

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS REACCIONES
SEROLOGICAS EN EL DIAGNOSTICO DE
AMIBIASIS INVASORA

55

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
NORMA ROSSET CAPIN GUTIERREZ



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.

PRESIDENTE	Magdalena Acosta Segura
VOCAL	Librado Ortiz-Ortiz
SECRETARIO	Ernestina Ballesteros Rueda
1er. SUPLENTE	Socorro Cao Romero Martínez
2o. SUPLENTE	Guillermo Rendón

Sitio donde se desarrolló el tema:

Depto. de Microbiología de la Facultad de Química

Depto. de Inmunología de la Facultad de Medicina

Depto. de Inmunología y Alergia del Hospital General
del IMSS.

Sustentante:

Norma Rosset Capín Gutiérrez

Asesor del Tema:

Dr. Librado Ortiz-Ortiz

CON TODO CARIÑO DEDICO ESTA TESIS A MIS PADRES,
SR. ANTONIO CAPIN CRUZ Y SRA. HERMELINDA GUTIERREZ DE
CAPIN, ASI COMO A MI HERMANA RUTH Y DEMAS FAMILIARES.

A MI DIRECTOR DE TESIS, DR. LIBRADO ORTIZ ORTIZ,
AGRADECIENDOLE LA DEDICACION QUE ME HA BRINDADO.

A MIS MAESTROS

A MIS AMIGOS

A JAVIER

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION.....	1
REVISION HISTORICA.....	2
Estudios inmunológicos.....	7
Fijación de complemento.....	8
Inmovilización.....	10
Precipitación.....	12
a) Precipitación en capilar.....	12
b) Doble difusión en gel.....	12
c) Contrainmunolectroforesis.....	14
Anticuerpos fluorescentes.....	15
Hemaglutinación indirecta.....	17
Aglutinación en látex.....	19
Prueba cutánea.....	21
Prueba de fagocitosis.....	21
Prueba de adherencia leucocitaria.....	22
Estudios comparativos entre algunas de las reacciones serológicas más utilizadas en el diagnóstico de la amibiasis.....	22
Clases de inmunoglobulinas involucradas en infecciones por <u>E. histolytica</u>	24
MATERIAL Y METODOS	
A.- Material.....	26
B.- Métodos.	
Tratamiento con 2-mercaptoetanol.....	30
Técnica de hemaglutinación indirecta.....	30

	Pág.
Técnica de fijación de complemento.....	33
Técnica de contrainmunolectroforesis.....	40
RESULTADOS	
Determinación de anticuerpos contra <u>E. histolytica</u> en :	
a) Sueros humanos provenientes del estado de Oaxaca.....	42
b) Sueros de individuos con absceso hepático amibiano.....	42
c) Sueros de familiares de pacientes con absceso hepático amibiano.....	43
d).- Sueros de pacientes hospitalizados con enfermedad de etiología no amibiana.....	43
Resultados acumulados.....	43
Tratamiento de los sueros con 2-mercaptoetanol para determinar la clase de inmunoglobulina involucrada en las reacciones serológicas estudiadas.....	44
DISCUSION.....	52
CONCLUSIONES.....	55
BIBLIOGRAFIA.....	56

INTRODUCCION

La amibiasis representa un problema médico-social en nuestro país y esto justifica el número siempre creciente de investigaciones en torno a Entamoeba histolytica. Los estudios epidemiológicos, señalan la prevalencia de la enfermedad en una población determinada y establece las medidas necesarias para combatirla. Por esta razón, hemos querido hacer una evaluación de las técnicas serológicas más usadas en nuestro medio para el diagnóstico de la amibiasis ocasionada por E. histolytica, específicamente: reacciones de contrainmuno-electroforesis, de fijación del complemento y de hemaglutinación indirecta. Al mismo tiempo y sabiendo que en la respuesta primaria la inmunoglobulina que predomina es de tipo IgM y en la respuesta secundaria es de tipo IgG, hemos determinado estos anticuerpos en un grupo de pacientes con amibiasis y en sujetos sin datos clínicos de la misma. Consideramos que conociendo la sensibilidad de las reacciones y la clase de inmunoglobulina predominante, podremos en un momento dado definir el tipo de reacción que debemos utilizar en un estudio epidemiológico o para el diagnóstico de la amibiasis.

REVISION HISTORICA.

Entamoeba histolytica, protozooario de la clase Sarcodina, produce varias enfermedades que se han agrupado con el nombre de amibiasis. Se ha encontrado que aproximadamente el 27% de la población mexicana está infectada con este parásito. En autopsias realizadas en el Hospital General de esta Ciudad, se ha encontrado que la amibiasis ocupa el quinto lugar entre las causas de muerte; por lo que en la República Mexicana este padecimiento se ha convertido en un gran problema de salud pública, que se presenta no sólo en la población de bajo nivel económico, donde la deficiencia nutricional, hacinamiento y malas condiciones de higiene en que vive, puede hacer de este grupo una presa fácil de la amibiasis; sino que también la clase media y aún la clase más elevada son atacadas por este parásito, debido principalmente a la poca higiene con que se elaboran los alimentos (1,2,3,4).

El ciclo de vida de E. histolytica es relativamente sencillo, requiriendo de un solo tipo de hospedero: los primates, entre los cuales destaca el hombre; por lo tanto esta parasitosis es considerada como una zooantroposis. Este hecho contribuye a la fácil propagación y difícil erradicación de la amibiasis (5).

Las características morfológicas de E. histolytica que la diferencian del resto de los miembros de la fa

milia Entamoebidae a la cual pertenece, son las siguientes:

a) El tamaño del trofozoito es de 15-30 micras de diámetro como promedio.

b) La formación de pseudópodos se realiza en forma explosiva.

c) Diferenciación bastante aparente entre ectoplasma y endoplasma. Con frecuencia en éste último pueden encontrarse glóbulos rojos en desintegración.

d) Núcleo excéntrico, teñido con hematoxilina presenta gránulos muy finos y uniformes de cromatina revistiendo la membrana nuclear y un cariosoma central de donde nace una fina red de fibrillas que se dirigen a la periferia del núcleo.

e) El quiste que mide de 10 a 14 u de diámetro está formado por una fina pared y un contorno simple. En sus diversos estadios de desarrollo pueden tener 1, 2 ó 3 núcleos; cuando los quistes están maduros pueden contener hasta 4 núcleos. Presentan una vacuola yodófila - que es más visible en los quistes uninucleados. Las inclusiones siderófilas o cromidios son frecuentes en todos los estadios de desarrollo (1,4,5).

La principal fuente de infección la constituye el enfermo crónico o el portador asintomático, ya que expulsan quistes en la material fecal, los cuales pueden contaminar el agua y los alimentos de consumo humano, sirviendo así como vehículo de transmisión. Una vez ingeri-

do por el hombre, el quiste maduro resiste a los jugos digestivos ácidos del estómago y llega a la parte baja del intestino delgado, donde bajo la influencia de las secreciones digestivas neutras o alcalinas provenientes del páncreas y de la actividad de la amiba, rompe su cutícula quística, liberando una amiba metaquística de 4 núcleos, la cual se divide formando 8 elementos que se rodean de citoplasma, para dar nacimiento a 8 trofozoitos pequeños. Estos trofozoitos pasan al intestino grueso (colon, especialmente ciego y recto sigmoide) donde algunos continúan dividiéndose por fisión binaria y otros forman prequistes. Cuando los quistes llegan a su madurez completa, son arrojados al exterior con la materia fecal y al contaminar los alimentos pueden ser ingeridos por otro huésped, iniciándose en esta forma un nuevo ciclo (1,4,5).

