

78
2EJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETECCION DE ANTIGENO SOLUBLE DE E. histolytica MEDIANTE ANTICUERPOS HOMOLOGOS ADSORBIDOS SOBRE S. aureus

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N ,

FERNANDO GUILLERMO MARTINEZ MENDOZA

RAUL RAMIREZ ARELLANO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN.**

MEXICO, D. F.

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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
I. GENERALIDADES	
A. AMIBIASIS. ASPECTOS GENERALES.	
A.1. Antecedentes	4
A.2. Clasificación	5
A.3. Aspectos biológicos	6
A.4. Aspectos inmunológicos	8
A.5. Diagnóstico	10
B. REACCION DE COAGLUTINACION COMO NUEVA OPCION	
B.1. Reacción de coaglutinación	14
B.2. Proteína A. Aspectos generales	15
B.3. Localización, Biosíntesis y aislamiento de la proteína A	16
B.4. Propiedades fisicoquímicas	17
B.5. Propiedades biológicas	18
B.6. Estudio químico y comportamiento inmunológico	20
B.7. Aplicaciones de la reacción de coaglutinación	22
II. PARTE EXPERIMENTAL	
A. Material biológico	23
B. Medios de cultivo	23
C. Condiciones óptimas de crecimiento para la producción de la proteína A	23
D. Fijación de la proteína A en la bacteria	24

E. Técnica para el acoplamiento de la gamma globulina monoclonal anti- <u>E. histolytica</u> con la proteína A de <u>S. aureus</u>	26
F. Incorporación de la gamma globulina a la proteína A	26
G. Tratamiento de muestras	27
H. Pruebas control	
H.1. Control de actividad de la proteína A	28
H.2. Control de actividad del reactivo preparado (<u>S. aureus</u> forrado de gamma globulina monoclonal anti- <u>E. histolytica</u>)	29
I. Determinación de la sensibilidad del reactivo preparado	29
III. RESULTADOS Y DISCUSION	31
IV. CONCLUSIONES	36
V. APENDICE	38
VI. BIBLIOGRAFIA	40

INTRODUCCION.

Las investigaciones epidemiológicas sobre la frecuencia y distribución de la enfermedad ambiana realizadas en México, al igual que en otras partes del mundo, son de naturaleza básicamente descriptiva y sólo permiten establecer algunos factores de riesgo de tipo ambiental, pero no han analizado con precisión los relacionados con el agente patógeno y con el huésped.

La frecuencia con que se han encontrado quistes de Entamoeba histolytica en heces varía entre 0.0 y 55.5 %. Esta variación está influida por diversos factores, pero fundamentalmente está relacionada con deficiencias y diferencias en las técnicas parasitológicas empleadas y a la falta de estudios de muestras representativas de la población.

La identificación de la forma vegetativa o quística de E. histolytica, es fundamental en el diagnóstico definitivo de la amebiasis intestinal, empleando para ello diversas técnicas coproparasitológicas. Sin embargo el uso de ellas requiere de tiempos prolongados y en la mayoría de los casos de por lo menos tres muestras para poder emitir un diagnóstico etiológico, en caso de ser positivo o descartarlo como negativo, así como de personal altamente especializado para su implementación y diferenciación morfológica de otro tipo de parásitos intestinales, en los métodos que así lo requieren.

Se han efectuado muchos ensayos con el fin de detectar antígeno soluble de Entamoeba histolytica en materia fecal, los cuales han mostrado cierto grado de inespecificidad y por lo consiguiente los resultados son poco confiables.

En este trabajo, la investigación de antígeno soluble presente en heces, se hizo por medio de la reacción de coagulación, que consiste en forrar a una bacteria (Staphylococcus aureus), que actúa como soporte con moléculas de gamma globulina específico anti-E. histolytica, dando como resultado una reacción macroscópica de aglutinación, en caso de ser positivo.

Esta reacción puede aportar una nueva alternativa al diagnóstico de la amebiasis intestinal por su rapidez y especificidad de la misma.

OBJETIVOS.

- Montar la técnica de coagulación para el diagnóstico de amibiasis intestinal.
- Valorar y comparar el método de coagulación, con respecto a otras técnicas copreparasitoscópicas, así como su posible implementación - en laboratorios de rutina, como una prueba confirmativa para el diagnóstico de amibiasis.

I. GENERALIDADES

A. AMIBIASIS. ASPECTOS GENERALES

A.1. Antecedentes.

La primera referencia directa sobre las amibas como probable agente causante de un padecimiento humano fue hecha por Lambl en 1860 (4), quien observó en los protozoarios en las heces de niños con disentería. Sin embargo, el mérito (no sólo del descubrimiento de la amiba, sino también de haber ofrecido una prueba experimental de su papel patógeno), pertenece a Friedrich Losh (4,6,43), quien en 1875 en Leningrado, (Rusia), encontró trofozoitos del parásito en la materia fecal en un enfermo de disentería; este material se inoculó en perros por vía rectal produciéndoles disentería y colitis. Losh describió al organismo con detalle y lo denominó Entamoeba coli. Los trabajos de Koch (1883), Kartulis (1886), Hlava (1887), Osler (1890), y Le Fleur y Councilman (1891) dieron las pruebas concluyentes de que el protozoario es el agente etiológico de la disentería y del absceso hepático (6,11).

Le Fleur y Councilman dieron el nombre de Entamoeba dysenteriae a la amiba encontrada en el material biológico de las personas infectadas. En 1893, Quincke y Roos confirmaron la existencia de más de una especie de amibas parásitas en el intestino humano y descubrieron el ciclo biológico de la amiba disentérica con la transformación de sus trofozoitos a quistes, siendo ésta la forma infectante (11,50). Scandian en 1903, detalló estructuralmente las dos especies de amibas encontradas en humanos; a la patógena le llamó Entamoeba histolytica (tiene la capacidad de destruir tejidos) y Entamoeba coli a la espe-

cio que no tiene poder patógeno en humanos. Cuttler en 1918 y Boeck y Drobny en 1925 (6), lograron cultivar in vitro a E. histolytica en cultivo mixto. Jacobs en 1947, Shaffer y col., en 1948 y Robinson en 1968 (6) cultivaron el parásito en condiciones monoxénicas. Diamond -- (6,8,11), logró finalmente establecer una metodología para el cultivo axénico de Entamoeba histolytica, con lo cual se inició una nueva etapa en los estudios morfológicos, fisiológicos, inmunológicos y bioquímicos del parásito, así como de las relaciones entre este parásito y sus huéspedes (sobre todo el ser humano).

A.2. Clasificación.

En la actualidad, E. histolytica se ha clasificado tomando en cuenta su historia natural y sus características biológicas (6,11), entre las cuales se pueden mencionar: morfología, tamaño, presencia de cuerpos cromatóideos, número de núcleos, habitat, distribución de la cromatina nuclear, formas de reproducción, tipo de metabolismo, características nutricionales y de crecimiento in vitro, formación de pseudópodos, temperatura de crecimiento, actividad patógena y virulencia, y reacciones inmunoserológicas (6).

Debido a la complejidad para clasificar al parásito, en los últimos años se ha recurrido a otras características más específicas de las amibas, como son: relación de ácidos nucleicos, contenido de proteínas, su contenido nucleotídico, y más específicamente al contenido isoenzimático siendo esta última característica la que ayuda a diferenciar in vitro, los distintos géneros y especies de amibas (6).

Tabla de clasificación de Entamoeba histolytica.

Reino -----	Animalia
Phylum -----	Protista
Subphylum -----	Sarcodastigophora
Superclase -----	Sarcodina
Clase -----	Rhizopoda
Subclase -----	Loxozoa
Orden -----	Amoebida
Familia -----	Endamoebidae
Género -----	Entamoeba
Especie -----	histolytica

A.3. Aspectos biológicos.

Muchos aspectos de la superficie de la membrana de E. histolytica se han caracterizado. Por otro lado los estudios hechos por microscopía electrónica de E. histolytica revelan la carencia de mitocondrias, existencia de ribonucleoproteínas en forma de hélice en el citoplasma, vesículas endo y ectoplásmicas, y una doble membrana limitante. En trofozoítos asibianos, se ha identificado un glicocalix veloso externo con estructuras que actúan como microvelosidades (40).

