



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

LA AGLUTINACION EN PLACA Y LA CONTRA-
INMUNOELECTROFORESIS CON EL MISMO
ANTIGENO EN EL DIAGNOSTICO DE LA
AMIBIASIS.

104

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a :
DANIEL CORPUS GUAJARDO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLASSE Tesii

N. 1418

TECNA U-1 107

PRESIDENTE Prof. Oscar Amor Dodero

VOCAL Prof. Magdalena Acosta Segura

SECRETARIO Prof. Ernestina Ballesteros Rueda.

1er. SUPLENTE Prof. Caemen Reyna Bordes

2do. SUPLENTE Prof. Socorro Cao Romero Martinez

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: HOSPITAL JUAREZ S. S. A.

SUSTENTANTE Daniel Corpus Guajardo

ASSOR Q. F. B. Magdalena Acosta Segura

SUPERVISOR TECNICO Dr. Santiago Fraga Ortega

Con cariño y gratitud a mi padre:

Ignacio Corpus Ramos,

Que con su esfuerzo y consejos hizo posible
la realización de mis estudios.

A mi madre como un homenaje postumo:

Antonia Guajardo de Corpus.

A mis hermanos:

Esdrás

Jonás

Elizabeth

Moisés

Lázara

Eva Luz

Isaac

Juan Ignacio

Raquel

Aaron

Beltsazar

Ruth

Ezequiel

A mi cuñado:

Jorge Ignacio Barragán Villaseñor, por la desinteresada ayuda que me brindo

A mi maestra:

Q. F. B. Magdalena Acosta Segura, que hizo posible la realización de mi tesis

Al Dr. Santiago Fraga Ortega, por sus consejos y valiosa ayuda.

I N D I C E

Introducción

Capítulo I -	Generalidades.	1
Capítulo II -	Material y métodos.	19
Capítulo III -	Resultados	30
Capítulo IV -	Discusión	31
Capítulo V -	Bibliografía	33

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

Las infecciones por Entamoeba histolytica, con la variedad de manifestaciones clínicas que se presentan, desde los cuadros insidiosos de trastornos gastrointestinales no definidos y crónicos, hasta el absceso amibiano grave, constituyen una de las endemias de mayor diseminación en el mundo.

El presente trabajo de tesis es con el objeto de ver el comportamiento de un mismo antígeno empleando dos técnicas diferentes; frente a los sueros de pacientes sospechosos de amibiasis invasora.

Estas técnicas fueron la contraelectroforesis y la aglutinación indirecta, empleando partículas de látex poliestireno recubiertas de antígeno amibiano, para ver si existe una correlación en los resultados, si hay variaciones en sensibilidad o discrepancias que puedan deberse a la clase de inmunoglobulina en que residen estos anticuerpos, ya que se sabe que las reacciones de precipitación se deben fundamentalmente a anticuerpos que residen en IgG en tanto que en las reacciones de aglutinación interviene la IgM.

C A P I T U L O I

GENERALIDADES

FRECUENCIA DE LA AMIBIASIS.

La frecuencia de esta enfermedad es de las más altas en el mundo; (1) representa un 2 % del total de los pacientes internados en los hospitales, y un 4 % en el total de las autopsias practicadas, siendo los casos más frecuentes por absceso hepático.

La enfermedad afecta a la población más pobre predominando en las zonas urbanas de mayor aglomeración y las más malas condiciones sanitarias.

La frecuencia del mal no solo es igual a la de hace 25 años, sino que parece ir en aumento, y su gravedad sigue siendo la misma.

La edad y el sexo tienen importancia en la enfermedad, ya que es evidente el predominio de la amibiasis en los adultos del sexo masculino en la edad media de la vida (2).

RESPUESTA INMUNOLOGICA A Entamoeba histolytica.

Sabemos que la amibiasis invasora determina elevación de las inmunoglobulinas del suero; particularmente de la G (3). Al mismo tiempo se determina la presencia de anticuerpos circulantes, precisamente localizados en IgG e IgM, anticuerpos que se ponen de manifiesto en las reacciones serológicas con antígeno amibiano.

Aparte de estas reacciones de inmunidad humoral se ha demostrado así mismo la existencia de reacciones de inmunidad celular, por medio de pruebas cutáneas con el mencionado antígeno (4) presentándose una hiper

sensibilidad con reacción de tipo retardado con antígenos de Entamoeba histolytica.

La obtención de un antígeno (Histolicitina) derivado de amibas cultivadas en medio axénico, fué el primer paso en su estudio y la prueba resultó ser totalmente inócua en los individuos en que se realizó.

El antígeno axénico que se obtuvo de la cepa HK-9 sirvió para que se practicaran pruebas intradérmicas con 1, 11 y 22 miligramos de protefina antigénica contenida en un volumen de 0.1 ml. Todas las pruebas fueron leídas en 5, 24, y 48 horas y solo se consideraron positivas aquellas cuya induración excediera los 8 milímetros de diámetro.

Si bien es indudable la respuesta inmunológica del organismo a la amibiasis invasora, la respuesta se observa únicamente cuando hay invasión tisular especialmente si es extensa, como en el caso del absceso hepático; no sucede lo mismo cuando el parásito está en calidad de comensal o sea— cuando obtiene ventajas nutricionales del huésped sin causarle daño.

Sin embargo, el hecho de que los títulos son elevados en estas — reacciones y la frecuente elevación de las inmunoglobulinas del suero (5) que se observan en el absceso hepático, así como la persistencia de reacciones positivas largo tiempo después de la curación puede sugerir cierta relación entre los mencionados anticuerpos y la defensa contra la reinfección, porque al presentarse de nuevo el parásito, que pasa a la circulación sanguínea por los linfáticos, es atacado por los anticuerpos impidiendo su implantación en los tejidos.

