hendiduras para muestras en el gel concentrador y se eliminó cualquier burbuja que estuviera presente.

Se agregó el amortiguador de corrida 1X restante a la parte inferior del tanque.

d) Preparación de las muestras

Se calculó la dilución correcta de las muestras para obtener la cantidad de proteína deseada.

Las muestras se prepararon sólo hasta que los geles estuvieron montados en las cámaras y el amortiguador de corrida se hubo colocado en los compartimientos superior e inferior.

En tubos Eppendorf que cerraban perfectamente se mezclaron las muestras con un volumen igual de amortiguador de muestras 2X.

Se colocaron los tubos Eppendorf perfectamente cerrados en un soporte circular de Unicel y se colocaron en un baño de agua hirviente durante 3 min.

Con una jeringa Hamilton de 10, 25 o 100 μ l, se colocó cada muestra en la hendidura correspondiente. La jeringa se enjuagó tres veces con amortiguador de corrida entre muestras.

e) Corrida electroforética

Se inició la corrida de las muestras con voltaje constante (60 volts); 10 min después, cuando las muestras habían penetrado al gel separador, se aumentó el potencial a 120 volts. El tiempo de corrida varió con cada cámara:

Cámara	Tiempo de corrida (h)
Mini Ephortec	2.5
Bio-Rad Mod. 220	6.0
Bio-Rad Protean II	6.0

f) Tinción de los geles

En un recipiente cuadrado de plástico se vació un volumen suficiente de colorante de Fairbanks para cubrir el gel que se mantuvo en esta solución toda la noche.

Al cabo de este tiempo, se retiró el colorante, se enjuagó el gel con agua corriente, se sumergió en solución desteñidora rápida y se puso ácido acético al 7.5%. Finalmente, se sustituyó el ácido acético por agua haciendo

varios cambios.

g) Se puso el gel sobre una placa de vidrio y se colocó un pedazo de papel Whatman No. 1 de tamaño apropiado para adherir al gel a éste; se despegó del vidrio y se puso en un secador Gel Slab Dyer-224 de Bio-Rad conectado a una bomba de vacío y con hielo seco (Fairbanks y col., 1971).

B. Inmunización de conejos

1. Dosis y vía

Se inmunizaron tres conejos Nueva Zelanda de 4 a 6 meses de edad con la IgGH obtenida mediante la cromatografía en DEAE-celulosa a una concentración de 1 mg/ml.

Se inyectaron 200 μ l de la IgG que había sido disuelta en PBS 15 mM, pH 8, mezclada con 200 μ l de adyuvante, perfectamente emulsificada (mediante agitación en un Vortex) en la región escapular del animal por vía subcutánea empleando una jeringa de 1 ml con aguja calibre 20 de 32 mm de largo.

2. Esquema de inmunizaciones y sangrados

Las inmunizaciones y sangrados se llevaron a cabo conforme al siguiente esquema:

La primera inmunización se hizo con adyuvante completo de Freund (ACF) y las siguientes tres inmunizaciones con adyuvante incompleto de Freund (AIF) con un intervalo de quince días entre cada una. Quince días después de la última inmunización se sangraron los tres conejos por medio de una pequeña incisión en la vena marginal de la oreja y aplicando vacío a través de un matraz Kitasato en cuyo interior se había colocado un tubo cónico de 50 ml. Se obtuvieron en cada sangrado 25 ml de cada conejo, que se dejaron coagular durante 24 horas a 4°C; al cabo de este tiempo, se desprendieron los coágulos de la pared de los tubos con una varilla de vidrio delgada y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min. Los antiseros sobrenadantes se retiraron con una pipeta Pasteur y se almacenaron a -20°C en viales de vidrio con tapon de rosca (Mayer y Walker, 1980).

3. Titulación de los antiseros

La titulación de los antiseros de los conejos se hizo por medio de inmunodifusión en geles de agarosa al 1.5%, para buscar el punto de equivalencia entre el antígeno (IgGH) y los antiseros (Davis, 1976).

Cuando los títulos fueron bajos al terminar la inmunización, los conejos fueron reinmunizados 29 días después del último sangrado con dosis iguales de antígeno emulsificado en AIF y luego sangrados nuevamente dos semanas

después.

a) Preparación de los geles de agarosa al 1.5%

Se pesaron 0.45 g de agarosa y se mezclaron con 29.55 ml de Tris-HCl 15 mM, pH 8 para producir una mezcla de agarosa al 1.5%. La mezcla se fundió en un horno de microondas (Panasonic, modelo Genius II) a máxima intensidad, mediante tres o cuatro períodos de irradiación de 10 seg (sin dejar que la mezcla llegase a ebullición) y se agitó con una varilla de vidrio hasta que se produjo un fluido cristalino. La agarosa se mantuvo en un baño a 57°C para evitar su gelificación.

b) Recubrimiento de portaobjetos con agarosa

Se tomaron 2.8 ml de la agarosa (con una pipeta de 5 ml previamente calentada en un mechero) y se extendieron cuidadosamente sobre portaobjetos perfectamente limpios y nivelados horizontalmente. El proceso no debía durar más de 20 seg, de lo contrario la agarosa se solidificaba y producía geles con una superficie irregular. Los geles se almacenaron a 4°C en cajas herméticas con papel húmedo (para evitar que se secaran), por no más de una semana para prevenir su contaminación por hongos (Weeke, 1973).

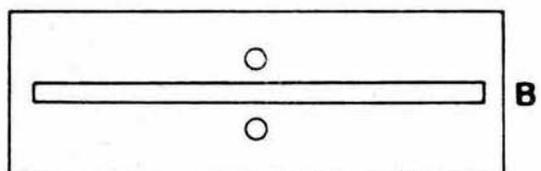
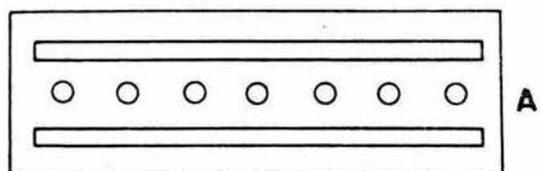
c) Perforación de los geles

Se construyeron plantillas de cartulina con diagramas con la disposición de los pozos y de los surcos en la siguiente forma. En la parte central, a lo largo del portaobjetos se perforaron 7 pozos de 3 mm de diámetro con una distancia de 1 cm entre ellos, utilizando un sacabocados conectado al vacío; luego se hicieron 2 surcos de 2 mm de ancho, a lo largo de los portaobjetos y a 0.5 cm de la hilera de pozos (Fig. 7).

d) Preparación de las muestras para la inmunodifusión

A partir de una solución con 5.7 mg de IgGH por ml, se realizaron diluciones seriadas al doble en PBS 15 mM, pH 8. Posteriormente se tomaron 10 μ l de cada dilución, se mezclaron con 10 μ l del antisuero de cada conejo y se incubaron a 37°C durante 30 min. Al cabo de este tiempo se colocaron 10 μ l de las mezclas en cada uno de los 7 pozos de la placa de agar. En el surco superior de cada gel se colocaron 100 μ l del antisuero de un conejo dado y en el inferior se colocaron 100 μ l de la solución IgG diluída 1:16 con el mismo amortiguador de fosfatos (concentración final de la IgGH: 0.36 mg/ml). Finalmente, se colocaron los geles en cajas de Petri sobre un colchón de papel húmedo y se

Fig. 7. Plantillas para la formación de pozos y surcos en geles de agarosa. Tamaño natural de las plantillas usadas en: (A) inmunodifusión para determinación de equivalencias antígeno/anticuerpo; (B) inmunoelectroforésis para dos antígenos (en los pozos) y un antisuero (en el surco).



incubaron durante 12 horas a 37°C.

e) Lavado de los geles

La extracción de las proteínas no inmunoprecipitadas de los geles de agarosa se realizó de la siguiente manera. Se colocaron los portaobjetos con cada gel sobre dos toallas de papel y se comprimieron con un objeto de aproximadamente 1 kg durante 15 min. Posteriormente se sumergieron 12 h en 250 ml de una solución de NaCl 0.1 M agitada magnéticamente durante 12 h y se lavaron 12 horas más por inmersión en agua bidestilada. Después se comprimieron nuevamente y se secaron 10 min en un horno eléctrico (J M Ortíz) a 60°C.

f) Tinción de los geles

Los geles secos se sumergieron en azul de Coomassie R al 0.5% durante 15 min. Luego se enjuagaron con agua para eliminar el exceso de colorante y se sumergieron en ácido acético al 7% durante el tiempo necesario para eliminar el fondo azul (Harboe e Ingrid, 1973).

C. Purificación de la IgG de conejo anti IgGH (IgG α IgGH)

1. Acoplamiento de la IgGH a Sepharose

Se mezclaron 2.5 g de Sepharose 4B, activada con bromuro de cianógeno (CNBr), con 30 ml de HCl 1 mM mediante agitación suave con una varilla de vidrio. El gel ya hinchado se lavó por filtración a través de un embudo Pyrex de vidrio, con filtro poroso mediano, a presión negativa, tres veces con 30 ml de HCl 1 mM y otras tres veces con 30 ml de NaHCO₃ 0.1 M NaCl 0.5 M, pH 8.3.

El gel lavado y húmedo se retiró del embudo y se depositó en un vaso de precipitados que contenía 4 ml de IgGH (10 mg/ml) disuelta en 10 ml de NaHCO₃ 0.1 M NaCl 0.5 M, pH 8.3 con el fin de acoplarla al gel. La mezcla se dejó reposar 2 horas a 4°C y al cabo de este tiempo la resina se lavó con el mismo embudo de vidrio poroso, tres veces con 30 ml de cada uno de los amortiguadores que fueron empleados sucesivamente: 1) Tris-glicina 0.1 M, pH 8.6, 2) acetatos 0.1 M, pH 4 y 3) Tris-HCl 0.1 M, pH 8.