Las ambas son aglutinadas por concavalina A (al que se ha considerado como un marcador del grado de patogenicidad de muchas cepas). El grado de aglutinación de las cepas virulentas, pueden estar relacionadas con la gran fluidez de la membrana, y una rápida reparación de receptores de superficie, los cuales pueden influir en la adherencia asibiana. De aislamientos relativamente puros de E. histolytica se han identifi

cada 19 plásmidos (40).

Sargeant y col. (40), han caracterizado numerosas muestras clínicas - por síndromes, que se encuentran constituidos por enzimas del parásito separadas por electroforesis en gel y son: glucosa fosfato, isomerasa, fosfoglucomutasa, L-malato: NADP óxido reductasa y hexocinasa, las cuales se han utilizado para clasificar a las cepas virulentas de Entamoeba histolytica.

Adherencia: Se sabe que existen dos adhesinas involucradas en la adherencia a células blanco, una es sensible de inhibición con N-acetil galactosamina (Gal-N-Ac) o residuos de galactosa, mientras que la segunda es inhibida por polímeros de N-acetil glucosamina (40). Estas dos adhesinas son las responsables de adherencia a la mucosa y submucosa del colon en mamíferos y humanos, así como también a otras células como son: bacterias, eritrocitos y cultivos de células de mamíferos (2,40). Se ha visto que para que pueda llevarse a cabo la adherencia amibiana a células blanco es necesario que las microvellosidades se encuentren intactas, funcionales y además requieren de la presencia de iones calcio en el medio (2,40).

Por otros estudios se sabe que la capacidad de E. histolytica para destruir tejidos involucran mecanismos bioquímicos contra el huésped, incluyendo secreción de enzimas, citotoxinas y mecanismos citolíticos - contacto-dependientes (40).

La cantidad de proteínas superficiales de Entamoeba histolytica es muy pequeña (2.5 % de la masa celular), ésta se ha considerado de 10^{-13} g/cél. Las proteínas básicas no se encuentran en concentraciones altas,

mediante técnicas de elución se han detectado 115 antígenos fraccionados -
proteicos con un peso molecular de 30 000 a 125 000 dalton's (22,34).

Mediante las técnicas de radiocodación y radiosulfuración se han aislado y purificado parcialmente antígenos proteicos de trofozoitos de E. histolytica de la cepa HM1-TMS (5,13,22,37).

Por lo anterior el antígeno soluble también puede ser resultado de diferentes sustancias secretadas por E. histolytica (incluidas aquellas dirigidas contra el huésped), o aquellas partículas proteicas solubles resultantes de la destrucción de trofozoitos y quistes, presentes en heces del huésped (5,13,22,37).

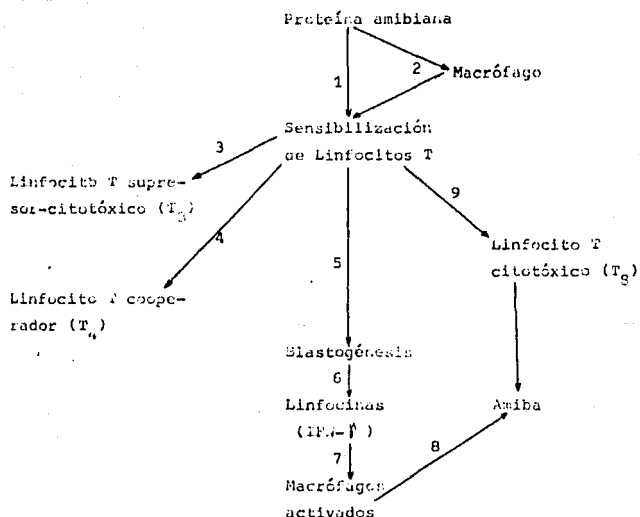
A.4. Aspectos inmunológicos.

Se ha demostrado que las reacciones inmunológicas en amebiasis, se ajustan a los principios generales de la Inmunología. Es decir son reacciones semejantes a las que ocurren en cualquier otra infección y por consiguiente, participan en ella tanto los fenómenos de inmunidad celular como los de la humoral, así como otros fenómenos de defensa inespecífica.

La respuesta inmune humoral parece no proporcionar una protección adecuada contra la infección. Los anticuerpos y el complemento sólo parecen prevenir la invasión temprana de muy pocas copias virulentas, o trabajar conjuntamente con la respuesta inmune celular en infecciones severas (42).

Investigaciones recientes indican que la respuesta inmune celular competente, tanto aferente como eferente, se desarrolla contra la ameba-

sis invasiva, y por estudios realizados in vitro e in vivo se piensa que actúa de la siguiente manera:



La proteína (inmunógeno) ambiental puede ser presentada de dos formas, 1) Directamente (1), o 2) procesada por el macrófago. Esto da por resultado una sensibilización de linfocitos T, que como consecuencia varía en sus subpoblaciones de linfocitos T, con un incremento en la subpoblación de supresor-citotóxicos T_3 (3) y un decremento en los linfocitos T cooperadores (4). La sensibilización de los linfocitos da como resultado una respuesta proliferativa (5), que es considerablemente más baja en pacientes con una relación de linfocitos $T_4:T_8$ baja, o tam-

bién en aquellos pacientes con un mes de terapia. La sensibilización y proliferación están asociadas con la producción de linfocinas, especialmente interferón (IFN- γ)(6), el cual activa a los macrófagos en contra del inmunógeno (7).

La actividad efectora celular contra E. histolytica se ha demostrado tanto por macrófagos activados como por linfocitos T citotóxicos (8,9)(42).

A.5. Diagnóstico.

La amibiasis se clasifica en intestinal y extraintestinal. El diagnóstico puede hacerse por métodos serológicos en caso de padecimientos extraintestinal o por estudios coproparasitológicos en casos de amibiasis intestinal.

Para la amibiasis extraintestinal, los métodos serológicos utilizados en el laboratorio como ayuda en el diagnóstico de ésta, se iniciaron en 1914, cuando Izar demostró anticuerpos específicos en infecciones por E. histolytica. Un gran número de técnicas se han desarrollado desde entonces para obtener una prueba sensible y confiable (38).

Entre las técnicas de mayor aplicación se encuentran la contrainmuno-electroforesis (CIEF)(18,29,46); doble difusión en gel de agar (18,29,44); aglutinación indirecta con látex (19,36); fijación de complemento (18,28); inmunofluorescencia indirecta (21); hemaglutinación pasiva (18,28,38,44). En esta última se han utilizado dos técnicas para sensibilizar glóbulos rojos de carnero con: 1) ácido tánico y 2) glutaraldehído; y una tercera técnica que utiliza eritrocitos humanos tipo "O" - sensibilizados con cloruro crómico (CrCl_3)(38,46).

Actualmente se ha implementado en muchos laboratorios la técnica inmuno enzimática (ELISA), (Voller y col., 1976, Thomas 1978, Yans y col., - 1979, Knoblock y col., y Speiser 1981), (13,19,20,28,41). Esta por su - alta sensibilidad y especificidad (92-98 %), es de las más confiables en el hallazgo de anticuerpos circulantes específicos contra Entamoeba histolytica.

No obstante, aún una de las técnicas más sensible tiene sus inconvenientes. Una de las limitaciones más importante de las técnicas serológicas es que detectan anticuerpos circulantes y no todos los pacientes con infecciones amebianas despiertan una adecuada respuesta de inmunidad humoral, ésta es sólo del 50-80 % en pacientes con disentería amebiana severa, el 85-90 % en casos de absceso hepático y sólo unos cuantos pacientes con diarrea amebiana presentan anticuerpos circulantes (50).

La colonización del intestino con cepas patógenas, despierta una respuesta de anticuerpos, pero la colonización con cepas no patógenas, raramente induce una respuesta inmune.

Aunado a lo anterior, sólo algunas técnicas son aplicables a estudios serológicos y a pruebas rutinarias del laboratorio, siendo en su mayoría las menos específicas, debido a que las otras tienen un alto costo y dependen del manejo de equipo especializado (50).