INVASION DE ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS A DIVERSOS ORGANOS Y TEJIDOS EN SUJETOS HUMANOS.

Con el propósito de valorar la capacidad invasora de Entamoeba histolytica a diferentes órganos y tejidos (6) en sujetos humanos, se estudió la frecuencia y distribución de lesiones amebianas en 175 casos de autopsia del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General del Centro Médico Nacional del I. M. S. S. En 175 casos de amebiasis, que corresponden al 5.8 % de las 3,000 autopsias revisadas, se encontró que la amebiasis fué responsable de la muerte en 150 casos (5 %), ocupando el 6o lugar en frecuencia, de las enfermedades consideradas como causa de muerte.

Los órganos más frecuentemente afectados fueron el hígado y el intestino grueso. El absceso hepático amebiano predominó en los sujetos del sexo masculino en proporción de 2.7:1 en relación con otras enfermedades como tumores malignos, cirrosis hepática, diabetes mellitus, fiebre reumática y tuberculosis, debido al alto nivel contaminante que aun prevalece en la amebiasis.

En una de las autopsias se encontraron lesiones en la piel y lesiones cerebrales, sin lesiones intestinales ni hepáticas.

Por lo que respecta a la amebiasis intestinal, las lesiones del intestino grueso se produjeron a diferentes niveles, así tenemos por orden de frecuencia que las porciones afectadas fueron: ciego y colon ascendente, rectosigmoides, colon transversal y descendente, y apéndice ileocecal.

LOCALIZACION DE LOS ANTICUERPOS ANTIAMIBIANOS EN LAS
INMUNOGLOBULINAS DEL SUERO HUMANO.

El desarrollo de métodos inmunológicos sensibles y específicos, ha permitido estudiar la presencia de los anticuerpos circulantes, aun cuando existan en pequeñas cantidades. Estos se localizan en la fracción de las gammaglobulinas del suero, las que corresponden a un grupo heterogéneo de proteínas con actividad de anticuerpo, con propiedades físico-químicas e inmunológicas diferentes.

El Servicio de Gastroenterología del Hospital General del Centro Médico Nacional del I. M. S. S., llevó a cabo un estudio para determinar la localización y caracterización de los anticuerpos contra Entamoeba histolytica (7); para lo cual utilizó los sueros obtenidos de 5 pacientes con absceso hepático amibiano, las inmunoglobulinas fueron separadas por medio de cromatografía en columna de intercambio aniónico usando dietil-amino-etil celulosa.

Las fracciones obtenidas fueron identificadas por análisis inmunoelectroforético, así como por el método de difusión en gel, y se encontró que los anticuerpos responsables de la reactividad de los sueros residían en IgG e IgM.

OBTENCIÓN DE ANTIGENOS DE ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS.

Entamoeba histolytica había sido cultivada in vitro desde 1925, pero siempre en presencia de bacterias (8). Es de gran importancia el cultivo del parásito en ausencia de bacterias, ya que esto es un pre-requisito para estudios básicos sobre la fisiología y patogénesis de este parásito así como para el diagnóstico inmunológico de la amibiasis.

Jacobs en sus trabajos demostró que los cultivos con una sola especie de bacteria podían ser usados para preparar antígenos de alta potencia, lo cual logró al introducir a los cultivos los antibióticos como medio de eliminación del desarrollo de diferentes bacterias nocivas y de contaminación, como *Clostridium perfringens* quedando *Escherichia coli* sola con el parásito en el cultivo el cual posteriormente fué inoculado a cabras para obtener el suero anti Entamoeba histolytica probándose a continuación dicho suero con el suero de pacientes que padecían la amibiasis.

El crecimiento de Entamoeba histolytica en presencia de un protozoo se logró con Trypanosoma cruzi en tubos de ensayo y en microtubos usándose en ambos tubos un sello de petrolato para impedir el acceso al oxígeno ambiental del medio. El medio de cultivo contenía tioglicolato, -- suero de caballo, sobreponiendo a él un cultivo difásico de agar-sangre -- que contenía una suspensión rica de T. cruzi. El tamizado F 22 de Entamoeba histolytica se usó en todos los experimentos.

Los tubos de ensayo conteniendo el medio descrito fueron inoculados con amibas provenientes de cultivos en los cuales había estreptobacilos inhibidos con penicilina.

La penicilina se usó en los cultivos amiba-trypanosoma durante las primeras cuatro resiembras, para asegurar la eliminación del estreptobacilo y se llevaron a cabo pruebas de esterilidad bacteriológica en cada resiembra hasta comprobar que fueran negativas. Los tubos de control sin T. cruzi no mostraron crecimiento de amibas.

Los cultivos amiba-trypanosoma fueron mantenidos durante 15 pases a intervalos de 48 horas sin disminución en el crecimiento de amibas, lo cual demostró que el método es adecuado para obtener desarrollo del parásito.

Sin embargo, la disminución de los flagelados en el medio de cultivo hace suponer que carece de algunos ingredientes necesarios para la nutrición de T. cruzi. Los microcultivos de E. histolytica que se iniciaron con trofozoitos individuales para conocer mejor su desarrollo, fueron lavados con solución de Locke estéril, para liberarlos de los componentes del medio donde estaban contenidos, como son los sustratos metabólicos de ciertas bacterias intestinales, transferidos por microaislamiento a microtubos conteniendo el mismo medio que se utilizó en los tubos de ensayo con trypanosoma.