El gel lavado con la proteína acoplada se empacó en una columna de vidrio de 16 ml de lecho y se equilibró con 150 ml de PBS 15 mM con NaCl 0.15 M, pH 7.4.

2. Purificación de anticuerpos de conejo dirigidos contra IgGH, mediante cromatografía de afinidad

Para purificar los anticuerpos de conejo dirigidos contra inmunoglobulina G humana (IgG α IgGH) se realizó una cromatografía del antisuero de conejo en la columna de

Sepharose 4B a la que se había acoplado IgGH pura, como se describió antes.

Se colocaron 4 ml de suero de conejo inmunizado con IgGH sobre la resina; se eluyó primero con PBS 15 mM, pH 7.4 a un flujo de 1 gota cada 7 segundos y se colectaron fracciones de 20 gotas en tubos de vidrio de 10 X 100 mm, con un colector de fracciones Ultra-Rac. La DO 280_{nm} de las fracciones eluidas se registró en el Uvicord.

Las fracciones que contenían proteína sérica no adsorbida a la columna fueron recolectadas y recicladas en la columna para asegurar la unión de la totalidad de los anticuerpos de conejo anti IgGH a la resina; después de esto, al disminuir la DO al nivel basal, los anticuerpos asociados fueron eluidos con amortiguador de glicina-HCl, pH 2.3. Las fracciones que contenían los anticuerpos se reunieron y se dializaron 48 h contra agua a 4°C. Al cabo de este tiempo, el contenido de la bolsa de diálisis se concentró por liofilización y se almacenó en un vial de plástico con tapa de rosca, sellado con parafilm, dentro de un desecador con sílica a 4°C (Pharmacia, 1987).

3. Pureza de la IgG α IgGH obtenida por cromatografía de afinidad

a) Inmunolectroforesis en geles de agarosa

Se prepararon los geles de agarosa (como se indicó antes) a los que se hicieron dos pozos de 3 mm de diámetro en la parte central del gel, con una separación de 8 mm entre ellos. En el pozo superior se colocaron 10 μ l de IgGH (2 mg/ml) mezclada con 1 μ l de azul de bromofenol al 1% en boratos 0.01 M, pH 8.6 y en el inferior 10 μ l de SHT teñido de la misma forma.

Se colocaron los portaobjetos sobre la placa del soporte del equipo de electroforesis (Bio-Rad-1405) perfectamente paralelos entre sí y perpendiculares a los depósitos de amortiguador de la cámara de electroforesis que habían sido llenados previamente con amortiguador de corrida (Tris-HCl 15 mM, pH 8). Se conectaron los geles a los depósitos con almohadillas de algodón y gasa humedecidas con el mismo amortiguador. La cámara se cerró, se conectó a la fuente de poder y se corrió la electroforesis 10 min a 60 V y luego 60 min a 120 V. Al terminar la corrida se hizo un surco a lo largo del gel y entre los pozos, donde se colocaron 100 μ l del antisuero de conejo (Weeke, 1973; Zochwa, 1976).

b) PAGE-SDS

Se preparó un gel de poliacrilamida al 10% en el que se

analizaron muestras del antisuero de conejo de las fracciones que eluyeron con el amortiguador de fosfatos 15 mM, pH 7.4 (no adsorbidas a la columna de afinidad de Sepharose 4B) y de la fracción asociada a la columna que eluyó con el amortiguador de glicina 0.1 M, pH 2.8.

D. Acoplamiento de la peroxidasa de rábano (HRP) a la IgG

Se disolvieron 5 mg de peroxidasa de rábano en 200 μ l de la solución de PBS 0.1 M, pH 6.8 con glutaraldehído al 1.25% y se mantuvo la mezcla a 4°C durante 18 horas. Luego se filtró la mezcla a través de una columna de Sephadex G 25 de 75 ml de lecho (50 X 0.7 cm) que había sido equilibrada con la solución de NaCl 0.15 M, pH 7.0, para obtener fracciones de 32 gotas/tubo eluidas con el mismo amortiguador.

Las fracciones de color café, que contenían la peroxidasa activada con glutaraldehído, se reunieron y se depositaron en una bolsa de diálisis y cuando era necesario, se concentraron hasta 1 ml colocando la bolsa de diálisis dentro de una caja de Petri que contenía 20 g de polietilenglicol, rotando la bolsa de vez en cuando.

Las fracciones con peroxidasa se dializaron contra 2 litros de solución de NaCl 0.15 M, pH 7.0 durante 12 horas a 4°C.

La mezcla con peroxidasa activada y dializada se

transfirió a un tubo de ensayo de 5 ml que contenía 5 mg de IgG_Cα-IgGH disuelta en 1 ml de solución de NaCl 0.15 M, pH 7.0 e inmediatamente después se añadieron 100 µl de amortiguador de carbonato-bicarbonato 1 M, pH 9.5 en el que se mantuvo durante 24 horas a 4°C; al cabo de este tiempo se le añadieron 100 µl de solución de L-lisina 0.2 M, pH 7.0 y se mantuvo dos horas más a 4°C.

Posteriormente la mezcla se dializó contra tres cambios de 2 litros de NaCl 0.15 M, pH 7.0 a lo largo de 24 horas y a 4°C.

Finalmente, la preparación se almacenó en tubos Eppendorf de 1.5 ml a -20°C hasta el momento de ser usada (Avrameas, 1974).

E. Adsorción del primer anticuerpo (IgGH) a membranas de nitrocelulosa

Para poner a punto el dot-ELISA usando a la IgGH como antígeno, buscamos primero las condiciones para la adsorción de la IgGH a membranas de nitrocelulosa.

Se realizaron diluciones, seriadas al doble, de la solución madre de IgGH (3.2 mg/ml) y se colocaron 10 µl de ellas en el centro de cada uno de ocho cuadros de 1.8 X 1.8 cm marcados en una tira de membrana de nitrocelulosa S&S BA 85 (14.4 X 1.8 cm) previamente lavada por 5 min en agua bidestilada y secada inmediatamente antes de poner en ella

las muestras. Posteriormente la tira de nitrocelulosa con la proteína adsorbida se sumergió 15 min en solución fijadora, después se lavó varias veces con agua bidestilada, se incubó 5 min en Tris-salino y se lavó cuatro veces con 80 ml de PBS 15 mM, pH 7.4. Finalmente se tiñó con Azul de Coomassie R durante 6 h y se destiñó con ácido acético al 7% (Jahan y col., 1984).

F. Búsqueda de las condiciones de reacción de la peroxidasa (HRP) con 4-Cloro-1-Naftol (4-Cl-1-N)

Para poder controlar la reacción de la HRP se hicimos experimentos de cinética enzimática. Primero analizamos el efecto de la concentración de sustrato. Hicimos cinco diluciones seriadas al doble de los sustratos: 4-Cl-1-N y H_2O_2 (contenidos en la mezcla de reacción, MR), en amortiguador TEA-salino.

Posteriormente, depositamos 500 μ l de cada dilución de la MR por duplicado en tubos de ensaye de 10 X 100 mm y les agregamos 100 μ l de la peroxidasa (1 μ g/ml) diluída en TEA-salino.

Se dejó que ocurriese reacción enzimática durante 5 min y al cabo de este tiempo se detuvo la reacción con 500 μ l de NaOH 1 N y se leyó la DO a 340 nm.

En seguida probamos el efecto de la concentración de enzima. Hicimos siete diluciones seriadas al doble de la

enzima HRP (concentración inicial: 1 $\mu\text{g/ml}$) con amortiguador de TEA-salino, en un volumen final de 300 μl . Luego depositamos 500 μl de la MR diluida 1:8 en TEA-salino (62.5 $\mu\text{g/ml}$ de 4-Cl-1-N) por duplicado en tubos de vidrio de 10 X 100 mm y agregamos 100 μl de cada dilución que contenían a la enzima.

Se dejó reaccionar la mezcla durante 5 min y al cabo de este tiempo se detuvo la reacción con 500 μl de NaOH 1 N y se leyó la DO 340 nm.

Analizamos la cinética en las siguientes condiciones finales de reacción: colocamos 100 μl de la enzima (1 $\mu\text{g/ml}$), 500 μl de MR diluida 1:8 (62.5 $\mu\text{g/ml}$ de 4-Cl-1-N) en tubos de ensayo de 10 X 100 mm por duplicado y detuvimos la reacción con 500 μl de NaOH 1 N a 15, 30, 45 segundos y 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 15 minutos.

G. Dot-ELISA con IgGH

Para analizar la actividad inmune y enzimática del conjugado IgG α IgGH-peroxidasa, realizamos un dot-ELISA usando como antígeno el primer anticuerpo (IgGH), inmovilizado directamente en las membranas de nitrocelulosa.

1. Fijación del primer anticuerpo

Se cortaron discos de 7 mm de diámetro con un perforador de

papel, y se lavaron por 5 min en una caja de Petri que contenía agua bidestilada. Los discos se secaron a temperatura ambiente e inmediatamente a cada uno se aplicaron 10 μ l del primer anticuerpo (IgGH a 3.2 mg/ml); es decir, a cada disco se aplicaron 32 μ g de IgGH. Después de la aplicación los discos se secaron a temperatura ambiente y cada uno se colocó en tubos de ensayo de 5 ml a los que se agregaron 500 μ l de solución fijadora, se incubaron 15 min a temperatura ambiente, luego fueron lavados con agua bidestilada, incubados 5 min en TBS y después 1 h en 250 μ l de solución bloqueadora (BSA al 5%).

2. Unión del segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa ("conjugado")

A cada tubo con un disco que contenía IgGH inmovilizada se agregaron 100 μ l de IgGc α IgGH-peroxidasa (diluciones 1:50, 1:100, 1:250 y 1:500 en BSA al 1%). Luego se incubaron 2 h a temperatura ambiente y después se lavó cada disco dos veces con 1 ml de TBS.