En la mayoría de los casos, para el diagnóstico de la amebiasis intestinal se realizan estudios coproparasitoscópicos, éstos están basados en el hallazgo de la forma vegetativa o quística de E. histolytica (9,11, 14,50). Hoy en día es el método más empleado para el diagnóstico de infecciones amebianas intestinales, teniendo cierto grado de dificultad

para interpretarlo.

El examen directo, ya sea de preparaciones frescas, fijadas y teñidas, generalmente detectan las infecciones graves, aún así es necesario repetir los exámenes en varias ocasiones, ya que los parásitos pueden presentarse intermitentemente. Las infecciones leves de los eliminadores de quistes, se pueden detectar mediante técnicas de concentración, como la de flotación con sulfato de zinc, y otras (40,50).

Las diferentes metodologías empleadas en estudios coproparasitológicos para localizar la presencia de protozoarios se resumen en la siguiente lista:

- 1) Montaje húmedo directo salino/yodo.
- 2) Tinción de hematoxilina-férrica.
- 3) Tinción de tricromo.
- 4) Tinción con azul de metileno.
- 5) Con solución de Sargeaunt.
- 6) Tinción clarazol negro E.
- 7) Formalina-Yodo-Merthiolathe (MIF).
- 8) Fijación por Schaudinn.
- 9) Fijación con alcohol polivinílico (PAV).
- 10) Formalina (4-10 %).
- 11) Flotación por sulfato de zinc.
- 12) Flotación salina.
- 13) Sedimentación éter-formol.
- 14) Sedimentación formol-etil acetato.
- 15) Cultivo.

16) ELISA

17) Inmunofluorescencia

18) Otras

Varias de estas técnicas empleadas para exámenes coproparasitológicos tienen los siguientes inconvenientes: requieren de tiempos prolongados, tediosos, en la mayoría de los casos se necesitan por lo menos tres -- muestras para poder emitir un diagnóstico etiológico, así como también contar con personal experimentado para su implementación y diferenciación morfológica de los diversos parásitos intestinales (9,50).

En recientes estudios se han adaptado técnicas más avanzadas, para emitir el diagnóstico de una amibiasis intestinal como son: el método inmunoenzimático (ELISA) e inmunofluorescencia (50).

Se ha visto que la detección de antígeno soluble en heces, para diagnosticar amibiasis intestinal por el método inmunoenzimático (ELISA), posee una gran sensibilidad y especificidad, por lo que hace a esta técnica la más confiable, con respecto a otras técnicas coproparasitológicas, teniendo como inconveniente principal su alto costo, por lo que no hace accesible este equipo a todos los laboratorios de rutina.

B. REACCION DE COAGLUTINACION COMO NUEVA OPCION.

B.1. Reacción de coagulación.

En una reacción de coagulación intervienen tres reactivos principales: - Proteína A de Staphylococcus aureus

- Gamma globulina específica contra un determinado antígeno
- Antígeno que se desea detectar.

La reacción entre proteína A y la gamma globulina no es en realidad una reacción antígeno-anticuerpo; se considera más bien a este efecto como una reacción pseudoimmune, ya que el sitio activo de la fracción Fab de la gamma globulina queda libre y sin sufrir modificación alguna (11,45). Al realizarse la reacción pseudoimmune, la gamma globulina queda unida por el fragmento Fc y expuesta la fracción Fab de la molécula de gamma globulina.

En esta reacción pseudoimmune, interviene la bacteria (S. aureus), la cual es tomada como soporte sólido para la molécula de gamma globulina soluble. Por lo tanto intervienen en esta reacción un soporte sólido y moléculas de gamma globulina y se denomina a la unión como anticuerpos en fase sólida.

El anticuerpo que se une a la proteína A debe ser específica contra algun antígeno determinado, con lo cual el anticuerpo adquiere más firmeza, se adhiere más fuertemente al antígeno y en muchos casos la fase sólida puede intervenir en la detección de alguna reacción Ag-Ac formando un complejo detectable por aglutinación macroscópica. A esta reacción Ag-Ac, con el Ac adherido a una fase sólida se le conoce como reacción de coagulación (10,17,18,45).

B.2. Proteína A. Antecedentes.

En 1940 durante el desarrollo de pruebas serológicas para la tipificación de cepas patógenas de Staphylococcus, Verwey (45) describió la presencia de una proteína altamente antigénica sobre la pared celular de - Staphylococcus como el mayor componente concentrado en una de sus cuatro fracciones. Más tarde Lofkvist y Sjoquist (45) purificaron esta - proteína de S. aureus, confirmando su naturaleza protéica y descubrieron en suero humano normal la presencia de anticuerpos aparentemente - naturales en contra de ella. Grov col. (45) en una purificación más rigurosa y un estudio analítico establecieron la identidad del antígeno A como una proteína simple y propusieron llamarle proteína A. (45).

Forsgren y Sjoquist investigando la naturaleza de la reacción entre la proteína A y la IgG, establecieron que la unión ocurre sólo en la fracción cristalizable (Fc) de la IgG humana, este tipo de reacción se le llamó "Reacción pseudoimmune" (10,17,45).

Kronvall y col. confirmaron la reactividad de la proteína y determinaron que la unión se llevaba a cabo en los subgrupos 1,2 y 4 y no había interacción con la gamma G₃. Ellos establecieron que cada microorganismo de S. aureus cepa Cowan I contenía aproximadamente 80 000 moléculas de proteína A (45).

La proteína A tiene un peso molecular de 42 000 d, está covalentemente unida al peptidoglicano de la pared celular, es estable a un amplio - rango de pH, es altamente resistente a la desnaturalización con agentes químicos y físicos, y tiene aproximadamente 3 o 4 sitios de unión

para la Fracción cristalizable (Fc) altamente homólogos (17,45).

B.3. Localización, biosíntesis y aislamiento de la proteína A.

Localización.- Se ha demostrado que la proteína A de S. aureus es un -- componente de la pared celular, esto puede comprobarse por técnicas indirectas, tales como aglutinación de la bacteria con gamma globulina o por estudio del ataque de ésta, a la pared celular bajo un microscopio electrónico (10,17,52).

El contenido de la proteína A de la pared celular, que en su mayoría es tá constituida por peptidoglicano, indica que la distribución de la proteína A en la pared celular es de un mol por 325 moles de peptidoglicano monomérico. Esto está basado sobre un peso molecular para la proteína A de 42 000 y para peptidoglicano monomérico de 1141.

Las paredes celulares aisladas, tratadas con lisostafina, pueden liberar proteína A. Las propiedades inmunológicas y la composición química son las mismas que la de la proteína A, aislada de la bacteria intacta.

Biosíntesis.- Casi todas las cepas de S. aureus de origen patógeno contienen proteína A. En la pared celular, la proteína está ligada covalentemente al peptidoglicano, pero el punto exacto de la unión no está esclarecido. Durante el crecimiento celular, la proteína se incorpora a la pared celular y también se libera hacia el medio de crecimiento y -- comprende una tercera parte de la proteína A que produce la bacteria. Existen también cepas de S. aureus, que no son capaces de incorporar -- proteína A a la pared celular y la liberan toda hacia el medio de crecimiento. Este fenómeno se observa en cepas resistentes a la metilicina.

La proteína A es liberada por la bacteria sin pasar por un estado citoplásmico soluble, se incorporan a la pared celular, uniéndose covalentemente con el peptidoglicano previamente sintetizado (17).

Aislamiento.- El aislamiento de la proteína A se puede hacer por digestión con lisostafina para liberar la proteína; posteriormente se precipita con sulfato de amonio al 80% y el precipitado se disuelve en agua y se dializa a 4° C. La muestra se aplica a una columna de DEAE-Sephadex para realizar una cromatografía, usando como eluyente bicarbonato de amonio 0.1-0.4 M pH 8. Se observa la absorbancia a 280 nm y la concentración de la proteína con las fracciones colectadas. Se prueban diversas fracciones para ver la reactividad de la proteína A por inmunodifusión en gel de agarosa contra IgG humana (10,17).

Después de la hidrólisis ácida de la proteína A, el número de aminoácidos calculado en base a la composición integral es de 378, con un error estimado de ± 6 aminoácidos, y la fórmula del peso existente es de -- 41 944. Las condiciones moderadas de hidrólisis establecen que algunas preparaciones de proteína A contienen menos de 0.2 % de hexosaminas.

