

144
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS
ANTI - Entamoeba histolytica MEDIANTE
AGLUTINACION DE PARTICULAS
DE LATEX



SECRETARIA DE EDUCACION
PUBLICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

AMANDO ALBERTO TIBURCIO BAEZ



MEXICO, D. F.

1990

TESIS CON
FECHA DE ORIGEN



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	2
I. GENERALIDADES	
A. AMIBIASIS. ASPECTOS GENERALES	
A.1 Epidemiología	3
A.2 Etiología	3
A.3 Aspectos biológicos	4
A.4 Patogénesis	5
B. ANTIGENOS AMIBIANOS	7
C. RESPUESTA INMUNE A ANTIGENOS AMIBIANOS	8
D. PRUEBAS PARA LA VALORACION DE LA RESPUESTA INMUNE	11
II. PARTE EXPERIMENTAL	
A. MATERIAL	13
B. METODO	14
B.1 Preparación de soluciones	14
B.2 Estandarización del reactivo	14
B.3 Desarrollo de la prueba	16
III. RESULTADOS Y DISCUSION	18
IV. CONCLUSIONES	23
V. APENDICE	25
VI. BIBLIOGRAFIA	27

INTRODUCCION

Es un hecho bien conocido que en México la amibiasis es frecuente y que representa un problema prioritario de salud. La información publicada señala que la infección se encuentra distribuida por todo el país, en forma independiente del clima, y que presenta una mayor incidencia en los medios mal saneados y de bajo nivel socioeconómico (9).

Los estudios epidemiológicos señalan a nuestro país como una de las áreas de mayor incidencia de amibiasis extraintestinal y específicamente de absceso hepático amibiano (9).

La detección serológica de anticuerpos anti*Amiba* es de gran utilidad en el diagnóstico de la amibiasis extraintestinal (10) y aunque existen diversas técnicas para ello, con una alta sensibilidad y especificidad como ELISA y CIEF, estas son laboriosas y de alto costo. Por esto se plantea la necesidad de utilizar una técnica sencilla y rápida en su ejecución a un bajo costo, como lo es la técnica de aglutinación de partículas de látex, que es especialmente útil cuando se requiere tomar una decisión terapéutica urgente como en el caso de una amibiasis extraintestinal fulminante.

El uso de la técnica de aglutinación de látex para el diagnóstico de la amibiasis invasora fue publicado por primera vez en 1970 por Morris y cols. (19,20,21) y el equipo diagnóstico de dicha técnica, fabricado en el extranjero, dejó de ser importado en nuestro país, por lo que se ha pensado que este trabajo aporta una alternativa para la preparación de los reactivos de dicha técnica en nuestro país para ser utilizados en nuestros laboratorios de diagnóstico.

OBJETIVOS

- Investigar los procesos para la elaboración de los reactivos utilizados en la técnica de aglutinación de partículas de látex para la detección de anticuerpos anti*amiba*, útil en el diagnóstico de la *amibiasis* extraintestinal.

- Valorar y comparar la técnica de aglutinación de látex para la detección de anticuerpos anti*amiba* con respecto a otra técnica inmunológica (HAI), así como su posible implementación en laboratorios de rutina, como una prueba auxiliar en el diagnóstico de la *amibiasis* invasora.

I. GENERALIDADES

A. AMIBIASIS. ASPECTOS GENERALES

A.1 Epidemiología

La amibiasis es una infección parasitaria distribuida prácticamente en todos los países del mundo. Se estima que en 1984 aproximadamente 500 millones de personas estaban infectadas por E. histolytica (29).

En México la amibiasis constituye un problema prioritario de salud y se ha visto que se encuentra extendida por todo el país, en forma independiente del clima y que predomina en los medios mal saneados y de bajo nivel socioeconómico (9). En nuestro país la frecuencia en la aparición de quistes de E. histolytica en heces va desde 0 hasta 55.5 % (9), siendo esta variación debida a factores como la toma de muestras no representativas, las deficiencias en las diversas técnicas parasitológicas utilizadas, y a la falta de capacidad del ejecutante.

En diversos estudios realizados se ha observado que en individuos con diarrea aguda, del 1-2 % están infectados con E. histolytica (9).

Las complicaciones de la amibiasis intestinal, como el absceso hepático amibiano se desarrolla en menos del 5 % de los casos de amibiasis intestinal (8).

A.2 Etiología

En el sentido estricto, el término amibiasis se define como la condición de albergar a alguna de las especies de amibas, como son: Endolimax nana, Entamoeba coli, Entamoeba hartmanni,

amibas de vida libre como: Entamoeba polecki y Iodamoeba butschlii, Dientamoeba fragilis y Entamoeba histolytica. De estas, solo las amibas de vida libre y las dos últimas son de importancia, ya que son capaces de causar patología en el hombre.

Sin embargo en la práctica se emplea el término amibiasis, para designar el estado de parasitosis causado por Entamoeba histolytica con o sin manifestaciones clínicas.