3. Reacción de la peroxidasa

A cada tubo con un disco que había sido incubado con el segundo anticuerpo, se agregaron 250 μ l de MR diluída 1:8 en TEA-salino. Las mezclas se incubaron 5, 15 o 30 min, al cabo

de los cuales se lavaron dos veces con 2 ml de TBS.

H. DOT-ELISA con Entamoeba histolytica

1. Preparación del antígeno amibiano

a) Cosecha de amibas

Cinco tubos con cultivos axénicos de trofozoítos de E. histolytica de la cepa HK9 en fase logarítmica tardía (10^5 amibas/ml), propagadas en medio TYI-S-33 (Diamond, 1978) se enfriaron por inmersión en agua-hielo durante 5 min, al cabo de los cuales suspendimos las amibas por inversión suave de los tubos; el contenido de ellos se reunió en un tubo Falcon cónico de 50 ml con tapón de rosca que se mezcló bien y se tomó una muestra para observarla con un hematímetro y calcular: a) la densidad de las amibas, b) el rendimiento promedio y c) el número total de amibas cosechadas. Una vez contadas, las amibas se centrifugaron a $90 \times g$ durante 3 min a $4^\circ C$; se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur conectada al vacío, con mucho cuidado, ya que la pastilla amibiana es muy suave. Se agregaron entonces 5 ml de medio TYI frío a la pastilla y se resuspendió suavemente para luego transferirla a un tubo cónico de vidrio graduado de 15 ml en el que se registró el volumen y se centrifugaron nuevamente las amibas a $90 \times g$ por 3 min a $4^\circ C$. Igual que

antes, se resuspendieron y centrifugaron las amibas dos veces más. Luego se contaron nuevamente para calcular su densidad y número total; se centrifugaron y se descartó el sobrenadante.

b) Fijación de las amibas con glutaraldehído

Las amibas ya cosechadas se resuspendieron en 43.5 ml de medio TYI frío y se fijaron añadiéndoles 1.5 ml de glutaraldehído al 25% dentro de una campana extractora (la concentración final de glutaraldehído fue 1%).

Las amibas suspendidas en la mezcla se mantuvieron con glutaraldehído en agitación suave y continua en un mezclador (Lab-Tek Aliquot Mixer) a 30 ciclos/min, durante 2 h.

Las amibas ya fijadas se centrifugaron a 90 X g durante 3 min a 24°C; el sobrenadante se descartó por aspiración y la pastilla se resuspendió en 50 ml de NaCl 0.1 M-Glicina 0.1 M, pH 7.4 y se mantuvo en agitación durante 30 min para bloquear los grupos aldehído libres del glutaraldehído.

Se lavó la pastilla tres veces mas por centrifugación con la misma solución y tres veces más con agua bidestilada.

Se contaron nuevamente las amibas en el hematímetro y se ajustaron a una concentración de 3×10^6 /ml en TBS con NaN_3 al 0.2%. (Cano-Mancera, 1986).

2. Inmovilización del antígeno

Una vez que se tuvo el antígeno amibiano fijado, se preparó el papel de nitrocelulosa donde se llevo a cabo la prueba del Dot-ELISA.

Se cortó la cantidad adecuada de papel de nitrocelulosa de acuerdo al número de muestras que se emplearían; la membrana se depositó en un recipiente con agua bidestilada y se dejó hidratar durante 5 min. Inmediatamente antes de fijar el antígeno al papel de nitrocelulosa, se colocó este sobre una toalla de papel desechable para eliminar el exceso de agua.

Se armó el Minifold primero con la base de vacío y sobre esta la sección intermedia o soporte. También se corto un cuadro de papel Whatman 3 Chr de 103 X 133 mm que se colocó sobre el soporte y luego sobre este se puso la membrana de nitrocelulosa todavía húmeda, con el lado opaco hacia arriba. Enseguida se colocó la sección superior del Minifold con 96 pozos y se prensó con las pinzas de sujeción.

En cada pozo del Minifold se colocaron 10 μ l del antígeno (3×10^4 amibas) ya fijadas y resuspendidas en TBS. Después de cada aplicación se seco el antígeno con la ayuda de una pistola de aire y luego se incubó con 500 μ l de TBS durante 5 min; al cabo de este tiempo se eliminó el TBS aplicando vacío a la cámara. Posteriormente se incubó 1 h con 200 μ l de BSA al 5% en TBS y luego se retiró por

aspiración cuidadosa con una pipeta Pasteur conectada al vacío (Jahan y col., 1984).

3. Unión de los anticuerpos

Se depositaron muestras de 100 μ l de sueros de cuatro personas sanas y de cuatro personas con absceso hepático amibiano (gentilmente donados por la Dra. Yolanda López Vidal, del Depto. de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición, titulados previamente por el método de ELISA clásico), en los pozos 1 al 11, en diluciones seriadas 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200 y 1:102400 en BSA al 1% en TBS; 30 min después se retiró el líquido de cada pozo por aspiración con una pipeta Pasteur y se lavó tres veces con 500 μ l de TBS, que se descartó por aspiración. La columna 1 pozos (pozos de las filas A-H) correspondió a las muestras blanco, es decir, mezclas sin suero anti-amibiano.

4. Reacción enzimática

Se agregaron 100 μ l de la IgG α IgGH conjugada a la peroxidasa diluida 1:300 en BSA al 1% en TBS, se incubó 2 h más a temperatura ambiente y se lavó con 500 μ l de TBS como se describió antes.

En cada pozo se pusieron 250 μ l de mezcla de reacción

diluida 1:8 en TEA-salino y se incubó 1 hora a temperatura ambiente evitando la luz directa sobre la cámara, que se cubrió con papel aluminio.

Finalmente se retiró la mezcla de reacción aplicando succión muy suave a la cámara de vacío del Minifold para que el producto de la reacción enzimática (precipitado azul) se depositara sobre el fondo blanco de la membrana de nitrocelulosa. Se desmontó la membrana de la cámara y se dejó secar a temperatura ambiente antes de ser guardada dentro de una bolsa de plástico que se cerró herméticamente (Pappas y col., 1983, 1984 y 1985; Sanjai, 1985).

V. RESULTADOS

A. Purificación del "primer anticuerpo" (IgG sérica humana)

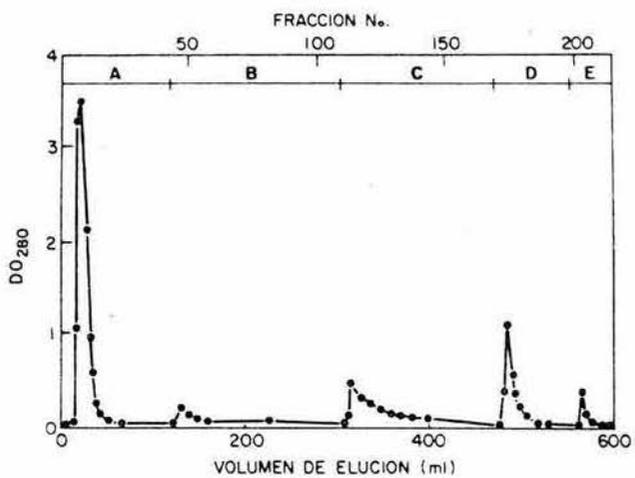
1. Cromatografía en L-Fenilalanina-Sepharose

Para separar las inmunoglobulinas del suero humano total (SHT) usamos el método de Doellegast y Plaut (1976), descrito originalmente para la purificación de IgA. Por resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Quezada-Calvillo, 1986), dicho método también es útil para obtener IgG con alto grado de pureza. La técnica se basa tanto en la eliminación de algunas proteínas no deseadas mediante precipitación con sulfato de amonio, como en la obtención de las inmunoglobulinas séricas por medio de cromatografía en L-Fen-S, eluyendo seriadamente con amortiguadores que tienen concentraciones variables de sulfato de amonio.

En la Fig. 8 se muestran los picos obtenidos mediante cromatografía del SHT en L-Fen-S. La IgG se encontró en las fracciones eluidas con el amortiguador D.

Para concentrar la IgG enriquecida, reunimos las fracciones que formaban el pico que eluyó con el amortiguador D en L-Fen-S, las dializamos contra agua para eliminar las sales, y las desecamos por liofilización para almacenarlas; antes de volver a usarlo, redisolvimos el

Fig. 3. Perfil cromatográfico del suero humano normal en L-fenilalanina-Sepharose. Las letras representan los amortiguadores usados para la elución de la proteína. Las fracciones eluidas con el amortiguador D contenían principalmente IgG y fueron reunidas para su purificación ulterior en DEAE-celulosa.



material liofilizado en amortiguador de fosfatos 15 mM, pH 8.

2. Cromatografía en DEAE-celulosa

Para enriquecer la fracción de IgG obtenida mediante cromatografía en L-Fen-S, la sometimos a cromatografía en DEAE-celulosa. Al eluir con el amortiguador A, obtuvimos un pico que contenía IgG, perfectamente separado del pico de proteína contaminante que eluyó con el amortiguador B (Fig. 9). Las fracciones eluidas con el amortiguador A fueron luego dializadas contra agua bidestilada y liofilizadas.

Para asegurarnos de la pureza de las inmunoglobulinas contenidas en las fracciones cromatográficas, las analizamos mediante inmunoelectroforesis empleando antisuero dirigido contra IgGH.

En la Fig. 10 se muestra el arco de precipitación obtenido mediante inmunoelectroforesis, donde se ve que la anti IgG sérica sólo reconoce a la IgG.

3. Rendimiento de la IgGH purificada

Para saber cuanta IgG fue purificada durante el proceso y el rendimiento de la misma, cuantificamos las proteínas en todas las fracciones con el método de Bradford (1976). Los datos de concentración, cantidad total y rendimiento de proteínas en cada paso de purificación se muestran en la Tabla 5.