Sabiendo que la proteína A precipita dentro de la región de exceso de IgG se calcula la relación molar entre IgG y proteína A, lo cual muestra que una mol de proteína A enlaza tres o cuatro moles de gamma globulina (10,17,45).

B.4. Propiedades fisicoquímicas.

La caracterización fisicoquímica de la proteína A es de importancia para la determinación de la estructura química de la misma y para comprender su función biológica.

El peso molecular de la proteína A puede determinarse por el equilibrio de sedimentación. También puede medirse por cromatografía en gel de agarosa en guanidina-HCl 6 M. El promedio del peso molecular por estos análisis es de 41,900 y el coeficiente de sedimentación de proteína A es de 2.1. Por los procesos de reducción y alquilación llevados a cabo en la proteína A confirman que no contiene ningún enlace disulfuro (S-S). Estudios químicos muestran que la proteína A no contiene cisteína, ni cistina y esto sugiere que no está compuesta de cadenas de polipeptido unidas por enlaces no covalentes ni por puentes disulfuro (17).

En algunos estudios hidrodinámicos de proteína A se evidencia que no se comporta como una proteína globular típica; debido a que su radio fraccional (2.1) y su viscosidad intrínseca (294 g/ml), son mucho más altos que para tales proteínas y del mismo orden de magnitud que para el fibrinógeno. La explicación sería, que la proteína A puede existir como una espiral lineal, puede ser una molécula rígida de forma extendida o la posibilidad de que contenga regiones de estructura ordenada, conectada por más segmentos flexibles de cadenas de polipéptidos.(17).

B.5. Propiedades biológicas.

La proteína A de S. aureus reacciona con la gamma globulina de mamíferos y más específicamente con el fragmento Fc (fracción cristalizante) de la IgG. Se ha establecido que todos los sueros humanos tienen los llamados anticuerpos naturales contra esta proteína de la pared celular y se demostró que la capacidad del suero normal humano para aglutinar frente a S. aureus, está basada en una reacción con este antígeno, el cual se

le dió el nombre de proteína A para distinguirla del polisacárido A.

La proteína A reacciona con gamma globulina de mieloma, observándose en una prueba de precipitación, líneas delgadas y tenues en comparación - con las bandas de precipitación de IgG normal.

Una molécula de IgG está compuesta de dos tipos de cadenas de polipépti do, H (pesadas) y L (ligeras). Se ha demostrado que el fragmento Fab es tá compuesto de porciones de cadenas H y porciones de cadenas L, mien- tras que el fragmento Fc únicamente de porciones de cadenas H (10).

Si la proteína A se incubaba con IgG normal o con cadenas H de IgG normal o IgG de mieloma, la reacción de precipitación del sobrenadante con IgG normal se inhibe completamente. No hay inhibición con cadenas L de IgG normal o de mieloma. También se observa que la parte reactiva de la molécula de IgG son las cadenas H, mientras que las cadenas L, no reaccio nan (10).

La reacción de la proteína A con el fragmento Fc y con cadenas H separa das, indican que el sitio de actividad real del anticuerpo, localizado en el fragmento Fab que contiene ambas cadenas H y L, no se involucra - en la reacción.

La IgG humana cuando reacciona para precipitar con la proteína A de -- S. aureus no es en realidad una reacción de combinación Ag-Ac, pero involucra el sitio en la parte Fc de la molécula, indicando probablemente la presencia de un sitio activo de combinación para la proteína A en la molécula de IgG (10,17).

Usando el método de difusión de Ouchterlony, se prueba la precipitación

de la proteína A contra subgrupos de cadenas H de IgG y se puede observar precipitación únicamente con los subgrupos IgG₁, IgG₂ y IgG₄, mientras que la reacción contra subgrupos IgG₃ no muestra ninguna reactividad, mostrando así una deficiencia antigénica con respecto a los otros subgrupos de IgG (10).

La ausencia de la reacción de la proteína A con IgG₃ puede ser debida a una deficiencia estructural distinta en la porción Fc de este subgrupo. Estas diferencias son claramente aparentes usando sueros selectivos en la descripción inicial de la cadena de subgrupo IgG₃.

La proteína contenida en S. aureus tratada con formol, puede ser utilizada como una partícula adsorbente de IgG. Esta reacción como se ha dicho no es en realidad una reacción Ag-Ac y puede confirmarse por descumbimiento de dos sueros de mieloma con alto título de anti-estreptolisina (ASO), que incrementa la capacidad para precipitar la proteína A, las actividades serológicas fueron detectadas en las mismas moléculas de inmunoglobulinas. Como puede verse, la actividad ASO se encontró en preparaciones del fragmento Fab, mientras que la reactividad contra la proteína A se detectó en preparaciones de la cadena H. Esto indica diferentes localizaciones de esta reactividad (17).

La presencia de reactividad de la proteína A en subgrupos de gamma globulina 1, 2 y 4 con ausencia de ella en el subgrupo 3, indica que la reactividad se adquiere en las cadenas H particulares producidas por tres genes diferentes.

B.6. Estudio químico y comportamiento inmunológico.

para el fraccionamiento de la proteína A se utiliza un cultivo de 18 - horas de la cepa Cowan I en agar nutritivo, cosechado y tratado para la extracción de la proteína A por precipitación con ácido tricloro - acético y etanol después de una digestión para la liberación de la pro teína A de la pared celular de la bacteria. Los precipitados ácidos se colectan, se disuelven en agua destilada y se dializan contra un flujo continuo de agua destilada. También se pueden utilizar columnas de intercambio iónico para purificar la proteína (10,17).

Las fracciones se examinan espectrofotométricamente, por pruebas de for mación de anillos de precipitación, y precipitación en gel de agar. Las fracciones positivas en las pruebas serológicas se colectan al vacío y pueden conservarse dializadas. Esta fracción se denomina proteína A pu rificada, que se ha seguido por métodos convencionales de aislamiento de proteína:

- Extrayéndola por ebullición durante una hora, seguida por precipita - ción a pH 3 con etanol.
- Usando filtración en gel y electroforesis.
- Digestión de S. aureus con lisozima, seguida por cromatografía de in - tercambio de DEAE-Sephadex y filtración en gel de Sephadex (17).

Se pueden tener ventajas utilizando una herramienta inmunológica, el - inmunoabsorbente, para una purificación rápida de proteína A en un -- solo paso. El método es para laboratorios donde la proteína A puede - ser de uso potencial en la tipificación de inmunoglobulinas. Así, cerca del 92 % de IgG humana normal puede combinarse con proteína A.

Se ha descubierto que las cepas de Staphylococcus aureus que son resis

tentes a la metilicina, no incorporan proteína A sobre su pared celular pero conservan su capacidad para sintetizar la proteína, la cual se excreta por estas cepas particulares hacia el medio, como una exotoxina. Estas pueden resultar convenientes para el procedimiento de purificación de la proteína A por inmunoadsorción (17).

La prueba de correlación entre la producción de proteína A en patogenicidad de Staphylococcus aureus es sensible y específica.

B.7. Aplicaciones de la reacción de coagulación.

Una excelente descripción de este tipo de prueba puede ser encontrada en resúmenes de Wasilauskas (45), quien enfatiza que la prueba de aglutinación ha sido útil en la detección tanto de antígeno soluble, así como de células intactas. Algunos ejemplos son la detección de enterotoxina termolábil de E. coli, la detección de antígenos de Haemophilus influenza tipo B (17), y antígeno de Legionella pneumophylax (45), en fluidos corporales, identificación rápida del virus de influenza, la seromicrocuantificación de microglobulina β_2 , y la detección de plasma seminal humano (45), serotipificación de Neisseria gonorrhoea, serotipificación de Mycobacteria e identificación de Streptococcus del grupo A (17).