Después de 72 horas de incubación se contaron hasta 200 amibas, - la prole de un solo trofozoito por exámen microscópico directo de los microtubos.

Se vieron amibas activas por 10 días. No se llevaron a cabo pases de los microcultivos, pero el medio fué transferido después de 10 días a un medio de tioglicolato y caldo-neopeptona para hacer las pruebas de esterilidad bacteriológica. No hubo crecimiento de bacterias en estas pruebas.

El crecimiento de Entamoeba histolytica con Trypanosoma cruzi tratado con calor solo ha sido demostrado en microcultivos porque representan una menor área de desarrollo comparado con los tubos de ensayo con medio de cultivo y por consiguiente menos posibilidades de contaminación por bacterias.

La ventaja principal de los cultivos de Entamoeba histolytica-Trypanosoma cruzi sobre cultivos amiba-bacteria es el hecho de que T. cruzi se puede inactivar a temperaturas ligeramente superiores a 37°C sin que cause la destrucción de ellos, al coagularse sus proteínas constituyentes, contrariamente a las bacterias que necesitan de altas temperaturas para ser inactivadas.

Estos cultivos por lo tanto, pueden servir como base para identificar los factores de crecimiento requeridos por Entamoeba histolytica.

A los cultivos dixénidos o cultivos mixtos se les llama así porque el parásito, en este caso Entamoeba histolytica, se cultiva en asociación con flora bacteriana compleja que proporciona al medio otros metabolitos necesarios para que se desarrolle el parásito.

CULTIVOS AXENICOS.

Después de haber desarrollado Entamoeba histolytica en cultivos mixtos y monoxénicos no fue sino hasta 1968, cuando Diamond publicó su técnica para el cultivo axénico. Se les llama así a los cultivos de Entamoeba histolytica cuando no requiere de ningún microorganismo para desarrollarse.

El medio de cultivo ideado por Diamond tiene la siguiente composición (9).

Medio líquido

Tripticasa	1.00	g
Extracto de hígado	2.00	g
Glucosa	0.50	g
Clorhidrato de L-cisteína	0.10	g
Acido ascórbico	0.02	g
Cloruro de sodio	0.50	g
Fosfato de potasio monobásico	0.60	g
Fosfato de potasio dibásico	0.10	g
Agua destilada c. b. p.	87.50	ml

Ajustar a pH 7.0 con NaOH.

Agregar ion agar No. 2	0.0175	g
Mucina gastrica	0.1	g

Filtrar y esterilizar a 15 libras durante 10 minutos.

Añadir:

Suero de caballo	10	ml
Mezcla vitamínica	2.5	ml
Temperatura de incubación	35.5°	c

Fórmula de la mezcla vitamínica.

Vitaminas hidrosolubles:

1. Solución A.

Acido para-amino benzóico	0.125 g
Niacina	0.0625 g
Agua destilada a temperatura de ebullición para llevar a 150 ml.	

Solución B.

Niacinamida	0.0625 g
Clorhidrato de piridoxina	0.0625 g
Clorhidrato de piridoxal	0.0625 g
Clorhidrato de tiamina	0.025 g
Pantotenato de calcio	0.025 g
L-inocitol	0.125 g
Clorhidrato de colina	1.250 g
Agua destilada	150 ml

Solución C.

Riboflavina	0.025 g
Se añaden 75 ml de agua destilada y se disuelve con ayuda de NaOH 0.1 N. llevando el volumen hasta	100 ml.

2. Solución de biotina.

D-biotina	0.030 g
Disolver en 200 ml de NaOH 0.1 N y llevar con agua destilada hasta	300 ml

3. Solución de ácido fólico.

Acido fólico	0.030 g
Disolver en 200 ml con NaOH 0.1 N y llevar con agua destilada hasta	300 ml

4. Vitaminas Lipo-solubles.

Solución A.

Vitamina D ₂ (calciferol)	0.300 g
Disolver en alcohol 95 % (v/v)	63 ml

A la solución anterior agregar:

Vitamina A (soluble en alcohol)	0.300 g
-----------------------------------	---------

Solución B.

Vitamina K (bisulfito sódico de menadiona)	0.60 g
Disolver en solución acuosa al 15 % de Tween 80	300 ml

Las soluciones A y B se combinan y se lleva a volúmen de 3000 ml.

5. Solución vitamina E.

Vitamina E (acetato de alfa tocoferol)	0.025 g
Disolver en agua destilada	250 ml

De las soluciones anteriores mezclar:

Solución vitamina B	500 ml
Solución biotina	250 ml
Solución ácido fólico	250 ml
Solución Lipo-solubles	2,500 ml
Solución vitamina E	250 ml

La mezcla vitamínica y el suero de caballo se agregan en condiciones asépticas a la solución ya estéril y ajustado su pH a siete.

Una vez hecha la mezcla guardar a -22°C.

El medio preparado en esta forma, se envasa en tubos con tapón de rosca y en matraces Erlenmayer de 125 ml, que se conservarán en refrigeración a -4°C . Para verificar su esterilidad, se incuban durante 48 horas a 35°C antes de ser utilizados.

Inicialmente las siembras se hicieron con inóculos de 2,000 trofozoitos en cada tubo y de 35,000 trofozoitos en cada matrás.

Las resiembras se efectuaron de la manera siguiente: se centrifugaron los tubos de cultivo a 1,200 rpm durante 15 minutos, una vez separado el sobrenadante por aspiración con una pipeta Pasteur, el sedimento se depositó en un medio de cultivo.