Fig. 9. Purificación de la IgGH por cromatografía en DEAE-celulosa. La cromatografía se realizó con el pico D obtenido de la cromatografía en L-Fen-S (ver Fig. 8). Las letras representan los amortiguadores usados en la elución. La IgG (detectada por inmunodifusión radial) eluyó con el amortiguador A, en tanto que la proteína retenida (contaminante) eluyó con el amortiguador B.

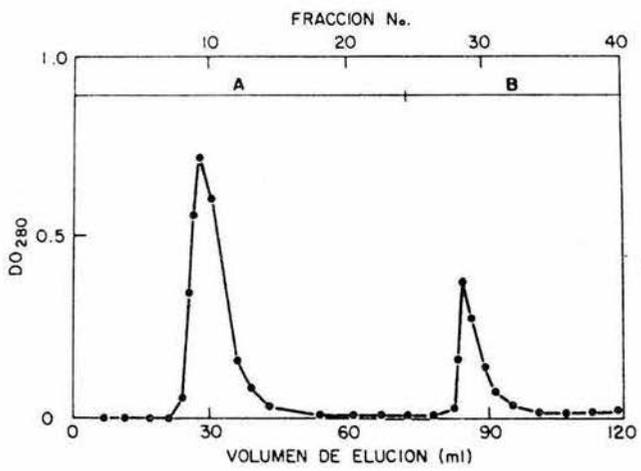


Fig. 10. Inmunolectroforésis de la IgG sérica humana obtenida por cromatografía en DEAE-c. En el pozo inferior se colocó suero humano total (SH) y en el pozo superior se colocó una muestra del primer pico obtenido de la cromatografía en DEAE-c (ver Fig. 9). En el surco central se colocó antisuero de conejo dirigido contra suero humano (α SH). Se observó mediante iluminación indirecta que la banda más intensa de inmunoprecipitado corresponde a la IgG.

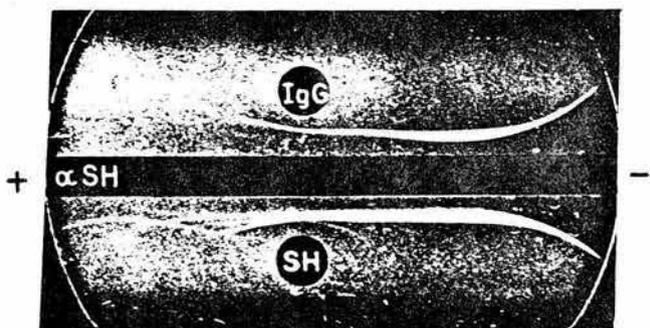


Tabla 5 PURIFICACION DE IgG SERICA HUMANA

Fracción	Volumen		P r o t e í n a s	
	(ml)	mg/ml	mg totales	Recuperación
Suero	6	17.803	106.818	(100%)
P50	6	12.184	72.888	68
Fen-S	5	0.149	0.745	0.697
DEAE-c	2	0.292	0.584	0.546

4. Pureza electroforética de la IgGH

El análisis de las fracciones ricas en IgGH obtenidas de las cromatografías sucesivas en L-Fen-S y DEAE-c, fue hecho en geles de poliacrilamida-SDS (Fig. 11). En el carril 1 se colocó una muestra de SHT (dilución 1:40), en el carril 2 una muestra de la fracción L-Fen-S y en el carril 3 una muestra de la fracción DEAE-c. Se aprecia que después de la cromatografía en L-Fen-S, la IgGH (flecha mayor) se encontró prácticamente libre de contaminación, apreciando en ella sólo una banda adicional muy tenue, que pareció corresponder a la albúmina (flecha menor). Después de la cromatografía en DEAE-c, la IgG apareció como una banda única muy intensa, que no contenía ninguna otra proteína detectable por tinción con Azul de Coomassie.

Por estos datos concluimos que mediante cromatografía secuencial, primero en L-Fen-S y luego en DEAE-c, se puede obtener IgGH sérica de pureza suficiente para inmunizar conejos y obtener un antisuero adecuado.

B. Producción de anticuerpos de conejo anti IgGH

1. Dosis, vía, adyuvantes, inmunizaciones y sangrados

Para obtener los anticuerpos de conejo anti IgGH inmunizamos tres conejos Nueva Zelanda jóvenes con la IgGH purificada y los sangramos conforme al esquema descrito en Métodos. En

Fig. 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las fracciones obtenidas durante la purificación cromatográfica de la IgG. En el carril 1 se colocaron 15 μ l de suero humano total diluido 1:40; en el carril 2 se colocaron 15 μ l de la fracción que eluyó con el amortiguador D de la cromatografía en L-fenilalanina-Sepharose (ver Fig. 8) y en el carril 3 se colocaron 15 μ l de la fracción rica en IgG obtenida por cromatografía en DEAE-c (ver Fig. 9). El gel fue teñido con azul de Coomassie. La flecha de la izquierda indica la posición de la IgG. Se aprecia en el carril 3 una banda única que corresponde a la IgG de alta pureza electroforética.



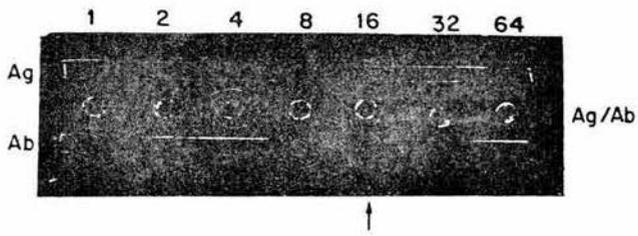
cada ocasión obtuvimos 25 ml de sangre de cada conejo y después de centrifugar quedaron 10-15 ml de suero.

2. Titulación del antisuero

Para titular los antisueros hicimos una inmunodifusión en geles de agarosa con objeto de encontrar el punto de equivalencia entre el volumen del antígeno (IgGH) y el volumen del antisuero (suero de los conejos). Después de incubar los geles con las muestras observamos bandas de precipitación entre el surco superior donde colocamos el antisuero y los pozos con las diluciones 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 de la IgGH (5.7 mg/ml) y del antisuero (Fig. 12); este resultado indicó que en ese caso había un exceso de antisuero. También observamos bandas de precipitación entre el surco inferior, donde colocamos la IgGH (1:16), y los pozos con las diluciones 1:32 y 1:64 de la mezcla de IgGH y el antisuero; este resultado indicó que para dichas diluciones había un exceso de IgGH. Por lo tanto, concluimos que la equivalencia de los antisueros en nuestro ensayo era 1:16 porque en el pozo correspondiente no se observó arco de precipitación, por existir a esa dilución equivalencia entre el antígeno y el anticuerpo.

El punto de equivalencia en la dilución 1:16 de los antisueros, correspondió a 0.3562 mg de IgG por ml de antisuero.

Fig. 12. Punto de equivalencia del antisuero de conejo dirigido contra IgG humana. En el surco inferior del gel se colocaron 100 μ l de antisuero de conejo (α IgGH); en el superior se colocaron 100 μ l de IgGH (diluída 1:16); en cada uno de los pozos centrales se colocaron 10 μ l de las diluciones sucesivas de IgGH (desde 1:1 hasta 1:64) que fueron mezcladas con un volumen igual de antisuero como indican los números. La observación del gel se hizo por iluminación indirecta. La flecha indica que la equivalencia se encontró en la dilución 1:16 del antisuero, ya que en el pozo marcado no se observa arco de inmunoprecipitado, mientras que sí hay arcos de precipitado arriba y abajo (i.e., antes y después de la dilución correspondiente).



C. Purificación del "segundo anticuerpo" (IgG de conejo anti IgGH)

1. Cromatografía de la IgG del suero de conejo dirigido contra IgGH (IgG α IgGH)

Realizamos la cromatografía de afinidad en una columna acoplada con IgGH, a través de la cual hicimos pasar la fracción de inmunoglobulinas para absorber a pH neutro el antisuero de conejo dirigido contra IgGH; con el amortiguador de glicina-HCl 0.1 M, pH 2.8, eluimos luego la IgG α IgGH que reconoció y se unió específicamente a la IgGH de la columna (Fig. 13).

Para concentrar los anticuerpos purificados, reunimos, dializamos y liofilizamos las fracciones que los contenían y las almacenamos a 4°C en un desecador con gel de sílice.

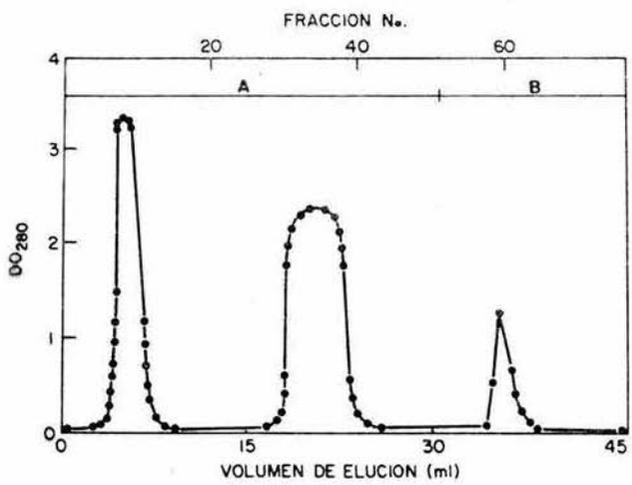
2. Análisis de la IgG α IgGH por IEF

El análisis del antisuero de conejo se realizó por inmunoelectroforésis en geles de agarosa a 1.5%.

Los geles se perforaron con un surco central y dos pozos, como se indicó en Métodos. En el pozo superior se colocó IgGH (2 mg/ml) y en el inferior SHT.

Después de la corrida electroforética, en el surco

Fig. 13. Purificación de anticuerpos de conejo anti IgG humana por cromatografía de afinidad. El antisuero de conejo anti IgGH fue aplicado a la columna y eluido con el amortiguador A (primer pico); estas fracciones se reunieron, se aplicaron nuevamente a la columna y se eluyeron con el mismo amortiguador (segundo pico). Los anticuerpos de conejo contra IgG humana fueron eluidos con el amortiguador B (tercer pico).



central del gel se colocó antisuero de conejo y se incubó 24 horas. Al cabo de este tiempo, sólo observamos dos bandas de precipitación bien definidas entre el pozo superior y el surco central, en la posición donde migra la inmunoglobulina G (Fig. 14).