II. PARTE EXPERIMENTAL.

A. Material biológico.

- Cepa de Staphylococcus aureus Cowan 1 (NCTC-8530, ATCC-12598).
- Albúmina sérica bovina.
- Gamma globulina monoclonal anti-Entamoeba histolytica (contra un antígeno de pared de E. histolytica, obtenido en ratón), proporcionado por el Instituto Nacional de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.
- Cepa de Entamoeba histolytica HM1-INSS. Proporcionada por el Centro Médico Nacional de México. I.N.S.S.
- Muestras biológicas: materia fecal fresca proporcionadas por el Instituto Nacional de Pediatría (antes DIF), el laboratorio de análisis clínicos LOME (Xochimilco, D.F.), y el Hospital General de México SSA.
- Controles: positivo.- Staphylococcus aureus forrado con gamma globulina monoclonal anti-E. histolytica + antígeno soluble amibiano.
negativo.- Staphylococcus aureus forrado con gamma globulina monoclonal anti-E. histolytica + sobrenadante de materia fecal negativa.
- Suero normal de conejo. Suero de conejo adsorbido con suspensión de Staphylococcus cepa Wood 46.

B. Medios de cultivo.

- Agar soya-tripticasa
- Caldo soya-tripticasa

C. Condiciones óptimas de crecimiento para la producción de la proteína

A.

La cepa Cowan 1 se siembra en cajas de Petri conteniendo agar soya-trip

licasa y se incuba durante 24-48 horas a 37°C con el fin de obtener un crecimiento para semilla.

Esta suspensión semilla de S. aureus se siembra en matraces Erlenmeyer conteniendo caldo soya-tripticasa previamente esterilizado. Se incuba durante 24-48 horas a 37°C con agitación constante, con el fin de obtener una oxigenación homogénea en todo el medio de cultivo. Bajo estas condiciones de crecimiento, se obtiene de la cepa Cowan I el mejor rendimiento en la producción de proteína A y además, incorporada a su pared celular.

Pueden utilizarse otros medios de cultivo para la producción de proteína A, como caldo C.C.Y. (Casein-Casein-Yeast), o medio de extracto de carne (17).

D. Fijación de proteína A en la bacteria.

Una vez crecida la bacteria en caldo soya-tripticasa se procede a cosechar el paquete celular, el que se separa del medio por centrifugación a 6000 rpm durante 15-20 minutos. Las bacterias obtenidas por centrifugación se lavan tres veces con buffer P.B.S. pH 7.2 que tiene la siguiente composición:

Buffer P.B.S. pH 7.2

KH_2PO_4	----- 0.15 M -----	24.0 ml
Na_2HPO_4	----- 0.15 M -----	76.0 ml
NaCl	----- 0.15 M -----	100.0 ml
NaN_3	----- 0.1 % -----	0.2 g

Los lavados con buffer eliminan todo resto de proteínas y sustancias -

que pueden sensibilizar a Staphylococcus. Después de los lavados, se suspende el paquete celular al 10 % v/v en el mismo amortiguador con 0.5 % de formol.

Esta suspensión bacteriana con formol se deja durante tres horas a temperatura ambiente con agitación ocasional, e inmediatamente se lava de nuevo tres veces con amortiguador P.B.S. para eliminar el formol y se suspende nuevamente al 10 % v/v con amortiguador P.B.S.

La suspensión bacteriana se trata con calor, sumergiendo la suspensión en un baño de agua a 80°C y dejándola expuesta a esta temperatura durante 5 minutos. Se retira la suspensión del calor y se enfría rápidamente en un baño de agua a 2-4°C y se mantiene hasta que alcance esta temperatura. Una vez tratada la suspensión bacteriana con calor y formol se hacen 2-3 lavados adicionales para eliminar impurezas y se hace una suspensión final al 10 % v/v en amortiguador P.B.S., con azida de sodio al 0.1 %.

En esta suspensión, la actividad de la protefina A se mantiene después de tres meses (permaneciendo en refrigeración a 4°C hasta su uso). Antes de usar el Staphylococcus para adsorberlo con la gamma globulina monoclonal anti-E. histolytica, las bacterias se centrifugan para eliminar el sobrenadante y se resuspenden a una concentración final de 10 % v/v en amortiguador P.B.S. pH 7.2 conteniendo NaCl (150 mM), EDTA (1 mM), NaN₃ (0.2 %), desoxicolato de sodio (0.5 %) y tween 80 (0.5 %), dejándose a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Posteriormente se centrifuga la suspensión para eliminar el sobrenadante y se lava una vez con P.B.S. El paquete celular se suspende en bu-

ffer P.B.S. al 10 % v/v, conteniendo un mg de albúmina sérica bovina - por ml.

Esta suspensión bacteriana se puede sensibilizar con gamma globulina - monoclonal anti-Entamoeba histolytica.

E. Técnica para el acoplamiento de gamma globulina monoclonal anti-E. histolytica con proteína A de Staphylococcus aureus.

Para poder tener una reacción de coaglutinación satisfactoria, deben tomarse en cuenta, desde la producción de la proteína A de S. aureus, hasta el anticuerpo específico que se desea unir a la proteína A.

En la producción de proteína A, se observa su máximo rendimiento utilizando la cepa Cowan I de S. aureus, que tiene como característica, además de producirla en gran escala, la fijación a su pared celular, ya que algunas cepas de Staphylococcus la secretan hacia el medio de cultivo y no la retienen sobre sí. Por ejemplo Staphylococcus cepa Wood - 46 produce proteína A, pero en menor escala en comparación de la cepa cowan I.

F. Incorporación de la gamma globulina a la proteína A.

La incorporación de la gamma globulina a la proteína A es específica e inmediata. Se adiciona 0.1 ml de gamma globulina monoclonal anti-E. histolytica (anticuerpo monoclonal de pared), sobre un ml de la suspensión al 10 % de S. aureus cepa Cowan I.

Después de mezclada la suspensión, se coloca a temperatura ambiente durante tres horas con agitación ocasional, a las tres horas se lava dos veces con buffer P.B.S. y se suspende al 1 % en el mismo conteniendo azi

da de sodio. Esta se mantiene a 4°C. y contiene a Staphylococcus forrado de gamma globulina monoclonal anti-E. Histolytica, lista para reaccionar frente a el antígeno soluble específico (E. histolytica), que -- puede detectarse por reacción macroscópica de aglutinación.

G. Tratamiento de muestras.

El antígeno soluble de E. histolytica puede ser extraído directamente de las muestras de heces del día, haciendo una suspensión al 10 % aproximadamente con solución salina isotónica.

Se adiciona de 9 a 10 ml de solución salina isotónica por cada gramo -- aproximado de materia fecal. Algunas veces se agita vigorosamente y se deja reposar tres minutos. De la suspensión anterior se toma una pequeña porción y se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos.

El sobrenadante claro contiene la mayor parte del antígeno soluble y -- el precipitado puede ser desechado.

Desarrollo de la prueba.

- 1.- La prueba se realiza con el reactivo de coagulación al 1 % preparado anteriormente (S. aureus forrado de gamma globulina monoclonal anti-E. histolytica).
- 2.- En una placa para aglutinación se colocan en tres distintas áreas -- de reacción:
 - Una gota del sobrenadante problema.
 - Una gota del sobrenadante control positivo.
 - Una gota del sobrenadante control negativo.

- 3.- Se le adiciona una gota del reactivo de coaglutinación a cada área de reacción.
- 4.- Mezclar perfectamente con aplicadores distintos. Agitar la placa con movimiento rotatorio por 2 a 3 minutos.

Interpretación de la prueba.

- 1.- El control positivo deberá dar una aglutinación macroscópica a la - cual pueden ser referidas las muestras problema.
- 2.- El control negativo deberá dar una suspensión homogénea, que debe - tener la muestra negativa.
- 3.- La lectura deberá realizarse dentro de los primeros 3-4 minutos. Si posteriormente llegará a dar positiva la prueba, no debe ser tomada en cuenta esta reacción, se recomienda repetir la prueba.

H. Pruebas control.

H.1. Control de actividad de la proteína A.

Con el fin de observar la actividad se puede realizar la siguiente reacción. Se puede pegar primeramente gamma globulina normal a la proteína A, de la misma manera que la gamma globulina monoclonal anti-Entamoeba histolytica.

La suspensión final se prueba con un suero de Coombs y se observan los resultados siguientes:

<u>S. aureus</u> (Cowan I)	Suero de Coombs-	Aglutinación macroscópica
sensibilizado con +		a los 15 seg.
γ -globulina humana		
normal.	Sol. salina I. -	Suspensión homogénea a los
		3 min.