Los tubos y los matraces colocados en posición vertical, se mantuvieron a 35.5°C . La viabilidad de los trofozoitos se comprobó periódicamente examinándolos con microscopio invertido.

Para determinar el número de trofozoitos se utilizó una cámara cuenta glóbulos.

EXTRACCION Y PURIFICACION DEL ANTIGENO.

El antígeno de Entamoeba histolytica se extrae de los cultivos axénicos de trofozoitos, y se estabiliza de acuerdo a procesos especiales de los laboratorios a cuya firma comercial pertenece (10).

Estos antígenos se purifican y se conservan liofilizados y son -rehidratados al momento de usarse con agua destilada imprimiéndoles una agitación suave. Una vez así preparado el antígeno se deja en reposo antes de ponerlo a reaccionar.

MÉTODOS INMUNOLÓGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA AMIBIASIS.

Desde hace muchos años se han venido desarrollando pruebas serológicas para la amibiasis; (11) Izar, en 1914 y Scalas en 1921, aplicaron la reacción de fijación del complemento. Craig desde 1928 comenzó hacer esta reacción y utilizó al principio un antígeno preparado con extracto alcohólico de Entamoeba histolytica, cultivada en medio de Dbrelav en simbiosis con bacterias intestinales, cuando otros investigadores repitieron los experimentos de Craig, no obtuvieron resultados uniformes y el uso de esta reacción no se generalizó.

Se objetaba que al prepararse el antígeno con amibas cultivadas en simbiosis con bacterias intestinales, los anticuerpos determinados podían ser tanto frente a Entamoeba histolytica, como a las bacterias asociadas.

Se dijo entonces que se requería de un antígeno más purificado y estandarizado.

Hay otras pruebas como la de inmovilización de los trofozoitos de Entamoeba histolytica, ideada por Zaman, en la cual los trofozoitos son inmovilizados al entrar en contacto con los anticuerpos contenidos en el suero del paciente. La reacción de inmunoprecipitación por la doble difusión en gel de agar, iniciada por Nakamura y Baker (1957), que puede hacerse cuantitativa probando diluciones del suero problema.

La inmunofluorescencia de Goldman y cols. (1954). La de la hemaglutinación indirecta utilizada por Kessel y cols. (1960) quienes utilizaron un antígeno obtenido de Entamoeba histolytica cultivada en simbiosis con trypanosoma cruzi. El ensayo de la prueba de la amibiasis se hizo

en el suero de conejos inoculados con la cepa DKB y los resultados fueron satisfactorios. Las reacciones fueron débiles porque el antígeno no procedía de cultivos axénicos pero se consideró al antígeno como suficientemente específico.

Lewis y Kessel probaron este antígeno en el suero de un enfermo con amibiasis hepática y obtuvieron una reacción positiva de 1:520,000.

METODOS SEROLOGICOS DE EMPLEO ACTUAL.

En todos los métodos se emplea antígeno amibiano obtenido de cultivos axénicos.

REACCION DE FIJACION DEL COMPLEMENTO.

La técnica de fijación del complemento consta de dos etapas, en la primera hay consumo de complemento si se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo: (12), después se adiciona un sistema hemolítico.

En la primera etapa, se incuba 18 horas a 5°C y 30 minutos a 37°C la mezcla constituida por el antígeno y el suero del paciente (previamente inactivado por calentamiento para destruir su complemento) y 2 Unidades (U) de complemento de cobayo.

Al terminar la primera incubación se añade el sistema hemolítico constituido por glóbulos rojos de carnero sensibilizados con 2 U. de hemolisina anticarnero y se incuba nuevamente 15 minutos a 37°C. Si el suero del paciente contenía anticuerpos contra el antígeno amibiano, al combinarse el antígeno y el anticuerpo se fija a las 2 U de complemento, por 1

lo tanto ya no hay complemento libre y no son lisados los glóbulos rojos, lo que indica la presencia de anticuerpos antiambianos y consecuentemente un diagnóstico positivo.

En cambio si no hay anticuerpos en el suero del paciente, no se lleva a cabo la fijación del complemento en la primera etapa, quedando este libre para lisar los glóbulos rojos lo que indica que el suero no contenía anticuerpos antiambianos.

Estas reacciones no son muy empleadas porque su sensibilidad es comparable a la de otras pruebas más sencillas y rápidas en su ejecución.

INMUNOPRECIPITACION.

La técnica de la doble difusión en gel de agar consiste en preparar una placa de agar sobre una superficie perfectamente nivelada, en esta placa se practica una serie de cortes de forma circular mediante un cortador metálico, dispuestos en forma de roseta; uno central y 6 en la periferia.

Los pozos de la periferia se llenan con los sueros problema y el pozo central se llena con antígeno ambiano. Si existen anticuerpos en los sueros problema se formarán bandas de inmunoprecipitados al ponerse en contacto el antígeno con el anticuerpo.

Como prueba de diagnóstico de la amibiasis también es poco utilizada por su poca sensibilidad y por requerir de 24-72 horas para obtener su resultado.

REACCION DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES.

Para la técnica de anticuerpos fluorescentes de Goldman (13) se emplea el método indirecto el cual consiste en hacer un frotis con trofozoitos que se fijan con acetona, después se cubren con el suero problema y se incuba a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda, se lava la preparación y se cubre con el suero antiglobulina humana, obtenida en conejo, - marcado con fluoresceína, se procede de nuevo a incubar y a lavar la preparación, y observar al microscopio con luz ultravioleta, si la prueba resulta positiva se verán los trofozoitos fluorescentes.