Por estos resultados concluimos que la IgG de conejo presente en el antisuero reconoce solamente a la IgGH y no a otros componentes del SHT.

3. Análisis de la IgG α IgGH en PAGE-SDS

El análisis electroforético de las fracciones de la IgG α IgGH obtenida mediante cromatografía de afinidad fue hecho en geles de poliacrilamida-SDS (Fig. 15).

En el primer carril se colocó una muestra de SHT diluida 1:40; en los carriles 2 y 3 se colocaron muestras de las fracciones del suero que no se asociaron a la columna de afinidad y eluyeron con el primer amortiguador de PBS 15 mM, pH 7.4; en el carril 4 se colocó una muestra de las fracciones que sí se asociaron a la columna de Sepharose 4B y eluyeron con el segundo amortiguador de glicina-HCl 0.1 M, pH 2.8. puede observarse en el carril 4 una banda única que corresponde a la IgG humana. Por lo tanto, mediante cromatografía de afinidad en Sepharose 4B si pudimos purificar los anticuerpos específicos dirigidos contra IgGH a partir del antisuero total de conejo.

Fig. 14. Análisis de la IgG α IgGH por inmunolectroforésis. En el pozo superior se colocaron 10 μ l de IgGH (2 mg/ml), (IgG) y en el inferior 10 μ l de suero humano total (SH). Después de la corrida electroforética, en el surco central se colocaron 100 μ l del antisuero de conejo (α IgG). Se observan en el gel por iluminación indirecta bandas de precipitación entre cada pozo y el surco central, que corresponden a la IgG, lo cual indica que el antisuero era específico.

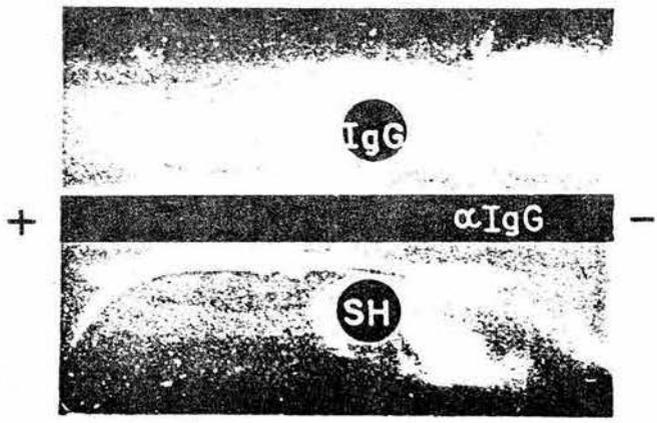
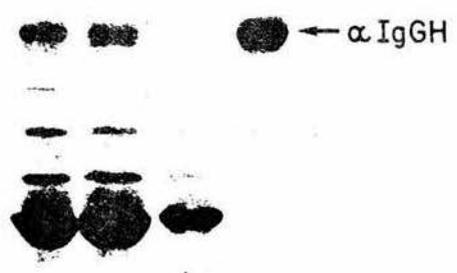


Fig. 15. Análisis de la IgG α IgGH por PAGE-SDS. En el carril 1 se colocaron 15 μ l de suero de conejo total (diluído 1:40). En los carriles 2 y 3 se colocaron 15 μ l de las fracciones de las proteínas del suero que no se asociaron a la columna de afinidad con el amortiguador A (ver Fig. 13). En el carril 4 se colocaron 15 μ l de las fracciones que sí se asociaron a la columna y eluyeron con el amortiguador B (ver Fig. 13). La flecha de la derecha indica que la única banda que se observa en el carril 4 corresponde a la IgG α IgGH.

1 2 3 4



D. Adsorción del primer anticuerpo (IgGH) a membranas de nitrocelulosa

Para realizar el dot-ELISA con IgGH, adsorbimos primero la IgGH purificada a membranas de nitrocelulosa. Para saber si la cantidad de proteína aplicada era proporcional a la cantidad adsorbida en la membrana, teñimos luego a esta con Azul de Coomassie.

Colocamos muestras con 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 μg de IgGH en una tira de nitrocelulosa. La cantidad de IgGH que se fijó en la membrana de nitrocelulosa sí fue proporcional a la cantidad que se colocó, de acuerdo a la intensidad de las manchas de Azul de Coomassie (Fig. 16).

E. Determinación de las condiciones de reacción de la HRP con 4-C1-1-N

1. Efecto de la concentración de 4-C1-1-N

Para encontrar la concentración apropiada de 4-C-1-N, variamos las concentraciones de éste y mantuvimos constante la concentración de HRP (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y el tiempo de incubación (5 min). En la Fig. 17 se observa que 62.5 μg de 4-C1-1-N/ml fue la concentración con la cual ocurrió la reacción enzimática a velocidad máxima, con una K_m de 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,

Fig. 16. Adsorción cuantitativa del primer anticuerpo (IgGH) a membranas de nitrocelulosa. Se colocaron muestras de 10 μ l que contenían 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 μ g de IgGH y se tiñeron con azul de Coomassie. La intensidad de las manchas fue proporcional a la cantidad de IgG aplicada en cada muestra.

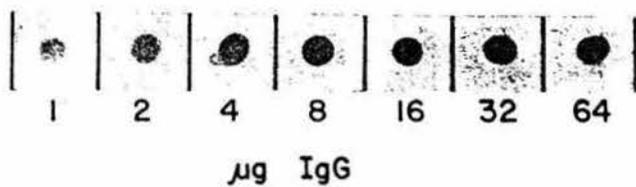
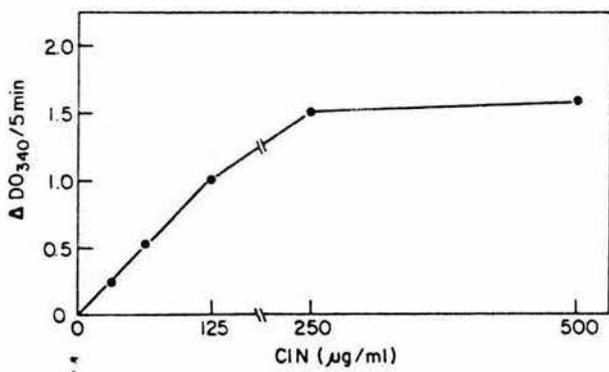


Fig. 17. Efecto de la concentración de 4-Cl-1-Naftol sobre la velocidad de reacción de la HRP. La enzima se encontraba a concentración fija (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y el tiempo de incubación fue constante (5 min). La velocidad de la reacción fue proporcional a la concentración del cromógeno (4-Cl-1-N), cuando esta fue menor de 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (7 mM). En los siguientes ensayos se usó 4-Cl-1-N a 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (3.5 mM).



equivalente a 4-Cl-1-N 3.5 mM, en las condiciones empleadas.

2. Efecto de la concentración de enzima

Para determinar las concentraciones de enzima dentro de las cuales la formación del producto de reacción fuese proporcional al contenido de HRP, mantuvimos constantes la concentración de 4-Cl-1-N (62.5 $\mu\text{g/ml}$) y el tiempo de incubación (5 min). En la Fig. 18 se observa que 1 μg de HRP/ml se encuentra en la región lineal del incremento de la velocidad de la reacción, y que la velocidad máxima se alcanza con aproximadamente 6 μg de HRP/ml.

3. Efecto del tiempo de incubación

Con las concentraciones de enzima (1 $\mu\text{g/ml}$) y sustrato (62.5 $\mu\text{g/ml}$) definidas antes, encontramos que la reacción enzimática era proporcional al tiempo de incubación hasta aproximadamente 1 min, y que el 4-Cl-1-N se agotaba entre 4 y 5 min (Fig. 19). En estas condiciones el decremento de la DO 340 nm por μg de HRP por min de incubación (DO/min por μg) fue aproximadamente 0.33, lo que equivalió a una actividad específica de 0.22 μmoles de 4-Cl-1-N transformados por min por μg de HRP.

Fig. 18. Efecto de la concentración de la HRP sobre la velocidad de reacción. Se observó que la región lineal de incremento de la velocidad de la reacción ocurrió con no más de 3 μg de HRP por ml, en tanto que la velocidad máxima se alcanzó con aproximadamente 6 μg de HRP/ml y disminuyó cuando la concentración de HRP rebasó los 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Condiciones fijas de la reacción: 62.5 μg de 4-Cl-1-N por ml y 5 min de incubación.

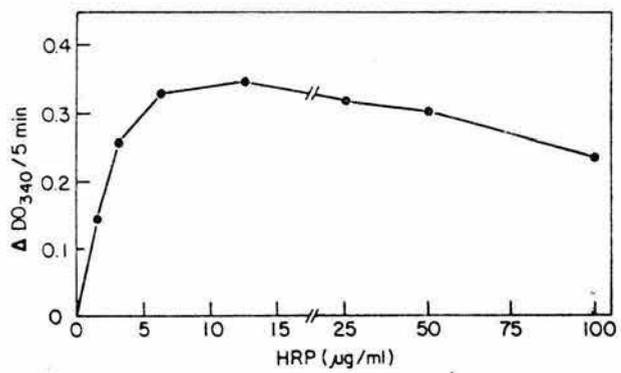
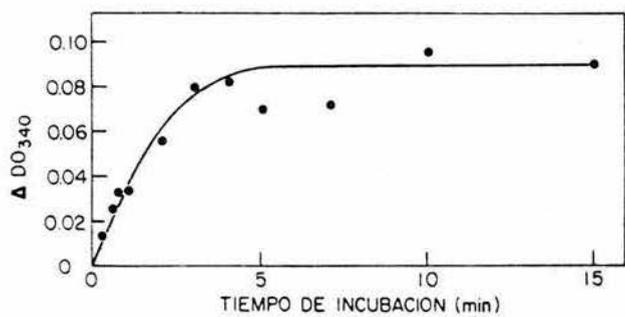


Fig. 19. Efecto del tiempo de incubación sobre la reacción enzimática de la HRP. Se mantuvieron constantes la concentración de enzima (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y de 4-Cl-1-N (62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La cantidad de producto fue proporcional al tiempo de incubación hasta aproximadamente 1 min, y el cromógeno se agotó alrededor de los 4 min. La actividad específica de la HRP, calculada con el promedio de los puntos obtenidos hasta el primer minuto de incubación, fue de 0.22 μmoles de 4-Cl-1-N transformados por μg de proteína.