En esta reacción también podemos observar si la gamma globulina se ha adsorbido sobre la pared de Staphylococcus por la fracción Fc.

H.2. Control de actividad del reactivo preparado (S. aureus forrado de gamma globulina monoclonal anti-E. histolytica).

Para la prueba del control positivo, se hace reaccionar; S. aureus forrado con gamma globulina monoclonal anti-E. histolytica frente a un extracto de heces en solución salina conteniendo antígeno soluble de E. histolytica HM1-IMSS. Por otro lado se coloca sobre el extracto control positivo una suspensión de Staphylococcus forrado con suero normal de conejo, observándose los siguientes resultados:

<u>Staphylococcus</u> sensibilizado con gamma globulina monoclonal anti- <u>E. histolytica</u>	<u>Staphylococcus</u> sensibilizado con suero normal de conejo
---	---

+

+

Extracto de heces con E. histolytica
(Eh/Eh).

Eh/Eh

Aglutinación de 1 a 2 minutos Suspensión homogénea en 3 minutos.

La suspensión de Staphylococcus sensibilizado con gamma globulina monoclonal anti-E. histolytica se coloca también frente a solución salina isotónica, para observar si hay alteraciones de la misma suspensión o presencia de autoaglutinación del reactivo preparado.

I. Determinación de la sensibilidad del reactivo preparado.

Preparación.- El antígeno soluble ambiano se preparó a partir de E. histolytica cepa HM1-IMSS de cultivo axénico, a la cual se inactivó por

repetidos cambios de temperatura, de 75 a 0°C, y se centrifugó a 5000 - rpm durante 15 minutos. Al sobrenadante obtenido se le determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry (3.3 mg/ml). A éste se le denominó ANTIGENO AMIBIANO SOLUBLE. (ver apéndice).

A partir del antígeno amibiano soluble preparado anteriormente se realizaron las diluciones respectivas y se adicionaron éstas a un gramo de - materia fecal (fresca y negativa por examen coproparasitoscópico), como muestra la tabla I. Se mezclaron y se dejaron reposar por 24 horas después de las cuales se procedió a probarlas y determinar la sensibilidad del reactivo preparado.

No. Mtra	Mat. fecal	Conc. Antígeno amibiano soluble(mg/ml)
1	1 g	3.3
2	"	2.64
3	"	1.98
4	"	1.32
5	"	1.09
6	"	0.66
7	"	0.33
8	"	0.264
9	"	0.198
10	"	0.165
11	"	0.132
12	"	0.099
13	"	0.066
14	"	0.033
15	"	0.026
16	"	0.0198
17	"	0.0132
18	"	0.0066
19	"	C(+) Control positivo
20	"	C(-) Control negativo

TABLA I. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DEL -
REACTIVO PREPARADO.

Materia fecal con diferentes diluciones del antígeno amibiano soluble.

III. RESULTADOS Y DISCUSION.

En este estudio se probaron un total de 200 muestras fecales, a las cuales se les realizó previamente un estudio coproparasitológico por técnicas de flotación y examen al microscopio, en el Instituto Nacional de Pediatría (antes D.I.F.), en el Hospital General de México SSA. y en el Laboratorio de Análisis Clínicos LOME (Xochimilco).

Las muestras fueron tratadas de acuerdo a la técnica descrita anteriormente y se probaron por la reacción de coagulación ya descrita, obteniéndose los siguientes resultados:

SENSIBILIDAD DEL REACTIVO PREPARADO.

La tabla II muestra los resultados obtenidos para determinar la sensibilidad del reactivo (S.aureus forrado con gamma globulina monoclonal --- anti-E. histolytica).

No. Mtra.	Mat. fecal	Conc. Ag sol. (mg/ml)	Resultado.
1	1 g	3.3	++++
2	"	2.64	++++
3	"	1.98	++++
4	"	1.32	++++
5	"	1.09	++++
6	"	0.66	++++
7	"	0.33	++++
8	"	0.264	++++
9	"	0.198	++++
10	"	0.165	++++
11	"	0.132	+++
12	"	0.099	++
13	"	0.066	-
14	"	0.033	-

Continuación de la tabla II.

No. Mtra.	Mat. fecal	Conc. Ag Sol. (mg/ml)	Resultado.
15	1 g	0.026	-
16	"	0.0198	-
17	"	0.0132	-
18	"	0.0066	-
19	"	C(+)	+++
20	"	C(-)	-

TABLA II. SENSIBILIDAD DEL REACTIVO.

Este método tiene una sensibilidad que permite detectar $\geq 100 \mu\text{g}$ de proteína de antígeno ambiano soluble por gramo de heces, que equivalen a más de 200 trofozoítos (53).

En estos resultados se nota una alta sensibilidad del reactivo preparado (S. aureus forrado con gamma globulina monoclonal anti-E. histolytica) que llega a detectar hasta $100 \mu\text{g}$ de antígeno ambiano soluble por gramo de heces.

Las pruebas se realizaron por triplicado y se comparó en cada caso con los respectivos controles positivo y negativo. La alta antigénicidad de E. histolytica tal vez es uno de los factores que realzan la sensibilidad del reactivo, aunado a esto la gran sensibilidad que tiene por sí misma la reacción de coaglutinación (45).

Por lo anterior puede verse que el reactivo es capaz de detectar cantidades muy pequeñas del antígeno ambiano soluble presente en heces, lo que podría ayudar a discriminar muestras parasitadas de las no parasitadas.

ESPECIFICIDAD DEL REACTIVO PREPARADO.

Los resultados de las 200 muestras probadas por examen coproparasitos-cópico y reacción de coaglutinación se muestra en la tabla III.

Parásito enc. por:	Examen CPS	Reac. Coaglutinación		% positividad
		+ <i>E. histolytica</i>	-	
<u><i>E. histolytica</i></u>	47	46	1	98 %
<u><i>E. coli</i></u>	24	12	12	50 %
<u><i>A. lumbricoides</i></u>	30	1	29	3.3 %
<u><i>T. trichiura</i></u>	8	0	8	0.0 %
<u><i>E. hominis</i></u>	5	0	5	0.0 %
<u><i>G. lamblia</i></u>	1	0	1	0.0 %
Negativas	85	26	59	30.5 %
Subtotales	200	92	108	-
Totales	200	- 200 -		-

TABLA III. ESPECIFICIDAD DEL REACTIVO PREPARADO.

Los resultados anteriores podemos graficarlos de la siguientes manera:

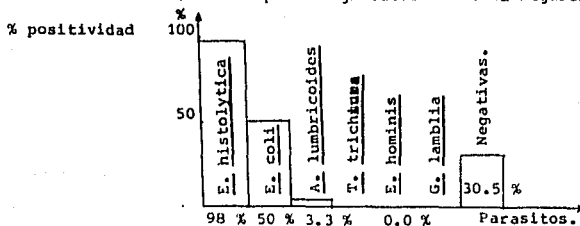


Fig. 1 GRAFICA DE ESPECIFICIDAD DEL REACTIVO

Esta gráfica nos muestra la capacidad discriminativa que posee el reactivo preparado (*S. aureus* forrado con gamma globulina monoclonal anti-

E. histolytica), notándose una elevada especificidad para detectar -- E. histolytica (98 %). Por otro lado Entamoeba coli parece no ser bien reconocida por el examen coproparasitológico, teniendo en cuenta que - en la mayoría de los casos su identificación al microscopio se hace difícil distinguir Entamoeba coli de una E. histolytica, ya que muchas veces se confunde una de otra, por el tamaño, siendo necesario para esto, gran habilidad y experiencia por parte del examinador. Inclusive muchas veces una infección con E. coli va acompañada de E. histolytica (43). Nuestro reactivo, es altamente eficiente debido a que la gamma globulina monoclonal que está adsorbida sobre el S. aureus es específica contra la pared de E. histolytica, por lo que tiene la capacidad de discriminar a E. coli de E. histolytica.

Los resultados de las muestras coproparasitológicas, pueden dar falsos negativos, debido a que depende de que la enfermedad no esté en un estado inicial y/o que no haya tratamientos previos; por lo que siempre se sugiere realizar estudios seriados. Por lo anterior la prueba de -- coaglutinación en casos negativos puede demostrar la presencia de la - enfermedad.