E. histolytica puede ser avirulenta, adoptando una existencia comensal en el lumen del intestino delgado, alimentándose de bacterias y detritus comestibles. Algunos autores la llaman forma minuta (15 a 20 micras de diámetro) y se le encuentra en los convalescientes y portadores sanos. Esta forma no virulenta puede hacerse virulenta bajo condiciones propicias que reúne el huésped, las cuales son importantes para lograr la interacción huésped-parásito. Entre estas condiciones tenemos:

a) Estado nutricional del huésped:

1.- Dieta elevada en carbohidratos. Entre muchas

otras substancias se ha demostrado un claro requerimiento de carbohidratos y colesterol. La alteración de estos componentes en la dieta del huésped modifica la actividad fisiológica del parásito.

2.- Dieta inadecuada. Puede causar una marcada atrofia de la mucosa cecal y estos cambios estructurales en el huésped ayudan a la invasión por la amiba.

b) Estado ecológico del intestino delgado:

Es importante la influencia de la flora bacteriana residente en el intestino, ya que se ha observado que existe una participación de las bacterias en la etiología de la amibiasis entérica. Las lesiones amibianas se desarrollan con todas las bacterias probadas, sin embargo la severidad de la enfermedad varía de acuerdo al tipo de asociación. En los tejidos, la invasión típica, activa de las amibas, es complicada a menudo por varios grados de sobreposición de la inflamación bacteriana (4, 5).

En la amibiasis invasora, la amiba se moviliza en la superficie de la mucosa y absorbe sus alimentos de los tejidos disueltos por sus enzimas citolíticas. También ingiere glóbulos rojos, hemoglobina, substancias parcialmente sintetizadas por el huésped y fragmentos de tejidos. Por otro lado la penetración del epitelio es usualmente seguida por una propagación al tejido subepitelial, extendiéndose más allá de la mucosa muscular, provocando las características ulceraciones y abscesos.

En la submucosa las amibas pueden tener acceso a la circulación porta hepática y linfática, siendo transportadas al hígado, pulmones, cerebro y otros focos metastásicos. El hígado es el órgano involucrado con mayor frecuencia y en donde la colonización puede iniciarse en ausencia de contaminación bacteriana. En el hígado la reacción celular del huésped es mínima y no hay infiltración típica leucocitaria o una encapsulación fibrosa de las áreas del absceso (5).

E. histolytica posee una serie de enzimas que incluyen algunas involucradas en la glicólisis anaerobia, además amilasa, fosfatasa ácida e hialuronidasa. En los tejidos invadidos por los trofozoitos se pueden observar zonas de licuefacción, lo que indica posiblemente una acción proteolítica donde participan gelatinasa, pepsina y tripsina. Estas sustancias proteolíticas las contienen tanto las cepas patógenas como las no patógenas. Sin embargo se ha encontrado que las amibas de vida libre carecen de tripsina ya que no lisan in vitro las células epiteliales (5).

Desde el punto de vista clínico la amibiasis sintomática se puede presentar como:

a) Amibiasis intestinal. En este caso se pueden observar formas agudas, como la disentería amibiana y formas crónicas, como la rectitis crónica, la colitis y el pseudo cáncer amibiano o ameboma (síndrome intestinal de carácter lesional).

b) Amibiasis extraintestinal. En este caso nos encontramos con los siguientes padecimientos:

Amibiasis hepática, donde se incluye tanto a la amibiasis hepática diseminada como al absceso hepático amibiano (6).

Amibiasis cutánea, localizada principalmente en los bordes cutáneos y mucosos. Entre este tipo de amibiasis tenemos aquéllas que se presentan en órganos genitales, en zonas perianales, en vejiga, etc. (7).

Otras localizaciones son poco frecuentes en clínica, en ocasiones constituyen hallazgos de autopsias y suelen ser complicaciones de una de las formas anatómico-clínicas mencionadas. Según sean las posibilidades de migración de E. histolytica en el hospedero nos encontramos con abscesos pulmonares, cerebrales, esplénicos, ganglionares, apendicitis amibiana, pericarditis amibiana, etc.

Estudios inmunológicos.-El diagnóstico de estos padecimientos es auxiliado por la detección en el laboratorio de E. histolytica. En amibiasis intestinal se logra determinando por métodos coproparasitoscópicos la presencia de quistes o trofozoitos en materia fecal o mejor aún por el examen del raspado rectal. En otras localizaciones, principalmente en las extraintestinales, no es posible o es difícil salvo excepciones, detectar al parásito. Sin embargo, desde que Izar en 1914 demostró la presencia de anticuerpos específicos en infecciones por E. histolytica (8), se han realizado intentos para desarrollar una prueba serológica útil y confiable para el diagnósti

co de estas enfermedades. Entre los métodos inmunológicos usados para detectar amibiasis invasora tenemos los siguientes:

Prueba de fijación del complemento.- Craig en 1927 (9) encontró que esta prueba podía tener posibilidades como técnica de diagnóstico. El fundamento de la técnica se basa en la capacidad del complemento de fijarse a complejos antígeno-anticuerpo. Esto se determina al ponerse en contacto en la fase inicial, cantidades conocidas de antígeno y diluciones del suero en estudio. Si existen anticuerpos, al reaccionar con el antígeno se forma un complejo que reaccionará con el complemento. Para determinar si el complemento se ha fijado, se adiciona un sistema indicador constituido por glóbulos rojos de carnero y anti-glóbulos rojos de carnero (hemolisina). Si el complemento se ha fijado en la etapa inicial, los eritrocitos sensibilizados no serán lisados. Por el contrario, si el suero en estudio no contiene anticuerpos contra el antígeno, el complemento libre reaccionará en la segunda fase con el complejo glóbulo rojo hemolisina, lisando el sistema indicador (10).

La fijación del complemento requiere de un cuidadoso control de todos los elementos que participan de la reacción. Es frecuente encontrar actividad anticomplementaria del suero (fijación inespecífica del complemento), la cual puede en algunos casos ser debida a contaminación bacteriana, complejos inmunes específicos o inespecífi -

cos (11).

Esta prueba tiene un límite de sensibilidad que le permite determinar de 0.05 a 0.1 µg de N de anticuerpo. Tanto la inmunoglobulina M (IgM) como la inmunoglobulina G (IgG) fijan el complemento, sin embargo la primera tiene más a avidez para fijarlo, lo cual se explica en base a su estructura. Esta mayor capacidad de fijación de la IgM, puede ser abolida por tratamiento con agentes reductores tales como el 2-mercaptoetanol, seguida por alquilación (12).