F. Dot-ELISA con IgGH

1. Condiciones del ensayo

Para probar la actividad inmunoquímica y enzimática del segundo anticuerpo conjugado a la HRP, así como la dilución apropiada y el tiempo de reacción del conjugado, realizamos un dot-ELISA con discos de nitrocelulosa a los que habíamos adsorbido el primer anticuerpo (IgGH). Agregamos diluciones 1:50, 1:100, 1:300 y 1:500 del conjugado a los discos; la reacción se llevó a cabo con MR diluída 1:3 que contenía 62.5 µg de 4-Cl-1-N y H₂O₂ al 0.0015%. Las mezclas se incubaron 5, 15 o 30 min a temperatura ambiente. Encontramos que a los 15 min de incubación de la MR con el conjugado IgGαIgGH-peroxidasa diluído 1:300 había un depósito claramente visible de producto azul solamente en los discos con 32 µg de IgGH fijada, pero no en los que no la contenían.

2. Sensibilidad y Especificidad

a. Sensibilidad

Para probar la sensibilidad del sistema variamos las concentraciones del antígeno (IgGH), del cual colocamos diluciones seriadas al doble que contenían desde 60.5 ng hasta 32 µg por disco. Encontramos que el sistema detectó

claramente desde 1 µg de IgG bajo estas condiciones.

b. Especificidad

Para probar la especificidad del segundo anticuerpo usamos como antígeno IgGH e IgAs (esta última purificada por el Biol. Fernando Navarro García por cromatografía en DEAE-c y Sephacryl S-300), de las cuales colocamos diluciones seriadas al doble que contenían desde 1 µg hasta 32 µg por disco y como segundo anticuerpo usamos IgGC α IgGH. Observamos que la IgGC α IgGH dio reacción con la IgAs sólo hasta la dilución 1:50, pero con la IgGH lo hizo hasta la dilución 1:300.

La leve reacción positiva cruzada del conjugado con la IgAs (seis veces menos intensa que con la IgGH) probablemente se debió a que ambos antígenos (IgGH e IgAs) contienen las mismas clases de cadenas ligeras (kappa y lambda) y comparten algunos determinantes antigénicos de las cadenas pesadas.

G. Dot-ELISA con Entamoeba histolytica

Se realizó un dot-ELISA en las siguientes condiciones:

Se adsorbieron 10 µl del antígeno (3×10^4 amibas) en cada pozo del Minifold sobre el papel de nitrocelulosa de 103 X 133 mm previamente hidratado.

El papel se preincubó con 500 µl de TBS durante 5 min y posteriormente se eliminó por succión.

Se bloquearon los sitios del papel que hubieran quedado libres (sin antígeno) con 200 µl de BSA al 5% en TBS durante 1 hora y luego se retiraron por aspiración.

Se depositaron muestras de 100 µl de los sueros antiamebianos de cuatro personas sanas y de cuatro personas con absceso hepático amibiano (ya titulados por el método de ELISA clásico) en diluciones seriadas al doble desde 1:50 hasta 1:102400 en BSA al 1% en TBS (pozos 2 a 12) durante 1 hora, que luego se lavaron tres veces con 500 µl de TBS.

La primera columna de filas A-H correspondió a mezclas de control negativo ("blancos") donde no se colocó suero humano.

Se colocaron luego en cada pozo 100 µl del segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (IgG α IgGH) diluido 1:300 en BSA al 1% en TBS que se incubó durante 2 horas luego se lavó tres veces con 500 µl de TBS.

La reacción enzimática se llevó a cabo con 250 µl de mezcla de reacción diluida 1:3 en TEA-salino y se incubó durante 1 hora; al cabo de este tiempo se lavó y se dejó secar el papel.

Encontramos que los sueros negativos (colocados en las filas A, B, C y D) desarrollaron color hasta las diluciones 1:200, 1:200, 1:100 y 1:200, respectivamente.

Con los cuatro sueros restantes de pacientes con absceso

hepático en curso (controles positivos colocados en las filas E, F, G y H) obtuvimos precipitado azul hasta las diluciones 1:1600, 1:300, 1:1600 y 1:12800, respectivamente (Fig. 20).

Los títulos obtenidos para estos sueros positivos y negativos con nuestro método correspondieron aproximadamente con los que habían sido obtenidos previamente por ELISA clásico usando diluciones seriadas de 5 en 5 (Tabla 6).

Fig. 20. Dot-ELISA con antígeno de trofozoítos E. histolytica. Se muestran los resultados obtenidos con los sueros de cuatro personas sin infección amibiana (controles negativos) colocados en los pozos de las filas A, B, C y D, en los que se observa desarrollo de manchas de color hasta las diluciones 1:200, 1:200, 1:100 y 1:200, respectivamente; los cuatro sueros de pacientes con absceso hepático amibiano en curso (controles positivos) fueron colocados en los pozos de las filas E, F, G y H en ellos se observa desarrollo de manchas de color hasta las diluciones 1:1600, 1:300, 1:1600 y 1:12800, respectivamente. La primera columna (BCO.) corresponde en todos los casos a muestras blanco que contenían el acarreador (BSA al 1% en TBS) pero no suero.

TITULOS COMPARATIVOS OBTENIDOS CON ELISA CLASICO Y
 DOT-ELISA EN SUEROS DE PACIENTES SIN INFECCION PREVIA Y
 CON ABSCESO HEPATICO AMIBIANO EN CURSO^a.

Suero No.	Pacientes con absceso hepático	ELISA	
		Clásico ^b	Dot ^c
1	No	625	200
2	"	625	200
3	"	125	100
4	"	625	200
5	Sí	3125	1600
6	"	3125	800
7	"	15625	1600
8	"	15625	12800

^a Los números indican los recíprocos de las diluciones a los que ocurrió la reacción al punto final.

^b Diluciones seriadas de 5 en 5.

^c Diluciones seriadas de 2 en 2.

VI. DISCUSION

A. Purificación del primer anticuerpo

Para la purificación de IgG se han descrito gran cantidad de métodos, entre los cuales la precipitación del suero con sulfato de amonio, seguida de cromatografía de intercambio iónico en DEAE-c, es el más ampliamente usado debido a su sencillez y alto rendimiento (Fahey y Terry, 1978). Sin embargo, las preparaciones obtenidas de este modo generalmente están contaminadas por otras proteínas séricas, e incluso por otras inmunoglobulinas (Doellegast y Plaut, 1976)

El método para purificar a la IgG que hemos empleado en este trabajo fue descrito originalmente por Doellegast y Plaut (1976) para la purificación de IgA sérica. Por resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Quezada-Calvillo, 1986), dicho método parecía ser útil para obtener IgG sérica con alto grado de pureza. Las fracciones eluidas con Tris-acetatos 0.5 M NaCl 0.25 M, pH 8 mediante cromatografía del suero en L-Fen-S (Fig. 8), se encontraron muy enriquecidas en IgG, pero aun contenían albumina (Fig. 11). Estas fracciones fueron sometidas luego a un segundo paso de purificación en DEAE-c, en condiciones de elución

que no permitieron la asociación de la IgG pero sí de otras proteínas a la resina, para así obtener preparaciones de IgGH suficientemente puras para inmunizar conejos y obtener antisueros adecuados (Fig. 9).

Aunque el rendimiento con el método empleado fue bajo (Tabla 5), la relativa alta concentración sérica de esta clase de inmunoglobulina permite que se obtengan cantidades apreciables de IgGH a partir de pequeñas cantidades de suero humano. Además, por la gran pureza de las preparaciones, el método de purificación resultó muy conveniente.

B. Producción y purificación del segundo anticuerpo

Para la inmunización de conejos con IgGH usamos el método descrito por Mayer y Walker (1980), que se basa en la formación de arcos de precipitado entre los surcos y los pozos formados en una placa de agarosa. Obtuvimos antisueros cuyo punto de equivalencia fue de 1:16, lo que correspondió a 356.2 µg de IgGH por ml de antisuero (Fig. 12).

Cuando había un exceso de Ag en la mezcla Ag/Ab que se colocó en los pozos, se formó el arco de precipitado entre estos pozos y el surco donde se colocó solamente Ag; cuando había exceso de Ab en la mezcla Ag/Ab, el arco se formó entre los pozos y el surco donde se colocó solamente Ab y cuando la reacción fue equivalente, el precipitado se formó dentro del pozo correspondiente al punto de equivalencia

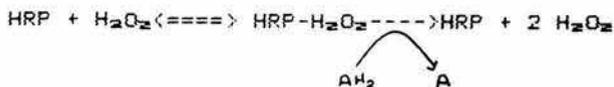
(Fig. 12) (Davis, 1976).

Una vez obtenidos los antisueros, purificamos los anticuerpos específicos mediante cromatografía de afinidad en una columna de Sepharose 4B acoplada a IgGH. Este método permitió obtener, en un sólo paso, anticuerpos específicos con un alto grado de pureza (Fig. 13).