En el caso de Giardia lamblia, Enteromonas hominis y Trichuris trichiura por lo tanto la positividad por reacción de coaglutinación fue de 0.0 % notándose un alto grado de especificidad del reactivo. No obstante el - número de muestras estudiadas, no es representativa para descartar una probable reacción cruzada con Entamoeba histolytica. Por lo que un estudio más detallado podría o no dar la confirmación de nuestros resultados. Al ser probado el reactivo con otros parásitos intestinales, se -

nota una discriminación elevada de estos, con casos aislados de positividad por ejemplo: Ascaris lumbricoides (3.3 %), de los cuales sólo podemos decir, que pudieran haber pasado desapercibidos algunos quistes - de E. histolytica en el examen coproparasitoscópico y por lo tanto dar reacción positiva por la técnica de coaglutinación, ya que muchas veces una enfermedad parasitaria intestinal puede ser debida a otros parásitos, o en su defecto que el paciente sea un portador sano de Entamoeba histolytica al que no se le presentó un típico cuadro clínico ambiano, sino el debido a otro parásito.

IV. CONCLUSIONES.

La reacción de coaglutinación es una técnica inmunológica confiable para la identificación de Entamoeba histolytica en heces, es sensible, es específica y no depende de la experiencia en el reconocimiento de la forma vegetativa o quística del parásito. Además tiene la ventaja que la prueba se realiza en un tiempo corto.

El reactivo preparado para este estudio (S. aureus forrado con gamma - globulina monoclonal anti-E. histolytica), tiene una alta sensibilidad, pues es capaz de detectar hasta 100 µg de antígeno amibiano soluble por gramo de heces; y una elevada especificidad para discriminar únicamente E. histolytica de entre otros parásitos intestinales. No obstante el haber encontrado positividad a E. histolytica también en muestras positivas a E. coli (12 muestras) y negativas (26 muestras) obtenidas por examen coproparasitológico. Esto último se puede deber a que los quistes de E. histolytica pasaron inadvertidos al momento de realizar el examen (ver análisis de resultados).

Al comparar las ventajas de la técnica coproparasitológica con la de coaglutinación, se desprende que esta última es superior, pues se evita la dificultad que implica el escrutinio y discriminación de parásitos al microscopio. Esto hace que la reacción de coaglutinación sea una nueva opción para el diagnóstico de amibiasis intestinal, lo que le permitiría fuera implementada en laboratorios de rutina, como una prueba confirmativa de amibiasis intestinal y prevenir un probable caso de amibiasis extraintestinal, que pudiera llegar a provocar un absceso hepático, debido a la frecuencia que tiene este parásito en la población de nues-

tro país.

Resumiendo, podemos decir que la reacción de coagulación puede ser de gran utilidad al sector salud en nuestro país por las ventajas que ofrece, pero para su implementación se hace necesaria la afinación de la técnica.

Con el auge que actualmente han adquirido el estudio y producción de anticuerpos monoclonales, en un futuro esta técnica puede tener las ventajas de alta sensibilidad y especificidad a un bajo costo, que es comparable a otras técnicas que por su alto costo (ELISA), las hacen inaccesibles a muchos laboratorios clínicos de rutina.

V. APENDICE.

DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METCDO DE LOWRY.

Reactivos:

- a) Sulfato de cobre pentahidratado al 1.0 %.

Disolver 1 g de sulfato de cobre pentahidratado en 50 ml de agua des
tilada, aforar a 100 ml con agua destilada.

- b) Solución de tartrato de sodio y potasio al 2,0 %.

Disolver 2 g de tartrato de sodio y potasio en 50 ml de agua destila
da, aforar a 100 ml con agua destilada.

- c) Solución de carbonato de sodio al 2.0 %.

Disolver 2 g de carbonato de sodio en 50 ml de hidróxido de sodio 0.1
mol/l. aforar a 100 ml con solución de hidróxido de sodio.

Solución I.

- Se prepara mezclando 1 ml de la solución de sulfato de cobre pentahi-
dratado y 1.0 ml de la solución de tartrato de sodio y potasio en 100
ml de la solución de carbonato de sodio (es necesario hacerla justa-
mente antes de su uso).
- Reactivo de fenol Folin-Ciocalteau (comercial) 2 N: antes de usarlo -
se diluye volumen a volumen con agua destilada para ponerlo 1 N.
- Solución de albúmina sérica bovina conteniendo 100 ug/ml.
Disolver 0.1 g de albúmina sérica bovina (ASB) cristalizada y purifi-
cada en 500 ml de agua destilada, se afora a 1000 ml con agua desti-
lada.

Método:

- Preparación de la curva estandar:
- En una serie de tubos de ensayo, se preparan a partir de la solución de ASB, diluciones que contengan 20, 40, 60, 80 y 100 ug de proteína por ml.
- En otros tubos, se mide 0.1 ml de la muestra de antígeno (Ag).
- Se completa el volumen a 1.0 ml con agua destilada.
- Se añade 3.0 ml de la solución I.
- Se agita y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
- A cada tubo se le agrega 0.3 ml de reactivo de fenol Folin-Ciocalteu 1 N.
- Se agita y se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se hace la lectura de la D.O. en un colorímetro a 500 nm de longitud de onda.

Interpretación.

- Se grafica la D.O. contra la concentración usando papel milimétrico.
- Se obtiene la concentración de proteínas del antígeno por interpolación de los valores de D.O. en la curva patrón.

VI. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arellano, J.; Miranda, R.; et al: HLA y absceso hepático amibiano. Resúmenes del X seminario sobre amibiasis. México D.F. 1986. p. 52.
- 2.- Arroyo, R.; Orozco, E.: Localización e identificación de adhemiba I una proteína que participa en la adhesión de Entamoeba histolytica a eritrocitos humanos y células epiteliales. Resúmenes del X seminario sobre amibiasis. México D.F. 1986. p. 14.
- 3.- Biagi, F. F.; Buentello, L.: Inmovilization reaction for the Diagnosis of amibiasis. J Exp Parasitol. 1961. 11; 188-190.
- 4.- Bränd, H.; Pérez, T.R. Amibiasis. 2a. edición, La prensa médica - mexicana. México D.F. 1970. p. 3.
- 5.- Calderón, A. E. S.; Navarrete, A. y Tovar, R.: Estudios de antígenos de superficie de Entamoeba histolytica con anticuerpos monoclonales. Resúmenes del X seminario sobre amibiasis. México D.F. 1986 p. 26.
- 6.- Calderón, S. M.: Clasificación de cepas de Entamoeba histolytica - aisladas de heces con base en sus isoenzimas. Facultad de Química U.N.A.M. México D. F. 1986 pp. 1-15.
- 7.- Cole, B.A.; Kent, J.F.: Inmovilization of Entamoeba histolytica in vitro by antiserum produced in the rabbit. P.S.E.B.M. 1953, 83: - 811-814.
- 8.- Daimond, L.S.: A new medium for the cultivation axenic of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. Roy Soc Trop Med Hyg 1978, 72: 43.
- 9.- Del Muro, R.; Oliva, A. y Ortiz, O.L.: Prueba diagnóstica para determinar Entamoeba histolytica en heces. Resúmenes del X seminario sobre amibiasis México D.F. 1986. p. 44.