A.3 Aspectos biológicos

El ciclo de vida de Entamoeba histolytica es comparativamente simple, comienza con la ingestión de quistes provenientes de las heces de algún individuo infectado. Estos quistes pueden transmitirse por contacto directo con manos contaminadas (infección ano-mano-boca), alimentos y agua contaminados o por vectores biológicos como la mosca y la cucaracha (8).

Una vez ingeridos, los quistes pasan al estómago en donde por acción del jugo gástrico la pared quística es degradada parcialmente, posteriormente, los quistes llegan al intestino delgado inferior en donde de cada uno surge una amiba que contiene los cuatro núcleos quísticos, y de estos por división citoplasmática surgen ocho trofozoítos, los cuales continúan por el intestino hasta el área cecal o a un nivel más bajo del intestino grueso, en donde se reproducen por fisión binaria transversa para dar un número de trofozoítos capaces de colonizar cualquier porción del intestino grueso (generalmente la porción cecal y rectosigmoides) Se debe tener presente que el establecimiento de la amiba en el epitelio intestinal depende de diversos factores tanto del parásito como del huésped, algunos

aún no establecidos. Los trofozoítos en este punto pueden seguir dos caminos: 1) establecerse en el intestino 2) ser arrastrados al exterior con la materia fecal. En esta última si la salida no es muy rápida primero pasan por un estado prequístico y aparecen en las heces como quistes, completando así el ciclo biológico.

Se ha visto que la gran mayoría de las personas infectadas por amiba, no muestran signos clínicos (asintomáticos).

La razón de esta variación en la susceptibilidad no se ha esclarecido todavía. Se ha pensado que todas las especies de *E. histolytica* son potencialmente patógenas y mediante algún estímulo no conocido, se convierten de su estado comensal a verdaderos parásitos hísticos.

Otra idea alternativa sugiere que la virulencia es una propiedad intrínseca del parásito.

La virulencia de la amiba se ha relacionado con patrones isoenzimáticos (zimodemos) caracterizados en diferentes cepas patógenas y no patógenas, así como por su capacidad de fagocitar eritrocitos, con su asociación con ciertas bacterias y con la carga negativa presente en la superficie de los trofozoítos (3).

En diversos estudios se ha observado que los mecanismos implicados en la invasión tisular incluyen: secreción de enzimas, citotoxinas y mecanismos citolíticos contacto-dependientes (23,3).

A.4 Patogénesis

La gran mayoría de los individuos infectados por amiba son eliminadores asintomáticos de quistes (más del 95%).

El período de incubación después de la ingestión de quistes es generalmente de una a cuatro semanas, pero puede ser de meses.

La patología intestinal de la amibiasis se observa mas comunmente en el área cecal y rectosigmoideas, pero puede ocurrir lesiones en cualquier porción del intestino grueso. Estas lesiones son producidas por la diseminación de las amibas a través de la pared intestinal.

La infección intestinal aguda se caracteriza por la presentación de diarreas mucosanguinolientas (dientéricas), pujo, tenesmo y dolor abdominal.

Algunos pacientes presentan diarreas leves y dolor abdominal, sin lesiones intestinales demostrables por sigmoidoscopia (colítis no dientérica).

En la colítis amibiana puede encontrarse hepatomegalia dolorosa sin que haya datos de infección del hígado. Se piensa que dicho crecimiento del hígado es una respuesta tóxica a la infección intestinal (30).

En casos crónicos, se pueden observar lesiones granulomatosas (amebomas) que semejan carcinomas del cólon.

Las complicaciones de la amibiasis intestinal ocurren en aproximadamente el 1-4% de los casos, y la más común es la perforación de la cavidad peritoneal (provocando peritonitis aguda) (8).

Desde la pared intestinal, las amibas pueden entrar en vénulas portales o menos comunmente en linfáticos y ser llevadas a otras partes del cuerpo, generalmente al hígado (80% de los casos), aunque también se puede diseminar a otros órganos como pulmones, cerebro, riñones, corazón e incluso a piel.

La amibiasis extraintestinal se presenta en más del 50% de los casos en individuos sin antecedentes clínicos de amibiasis inva-

sora (8).

B. ANTIGENOS AMIBIARIOS

Los homogenados y extractos de amibas completas son las preparaciones más frecuentemente utilizadas para serodiagnóstico y estudios de inmunización contra amiba. La complejidad de estas preparaciones se ha demostrado por inmunolectroforesis bidimensional, en la que se han observado 32 bandas de precipitación. Se ha visto también que los antígenos presentes en estos preparados tienen un peso molecular que varía de 9000 a 150 000 Daltons (1).

La presencia de antígenos en la superficie de la amiba se ha demostrado por la interacción de estos con sueros inmunes marcados, mediante la lisis por complemento de trofozoítos mediada por anticuerpos y otras técnicas, pero existe la duda de si estos antígenos son producidos por la amiba o si son componentes del suero y medio utilizados en su cultivo, que se adhieren en su superficie y que son capaces de inducir una respuesta inmune humoral (28). Se han identificado alrededor de doce glicoproteínas en fracciones de membranas plasmáticas con una composición química muy compleja, y un glicocáliz cuyo papel en la inducción de la respuesta inmune no es muy clara (1,3).