C. Acoplamiento de la IgG α IgGH con peroxidasa

Las enzimas unidas a anticuerpos han sido ampliamente usadas en inmunoquímica para detectar antígenos en los tejidos. Esta técnica da buenos resultados con la peroxidasa de rábano (HRP) unida covalentemente a través de uno de los dos grupos activos del glutaraldehído. El grupo aldehído que queda disponible se une luego al anticuerpo (Avrameas y Ternyck, 1971).

Con este método acoplamos la peroxidasa a 5 mg de IgG α IgGH. Para la detección de la actividad de la enzima conjugada usamos como sustancia cromogénica al 4-Cl-1-N que es oxidado por el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en la siguiente reacción general (Morris, 1976):



en donde AH₂ es la sustancia cromogénica y A es el

producto colorido insoluble.

D. Condiciones de reacción y actividad específica de HRP

Las concentraciones apropiadas de 4-Cl-1-N y de enzima para la reacción de la peroxidasa de rábano (HRP) fueron 62.5 µg/ml y 1 µg/ml, respectivamente. En estas condiciones la reacción se mantuvo en la región lineal de incremento de la velocidad de reacción (Figs. 17 y 18). El cromógeno se agotó en unos 4 min en estas condiciones (Fig. 19). La actividad específica de la HRP resultó así de 0.22 µmoles de 4-Cl-1-N transformados por minuto por µg de enzima.

E. Dot-ELISA con IgGH

Las membranas de nitrocelulosa han sido muy usadas en biología molecular para la inmovilización de ácidos nucleicos y proteínas (Jahn y col., 1983).

Adsorbimos IgGH en las membranas de nitrocelulosa para probar la actividad inmunológica y enzimática del segundo anticuerpo conjugado con HRP, así como la dilución apropiada y el tiempo de reacción del conjugado.

Encontramos que con 15 min de incubación, el segundo anticuerpo conjugado (IgGCxIgGH-peroxidasa) diluido 1:300 producía un depósito claramente visible de precipitado azul en las membranas de nitrocelulosa que contenían IgGH

inmovilizada. Así mismo, determinamos la sensibilidad del sistema variando las concentraciones del primer anticuerpo (IgGH); encontramos que se podía detectar claramente por lo menos 1 µg de IgGH en estas condiciones.

Para probar la especificidad de nuestro segundo anticuerpo, usamos como primer anticuerpo IgGH o IgAsH. Observamos que la IgGαIgGH conjugada con HRP reconoció a la IgAsH sólo hasta la dilución 1:50 pero a la IgGH hasta la dilución 1:300. Por lo tanto, nuestro segundo anticuerpo es seis veces más potente para la detección de IgGH que IgAsH.

La reacción positiva del conjugado con la IgAsH probablemente se debió a que tanto IgGH como IgAsH contienen las mismas clases de cadenas ligeras (kappa y lambda) y comparten determinantes antigénicos en las cadenas pesadas γ y α .

Consideramos que este resultado es muy importante, ya que con nuestro método interesa detectar anticuerpos antiamibianos preferentemente de la clase IgG, y la IgA no parece contribuir significativamente en esta reacción.

F. Dot-ELISA con E. histolytica

Una vez que definimos las condiciones de reacción del dot-ELISA con IgGH, pudimos probar el sistema con trofozoítos de E. histolytica como antígeno. Para ello usamos cuatro sueros de personas sanas y otros cuatro de

personas con absceso hepático amibiano, los cuales habían sido previamente titulados por el método de ELISA clásico.

Las condiciones del ensayo en cada pozo del Minifold fueron las siguientes:

- a) Antígeno amibiano: 3×10^4 amibas (10 μ l por pozo)
- b) Primer anticuerpo: suero humano a prueba, en diluciones seriadas al doble desde 1:50 hasta 1:102400 (100 μ l por cada pozo, excepto la primera columna A-H del Minifold a la que se añaden 100 μ l de BSA al 1% por pozo)
- c) Segundo anticuerpo: IgGc α IgGH-Peroxidasa, diluída 1:300 (100 μ l por pozo)
- d) Substrato: mezcla de reacción diluída 1:8 con 62.5 μ g/ml de 4-Cl-1-N y H₂O₂ al 0.0015% (100 μ l por pozo)
- e) Tiempo de reacción: 1 hora.

Encontramos que los sueros de personas sanas (controles negativos, colocados en las líneas A, B, C y D) desarrollaron color en los primeros pozos hasta las diluciones 1:200, 1:200, 1:100 y 1:200, respectivamente, por lo que los inversos de tales diluciones (100-200) fueron consideradas como los títulos al punto final de los sueros normales.

Con los cuatro sueros restantes (controles positivos, colocados en las columnas E, F, G y H) obtuvimos un precipitado azul en las diluciones 1:600, 1:800, 1:600 y 1:12800, respectivamente.

Los títulos obtenidos para los sueros positivos y

negativos con nuestro método correspondieron aproximadamente a los que habían sido obtenidos previamente con el método de ELISA clásico en el que se usaron diluciones seriadas de 5 en 5 (Tabla 6).

El ELISA clásico se ha aplicado con éxito desde hace una década para el serodiagnóstico de infecciones parasitarias tales como enfermedad de Chagas, equinococosis, paludismo, esquistosomiasis, tripanosomiasis y leishmaniasis cutánea y visceral (Pappas y col., 1983).

El método dot-ELISA usa membranas de nitrocelulosa en vez de placas de microtitulación como soporte del antígeno y ha sido empleado para el diagnóstico serológico de la leishmaniasis visceral (Pappas y col., 1983) y más recientemente de la amibiasis (Sanjai y col., 1985).

El método dot-ELISA ofrece varias ventajas. Puede ser usado para detectar anticuerpos dirigidos hacia cualquier antígeno que haya sido adsorbido a las membranas de nitrocelulosa e inducidos en animales o en humanos. Se necesitan mínimas cantidades, tanto del antígeno del parásito fijado a la nitrocelulosa (que puede ser preservado por largo tiempo), como los reactivos que utiliza. También se requieren cantidades muy pequeñas de suero para su titulación. La prueba toma poco tiempo (alrededor de 2 h) y se realiza a temperatura ambiente.

A diferencia del ELISA clásico, el dot-ELISA no requiere fotómetro o colorímetro especial para la lectura de

las placas de microtitulación. Tampoco requiere contador de centelleo, fuente de poder, isótopos radioactivos, etc., como el radioinmunoensayo, por lo que resulta muy económico y puede ser utilizado en áreas remotas o alejadas de laboratorios de diagnóstico clínico donde la electricidad, transporte y personal auxiliar sean muy limitados o no existan (Pappas y col., 1983, 1984 y 1985). Los resultados obtenidos con el dot-ELISA son leídos visualmente y el precipitado que se deposita sobre la membrana es estable por meses.

El ELISA clásico, el dot ELISA y la prueba de fijación del complemento han sido comparados en estudios serológicos de leishmaniasis; la sensibilidad y especificidad del ELISA clásico y del dot-ELISA fueron equivalentes y superiores a la fijación del complemento (Pappas y col., 1984).

VII. CONCLUSIONES

A. Purificación del primer anticuerpo (IgGH)

1. La IgGH no fue suficientemente purificada mediante cromatografía en L-Fen-S.
2. La IgGH sí fue purificada suficientemente mediante cromatografía en L-Fen-S seguida de cromatografía en DEAE-c.
3. El rendimiento de la IgGH con el segundo método de purificación fue bajo; sin embargo, su relativa alta concentración sérica, permitió obtener cantidades suficientes para usarla como primer anticuerpo.

B. Producción del segundo anticuerpo

1. Los anticuerpos de conejo específicos anti IgGH se indujeron adecuadamente con preparaciones de IgGH obtenidas por nosotros.
2. Los anticuerpos de conejo anti IgGH se purificaron en un sólo paso mediante cromatografía de afinidad.

3. El acoplamiento de IgG_Cα-IgG_H a la peroxidasa de rábano se realizó adecuadamente con glutaraldehído.

C. Determinación de las condiciones de reacción de la HRP

1. El análisis de la cinética de reacción de la HRP permitió optimizar la composición y tiempo de incubación de la mezcla de reacción.

D. Dot-ELISA con IgG_H

1. La adsorción del primer anticuerpo a las membranas de nitrocelulosa permitió determinar la actividad inmunológica y enzimática del segundo anticuerpo conjugado a la HRP, así como la dilución apropiada y el tiempo de reacción del conjugado en el método de ensayo.

E. Dot-ELISA con antígeno de Entamoeba histolytica

1. Nuestro sistema dot-ELISA permitió titular de manera rápida y confiable a los anticuerpos anti Entamoeba histolytica del suero.

2. Cada ensayo emplea 3×10^4 amibas estables indefinidamente que se encuentran fijadas con glutaraldehído y adsorbidas a un área circular de 4 mm de diámetro en una

membrana de nitrocelulosa.

3. El segundo anticuerpo debe diluirse 1:300 y la mezcla de reacción incubarse en presencia de BSA al 1% para eliminar las reacciones positivas falsas y el fondo inespecífico.

4. El ensayo es rápido (toma alrededor de 2 horas) y se lleva a cabo a temperatura ambiente.

5. La titulación al punto final de los sueros probados se lee directamente, sin necesidad de equipo adicional.

6. La sensibilidad y especificidad de nuestro Dot-ELISA son similares a los del ELISA clásico.

VIII. REFERENCIAS

1. Avrameas S, Ternyck T. 1971. Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry* 8:1175-1179.
2. Avrameas S, Guesdon JL, Ternyck T. 1974. Brief general review of immunoenzyme techniques. *Bol. Soc. Mex. Cien. Fisiol.* 6:3-5.
3. Benacerraf B, Unanue ER. 1979. Textbook of immunology. Williams and Wilkins, Baltimore. Pags. 1-3.
4. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
5. Brown HW, Neva FA. 1983. Basic Clinical Parasitology. Prentice-Hall Do Brasil LTDA, Río de Janeiro. Pags. 18-37.