La reacción utilizada en amibiasis ha dado lugar a controversias en cuanto a su utilidad. Para algunos autorees ha dado magníficos resultados, para otros sin embargo ha dado tanto falsas positivas como negativas (13). Las diferencias observadas se han tratado de explicar en base a los distintos tipos de antígeno utilizados (DKB, NRS, BH, F-22, HK-9, 200, JH, K-9, JS, Huff, LA, etc.) (14). A continuación presentamos una relación de los resultados obtenidos:

Craig en 1933 (15), encontró el 90% de reacciones positivas en amibiasis intestinal, sin embargo Paulson y Andrews en 1938 (16) encontraron sólo el 47%; Terry y Bozicevich en 1948 (17) estudiando pacientes con invasión hepática amibiana hallaron el 80%. Por otra parte Hussey y Brown en 1950 (18), encontraron el 2.2% en pacientes que presentaban E. histolytica en evacuaciones y varios grados de amibiasis clínica intestinal y Bozicevich en 1950 (19) no observó reacciones positivas en casos de amibiasis intestinales. Sin embargo McDearman y Dunham en 1952 (20) utilizando el mismo tipo de antígeno que Bozi-

cevich obtuvieron el 15% en amibiasis intestinal y el 85% en amibiasis extraintestinal. En el mismo año, Elsdon-Dew y Maddison (21) encontraron el 63% de reacción positiva en amibiasis intestinal confirmada y el 96.5% en absceso hepático amibiano; posteriormente Juniper en 1970 (22), encontró el 83% de pruebas positivas en amibiasis hepática. En la actualidad la prueba de fijación de complemento para amibiasis ha sido descontinuada por su poca reproductibilidad (23).

Prueba de inmovilización.- Fue descrita por Cole y Kent en 1953 (24) y se fundamenta en el hecho de que las amibas pierden su motilidad al ser incubadas con sus anticuerpos específicos. El trofozoito deja de formar pseudópodos, con una inmovilización que es máxima entre los 20 a 30 minutos, recuperando más tarde su actividad. Esta reacción se ha utilizado como diagnóstico serológico en la amibiasis y se ha encontrado que tiene mayor sensibilidad que la prueba de fijación de complemento.

En 1961 Biagi y Buentello (25) demostraron que los sueros de pacientes con amibiasis tenían anticuerpos inmovilizantes y que este factor de inmovilización podía pasar la barrera placentaria. El factor inmovilizante de E. histolytica se encontró en la fracción globulina del suero inmune. Debido a la aparente reversibilidad de la inmovilización, ha habido controversias en cuanto a su interpretación (26).

Los resultados obtenidos por Biagi y Buentello(27)

son los siguientes:

Absceso hepático amibiano	88%	positivos.
Amibiasis intestinal aguda	90%	"
Amibiasis intestinal crónica	78%	"
Casos sospechosos	58%	"
Personas sanas	18%	"

Posteriormente Beltrán y col. en 1962 (28) reportaron resultados similares:

Amibiasis comprobada	89.3%	positivos.
Sin antecedentes de cuadros clínicos atribuibles a amibiasis	10.3%	"

En 1966 se utilizaron anticuerpos fluorescentes y se observó que cuando la inmovilización ocurría, la fluorescencia se localizaba en la superficie del microorganismo y que después de 45 minutos se encontraba regularmente distribuida en el endoplasma y ectoplasma. A los 75 minutos la fluorescencia se observaba en una gran vacuola en el endoplasma y a los 101 minutos apenas si sea perceptible. En este tiempo el trofozoito recobraba por completo su movilidad. La disminución de la fluorescencia no se observaba en aquellos trofozoitos que no se recuperaban.

Además, se ha encontrado que la prueba de inmovilización se vuelve positiva en personas que han adquirido la enfermedad recientemente. En algunos casos se pudo comprobar que el padecimiento tenía 10 días de iniciado(29).

Esta prueba de inmovilización también la han utilizado empleando sueros de conejos inmunizados contra E. histolytica, con el objeto de identificar diferentes ce-

pas de este protozoario, demostrándose que a pesar de formar grupos distintos, las cepas virulentas y las avirulentas dan reacción cruzada (30). En 1957 Sato y Kaneko (5), encontraron que los anticuerpos específicos contra Entamoeba coli cruzaban con E. histolytica, mientras que anticuerpos contra esta última no mostraban reactividad cruzada con Entamoeba gingivalis.

Prueba de precipitación.- Desde 1924, Wagener (5) había reportado la presencia de precipitinas en el suero de gatos con disentería amibiana experimental. En la actualidad las pruebas de precipitación empleadas en el diagnóstico de la amibiasis son:

a) Prueba de precipitación en capilar: Se realiza introduciendo en un tubo capilar el antígeno y el anticuerpo, ambos en forma soluble. Se mezclan e incuban inicialmente a 37° C durante 60 minutos y después por 18 horas a 4° C. Esta prueba tiene varias ventajas, ya que usa cantidades pequeñas de los reactivos serológicos y además es un método sensible, específico y reproducible, que permite una apreciación semicuantitativa de la reacción, ya que el precipitado se sedimenta y se acumula en el fondo de la columna líquida. La altura de esta columna se puede medir, constituyendo un índice de la cantidad de anticuerpos presente en la zona de equivalencia. Originalmente el antígeno utilizado fué obtenido de un cultivo monoxénico de E. histolytica - C. welchii (31, 32).

b) Prueba de doble difusión en gel: Desarrollada por primera vez por Ouchterlony (33), ha sido usada en la determinación de anticuerpos contra E. histolytica.

En esta reacción el antígeno y el anticuerpo difunden a través de un gel de agar; al encontrarse forman un complejo antígeno-anticuerpo, obteniéndose una banda de precipitación que se observa fácilmente. La ventaja principal de esta prueba es la facilidad con que se puede reconocer la identidad o diferencia serológica de antígenos distintos. Por este método Maddison y Eldson-Dew (14), identificaron anticuerpos precipitantes en los sueros de pacientes con amibiasis. La presencia de anticuerpos se demostró en el 100% de los sueros obtenidos de pacientes con absceso hepático; en el 69% de aquéllos con disentería amibiana y en el 60% de los sueros de individuos con disentería no amibiana.

En otro estudio por Maddison y col. (34), no se pudo demostrar la presencia de anticuerpos en el 60% de individuos africanos portadores de quistes. Los autores postulan la posibilidad de que la amiba pueda vivir en el lumen sin estimular la formación de precipitinas a nivel detectable. Otra posibilidad que no puede descartarse es la de que existan los anticuerpos contra la amiba, pero que la técnica no tenga la sensibilidad apropiada.

Nakamura y col. (35), estudiando los anticuerpos contra E. histolytica por difusión en gel, encontraron tres bandas de precipitación; Sen y col. (36), utilizando un antígeno de E. histolytica asociado con Escherichia coli-Pseudomonas pyocianus y un suero de conejo hiperinmune, también encontraron tres bandas de precipita-

ción; otros autores han reportado en el suero de pacientes con absceso hepático, disentería amibiana y portador sano, de 2-10 bandas de precipitación (37).

Estos resultados han mostrando la sensibilidad del procedimiento de doble difusión en gel; sin embargo se ha encontrado que el mayor o menor número de bandas depende tanto de la concentración en la cual se encuentra el material de prueba como del tipo del antígeno utilizado. Esta prueba también se utiliza para ver reacción cruzada entre los diferentes géneros de Entamoeba (37, 38).

c) la inmunoelectroforesis cruzada o contrainmuno-electroforesis (CIE): Es una técnica que desde 1971 se empezó a utilizar en la investigación de reacciones serológica de la amibiasis invasora. Se basa en que el anticuerpo antiamibiano al desplazarse hacia el cátodo por el efecto de la electroendosmosis, se encuentra con el antígeno amibiano que se moviliza hacia el ánodo por influencia de la corriente electroforética, formando así bandas de precipitación. Es una técnica sensible, rápida y sencilla para el diagnóstico de la amibiasis invasora (39).