Este método es muy sensible pero su uso está limitado por la necesidad de contar con el microscopio de luz ultravioleta y cultivos axénicos de Entamoeba histolytica para la preparación de los frotis con trofozoitos.

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

La técnica de la contraimmunoelectroforesis utilizada previamente en otros estudios inmunológicos, se aplicó a la investigación de las reacciones serológicas de la amibiasis invasora, partiendo de dos ideas: (14)

- a) Los anticuerpos antiamibianos se localizan en la inmunoglobulina G y por tanto se desplazan hacia el cátodo bajo el efecto de la corriente eléctrica; y
- b) El antígeno amibiano se moviliza hacia el ánodo, por influencia de la corriente electroforética.

Es una técnica sensible y rápida que requiere poco tiempo y el empleo de un aparato de electroforesis, el método y sensibilidad se describen en los capítulos posteriores.

AGLUTINACION EN LATEX.

La reacción de aglutinación en látex es la de mayor empleo en nuestro medio y sirve como método de selección para saber si en un suero problema existen anticuerpos antiambianos, su resultado positivo se reporta de acuerdo a la intensidad de la reacción asignándole de una a cuatro cruces.

El antígeno ambiano se presenta liofilizado, estandarizado y purificado para ser rehidratado con una suspensión de látex poliestireno. Los detalles del método y la evolución de su sensibilidad se dan en los capítulos posteriores.

REACCION DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA (15).

El antígeno ambiano se adsorbe en eritrocitos humanos del grupo O, o de carnero, lavados y tratados con ácido tánico, y para su conservación se liofilizan. Estos eritrocitos sensibilizados con antígeno ambiano reaccionan con los anticuerpos presentes en el suero. La prueba es cuantitativa por lo que usualmente es un método de comprobación.

Puede realizarse por macro y microtécnica. La macrotécnica se lleva a cabo probándose una serie de diluciones seriadas de los sueros pro-

blema con tris-amortiguador que van desde 1:32 a 1:8,192.

Una vez que se lleva a cabo la reacción con el antígeno amibiano- se interpretan sus resultados de la siguiente manera: en la reacción posi- tiva se forma una capa homogénea de los eritrocitos al combinarse con el- antígeno amibiano. En la reacción negativa se forma un botón de eritroci- tos en el fondo del tubo o de la excavación. La máxima dilución que presen- te formación de capa homogénea o bien un anillo difuso será el título de- la reacción.

Un resultado positivo mayor de 1:128 es indicativo de que la infec- ción por Entamoeba histolytica es reciente, pero si el título de anticuer- pos presentes en el suero sobrepasa de 1:1024 la infección es actual.

Como en las demás pruebas es necesario efectuar reacciones simul- taneas con sueros control positivo y negativo.

C A P I T U L O I I

MATERIAL Y METODOS.

METODO DE AGLUTINACION EN PLACA.

Fundamento: En esta reacción se emplean partículas de látex poliestireno, recubiertas con un extracto purificado y estandarizado de un cultivo axénico de Entamoeba histolytica; estas partículas al estar en contacto con los anticuerpos específicos, forman agregados apreciables a simple vista.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se emplean equipos comercializados que constan con:

Antígeno amibiano: Se presenta liofilizado, en cantidad suficiente para sensibilizar la suspensión de látex que viene en el equipo.

Suspensión de látex: Se presenta en una ampollita conteniendo una suspensión de partículas de látex poliestireno.

Suero control positivo: Se presenta liofilizado, para su empleo se rehidrata con 0.2 ml de agua destilada.

Suero control negativo: Se presenta liofilizado se rehidrata con 0.2 ml de agua destilada.

Sueros problema.

EQUIPO.

Placa para la reacción: En una placa de vidrio común se marcaron cuadros de 2×2 cm para cada serie de pruebas. Para pruebas individuales pueden usarse portaobjetos.

Aplicadores de madera.

Pipetas capilares.

TECNICA.

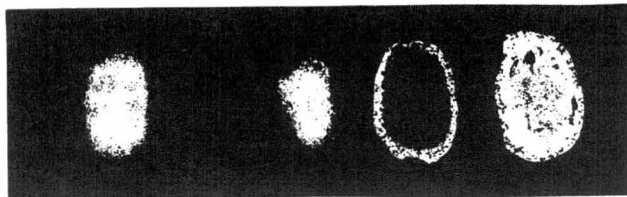
1. Los sueros problema se calientan a 62°C durante 30 minutos, para inactivar el complemento que puede dar reacciones falsas positivas.
2. Sensibilización del látex: Usando una pipeta capilar se transfiere la suspensión de látex a la ampollita que contiene el antígeno ambiano liofilizado y se mezcla hasta disolver el antígeno completamente. Se deja reposar por lo menos 5 minutos antes de usarlo.
3. Se toma suspensión de látex sensibilizado con una pipeta capilar y se deja caer una gota para cada prueba en cada uno de los cuadros de la placa, junto, se deposita una gota, medida también con pipeta capilar, del suero problema.
4. Usando un aplicador de madera diferente para cada reacción se mezclan perfectamente las dos gotas. Luego se imprime un movimiento de rotación a las gotas sobre la placa durante 5 minutos y se observa la reacción.

INTERPRETACION.

Formación de acúmulos de partículas = Reacción positiva.

La mezcla permanece homogénea = Reacción negativa.

Simultáneamente se hacen reacciones con los sueros Control Positivo y Negativo para que sirvan como punto de comparación para la lectura.



Aspecto de las reacciones positiva y negativa.