- 10.- Forsgren, A. y Sjöquist, J.: Protein A from S. aureus I. Pseudo-Immune reaction with human gamma globulin. J Immunol 1966, 97: - 822-827.
- 11.- Faust, E.C.; Russell, P.R. y Jung, R.C.: Parasitología Clínica. 4a. reimpresión. Salvat Mexicana de Ediciones, México D.F. 1981 - pp. 135-170.
- 12.- González, M.; Gutiérrez, G.: Reducción en la letalidad por absceso hepático amibiano. Experiencia en un Hospital Pediátrico Mexicano. Resúmenes del X seminario sobre amibiasis. México D.F. 1986 p. 53.
- 13.- Grundy, M.S.: Antigen Fraction from Entamoeba histolytica strain HK-9 for use in ELISA. Arch Invest Méd. 1982, 13: 249-253.
- 14.- Guerrant, R.L.: The global problem of amibiasis: current status - reserch needs, and opportunities for progress. Rev Inf Dis 1986. 8: 218-227.
- 15.- Gustafson, G.T.; Sjöquist, J. y Stalenheim, G.: Protein A from - Staphylococcus aureus. II. Arthus-Like reaction produced in rabbits interaction of protein A and human gamma globulin. J inmunol 1967. 98: 1178-1181.
- 16.- Gutiérrez, G.: Epidemiología y control de la amibiasis. La amibia sis en México. Resúmenes del X seminario sobre amibiasis. México D.F. 1986. pp. 65-67.
- 17.- Gutiérrez, R.A.: Identificación de Streptococcus del grupo A por reacción de coagulación. Tesis Facultad de Química U.N.A.M. - México D.F. 1981. pp. 1-40.
- 18.- Handsher, R.; Fogel, A.: Modified Staphylococcal abasortion method used for detecting Rubella-specific immunoglobulin M antibodies - during a Rubella epidemic. J Clin Microbiol 1977. 5: 588-592.

- 19.- Healy, G.R.: Immunologic tools in the diagnosis of amebiasis. Epidemiology in the United States. Rev Inf Dis 1986. 8: 239-246.
- 20.- Hernández, V.R.; Muñoz, H.O.: Identificación de antígeno amebiano circulante en el hombre por análisis inmunoenzimático. I. Desarrollo de la técnica. Arch Invest Méd México. 1982. 13: 297-300.
- 21.- Hoffman, E.O.: Immunofluorescent staining of amoebae in routine paraffin-embedded tissues. J Parasitol 1975. 61: 1104-1105.
- 22.- Jiménez, C.E.; Olvera, S.J.: Purificación parcial de algunos antígenos de superficie de Entamoeba histolytica. Investigación de la actividad biológica frente a sueros de pacientes con absceso hepático amebiano. Arch Invest Méd México 1982. 13: 281-289.
- 23.- Kaur, U.; Dilawari, J.B. y Anand, B.S.: Role of amoebic antigen in diagnosis of bloody diarrhoea. Indian J Méd Res 1982. 75: 223-226.
- 24.- Kearney, R.; Chia, E.: Detection of membrane associated antigens on lymphoid cells by antibody coupled to Staphylococcal protein A. J Immunol 1975. 114: 1143-1146.
- 25.- Kessler, S.W.: Cell membrane antigen isolation with the Staphylococcal protein A antibody adsorbent. J Immunol 1976, 117: 1482-1490.
- 26.- Kessler, S.W.: Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A. Antibody adsorbent: parameters of the interaction of antigen-antibody complexes with protein A. J Immunol 1976. 115: 1617-1624.
- 27.- Knight, R. Surveys for amoebiasis. Interpretation of data and their implications. Ann Trop Med and Parasitol 1975. 69: 35-48.
- 28.- Knobloch, J.; Mannweiler, E. y Höfler, W.: Efficiency of serodiagnosis in amoebiasis. Results obtained by four different tests in 13458 persons with varying exposure. Trop Parasitol 1982. 33:107-110

- 29.- Lee, E.; Palacios, O. y Sepúlveda, B.: Inmuno-electroforesis del antígeno amibiano axénico en presencia de suero de pacientes con absceso hepático amibiano. Arch Invest Méd México 1970. 1: 91-96.
- 30.- López, J.S.: Anticuerpos monoclonales contra Entamoeba histolytica Arch Invest Méd México 1982. 13: 291-295.
- 31.- Maitra, T.K.; Jalan, K.N.; Mohimen, A.: Detection of Entamoeba histolytica immune complexes in human tissues by a solid phase - sand with assay. Resúmenes del X seminario sobre amibiasis. México D.F. p. 45.
- 32.- Martin, R.; Russell, C.J.G.; White, A.: Human reactions to Staphylococcal antigens. J Immunol 1967. 99: 267-275.
- 33.- Mc Allister, T.A.; B.M.: Diagnosis of amoebic colitis on routine - biopsies from rectum and sigmoid colon. Br Med J 1962. 10: 362-364.
- 34.- Mendoza, F.; Arcos, L.; Ortiz, O.L.; Díaz, L.L.: Protein biosynthesis by Entamoeba histolytica in culture. Arch Invest Méd México - 1982. 13: 71-76.
- 35.- Miller, M.; Scott, F.: Serological test for amoebiasis. Br Med J 1974. 6: 59-60.
- 36.- Morris, M.N.; Powell, S.J.: Invasive amoebiasis: circulating antibody levels by latex agglutination test. So Afr Med J 1971. 45: 1206-1208.
- 37.- Oliva, A.; Correa, I.; Ortiz, O.L.: Inmunogenicidad de un nuevo antígeno deslipidizado de Entamoeba histolytica. Resúmenes del X seminario sobre amibiasis. México D.F. 1986. p. 39
- 38.- Ortiz, O.L.; et al: Un nuevo método de hemaglutinación para determinar anticuerpos contra Entamoeba histolytica. Arch Invest Méd - México 1978. 9: 351-355.

- 39.- Pawlowski, Z.S.: Strategies currently applicable for control of - amoebiasis. Resúmenes del X seminario sobre amibiasis. México D.F. 1986. p. 42.
- 40.- Ravdin, J.I.: Pathogenesis of disease caused by Entamoeba histolytica, studies of adherence secreted toxins and contact-dependent cytolysis. Rev Inf Dis 1986. 8: 247-260.
- 41.- Resano, P.F.; Arellano, T.J.: Detección de antígeno por el método de ELISA en el suero de pacientes con absceso hepático. Arch Invest Méd México 1982. 13: 301-305.
- 42.- Salata, R.A.; Ravdin, J.I.: Review of the human immune mechanisms directed against Entamoeba histolytica. Rev Inf Dis 1986. 8: 261-272.
- 43.- Schmidt, G.D.; Roberts, L.S.: Fundamentos de Parasitología. 1a. - edición, Ed. CECSA. México D.F. 1984. pp. 113-127.
- 44.- Sepúlveda, B.: Reacciones de hemaglutinación y de precipitación con antígeno amibiano axénico en amibiasis invasora. Arch Invest Méd. México 1970. 1: 111 - 115.
- 45.- Shantz, E. M.; Pansorbin: Staphylococcus aureus cells. Immunological applications of fixed protein A-bearing Staphylococcus aureus cells. CALBIOCHEM. Brand Biochemicals. Behring Diagnostics. Division of American Hoechst Corporation. 1983.
- 46.- Suksanong, M. y Adman, S. D.: Detection of Haemophylus influenzae type B antigens in body fluids, using specific antibody - coated Staphylococci. J clin Microbiol 1977. 5: 81-85.
- 47.- Tanimoto, M.; Aguirre G. J.: Inducción de inmunidad protectora antiamebiana en el hamster con antígeno soluble deslipidizado. Resúmenes del X Seminario sobre amibiasis, México, D.F. 1986. p. 40.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 48.- Trujillo, J.; Segovia, E.; Gallegos, J.; Resano, F.: Detección a largo plazo de anticuerpos antiambianos por contrainmunoelectroforesis y hemaglutinación indirecta. Arch Invest Med México - 1982. 13: 311-314.
- 49.- Walsh, J.A.: Amoebiasis in the world. Resúmenes del X Seminario sobre amebiasis, México, D.F. 1986. P. 25.
- 50.- Walsh, J. A.: Problems in the recognition and diagnosis of amoebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Inf Dis 1986. 8: 228-238
- 51.- Weir, D.M. Immunochemistry: Handbook of Experimental Immunology. Volume 1. Third edition. Blackwell Scientific Publications. 1979 pp. 844-876.
- 52.- Yoshida, A.; Mudd, S. y Lenhart, N. A.: The common protein agglutinin of Staphylococcus aureus. II. Purification, Chemical -- Characterization, and serologic Comparison with Jensen's antigen. J Immunol 1963. 91: 77-782.
- 53.- Ortiz, O. L.: Determinación de Entamoeba histolytica en heces por metodología ELISA con un anticuerpo monoclonal específico. Pub. - Ortho. Diagnostic Systems. México. 1986.