Se ha encontrado también una lipídopéptidofosfoglicana, y en animales de laboratorio se han detectado anticuerpos de la clase IgA contra esta molécula.

Algunos estudios demuestran que el número de antígenos, el nivel de antigenicidad y la capacidad inmunogénica es mayor en fracciones vesiculares citoplasmáticas que en fracciones de membranas plasmáticas, por lo tanto el mayor estímulo para la produc-

ción de anticuerpos por el huésped será dado por los inmunógenos intracelulares más que por antígenos presentes en la superficie de los trofozoitos intactos. La baja inmunogenicidad de las amibas vivas puede ser responsable de la incapacidad del huésped en la prevención de la invasión por el parásito (1).

La obtención de antígenos amibianos ha sido posible gracias a que se ha podido cultivar al parásito "in vitro", con lo cual se obtiene una cantidad de amibas considerable para ser utilizadas en pruebas serodiagnósticas, estudios de la respuesta inmune etc.

E. histolytica se ha cultivado "in vitro" en una variedad de medios de cultivo complejos. Inicialmente se utilizaron medios moxonénicos (con una especie de bacteria u otro protozoario), posteriormente se desarrolló un medio axénico (libre de otros microorganismos) el cual facilitó ampliamente los estudios bioquímicos patológicos e inmunológicos de la amiba, pero con la desventaja de la pérdida de la capacidad de enquistamiento y disminución de la virulencia de las amibas cultivadas (28,3,4).

El medio axénico utilizado es muy complejo y está constituido principalmente de sales minerales, triptosa, tripticasa, extracto de levadura, suero bovino, vitaminas y antibióticos (4).

C. RESPUESTA INMUNE A ANTIGENOS AMIBIANOS

En la amibiasis como en cualquier otra infección, participan fenómenos de inmunidad humoral, inmunidad celular y mecanismos inespecíficos de resistencia a la infección.

De acuerdo a estudios seroepidemiológicos el 81-100% de los pacientes con amibiasis invasiva desarrollan anticuerpos circulantes específicos contra amiba (24). Estos anticuerpos son princi-

palmente de la clase IgG aunque también se encuentran presentes inmunoglobulinas M. Se ha visto que la inmunoglobulina A también se encuentra elevada aunque en proporción menor que las dos anteriores (25).

Algunos estudios "in vitro" revelan que las amibas tienen la capacidad de ingerir anticuerpos, así como la de liberar anticuerpos pegados al parásito; estos estudios sugieren un mecanismo por el cual la amiba puede escapar a la respuesta inmune humoral del huésped. Por lo anterior, la respuesta de anticuerpos no parece ser efectiva controlando o protegiendo contra la invasividad del parásito (24).

Sin embargo, los sueros de pacientes con altos títulos de anticuerpos anti-amiba son amebicidas a través de la activación del complemento ya sea por la vía clásica o la vía alterna.

En algunos estudios se observó que las cepas de amiba no patógenas (caracterizadas por patrones isoenzimáticos) fueron susceptibles a la lisis por complemento, mientras que las cepas patógenas (9 de 11) fueron resistentes a la lisis mediada por el complemento. De lo anterior se concluye que los mecanismos humorales de resistencia a la invasividad del parásito son directamente importantes por la vía del complemento (24).

Guerrant demostró que las cepas patógenas de E. histolytica tienen la capacidad de destruir neutrófilos mediante un mecanismo contacto-dependiente sin perder su viabilidad, mientras que los neutrófilos destruyen a las cepas de amibas menos virulentas.

Además de eliminar un importante mecanismo de defensa del huésped, la lisis de neutrófilos por amibas patógenas provoca la

liberación de enzimas tóxicas de los neutrófilos, las cuales contribuyen a la necrosis de tejidos en la amibiasis invasora.

Los estudios "in vitro" con células sanguíneas han dado evidencia de la participación de los mecanismos inmunes celulares contra E. histolytica (24).

Recientemente se ha descrito la interacción in vitro de leucocitos humanos de individuos no infectados con trofozoítos de amibas virulentas, y se observó que estas mataban células mononucleares de sangre periférica y linfocitos sin observación aparente de la pérdida de viabilidad de los trofozoítos.

Se ha visto también que los macrófagos activados son capaces de destruir a trofozoítos de E. histolytica mediante un mecanismo contacto dependiente indicado por examen microscópico, análisis cinético y estudios de adherencia (24).

En un estudio hecho por Salata, las amibas fueron destruidas por linfocitos de pacientes curados de absceso hepático amibiano, en contraste, con linfocitos de pacientes normales o con amibiasis aguda los cuales fueron fagocitados por los trofozoítos. Esto ocurre posiblemente debido a de algún producto secretado por los linfocitos, ya que los sobrenadantes obtenidos después de la incubación de linfocitos con antígeno amibiano son igualmente efectivos (24).