Algunos estudios con la reacción de precipitación en gel fueron realizados por:

Maddison en 1965 (34), quien encontró en absceso hepático amibiano el 97% de reacciones positivas, disentería amibiana 89%, portadores de quistes 37% y en controles del 6 al 27%; en el mismo año Powell y col. (40),

encontraron en casos de absceso hepático entre el 90 y 96%. En 1966 estos últimos autores (41), encontraron en casos de disentería amibiana el 92% de positivos, en colitis ulcerativa post-disentérica 100% y en colitis crónica ulcerativa no específica 0%; en el mismo año Aurenheimer (42), hizo un estudio con pacientes asintomáticos y observó un 51% de casos positivos, mientras que en pacientes sintomáticos la frecuencia fue de 85%. Un año más tarde Halpern (43) obtuvo un 92% en caso de absceso hepático amibiano. Ultimamente Lavalley y col. (44), utilizando pacientes con absceso hepático en etapa aguda obtuvo un 100% de reacciones positivas, mientras que en etapa tardía el porcentaje fue de 82.6% y en pacientes sin evidencia clínica hubo sólo de 3-5% casos positivos.

La prueba de precipitación por difusión en gel para amibiasis aparece ligeramente menos sensible en disentería que en absceso hepático. Los resultados son mucho más consistentes que aquellos obtenidos por la prueba de fijación de complemento (45).

Prueba de anticuerpos fluorescentes (PAF).-Esta técnica se basa en la propiedad que tienen los tiocianatos e isotiocianatos a reaccionar con los grupos amino de las proteínas. Si a estos tiocianatos se les acopla químicamente un agrupamiento fluorescente, se encontrará con un reactivo que permitirá etiquetar las proteínas o específicamente las fracciones gamma globulina de un suero inmune. Este material así marcado es susceptible de ser excitado por la luz de longitud de onda corta (ultravioleta-

ta y azul corta) y de emitir instantáneamente una luz de longitud de onda mayor (luz visible), produciendo una luz verde o amarillo verdosa (31).

Este método de fluorescencia fue aplicado a protozoarios por Goldman en 1953 (6), en la determinación de anticuerpos en la amibiasis humana. Esta técnica ofrece varios problemas debido a que se observa una coloración variable de las amibas y además un verde fluorescente no específico, lo que hace extremadamente subjetivo el interpretar la lectura. Debido a estos problemas se han hecho algunas modificaciones a la técnica, como es el uso del azul de Evans como contraste (6).

La técnica de fluorescencia ha mostrado los siguientes resultados:

En 1965 Beltrán (26) reportó en amibiasis intestinal aguda el 93.5% de casos positivos, en amibiasis intestinal crónica un 83.5%, en absceso hepático amibiano 92.6% y en personas sanas un 33.3%. Goldman en 1966 (6), reportó el 73.1% en casos de amibiasis intestinal confirmada, el 91.3% en amibiasis extraintestinal y el 31% en individuos sin evidencia amibiana. En el mismo año Talis(46) encontró el 50% de reacciones positivas en pacientes con padecimientos no amibianos, lo cual se atribuyó a un contacto pasado con amibas. En 1967 Gore (47) obtuvo en amibiasis extraintestinal el 100% de reacciones positivas, en disentería amibiana el 83% y en amibiasis asintomática el 50%.

Se ha reportado que la sensibilidad de la prueba de inmunofluorescencia directa, utilizando como antígeno trofozoitos íntegros de E. histolytica desarrollada en cultivos axénicos, es de un 90%; pero la importancia primordial de esta técnica consiste en que la lectura se realiza por observación directa de las células amibianas completas con lo que se disminuye el riesgo de resultados falsos positivos (48). La sensibilidad de la inmunofluorescencia directa, cuando se utilizan cortes histológicos de hígado de hamster inoculados con trofozoitos de Entamoeba histolytica, es del 90%; aunque por este método es mayor el riesgo de obtener reacciones falsas positivas (49).

La prueba de antígeno soluble-anticuerpo fluorescente (SAFA), consiste en utilizar un antígeno axénico de E. histolytica de preparación comercial, adsorbido en discos de papel filtro de celulosa; se deja secar y se prosigue con el método de inmunofluorescencia indirecta. La lectura se hace en un fluorómetro. Esta técnica muestra un alto grado de especificidad y reproducibilidad de los resultados observados. Sin embargo se han obtenido reacciones cruzadas con sueros de pacientes con leishmaniasis visceral y otras enfermedades infecciosas. En general correlacionan los títulos de los anticuerpos con el grado y localización del órgano involucrado (47, 50).

Hemaglutinación indirecta (HAI).-Debido a la gran sensibilidad que tiene la reacción de hemaglutinación pa

siva llamada también indirecta, en la determinación de anticuerpos (0.005 $\mu\text{gN/ml}$), se le ha utilizado en estudios epidemiológicos de amibiasis. Los eritrocitos que se utilizan como soporte son tratados con ácido tánico. Este tratamiento permite la posterior adsorción del antígeno. En esta forma tenemos un material antigénico particulado de E. histolytica (31).

Este método se empezó a usar en el diagnóstico de la amibiasis desde 1961, cuando Kessel y col. (51) indicaron que la hemaglutinación indirecta era útil en la determinación de anticuerpos contra E. histolytica. Las variaciones en la reactividad encontrada se atribuyeron principalmente a: características del antígeno, duración y frecuencia de la acción de E. histolytica en una infección y a la eficiencia del huésped en la producción de anticuerpos (6).

En 1965 Kessel y col. (52), encontraron que la prueba de HAI permanecía positiva al menos un año después de la infección inicial y que en la mayoría de los casos los títulos encontrados disminuían gradualmente.

Milgram y col. (53), hicieron estudios que mostraron una alta especificidad de la HAI en los sueros de pacientes con amibiasis extraintestinal y enfatizaron su valor en la diferenciación amibiana y en el absceso piógeno del hígado. Sus resultados en amibiasis intestinal fueron también alentadores. La prueba fue específica pero no detectó todos los casos de amibiasis intestinal.

Los resultados obtenidos por algunos investigado-

res con esta prueba son los siguientes:

En 1961 Kessel y col. (51), reportaron en el absceso hepático amibiano un 100% de reacciones positivas, disentería amibiana 98%, portadores asintomáticos el 66% y controles 3%. En 1965 este autor repitió sus estudios y llegó a resultados similares, además en amibiasis del colon obtuvo un 87%. Un año más tarde Milgram (53) reportó en amibiasis hepática el 96%, en amibiasis del colon el 48%, en amibiasis sintomática el 82%, en amibiasis asintomática el 9% y en personas sanas solamente 0.6% de reacciones positivas. En 1967 Halpern (43) encontró una positividad del 85% en amibiasis invasora, del 88% en amibiasis del hígado y del 83% en casos de amibiasis extraintestinal. Un año más tarde Thompson (54) reporta en casos de amibiasis sintomática el 90%, amibiasis asintomática el 58% y en personas sanas el 17%. En el mismo año Juniper y col. (55), obtuvieron para amibiasis sintomática un 87% y en la asintomática un 52%, en casos de pacientes sin amibiasis el 7%. En 1969 Juniper y col. (56), reportaron en la amibiasis invasora un 84% de reacciones positivas y un 0.9% de reacciones falsas positivas. Un año más tarde Krupp (57) obtuvo en casos de amibiasis extraintestinal el 87%, para colitis amibiana el 81%, en portadores de quistes el 9% y en personas sanas un 7% de reacciones positivas.