6. Calderon J, Schreiber RD. 1985. Activation of the alternative and classical complement pathways by Entamoeba histolytica. *Infect. Immun.* 50:560-565.
7. Calderon J, Tovar-Gallegos R. 1980. Loss of susceptibility to antibody and complement mediated lysis in Entamoeba histolytica. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 11 (Supl. 1):241-244.
8. Campós-Rodríguez R, Reyes-Montes R, Acosta-Altamirano G, Isibasi-Araujo A, Santos-Preciado JI, Kumate-Rodríguez J. 1986. Papel de la histamina en la respuesta inmune local antiámiba. *Arch. Invest. Med. (Méx)* 17 (Supl. 1):273-276.
9. Canales L, Tsutsumi V, Ramírez-Rosales A, Martínez-Palomo A. 1986. Amibiasis hepática experimental en cobayo: un modelo de resistencia. *Resúmenes del X Seminario sobre Amibiasis. México, D.F.,* pags. 46.
10. Cano-Mancera R. 1986. Adhesión of Entamoeba histolytica to human erythrocytes. I. Maintenance of integrity, viability and adhesion of trophozoites in different media. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 17 (Supl. 1):141-145.
11. Capin R, González-Mendoza A, Ortiz-Ortiz L. 1980. Disminución de la actividad del sistema fagocítico

mononuclear en hamsters infectados con Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 11 (Supl. 1):235-240.

12. Davis CN, Ho M. 1976. Quantitation of immunoglobulins. En: Rose NR, Friedman H. (eds.) Manual of clinical immunology. American Society for Microbiology, Washington, pags. 4-16.

13. Diamanstein T, Klos M, Gold D, Hahn H. 1981. Interaction between Entamoeba histolytica and the immune system. I. Mitogenicity of Entamoeba histolytica extracts for human peripheral T lymphocytes. J. Immunol. 126:2084-2086.

14. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. 1978. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:431-432.

15. Doellegast GJ, Plaut AC. 1976. Purification of IgA by salt mediated hydrophobic chromatography. Immunochemistry 13:135-139.

16. Donaldson RJ. 1979. Parasites and Western Man. University Park Press, Baltimore, pags. 133-148.

17. Fahey Jr, Terry EW. 1978. Ion exchange chromatography

and gel filtration. En: Weir, PM. Handbook of experimental immunology, 3a edicion. Blackwell, Oxford and Edinburgh, pags. 8.1-8.16.

18. Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH. 1971.

Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry 10:2606-2616.

19. Gil-Recasens NE, Cats S, Rosenstein J, Cervera J,

Kretschmer R. 1982. Liberación in vitro de histamina leucocitaria provocada por antígeno amibiano y por concanavalina A en pacientes con amibiasis invasora. Arch. Invest. Med. (Méx.) 13 (Supl. 3):277-280.

20. Ghadirian E, Meerovitch E, Kongshavn PAL. 1982. Role of macrophages in host defense against hepatic amoebiasis in hamsters. Infect. Immun. 42:1017-1019.

21. Guerrant RL, Brush J, Ravdin JI, Sullivan JA, Mendell GL. 1981. Interaction between Entamoeba histolytica and human polymorphonuclear neutrophils. J. Infect. Dis. 143:83-93.

22. Gutiérrez G. 1986. Epidemiología y control de la amibiasis en México. Arch. Invest. Med, (Méx) 17 (Supl. 1):373.

23. Harboe N, Ingrid A. 1973. Immunization, isolation, estimation of antibody titre. En: Axelsen NH, Kroell J, Weeke B. (eds.). A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Methods and applications. Scand. J. Immunol. 2 (Supl.1): 161-164.

24. Hernández R, Muñoz O, Jaime M, Garduño G. 1982. Identificación de antígeno amibiano circulante en el humano por análisis inmunoenzimático. I. Desarrollo de la técnica. Arch. Invest. Med. (Méx.), 13 (Supl. 3): 297-300.

25. Jahan R, Schiebler W, Greengard P. 1984. A quantitative dot-immunobinding assay for proteins using nitrocellulose membrane filters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1684-1687.

26. Juniper K Jr, Worrell CL, Minshew CN, Roth LS, Cypert H, Lloyd RE. 1972. Serologic diagnosis of amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21:15-17.

27. Kagan JC. 1976. Seroepidemiology of amebiasis. En: Sepúlveda B, Diamond LS (eds). Amibiasis. IMSS, México. Pags. 574-587.

28. Kretschmer RR, Castro EN, Arellano J, Pacheco MG. 1986. Estudio "in vitro" de la interacción de monocitos humanos y

el factor inhibidor de la locomoción de los mismos producida por Entamoeba histolytica. Resúmenes del X Seminario Sobre Amibiasis. México D.F., pag. 31.

29. Krupp IM. 1977. Amoebic disease. ICN 1:1-5.

30. Krupp IM, Powell SJ. 1971. Antibody response to invasive amebiasis in Durban, South Africa. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20:414-420.

31. Lin TM, Halbert SP, Chiu CT, Zarco R. 1981. Simple standardized Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for human antibodies to Entamoeba histolytica. J. Clin. Microbiol., 13: 646-651.

32. López-Osuna M, Contreras BA, Kretschmer RR. 1986. Interacción in vitro de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y Entamoeba histolytica. Resúmenes del X Seminario Sobre Amibiasis. México, D.F., pag. 32.

33. Lynch MS, Raphael SG, Mellor LD. 1982. Métodos de laboratorio, 3a ed. Interamericana, México D.F., pag. 285.

34. Markell EK, Voge M. 1981. Parasitología. Prevención, Diagnóstico y Tratamiento. Manual Moderno, México, D.F., pag. 429.

35. Martínez-Palomo A. 1986. Amebiasis. Human Parasitic Diseases, Vol. 2. Elsevier, Amsterdam, pag. 269.
36. Mayer RJ, Walker JH. 1980. Cap. 7. Technical supplement. En: Mayer RJ, Walker, JH (eds.). Immunochemical methods in biological sciences: Enzymes and proteins. Academic Press, Nueva York, pags. 126-151.
37. Meri S, Richard G, Linder E. 1985. Complement activation by antigenic fractions of Entamoeba histolytica. Parasite Immunol. 7:153-164.
38. Morris JG. 1976. Fisicoquímica para biólogos. Reverte, Barcelona, pags. 277-320.
39. Muñoz-Espinoza LE, Hernandez MP, Salazar OG, Cavazos R, Silva JB. 1986. Concentración plasmática de C3d en el absceso hepático amibiano. Resúmenes del X Seminario Sobre Amibiasis. México, D.F., pag. 41.
40. Ortíz-Ortíz L, Capin R, Capin NR, Sepúlveda B, Zamacona G. 1978. Activation of alternative pathway of complement by Entamoeba histolytica. Clin. Exp. Immunol. 34:10-18.
41. Pappas MG, Hajkowski R, Hockmeyer WT. 1983.

Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA): A micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. J. Immunol. Methods 64:205-214.

42. Pappas MG, Hajkowski R, Cannon LT, Hockmeyer WT. 1984. Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA): Comparison of standard ELISA and complement fixation assays for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. Vet. Parasit. 14:329-349.

43. Pappas MG, Hajkowski R, Tang DB, Hockmeyer WT. 1985. Reduced false positive reactions in the Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for human visceral leishmaniasis. Clin. Immunol. Parasitol. 34:392-396.

44. Pappas MG, Ripley WM, Gray MR, Takafuji ET, Miller RN, Hockmeyer WT. 1985. Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific Dot-ELISA: Comparison with the microscopic agglutination test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34:346-354.

45. Pharmacia Fine Chemicals. 1987. Affinity chromatography, Principles & Methods. Upsala, pags. 11-12.

46. Quezada-Calvillo R. 1987. Proteólisis de inmunoglobulinas por trofozoítos de Entamoeba histolytica.

Tesis de maestría. Biología Celular, CINVESTAV-IPN, México, D.F., pags. 211.

47. Ravdin JI, Guerrant RL. 1982. A review of the parasite cellular mechanism involved in the pathogenesis of amebiasis. Rev. Infect. Dis. 4:1185-1207.

48. Sanjai K, Band AH, Samantaray JC, Dang N, Talwar GP. 1985. A dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of antibodies against Entamoeba histolytica. J. Immunol. Methods 83:125-133.

49. Seehan DJ, Bottone EJ, Pavletick, Heath MC. 1979. Entamoeba histolytica: Efficacy of microscopic, cultural, and serological techniques for laboratory diagnosis. J. Clin. Microbiol. 10:128-133.

50. Sepúlveda B, Aubanel M, Landa L, Velázquez G. 1972. Contraimmunolectroforésis para serodiagnóstico de amebiasis. Arch. Invest. Med. (Méx.) 3 (Supl. 2):363-370.

51. Sepúlveda B. 1982. Amebiasis: Host-pathogen biology. Rev. Infect. Dis. 4:1247-1253.

52. Trissl D. 1982. Immunology of Entamoeba histolytica in human and animal hosts. Rev. 4: 1247-1253.

53. Trujillo J, Segovia E, Gallegos J, Resano F.. 1982. Detección a largo plazo de anticuerpos antiamibianos por contraelectroforesis y hemaglutinación indirecta. Arch. Invest. Med (Méx.) 73 (Supl. 3):311.
54. Voller A, De Savigny D. 1981. Diagnostic serology of tropical diseases. J. Immunol. Methods 46:1-29.
55. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. 1979. The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Laboratories, Virginia, pags. 125.
56. Weeke B. 1973. General remarks on principles, equipment, reagents and procedures. En: Axelsen NH, Kroll J, Weeke B (eds.) A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Methods and applications. Scand. J. Immunol. 2 (Supl. 1):15-35.
57. Zochwa S. 1976. Immunoelectrophoresis (including zone electrophoresis). En: Rose NR, Friedman H (eds.) Manual of clinical immunology. American Society for Microbiology, Washington. pag. 17-35.