Recientemente se ha observado por medio de experimentos con anticuerpos monoclonales que los linfocitos T citotóxicos participan en la destrucción de trofozoítos. Por medio de técnicas de microscopía y estudios de adherencia se ha visto un mecanismo contacto dependiente necesario para la lisis de amibas por los lin-

focitos T citotóxicos.

Los estudios hechos por Salata demuestran que los linfocitos de pacientes tratados de absceso hepático amibiano eran estimulados por preparaciones solubles proteicas de amibas virulentas para destruir a los trofozoitos, en contraste, con linfocitos no estimulados en los cuales no se observó citotoxicidad para la amiba. Algunos estudios adicionales demuestran que el interferón es un componente de las linfocinas estimuladas por Concanavalina A y que es capaz de estimular a los macrófagos y linfocitos a destruir trofozoitos de amiba.

Por lo anterior, se observa que la respuesta inmune celular juega un papel muy importante en el control y protección contra la invasividad del parásito (24).

D. PRUEBAS PARA LA VALORACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE .

De acuerdo a estudios seroepidemiológicos, el 81-100% de los pacientes con amibiasis colónica invasiva o absceso hepático amibiano desarrollan anticuerpos circulantes específicos anti-amiba. Generalmente, los individuos con infección asintomática (probable colonización intestinal) desarrollan menos frecuentemente respuesta de anticuerpos, por lo que una reacción positiva en la detección de anticuerpos específicos contra el parásito, ha sido aceptada como indicador de una infección invasiva. Este aspecto es de gran utilidad debido a la dificultad de identificar al parásito directamente, lo cual se hace por aspiración de trofozoitos del absceso y observación microscópica de los mismos.

Un hecho de gran interés es que los anticuerpos específicos per-

sisten años después de curada la amibiasis invasora, y que, con toda probabilidad, aparecen después de infecciones subclínicas, como ocurre en muchas otras enfermedades infecciosas, por esto, es preciso interpretar los resultados del estudio serológico de conformidad con el conjunto de datos clínicos, a fin de darles su valor justo, ya que una reacción positiva puede ser solo una secuela de infección amibiana previa.

Por otro lado, el hecho de que los anticuerpos persistan después de años de presentada la infección es de gran utilidad para la realización de encuestas seroepidemiológicas (25).

Se han desarrollado varias técnicas para la determinación serológica de anticuerpos anti-amiba entre las cuales se incluyen:

- Hemaglutinación indirecta *
- Aglutinación de Látex *
- Inmunofluorescencia indirecta
- Inmunolectroforésis
- Contrainmunolectroforésis *
- Difusión en gel de agar *
- Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) *
- Fijación de complemento
- Floculación de Bentonita
- otros * Disponibles Comercialmente

De estos, los más sensibles y específicos son el ELISA y la hemaglutinación indirecta. Pero se encuentran con la desventaja de ser muy costosas (ELISA) y poco prácticas cuando se requiere de la determinación ocasional de un solo suero (27).

II PARTE EXPERIMENTAL

A. Material

Equipo:

Espectrofotómetro Coleman Jr.

Potenciómetro

Agitador mecánico

Material de vidrio

Lámpara de luz indirecta

Placa de vidrio

Reactivos:

Glicina

Cloruro de sodio

Hidróxido de sodio

Sulfato de cobre pentahidratado

Tartrato de sodio y potasio

Carbonato de sodio

Reactivo de Folin-Ciocalteu

Suspensión de látex 0.5 M ICN

Material Biológico:

Suero control positivo (Cellognost-Amebiasis de Química Hoecht)

Suero control negativo (Cellognost-Amebiasis de Química Hoecht)

Sueros control positivo (De pacientes con Absceso hepático amibiano, probados por HAI*)

Sueros control negativo (De individuos normales probados por HAI)

Sueros Positivos y Negativos ** (probados por HAI)

Suero normal de conejo

Antígeno de amiba de la cepa HM1-IMSS (Proporcionado por el Instituto de Investigaciones Biomédicas)

* Hemaglutinación Indirecta

** Proporcionados por el Instituto de Investigaciones Biomédicas provenientes de la encuesta seroepidemiológica nacional de la Secretaría de Salud 1988-1989.

B. Método

B.1 Preparación de soluciones.

Solución amortiguadora de glicina.

Cloruro de sodio	9g
Glicina	7.5g
Agua dest.	1000ml

Ajustar a pH 8.2 con hidróxido de sodio 1 N

Suspensión de látex

El látex comercial se diluye en solución amortiguadora de glicina de modo que de una densidad óptica de 0.16-0.17 cuando se diluye 1:100 en la misma solución amortiguadora y es leído en un espectrofotómetro Coleman Jr. a 650 nm.

B.2 Estandarización del Reactivo

Es importante señalar que la técnica de aglutinación de látex esta siendo estandarizada por comparación con la técnica de Hemaglutinación Indirecta para la determinación de anticuerpos anti-amiba (Desarrollada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas

U.N.A.M.), la cual es una técnica cuantitativa y con alto grado de sensibilidad. En esta los sueros se consideran positivos cuando dan una reacción de aglutinación al ser diluidos 1:80, por lo que el reactivo para aglutinación de látex debe dar una reacción positiva cuando se haga reaccionar con sueros de título igual o mayores de 1:80.