Prueba de aglutinación en látex.-Basados en la reacción de hemaglutinación se ha desarrollado una prueba de

aglutinación utilizando partículas de látex (poliestireno) como soporte del antígeno amibiano. Se ha usado el antígeno axénico HK-9 de E. histolytica. La prueba ha mostrado ser más sensible que la difusión en gel en casos de amibiasis intestinal. Sin embargo la aglutinación en látex muestra un alto porcentaje de reacciones positivas en pacientes asintomáticos, lo cual posiblemente refleja una infección clínica pasada de poca importancia o bien una reacción falsa. Por otra parte, un resultado negativo en esta prueba es de un valor definitivo en la exclusión de un absceso hepático amibiano (58). Los datos obtenidos usando esta prueba son:

	Quistes o trofozoitos Posit./Total	Precipitación en gel Posit./Total	Látex Posit./ Total
Problema gastroin- testinal e hígado	2/128	0/200	37/200
Diarrea	26/63	3/63	18/63
Absceso hepático amibiano	1/11	11/11	11/11

Otros autores han encontrado con la prueba de látex, una positividad del 98% en el absceso hepático amibiano y un 96% en la disentería amibiana. También se han reportado reacciones negativas falsas, por lo que no se ha adaptado como método de laboratorio (59).

La sensibilidad de estas pruebas es:

REACCION	μ g de N de Ac/ml de suero	(60,61).
Precipitación	3-20	
Inmunolectroforesis	3-20	
Doble difusión en agar	6	
Fijación de complemento	0.01-0.1	
Hemaglutinación indirecta	0.005	

Prueba cutánea.- En 1968, Maddison y col. (62) realizando pruebas cutáneas en pacientes infectados con E. histolytica, encontraron tanto reacción inmediata como retardada. Mientras los pacientes con absceso hepático mostraron ambas reacciones, los pacientes con amibiasis intestinal presentaron predominantemente una respuesta de tipo inmediato. La respuesta tardía se asoció a una invasión tisular pasada o a una enfermedad crónica. En 1971 Kretschmer y col. (63) utilizando como antígeno la histolycina, encontraron que excluyendo a los pacientes con anergía, la reacción tardía era obtenida en 64.4% de pacientes con absceso amibiano del hígado, en 47.1% de los pacientes con rectocolitis amibiana y en 20.4% de los controles. La prueba tardía a la histolycina es una técnica que tiene gran potencial en el estudio de la epidemiología y la inmunidad a E. histolytica.

Prueba de fagocitosis.- Este método está basado en el poder fagocitario selectivo, que ejercen los neutrófi los humanos, que han sido expuestos previamente al suero de pacientes con amibiasis o al suero de animales inmunizados con el antígeno de amiba, sobre partículas de ben-

tonita sensibilizadas con antígeno amibiano (64). En 1967 Halpern (43), haciendo un estudio comparativo de esta prueba con otras pruebas serológicas, encontró los siguientes datos:

98% Positiva	Prueba de fagocitosis
86% Positiva	Hemaglutinación
95% Positiva	Difusión en agar
91% Positiva	Examen microscópico

Prueba de adherencia leococitaria.- Se ha encontrado que los leucocitos de individuos con disentería amibiana se adhieren a las amibas de cultivo axénico HK-9 y 200 cuando han sido incubadas durante 60 minutos a 37°C. Los leucocitos de individuos sin historia de amibiasis no se adhieren a E. histolytica. Un estudio realizado en sueros ha mostrado una correlación entre el título de hemaglutinación, títulos de IgA específica contra el parásito y los resultados obtenidos por la prueba de adherencia leucocitaria (65).

Juniper y col. en 1970 (22), tratando de correlacionar los resultados de algunas de las pruebas más utilizadas, realizó estudios empleando como antígeno cepas axénicas NIH-200 y HK-9 obteniendo los siguientes resultados:

Padecimiento amibiano	Prueba empleada.		
	H A I	Precip.	F C
Piel y Pulmones	100%	100%	100%
Absceso hepático	83%	83%	83%
Invasión del colon	95%	85%	86%

Sintomatología del colon	61%	56%	54%
Colon asintomático	58%	58%	52%
Casos intestinales	77%	71%	71%

Un año más tarde Krupp y Powell (66), utilizando cepas axénicas DKB, 200 y cepas monoxénicas con C welchii, obtuvieron:

	H A I	Precip.	F C
Amibiasis invasora	94%	95%	65%
Portadores de quistes	55%	39%	--

Nuevamente en 1972 Juniper y col. (67) utilizando el mismo antígeno que en 1970, reportaron:

	H A I	Precip.	F C
Amibiasis invasora	95%	86%	85%
Amibiasis sintomática	61%	56%	54%
Amibiasis asintomática	58%	58%	52%

Maddison en 1965 (68), muestra la relación entre HAI y la prueba de precipitación para la detección de anticuerpos contra amiba, encontrando muchos casos en que la HAI es positiva, mientras que la precipitación resultaba negativa y viceversa. Estas discrepancias nos sugieren ya, que seguramente estas técnicas detectan diferentes clases de anticuerpos.

En el mismo año Kessel y col. (52) comparando la técnica de HAI y FC encontraron los siguientes resultados:

	H A I	F C (% de positivos).
Absceso hepático	100%	100%
Disentería (sangre y moco)	98%	90%

Síntomas entéricos leves	97%	33%
Asintomático	66%	28%
Grupo control	3%	0%

Esto indica que los anticuerpos medidos por la prueba de fijación de complemento (FC), son formados menos frecuentemente o desaparecen más rápidamente que aquéllos medidos por la prueba de hemaglutinación indirecta (HAI). Por lo tanto un título alto, mediano o bajo de HAI con un negativo de FC indicará una infección pasada o presente, lo cual podría diferenciarse solamente por los hallazgos clínicos; mientras que una HAI negativa y una prueba de FC positiva, caso poco frecuente, podría indicar una infección temprana o inhabilidad de parte del paciente de producir anticuerpos aglutinantes.