Homogénea: Negativa Aglutinación: Positiva

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

Fundamento: Cuando en un campo eléctrico se coloca un antígeno cuya movilidad es del cátodo (-) hacia el ánodo (+) y frente a él se colocan sus correspondientes anticuerpos, como éstos siempre migran del ánodo hacia-- el cátodo, al aplicar la corriente eléctrica ambos reactivos migran uno - hacia el otro y al encontrarse, si están en cantidades equivalentes se forman una o más bandas de inmunoprecipitado.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Antígeno amibiano: Se empleó el mismo antígeno que para la prueba anterior, pero en vez de rehidratarlo con la suspensión de látex se disolvió en 0.2 ml de agua destilada.

Suero control positivo:

Suero control negativo:

Sueros problema:

REACTIVOS.

Amortiguador de barbital pH 8.6, $\mu=0.05$.

Amortiguador de barbital pH 8.6, $\mu=0.01$.

Gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador de barbital pH 8.6, $\mu=0.01$.

Gel de agar purum al 2.5 % en agua destilada.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS.

1. Amortiguador de barbital pH 8.6, $\mu=0.05$.

Se pesan 1.84 g de ácido dietil barbitúrico que se disuelven en 400 ml de agua bidestilada a punto de ebullición, inmediatamente se disuelven en la solución anterior 10.4 g de dietil barbiturato de sodio, se deja enfriar, se afora hasta la marca con agua destilada. Se ajusta su pH a 8.6 con ácido clorhídrico 0.1 N.

2. Amortiguador de barbital pH 8.6, $\mu=0.01$.

El amortiguador de barbital de pH 8.6, $\mu=0.05$ se diluye con agua bidestilada en proporción 1:5 así se tendrá una fuerza iónica de 0.01.

EQUIPO.

Aparato de electroforesis.

Placas de vidrio común de 9×18.5 cm.

Nivel de gota.

Tiras de papel filtro Whatman No. 1 de 18 cm de largo por 5 cm de ancho.

Plantilla.

Cortador circular de metal de 3 mm de diámetro.

Una brocha pequeña.

Aplicadores de madera.

Tubos de ensayo de 13×100 mm.

Pipetas de 1 y 10 ml.

Pipetas caelares.

PREPARACION DE LAS PLACAS.

1. Las placas de vidrio limpias y perfectamente desengrasadas, se barnizan mediante una brocha pequeña con gel de agar Purum al 2.5 % en agua bi destilada, para que cuando se practiquen los cortes de los pozos los fondos de ellos quedan sellados evitando así que se difundan los reactivos entre la placa de vidrio y el gel. Debe procurarse no pasar la brocha 2 veces por el mismo lugar.
2. La placa ya sellada se coloca sobre una superficie perfectamente nivelada y se le vacían encima 28 ml aproximadamente de gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador de barbitol pH 8.6, $\mu=0.01$ a una temperatura de más o menos 80°C.
3. Se deja solidificar el gel y la placa se coloca en el refrigerador durante 10 minutos aproximadamente para lograr la solidificación completa del gel de agarosa.
4. Mediante el cortador circular y guiándose por la plantilla se hacen 3 filas de pares de pozos de 3 mm de diámetro dejando una separación de 5 mm entre los bordes de los pozos pares y de 10 mm de separación entre dos filas de pozos pares (Figura No. 1).
5. Mediante un aplicador de madera terminado en punta muy aguda se retira el gel de los cortes quedando los pozos ya listos para ser llenados.

PREPARACION DE LAS DILUCIONES.

Los sueros problema se corrieron en diluciones seriadas para tener resul-

tados semicuantitativos para lo cual se procedió de la siguiente manera: Para preparar las diluciones de los sueros se emplea el amortiguador de \bar{b} barbital pH 8.6 y $\mu=0.01$. Para ello se utilizan tubos de 15 X 100 mm, en cada uno de los cuales se colocan 0.5 ml del amortiguador, al primer tubo se le agrega 0.5 ml del suero problema y se mezcla perfectamente y de ésta, que es la dilución 1:2, se toman 0.5 ml y se pasan a un segundo tubo para tener una dilución 1:4 se mezcla bien y de esta dilución se toman — 0.5 ml que se pasan a un tercer tubo para hacer la dilución 1:8 y así sucesivamente se preparan las diluciones hasta el tubo 12 en el cual tendremos una dilución del suero problema de 1:2048.

Las diluciones de los sueros se preparan al momento de usarse.

CARGADO DE LAS PLACAS.

Por medio de las pipetas capilares se procedió a llenar una fila horizontal de pozos con suero problema y sus diluciones, mientras que en la fila de pozos opuesta se llenaron con antígeno ambiguo.

Los pozos deberán llenarse al ras de manera que no queden semilenos ni — que tampoco se derrame su contenido.

De igual manera se procedió a llenar una fila con los sueros control Positivo y Negativo dispuestos igual que los problemas y el antígeno.

CORRIMIENTO ELECTROFORETICO.

1. Los dos compartimentos de la cámara de electroforesis, se llenan con el amortiguador de barbital pH 8.6, $\mu= 0.05$ quedando al mismo nivel, este

amortiguador debe ser cambiado cada dos corrimientos electroforéticos.

2. La placa ya cargada con los sueros problema, se coloca en el soporte de la cámara de electroforesis y se hace el contacto entre ella y el amortiguador mediante las tiras de papel filtro Whatman No. 1.

3. Se conecta la cámara de electroforesis a la fuente de poder, colocando los sueros del lado del ánodo (+) y el antígeno del lado del cátodo (-).