Preparación del reactivo:

Las amibas colectadas de un medio de cultivo axénico (cultivadas por el método de Diamond) se sometieron a cambios bruscos de temperatura sucesivos, de 25C (temperatura ambiente), a -70C utilizando un congelador (Reuco), para obtener un extracto antigénico amibiano soluble, al cual se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (17.17mg/ml) (ver apéndice).

De este extracto antigénico se realizaron diluciones en solución amortiguadora de glicina de modo que quedaron concentraciones de proteínas en mg/ml de 5,4,3,2,1,0.5,0.25,0.125 respectivamente. Un volumen igual de cada una de las diluciones del antígeno fué mezclada con un volumen igual de suspensión de látex, se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el fin de favorecer la adsorción del antígeno a la superficie de las partículas de látex.

Determinación de la concentración óptima de antígeno para sensibilizar las partículas de látex:

En una placa de vidrio cuadrículada (3 cm por lado cada cuadro) se colocó una gota de cada uno de los siguientes reactivos:

- 1.- Suero positivo con título 1)=512 *
- 2.- Suero positivo con título 1:320 *

3.- Suero positivo con título 1:80 *

4.- Suero Negativo

5.- Suero Normal de Conejo

* Titulados por HAI

6.- Solución amortiguadora de glicina

Se añade a cada uno de estos una gota del mismo volumen (20 μ l) de la preparación de látex sensibilizado con 5 mg/ml de proteína. Se mezclan las gotas con palillos o aplicadores diferentes y se agitan con un movimiento rotatorio durante 3 minutos. Transcurrido el tiempo de reacción se observa contra una luz indirecta si hay aglutinación en cada uno de los cuadros de prueba.

Se realiza el mismo esquema para cada una de las otras preparaciones con diferentes concentraciones de proteínas (ver tabla I). La solución amortiguadora de glicina sirve como control del reactivo, es decir, para observar si se presenta autoaglutinación de las partículas de látex.

El suero normal de conejo también es un control del reactivo, ya que una reacción de aglutinación en este, nos estará indicando reacción con componentes inespecíficos del suero.

La concentración óptima de antígeno será aquella en la que se presente aglutinación con los sueros positivos (1:80, 1:320, 1:512) y no aglutine con el suero negativo, con el suero normal de conejo y con la solución amortiguadora de glicina.

B.3 Desarrollo de la prueba

- 1.- La prueba se realiza utilizando el reactivo preparado con una concentración de proteínas de 1.0 mg/ml.
- 2.- En una placa de vidrio se colocan en tres distintas áreas de reacción:

Una gota de suero control positivo

Una gota de suero control negativo

una gota de suero problema

- 3.- Se le adiciona una gota del reactivo de látex a cada área de reacción.
- 4.- Mezclar perfectamente con aplicadores distintos. Agitar la placa con movimiento rotatorio por 3-4 minutos.
- 5.- Observar la placa contra una luz indirecta.

Interpretación de la prueba.

- 1.- El control positivo debena dar una aglutinación macroscópica a la cual pueden ser referidas las muestras problema.
- 2.- El control negativo debena permanecer como una suspensión homogénea.
- 3.- La lectura debe realizarse despues de 3 o 4 minutos de haberse hecho la mezcla. Si posteriormente llegara a dar positiva la prueba no debe ser tomada en cuenta esta reacción, se recomienda repetir la prueba.

III) RESULTADOS Y DISCUSION.

Los resultados de las pruebas en la determinación de la concentración adecuada de antígeno para sensibilizar las partículas de látex se muestran en la siguiente tabla:

Concentración de proteínas de Ag amibiano (mg/ml)	*	*	*	Negativo	SNC	CR
5	+	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
1	+	+	+	-	-	-
0.5	+	+	+	+	+	+
0.25	+	+	+	+	+	+
0.125	+	+	+	+	+	+

Tabla 1. Determinación de la concentración óptima de Antígeno

* Sueros controles (+) de título conocido
 SNC Suero normal de conejo
 CR Control del reactivo

Se puede ver que la concentración de 1 mg/ml de proteína de antígeno es la adecuada para la preparación del reactivo, ya que es capaz de discriminar los sueros positivos de los negativos y no presenta autoaglutinación de las partículas de látex.

El hecho de que las partículas de látex se autoaglutinen cuando están parcialmente cubiertas con el antígeno amibiano puede deberse a la adsorción de este a dos o más partículas de látex simultáneamente, lo que no sucede cuando están completamente cubiertas ya que no hay sitios expuestos en la superficie de las partículas de látex.

Las siguientes pruebas fueron realizadas con el reactivo preparado como fué descrito anteriormente, utilizando una concentración proteica de antígeno soluble de 1 mg/ml.