Clases de inmunoglobulinas involucradas en infecciones por E. histolytica.- Debido a los diferentes resultados obtenidos con las técnicas antes mencionadas, particularmente hemaglutinación y precipitación, se pensó que una de las razones para explicar estas discrepancias podría ser la clase de inmunoglobulina involucrada en las reacciones serológicas. Tomando en cuenta todo esto, se han hecho estudios para detectar la clase de anticuerpos presentes en la amibiasis invasora. En 1968 Ali Khan, Z. y col. (69) utilizaron el tratamiento con el 2-mercaptotanol (2ME), en el suero anti-amibiano de conejos. El 2ME tiene la propiedad de fraccionar por reducción a la IgM, destruyendo completamente su actividad, sin afectar el

comportamiento de la fracción IgG. Si se tratan los antii sueros con 2ME, seguida por tratamiento con iodoacetamida, se alkilan las fracciones reducidas por el mercaptoetanol, de tal manera que se evita la reasociación de la globulii na reducida. Los anticuerpos de conejo se obtuvieron por inmunización con antígeno de E. histolytica cepa DKB, mezclada con un volumen igual de adyuvante completo de Freund. La prueba de hemaglutinación se hizo en la respuesta primaria (de la 1^a a la 3^a semana después de la primera inyección) y en la respuesta secundaria (5^a 6^a y 12^a semana después de la inmunización). Los resultados indicaron que la HAI detecta tanto la IgM como la IgG; mientras que la prueba de precipitación sólo detecta la IgG. Esto se demostró más ampliamente al hacer el corrimiento inmuno-electroforético de los sueros antes y después del tratamiento con el 2-mercaptoetanol; ya que en el suero tratado se observó que había bandas de precipitación en la posición IgG, pero no había ninguna en la posición de la IgM o de la IgA.

MATERIAL Y METODOS

A.- MATERIAL.

Antígeno.- Se utilizó un antígeno comercial de cultivos axénicos de Entamoeba histolytica, HK9 (Internations Chemical and Nuclear Corp. Irvine, Cal.), lote N° EADOZE 1072 que contenía 2.2 mg de nitrógeno protéico liofilizado. El antígeno se mantuvo congelado a -20°C. El material reconstituido se conservó a 4°C por períodos hasta de un mes.

Sueros.- Los sueros fueron proporcionados por el Banco de Sueros del Hospital General del Centro Médico, IMSS, donde se mantenían congelados a -40°C. Entre éstos se encuentra un lote de sueros procedentes del estado de Oaxaca, zona endémica, que acusa el 73% del total de los casos registrados de amibiasis en la República Mexicana (70). Los sueros se inactivaron por calentamiento a 56°C durante 30 minutos.

2-Mercaptoetanol (ME).- Se preparó una solución de ME 0.1 M en cloruro de sodio 0.15 M (7.04 ml de ME en 1000 ml de NaCl 0.15 M).

Iodoacetamida cristalina.- Solución 0.01 M de iodoacetamida en cloruro de sodio 0.15 M.

Eritrocitos de carnero.- La sangre se conservó en una solución de citrato de sodio al 3.8% a una temperatura de 4°C. El anticoagulante se utiliza en la siguiente proporción: 360 ml de citrato de sodio al 3.8% para 300 ml de sangre. Una vez hecha la mezcla debe agitarse bien pa

ra que no se formen coágulos. Los eritrocitos deben dejarse reposar cuando menos 24 hr a partir de su extracción, antes de ser usados. La solución se utilizó hasta por períodos de 3 a 4 semanas.

Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.4 concentrada (PB 6.4).-

Solución 0.15 M de Na_2HPO_4 ----- 1 parte

Solución 0.15 M de KH_2PO_4 ----- 3 partes

Ajustar el pH entre 6.3 y 6.45, con la solución de Na_2HPO_4 para acidificar o con la solución KH_2PO_4 para alcalinizar.

Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 concentrada (PB 7.2).-

Solución 0.15 M de Na_2HPO_4 ---- 3 partes

Solución 0.15 M de KH_2PO_4 ----- 1 parte

Ajustar el pH entre 7.1 y 7.3, con la solución de Na_2HPO_4 para acidificar o con la solución de KH_2PO_4 para alcalinizar.

Solución salina isotónica.- Cloruro de sodio 0.15 M en agua destilada.

Solución salina amortiguada con fosfatos al 0.15 M y de pH 6.4 (PBS-6.4).- Para su preparación, poner un volumen de amortiguador de fosfatos 0.15 M (PB 6.4) diluído con 3 volúmenes de solución salina isotónica.

Solución salina amortiguada con fosfatos al 0.15 M y de pH 7.2 (PBS-7.2).- Preparación: un volumen de amortiguador de fosfatos 0.15 M (PB 7.2), con 3 volúmenes de

solución salina isotónica (52).

Solución amortiguadora de veronal pH 7.5, 0.15 M.

Substancias:	NaCl-----	85.0 g
	5,5-dietilbarbiturato de Na ---	3.75 g
	Acido 5,5-dietilbarbitúrico ---	5.75 g
	Sol. madre Mg Cl ₂ 1 M y Ca Cl ₂	
	0.3 M -----	5.0 ml
	Agua destilada cbp -----	2000 ml

Manera de prepararse:

Disolver en aproximadamente 1 litro de agua el NaCl y el 5,5-dietilbarbiturato de Na. Aparte, el ácido 5,5-dietilbarbitúrico se disuelve en aproximadamente 500 ml de agua caliente. Mezclar las dos soluciones y dejar enfriar a temperatura ambiente; después de adicionar la solución madre de Mg Cl₂ y Ca Cl₂ y aforar a 2000 ml con agua destilada. Ajustar el pH a 7.5. Diluir 1:5 con agua destilada en el momento de usarse. Descartar el sobrante (12).

Solución madre amortiguadora de veronal pH 8.6, 1M.- Se disuelven 21.35 g de barbital en 200 ml de agua destilada calentando hasta ebullición, enfriar y agregar 4g de hidróxido de sodio y aforar a un litro. A partir de este amortiguador se prepararon los siguientes amortiguadores:

a) solución amortiguadora de veronal pH 8.6, 0.01 M.- Se hizo una dilución 1:100 de la solución madre con agua destilada.

b) Solución amortiguadora de veronal pH 8.6, 0.05 M.-Se preparó haciendo una dilución 1:20 de la solución madre con agua destilada (71).

Agarosa al 1%. - Se preparó disolviendo 1g de agarosa en 100 ml de solución amortiguadora de veronal pH 8.6 y 0.01 M.

Agarosa al 1.5%. - Se disuelve 1.5g de agarosa en 100 ml de agua destilada.

Solución de rojo de Ponceau. - En 100 ml de una solución de ácido tricloroacético al 5% se disolvieron 500 mg de rojo de Ponceau.

Amortiguador salino de fosfatos- albúmina humana pH 7.2 (PBS-HA-7.2). - Se preparó una solución de albúmina pura al 0.75% en PBS-7.2.

Acido tánico. - Solución madre de ácido tánico 1:1000. Disolver 50mg de ácido tánico en 50 ml de agua destilada. Para obtener la solución de trabajo, diluir 0.5 ml de la solución madre con 49.5 ml de PBS-7.2 (concentración final de 1:100,000).

Complemento. - Extraer la sangre del cobayo por punción cardiaca, colectar en un tubo de centrífuga que esté sumergido en hielo. Dejar coagular durante 30 min, se parar los bordes del coágulo y centrifugar en frío a 2000 rpm durante 5 minutos. El suero así obtenido se distribuye en pequeñas porciones de 0.5 y 1 ml en tubos de ensaye, se sella con papel parafilm y se conservan congelados hasta el momento de usarse (12).

Hemolisina. - Hemolisina de carnero glicerizada (Laboratorios Difco, Detroit, Mich) fue diluída 1:100 en solución amortiguadora de veronal pH 7.5, 0.15 M y distribuir la en tubos, en cantidades de 10 ml y conservarla con

gelada hasta el momento de usarse.

B.- METODOS.

Tratamiento de un lote de sueros con 2-mercaptoetanol 0.1 M (ME).