4. Se aplica corriente eléctrica durante 30 minutos a una intensidad de 160 Voltios/cm y 16 mA.

5. Una vez terminado el corrimiento electroforético, la placa se saca de la cámara y se hace la lectura colocandola sobre fondo negro y con iluminación lateral para destacar más las bandas de precipitación.

6. La máxima dilución que dé una banda de precipitación definida, será el título de la reacción.

Para tener control sobre el sistema se corren simultaneamente sueros negativo, y positivo.

Si se desea intensificar las bandas de inmunoprecipitados se pueden teñir; para esto, las placas se lavan durante 24 horas con solución salina isotónica cambiandola con frecuencia para eliminar todas las proteínas que no reaccionaron, después de lavadas las placas se cubren durante 5 minutos con un colorante para proteínas, como por ejemplo rojo de Ponceau, Negro de amido etc.

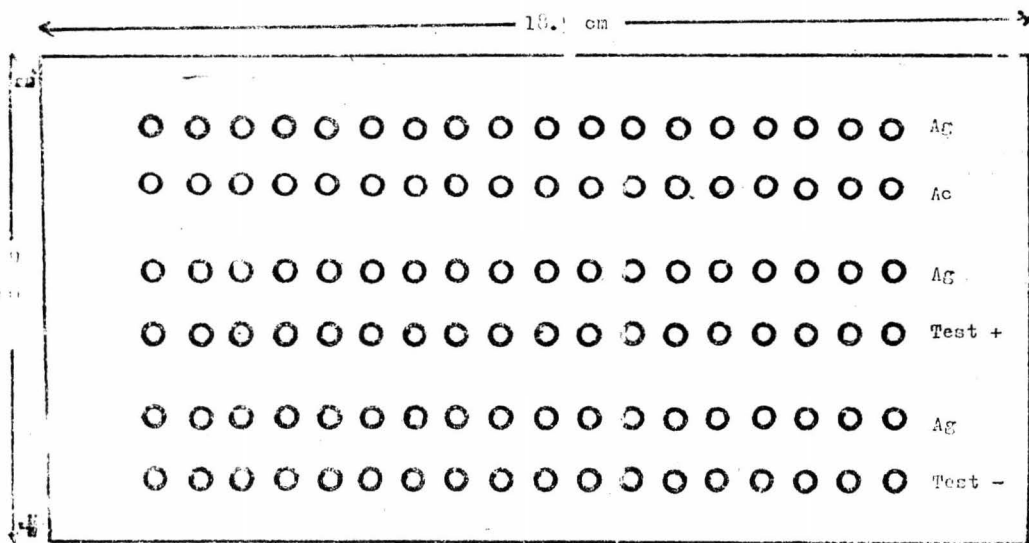
Transcurrido el tiempo de coloración las placas se lavan para eliminar el exceso de colorante y destacar las bandas de precipitación.

Si se emplea negro de amido el líquido de lavado, metanol-acético (9/3)

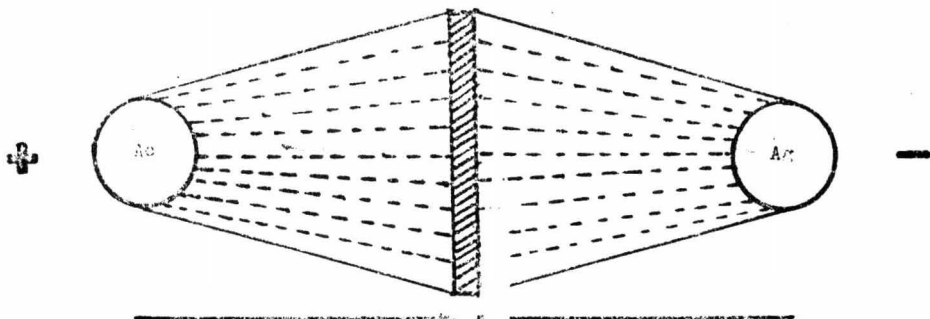
(27)

puede recuperarse, si se trata con carbón vegetal activado hasta su completa decoloración y se filtra.

Fig. 1. Esquema de una placa de co trainmunolectroforesis.



Se demuestra una reacción positiva de la difusión en gel del antígeno y anticuerpo por el método de co trainmunolectroforesis.



UTILIZACION DE ESTE SISTEMA PARA LA INVESTIGACION SIMULTANEA DE OTROS
ANTIGENOS Y ANTICUERPOS.

Para aprovechar al máximo las placas se corrieron simultaneamente varios-
sueros problema con su control positivo y negativo y además otros sueros-
para la detección de otro tipo de anticuerpos como antiesperma y anticuer-
pos frente al antígeno asociado a la hepatitis B para la investigación, -
así como de α_2 fetoproteína, productos de degradación del fibrinógeno D y
E, y del propio antígeno asociado a la hepatitis B.

C A P I T U L O I I I

RESULTADOS.

No. de sueros	Aglutinación en placa	Contrainmuno-electro- foresis
24	neg	neg
5	neg	1:1
3	neg	1:2
12	+	1:2
4	+	1:4
1	+	1:16
6	++	1:1
1	++	1:2
5	++	1:4
1	++	1:8
1	++	1:16
2	+++	1:2
3	+++	1:4
6	+++	1:8
3	+++	1:16
3	++++	1:2
9	++++	1:4
5	++++	1:8
4	++++	1:16

C A P I T U L O I V

DISCUSION.

Para las reacciones de aglutinación el antígeno se rehidrató con una suspensión de látex poliestireno, mientras que para las reacciones de precipitación se rehidrató con agua destilada. Los sueros problema se estudiaron por ambos métodos.