En el presente estudio se probaron por la técnica de aglutinación de látex un total de 200 sueros, los cuales fueron previamente titulados por la técnica de Hemaglutinación Indirecta para la detección de anticuerpos antiambiá, estandarizada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas U.N.A.M.

Los resultados comparativos de ambas técnicas se muestran en la tabla II.

Sueros probados por HAI	Agutinação de Látex	% Especificidad
Positivos 154	133 (+)	86.36
	21 (-)	13.64
Negativos 46	6 (+)	13.04
	40 (-)	86.96
Totales 200		

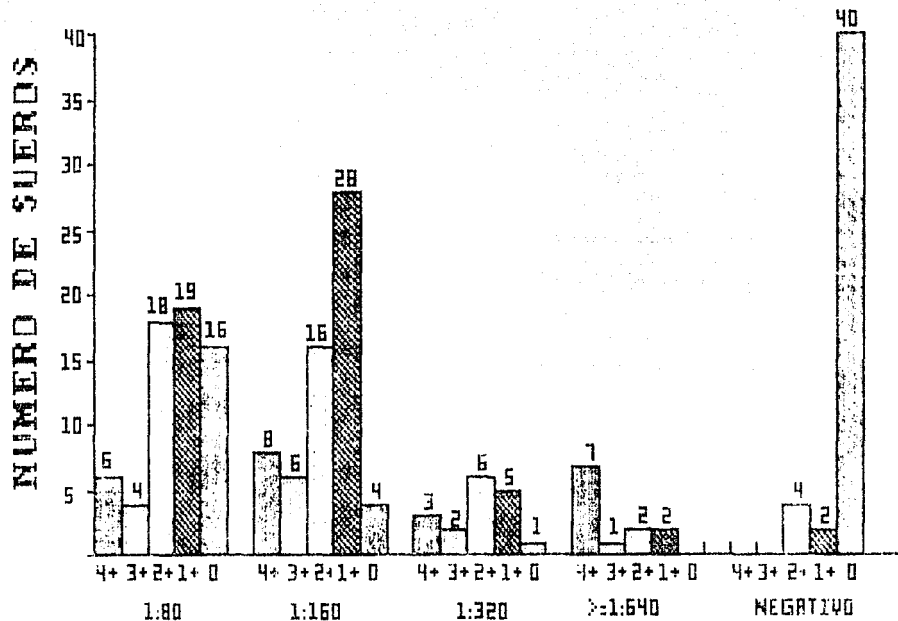
Tabla II. Correlación de resultados de HAI y Aglutinación de Látex

Los resultados por la técnica de aglutinación de látex fueron leídos de 1+ a 4+ de acuerdo a la intensidad de la reacción de aglutinación y 0 cuando no se presentó aglutinación visible al final del tiempo de reacción.

Los resultados de la intensidad de reacción en los sueros probados comparados con el título encontrado por HAI se muestran en la gráfica I.

Para saber si la técnica de aglutinación de látex podría tener una aplicación semicuantitativa se utilizaron sueros de título co-

ESTADO LIBRE ASOCIADO DE PUERTO RICO
 DEPARTAMENTO DE SALUD
 DIVISION DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS



GRAFICA 1. DISTRIBUCION DE LA INTENSIDAD DE LA AGLUTINACION EN EL TOTAL DE LOS SUEROS.

nocido (por HAI) , los cuales fueron diluidos y probados con el reactivo de aglutinación de látex para obtener el título por dicha técnica.

Los resultados obtenidos en esta prueba se muestran en la tabla III.

Suero	Título por HAI	Dilución de los sueros			
		Concentrado	1:2	1:4	1:8
1	1:640	+++	++	+	-
2	1:160	++	+	-	-
3	1:80	++	-	-	-

Tabla III. Titulación de sueros por aglutinación de látex.

En la tabla II se puede observar que existe una buena correlación de los resultados obtenidos por las técnicas de HAI y aglutinación de látex, siendo que el 86% de las pruebas dieron un resultado satisfactorio y solo el 13% de las pruebas dieron reacciones falsas positivas y falsas negativas.

Debemos tener en consideración que los resultados obtenidos por aglutinación de látex se están comparando con los obtenidos por HAI y que esta última puede dar también algunas reacciones falsas por lo que sería conveniente que los sueros fueran probados también por una tercera técnica con alto grado de sensibilidad como ELISA o contraímmunoelectroforésis (CIEF).

En la gráfica I se observa que no existe una relación precisa entre la intensidad de la aglutinación y el título encontrado por HAI, por lo que los resultados obtenidos por la técnica de aglutinación de látex deben ser leídos como positivos o negativos y no

tratar de relacionar la intensidad de la aglutinación con un título dado.

En la tabla III podemos ver que el título encontrado por aglutinación de látex no tiene una relación precisa con el encontrado por HAI, por lo que podemos decir que la técnica en prueba tiene una aplicación exclusivamente cualitativa.

Aunque con una menor sensibilidad (en cuanto al título) podría en un momento dado cuantificarse.