1.- Dializar el suero diluído 1:2 con solución salina isotónica, contra ME 0.1 M, durante 24 hr a temperatura ambiente.

2.- Dializar a 0°C contra una solución de iodoacetamida 0.01 M en solución salina isotónica por 24 hr.

3.- Dializar por 24 hr a 4°C contra solución salina isotónica. Realizar 4 cambios de la solución salina durante este tiempo (72).

Técnica de hemaglutinación indirecta (HAI).

A.- Sensibilización de los eritrocitos con el antígeno de E. histolytica.

1.- Lavar los eritrocitos de carnero 3 veces con PBS-7.2.

2.- Hacer una suspensión de células al 3% con PBS-7.2.

3.- Preparar una solución de ácido tánico 1:100,000, mantenerla en la obscuridad y en frío a 4°C.

4.- Poner partes iguales de eritrocitos al 3% y de la solución de ácido tánico.

5.- Incubar a 4°C durante 15 a 20 minutos, invertiendo el tubo una vez a los 7 minutos (73).

6.- Centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos.

7.- Lavar las células tanizadas una vez con PBS 6.4.

8.- Resuspender las células a su volumen original con PBS 6.4.

9.- Preparar una solución del antígeno de E. histolytica a una concentración de 1000 µg/ml.

10.- Poner 2 partes de la suspensión de células al 3% con una parte del antígeno (1000 µg/ml). Por lo tanto queda una concentración de 500 µg en la solución.

11.- Incubar en baño maría a 37°C por 15 minutos. Para mantener las células en suspensión, se invierten los tubos a intervalos de 5 minutos.

12.- Centrifugar la células a 2000 rpm durante 5 minutos.

13.- Cuidadosamente decantar el sobrenadante y resuspender las células en PBS-HA-7.2 a su volumen original.

14.- Centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos.

15.- Resuspender las células en PBS-HA-7.2 a una concentración final de 2% (o sea 1.5 veces el volumen original de las células).

B.- Hemaglutinación indirecta (HAI).

1.- Con una pipeta graduada poner en las excavaciones de la placa, 0.075 ml de PBS-HA-7.2.

2.- Tomar con las asas de microdilución una muestra de 0.025 ml del suero inactivado y depositar en el primer orificio de la placa, agitar. En esta forma se obtiene una solución del suero diluída 1:4.

3.- Sacar el asa y pasarla a la siguiente excavación. Repetir este procedimiento hasta obtener la dilución 1:65,536.

4.- Con una pipeta de gota graduada de 0.025 ml to

mar la suspensión de eritrocitos sensibilizados con el antígeno al 2% y poner una gota en cada excavación.

5.- Agitar un minuto con movimientos vibratorios.

6.- Cubrir la placa con cinta adhesiva para evitar evaporación y dejar a temperatura ambiente por 60 minutos.

7.- Leer las placas de reacción, observando el fondo de las mismas con ayuda de un espejo de aumento.

Controles.-

a).- Control positivo del sistema. Se utilizó una gamma globulina hiperinmune conocida.

b).- Control negativo del sistema. Se empleó un suero normal de individuos sin datos clínicos ni de laboratorio de amibiasis.

c).- Control del suero del paciente en estudio. Se utilizan eritrocitos tanizados sin sensibilizar con el antígeno. Aquí se puede observar si hay aglutinación in-específica.

d).- Control negativo del antígeno. Se emplean los eritrocitos sensibilizados con antígeno pero sin suero.

e).- Control negativo de eritrocitos. Empleando eritrocitos tanizados sin Ag y sin suero.

Interpretación de los resultados.

++ Aglutinación granular compacta o una película difusa de células aglutinadas que cubren el fondo del tubo; las orillas de la película están dobladas o algo arrugadas.

+ Anillo angosto de células que rodean una película difusa de células aglutinadas.

- Un anillo compacto de células o un botón suave de células en el centro del tubo.

El título será la dilución más alta de suero que produce aglutinación. En este estudio se consideran positivos aquellos sueros cuyos títulos son $\geq 1:128$ (52,74).

Técnica de fijación de complemento.

La prueba se realizó con algunas modificaciones, de acuerdo al método descrito por Plescia y col. en 1957 (75), haciéndose por duplicado a una temperatura de 4°C. Para realizar esta prueba es necesario estandarizar todos los reactivos:

Solución de eritrocitos de carnero (2×10^9 cel/ml).

1.- Lavar las células 3 veces con solución amortiguadora de veronal y centrifugar en cada lavada a 2000rpm durante 5 minutos.

2.- Tomar 1 ml del paquete celular y suspenderlo en 9 ml de solución amortiguadora.

3.- Colocar 1 ml de la suspensión celular en un matraz aforado de 25 ml y aforar con agua destilada.

4.- Dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

5.- Leer el grado de hemólisis en el espectrofotómetro a 541 m μ .

6.- Ajustar las células a 2×10^9 cel/ml utilizando la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Vol. inicial} \times \text{D.O. obtenida}}{\text{D.O. requerida (680)}} = \text{Volumen requerido.}$$

Sensibilización de los eritrocitos con hemolisina.-

1.- Poner partes iguales de hemolisina titulada (2-50% unidades/ml) y eritrocitos.

2.- Incubar a 37°C por 30 minutos.

3.- Agitar para homogeneizar cada 7 minutos.

Titulación de complemento.-

1.- Poner 1×10^9 de eritrocitos sensibilizados con hemolisina en volúmenes de 0.1 ml en 9 tubos de hemólisis.

2.- Añadir el complemento (0.1 ml) en concentración variable y la solución amortiguadora de acuerdo al esquema siguientes:

Tubo	G.R.Sensibilizados 1×10^9	Complemento	Sol. Amortiguadora	Agua
1	0.1	0.1(1:10)	0.5	-
2	0.1	0.1(1:20)	0.5	-
3	0.1	0.1(1:30)	0.5	-
4	0.1	0.1(1:40)	0.5	-
5	0.1	0.1(1:80)	0.5	-
6	0.1	0.1(1:160)	0.5	-
7	0.1	0.1(1:320)	0.5	-
8	0.1	---	0.6	-
9	0.1	---	-	0.6

Nota: La mezcla de los componentes de la reacción debe hacerse a 0°C.

3.- Incubar a 37°C durante 60 minutos.

4.- Añadir 2 ml de la solución amortiguadora de veronal pH 7.5, 0.15 M a todos los tubos.

5.- Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.

6.- Leer la densidad óptica del sobrenadante a 541 μ , ajustando el espectrofotómetro a 0 con el sobrenadante obtenido del tubo 8.

7.- Graficar en forma logarítmica, colocando en el eje de las ordenadas el logaritmo de la dilución del complemento y en el eje de las abscisas el $\log \frac{y}{1-y}$, donde "y" corresponde a la D.O. obtenida en las diferentes diluciones y "1" corresponde a la D.O. que dió mayor grado de hemólisis (Gráfica 1).

Titulación de hemolisina.-

Para la titulación de la hemolisina, hay que seguir el siguiente esquema:

1.- En una serie de 8 tubos, colocar en cada uno de ellos 0.1 ml de diluciones al doble de hemolisina inactivada en baño maría a 56°C por 30 minutos, en los diferentes tubos, es decir 1:100, 1:200, 1:400, etc.

2.- A continuación, adicionar 0.1 ml de eritrocitos que tengan una concentración de 2×10^9 células/ml.