En 32 casos estudiados se encontró: 75 % de concordancia en negatividad por ambos métodos, y en 8 casos (25 %) se encontró negatividad por aglutinación y positividad por contraimmunoelectroforesis; en el 37.5 % de estos casos positivos fué posible determinar por medio de la historia clínica que se trataba ciertamente de amibiasis invasora, por lo que cabe pensar que la contraimmunoelectroforesis es más sensible que la aglutinación en la detección de anticuerpos anti**amibianos**.

En uno de los sueros positivos por contraimmunoelectroforesis se vió en la historia clínica que el laboratorio había reportado que existía **uncinariasis**.

De los 66 casos positivos comprobados por ambos métodos se encontró: 63.6 % de concordancia en el grado de positividad, quedando un 36.3 % en valores discrepantes de título de anticuerpos, observándose que las reacciones de aglutinación fueron más definidas.

Por el mayor número de casos positivos obtenidos por contraimmunoelectroforesis (100 %) podemos decir que: el antígeno utilizado puede emplearse tanto para la detección de anticuerpos **anti**amibianos** aglutinantes** y -- precipitantes.

CONCLUSIONES.

1. El antígeno desarrollado para la prueba de aglutinación en placa puede emplearse también, hidratado con agua destilada para la reacción de —
contrainmunolectroforesis.
2. Tomando como base los resultados obtenidos, la contrainmunolectroforesis mostró ser más sensible a la detección de anticuerpos antiamibianos que la aglutinación en placa.
3. La contrainmunolectroforesis mostró una positividad de 100 % en los sueros estudiados, mientras que la aglutinación en placa dió una positividad de 89.1 %.
4. La contrainmunolectroforesis es una técnica sencilla que puede llevarse a cabo fácilmente, la única desventaja es que requiere de un aparato de electroforesis.
5. Tiene la ventaja de que en una misma placa de gel, pueden correrse varias muestras, ya sea para la investigación de los anticuerpos antiamibianos o para la detección de otro tipo de anticuerpos, como por ejemplo: antiesperma, o de antígenos como el antígeno asociado a la hepatitis B, α , fetoproteína y productos de degradación del fibrinógeno D y E.
6. La aglutinación en látex se recomienda como prueba de selección ya que no requiere equipo de laboratorio, es de ejecución muy sencilla y los resultados se obtienen en unos minutos, posterior a esta prueba de selección, los casos positivos se comprobarán por contrainmunolectroforesis — para dar además el título de anticuerpos presente.

C A P I T U L O V

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

1. Sepúlveda B. 1970 Introducción al estudio de la amibiasis. Arch. Inv. Med (Mex) 1, Supl. No. 1,5
2. Sepúlveda B., M. De La Torre., y R. De La Hoz-Couturier., 1971 La amibiasis invasora por Entamoeba histolytica. Gaceta Medica de México. Vol. 100, No. 3,203.
3. Perches A., R. Kretschmer., E. Lee., y B. Sepúlveda., 1970 Determinación de inmunoglobulinas del suero en pacientes con amibiasis invasora. Arch. Inv. Med (Mex) 1, Supl. No. 1,97.
4. Kretschmer R. y M. López-Osuna., 1971 Estudios sobre inmunidad celular con antígeno amibiano axénico y sus fracciones. Arch. Inv. Med (Mex) 2, Supl. No. 1,269.
5. Aguirre-García J., 1970 Peculiaridades histopatológicas de la lesión amibiana. Arch. Inv. Med (Mex) 1, Supl. No. 1,147.
6. Flores-Barroeta F., R. Saavedra-Shimidzu., y F Velasco-Avilez. 1970 - Invasión de Entamoeba histolytica a diversos órganos y tejidos en sujetos humanos. Arch. Inv. Med. (Mex) 1, Supl. No. 1,129.
7. Lee E., O. Palacios., y R. Kretschmer., 1970 Localización del anti - cuerpo anti amibiano en las inmunoglobulinas de suero humano. Arch. Inv. - Med. (Mex) 1, Supl. No. 1,101.
8. Lee E., O. Palacios., y B. Sepúlveda., 1970 Inmunolectroforesis del antígeno amibiano. Arch. Inv. Med. (Mex) 1, Supl. No. 1,91.

9. De La Torre M., R. De La Hoz-Couturier., L. Landa., y B. Sepúlveda.,-
1971 Cultivos axénicos de Entamoeba histolytica Arch. Inv. Med. (Mex) 2
Supl. No. 1,166.
10. Enders B. , y K. D. Hungerer., 1974 Serodiagnosis in Amoebiasis. La-
boratory notes for Medical Diagnostics.
11. Philips B. P., 1950 Cultivation of Entamoeba histolytica with Trypa-
nosoma cruzi. Science. Vol. 111, No. 81,2871.
12. Bellanti J. A., 1972 Fijación del complemento. Immunología. Ed. In-
teramericana. Pag. 170.
13. Mancera-Massieu R., Lehmann-Azuaga Y., y S. Castro-Vargas., 1971 ---
Reacciones serológicas en la amibiasis invasora con la técnica de anti---
cuerpos fluorescentes. Arch. Inv. Med. (Mex) 2, Supl. No. 1,255.
14. Sepúlveda B., E. Lee., y L. Landa., 1971 El diagnóstico serológico de
la amibiasis invasora con la técnica de inmunoelectroforesis cruzada. ---
Arch. Inv. Med. (Mex) 2, Supl. No. 1,263.
15. Sepúlveda B. , 1970 Reacciones de hemaglutinación y de precipitación
con antígeno amibiano axénico en amibiasis invasora. Arch. Inv. Med. ---
(Mex) 1, Supl. No. 1,111.