El reactivo para aglutinación de partículas de látex fue probado cada 24 horas con sueros control positivos y negativos para observar la estabilidad del reactivo y se encontró que la efectividad del reactivo permanecía hasta las 48 horas.

IV. CONCLUSIONES

La prueba de aglutinación de partículas de látex desarrollada, es una técnica inmunológica capaz de detectar anticuerpos específicos anti-amiba, lo cual es de gran utilidad en el diagnóstico de la amibiasis extraintestinal, especialmente en casos de absceso hepático amibiano en la que los títulos de anticuerpos anti-amiba se encuentran elevados (generalmente arriba de 1:512 por HAI) y la confiabilidad de la técnica de aglutinación de partículas de látex es aceptable.

La técnica tiene una aplicación exclusivamente cualitativa ya que no se puede relacionar un título dado con el grado de aglutinación o con la reacción con diluciones del suero.

La prueba de aglutinación de partículas de látex ofrece las ventajas de ser una técnica rápida y sencilla en su ejecución, y el material necesario para efectuarla puede elaborarse en un laboratorio central y después distribuirse a otros laboratorios (el antígeno liofilizado) donde no es necesario disponer de personal especializado ni equipo especial para realizar la prueba, lo que la hace también de bajo costo.

La prueba es especialmente útil cuando se requiere la determinación ocasional en un solo suero, ya que la práctica de otras técnicas, aunque algunas más confiables, son más laboriosas, llevan más tiempo en dar el resultado y son de mayor costo.

El hecho de que la técnica de aglutinación de partículas de látex puede dar resultados rápidamente (2-4 minutos después de realizada la prueba) permite que sea útil también cuando se requiere el resultado de la determinación urgentemente para tomar

una decisión terapéutica como en el caso de una amibiasis extra-intestinal fulminante.

Es importante señalar que como en otras infecciones, los anticuerpos anti-amiba pueden persistir después de años de curada la enfermedad, por lo que es preciso interpretar los resultados del estudio serológico de conformidad con el conjunto de datos clínicos, a fin de darles su valor justo, ya que una reacción positiva puede ser solo una secuela de infección amibiana previa.

Debido a la alta prevalencia de amibiasis en México, podemos decir que los reactivos desarrollados para la técnica de aglutinación de partículas de látex podrían ser de gran utilidad en nuestros laboratorios de diagnóstico.

U. APENDICE.

DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY.

Reactivos:

- a) Sulfato de cobre pentahidratado al 1.0%

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

- b) Solución de tartrato de sodio y potasio al 2.0%

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

- c) Solución de carbonato de sodio al 2.0%

Disolver 2g de carbonato de sodio en aproximadamente 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 pentahidratado y 1 ml de la solución de tartrato de sodio y potasio en 100 ml de solución de carbonato de sodio (prepararla justamente antes de su uso).

Solución II

Reactivo de fenol Folin-Ciocalteu (comercial) 2 N : antes de usarlo se diluye volumen a volumen con agua destilada para ponerlo 1 N.

Solución III

Albúmina sérica bovina 100 ug/ml

Disolver 0.1 g de albúmina sérica bovina (ASB) cristalizada y

purificada en 500 ml de agua destilada, se afona a 1000 ml con agua destilada.

Método:

- En una serie de tubos de ensayo, se preparan a partir de la solución de ASB (100 ug/ml) diluciones que contengan 20, 40, 60, 80 y 100 ug de proteína por ml.
- Se transfieren 0.1 ml de cada dilución de ASB a otros tubos de ensayo.
- En otro tubo se mide 0.1 ml de la muestra de antígeno (se recomienda hacerlo por duplicado).
- Para la preparación del blanco de reactivos se utiliza 0.1 ml de agua destilada.
- Todos los tubos se completan a 1.0 ml con agua destilada.
- Se añade a cada tubo 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 del reactivo de fenol Folin-Ciocalteu 1 N.
- Se agita y se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se hace a lectura de D.O. en un espectrofotómetro a 500 nm de longitud de onda.

Interpretación:

- Curva patrón: Se grafica la D.O. contra la concentración de los tubos con ASB en papel milimétrico.
- Se obtiene la concentración de proteínas del antígeno por interpolación de los valores de D.O. en la curva patrón.

1. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ahmad, S.; Khan, H.M.; Mahdi, A.; Kumar, M.: Entamoeba histolytica antigens as possible vaccinogens?. Journal of Chromatography 1988. 440: 467-472.
- 2.- Borges, C.; Moctezuma, U.; Montiel, J.; Arrubarrrena, M.: Valoración diagnóstica de la prueba de látex en el absceso hepático amibiano. Rev. Gastroenterol. México 1971. 36:284-287
- 3.- Chayen, A.; Auron, B.: Entamoeba histolytica, antigens and amoebiasis. Current topics in Microbiology and Immunology 1985. 120: 19-35.
- 4.- Diamond, L.S.: Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schauding 1903 and E. histolytica-like amebae. The Journal of Parasitology 1968. 54, No.5: 1047-1056.
- 5.- Faust, E.C.; Russell, P.R.; Jung, R.C.: Parasitología Clínica 4a. reimpresión Salvat Mexicana de ediciones. México 1981: 135-170.
- 6.- Gomez, T.; Garcia, R.; Torres, F.; Ortiz, E.; Villaseñor, C. Flores, A.; Gomez, E.: Pruebas de aglutinación de látex en absceso hepático amibiano. Rev. Gastroenterol. México 1971 36: 21-28.
- 7.- Grundy, M.S.: Antigen fraction from Entamoeba histolytica strain HK-9 for use in ELISA. Arch. de Invest. Med. México 1982. 13.(supl.3): 249-253.

- 8.- Guerrant, R.L.: The global problem of amebiasis: Current status, Research needs, and opportunities for progress. *Reviews of Infectious Diseases*. 1986 8, No.2: 218-227.
- 9.- Gutierrez, G.: Epidemiología y control de la amibiasis en México. *Arch. de Invest. Med. México* 1986. 17 (supl.):375-382.
- 10.-Healy, G.R.: Immunologic tools in the diagnosis of amebiasis: Epidemiology in the United States. *Reviews of Infectious Diseases* 1986. 8, No. 2: 239-245.
- 11.-Healy, G.; Visvesvara, G.; Kagan, I.: Observations of the persistence of antibodies to E. histolytica. *Arch. de Invest. Med.* 1974 5 (supl.2): 495-500.
- 12.-Heiblum, M.; Borges, C.; Montiel, J.: Prueba de aglutinación de látex en el diagnóstico de la amibiasis intestinal invasora. *Rev. Gastroenterol. México* 1971. 36: 281-283.
- 13.-Heiblum, M.; Borges, C.: Evaluation of the latex agglutination test for the diagnosis of invasive amebiasis. *Dis. Col. and Rect.* 1975 16, No.5 368-370.
- 14.-Jimenes, E.; Olvera, S.; Kumate, J.; Ortiz, B.: Purificación parcial de algunos antígenos de superficie de E. histolytica Investigación de la actividad biológica del suero de pacientes con absceso hepático amibiano. *Arch. de Invest. Med.* 1982 13. (supl.3) :281-288.
- 15.- Joklik, W.K.; Willett, H.; Amos, D.: *Zinsser Microbiología* 18a Edición. Ed. Panamericana. Argentina 1986. P.1354-1360.

- 16.- Kagan, I.: The Immunology of amebiasis. Arch. de Invest. Med. 1973, 4 (supl.): 169-175.
- 17.- Knight, R.: Surveys of amoebiasis. Interpretation of data and their implications. Ann. Trop. Med. and Parasitol. 1975 69:35-48.
- 18.- Miller, M.; Scott, F.: Serological tests for amoebiasis. Br. Med. J. 1974, 6: 59-60.
- 19.- Morris, M.; Powell, S.; Elsdon-Dew, R.: A rapid latex agglutination test for invasive amoebiasis. S.A. Medical Journal 1970, 4: 594-595.
- 20.- Morris, M.; Powell, S.; Elsdon-Dew, R.: Latex agglutination test for invasive amoebiasis. The Lancet 1970, 1:1362-1363
- 21.- Morris, M.; Powell, S.; Elsdon-Dew, R.: Invasive amoebiasis: Circulating antibody levels by latex agglutination test. S. Afr. Med. J. 1971, 45: 1206-1208.
- 22.- Panchanadam, M.; Gopalan, K.; Chack, C.; Prabakar, U.; Madanagopalan, N.: Latex agglutination test for amoebiasis in adults. The American Journal of Proctology 1971 22, No.4: 288-291.
- 23.- Ravdin, J. I.: Pathogenesis of disease caused by Entamoeba histolytica : Studies of adherence, secreted toxins, and contact dependent cytolysis. Reviews of infectious diseases 1986 8, No.2: 247-257.

- 24.- Salata, R.; Ravdin, J.: Review of the human immune mechanisms directed against E. histolytica. Reviews of infectious diseases 1986. 8. No. 2: 261-268.
- 25.- Sepulveda, B.: Inmunología de la amibiasis. Memorias de la primera conferencia internacional sobre amibiasis. México 1976. p.78
- 26.- Sharma, P.; Dutta, G.: Diagnóstico rápido del absceso hepático amibiano mediante antígeno de E. histolytica. Arch. de Invest. Med. 1981. 12 No. 4: 553-555.
- 27.- Sodeman, W.; Dowda, C.: Rapid serological methods for the demonstration of E. histolytica activity. Gastroenterology 1973. 65: 604-607.
- 28.- Trissi, D.: Immunology of Entamoeba histolytica in human and animal hosts. Reviews of infectious diseases 1982. 4 No. 6: 1154-1158.
- 29.- Walsh, J.A.: Amebiasis in the world. Arch. de Invest. Med. México 1986. 17 (supl): 385-389.
- 30.- Youmans, G.P.; Paterson, P.Y.; Sommers, H.M.: Infectología clínica. 2a. Edición. Ed. Interamericana. Mexico 1982: 626-635