3.- Incubar los tubos a 37°C por 30 minutos, agitando a intervalos de 5 minutos.

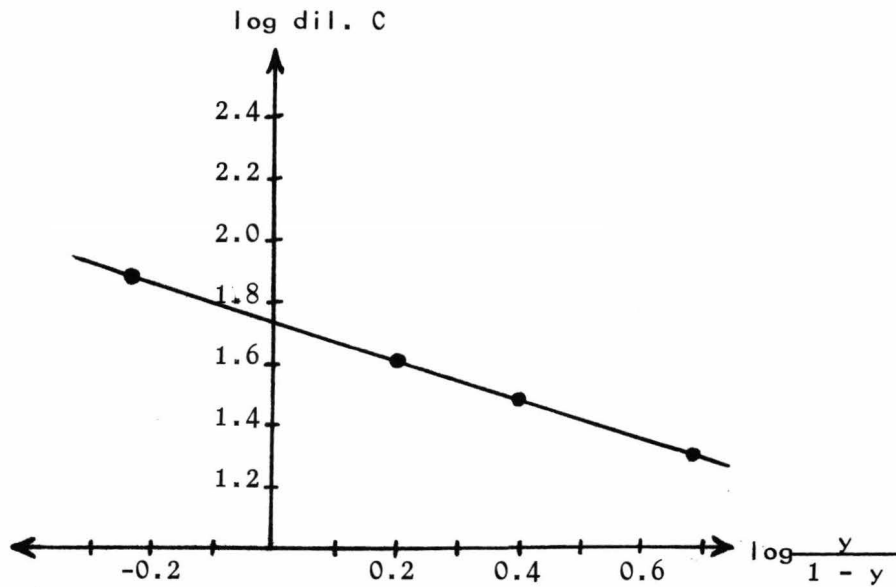
4.- Colocar los tubos en baño de hielo durante 5 minutos.

5.- Añadir a cada tubo 2-50% unidades de complemento contenidas en 0.2 ml.

6.- Incubar nuevamente a 37°C durante 60 minutos - agitando a intervalos de aproximadamente 7 minutos.

7.- Poner a cada tubo 2 ml del amortiguador de veronal pH 7.5

Gráfica 1.- Titulación del complemento.



8.- Centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos.

9.- Separar el sobrenadante y leerlo en un espectrofotómetro a 541 mμ.

10.- Graficar en el eje de las ordenadas el logaritmo de la dilución de la hemolisina y en el eje de las abscisas el $\log \frac{y}{1-y}$ (Gráfica 2).

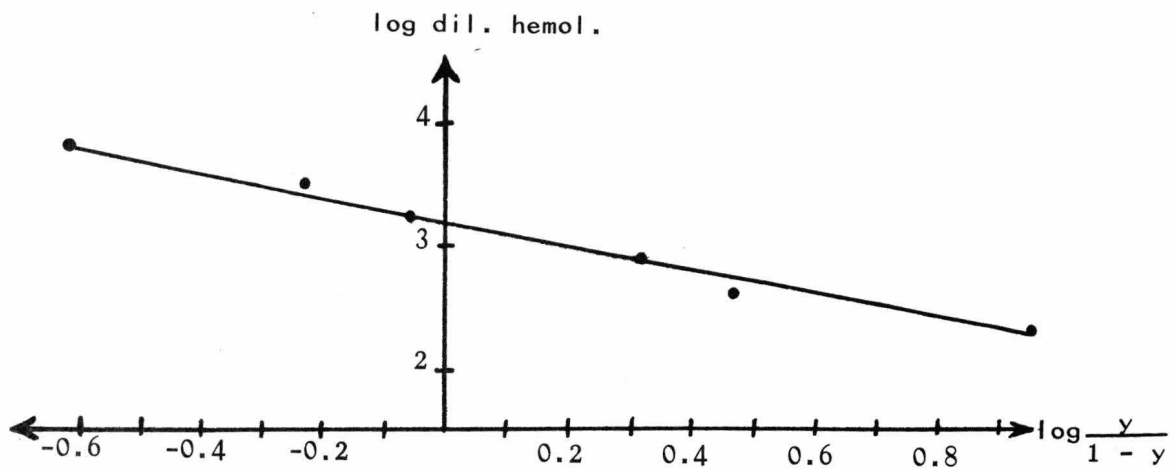
Técnica de fijación del complemento.

La reacción se realiza de acuerdo al siguiente esquema:

Núm. Tubo	Suero 1:50	2-50% u.de C	Ag. de <u>E. histolytica</u>	Amortig. Veronal	Hemolisina - G.R.	Hemólisis	
1	0.1	0.1	0.1 (100%)	-	Agitar y dejar a 4°C por 24 hr	0.1	
2	0.1	0.1	0.1 (90%)	-		0.1	
3	0.1	0.1	0.1 (80%)	-		0.1	
4	0.1	0.1	0.1 (70%)	-		0.1	
5	0.1	0.1	0.1 (60%)	-		0.1	
6	0.1	0.1	0.1 (50%)	-		0.1	
7	0.1	0.1	0.1 (25%)	-		0.1	
8	0.1	0.1	0.1 (10%)	-		0.1	
9	0.1	0.1	-	0.1	Incubar a 37°C-45 min.agitando.	+	
10	-	0.1	0.1 (100%)	0.1		0.1	+
11	-	0.1	-	0.2		0.1	+
12	-	-	-	0.3		0.1	-

Como se explica en la tabla anterior, hay que seguir los siguientes pasos:

Gráfica 2.- Titulación de hemolisina.



1.- En una serie de tubos, poner 0.1 ml del suero problema diluído 1:50, incluyendo el testigo de antígeno y el del anticuerpo, testigo del complemento, testigo de eritrocitos sensibilizados, testigo hemolisina.

2.- Depositar en cada tubo 0.1 ml de una solución de complemento que contiene 2-50% unidades, exceptuando los tubos testigo de eritrocitos sensibilizados, y testigo hemolisina.

3.- Posteriormente poner diferentes diluciones del antígeno de E. histolytica (por ejemplo de 100 γ a 10 γ), excepto en los tubos de testigo de anticuerpo, testigo de complemento, testigo de eritrocitos sensibilizados y testigo de hemólisis.

4.- Completar el volumen de todos los tubos con la solución amortiguadora de veronal pH 7.5.

5.- Agitar y dejar a 4°C por 24 horas.

6.- Agregar a cada tubo 0.1 ml de eritrocitos sensibilizados con hemolisina.

7.- Incubar a 37°C por 45 minutos, agitando cada 5 minutos.

8.- Adicionar a cada tubo 2 ml de la solución amortiguadora de veronal; centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos y después de ajustar el espectrofotómetro a 0 con el sobrenadante del tubo 12 se leen los sobrenadantes del resto de los tubos a 541 m μ . Obtener el por ciento de hemólisis.

9.- Se considera el 100% de hemólisis el promedio de los testigos hemolíticos. Se toma como una reacción po

sitiva cuando el porcentaje de hemólisis es mayor o igual a el 50% de hemólisis. Se considera negativo cuando el porcentaje es menor del 50% (12, 75).

Técnica de contrainmunolectroforesis (C.I.E)

Preparación de placas.-

1.- Sobre las placas de vidrio poner una precubierta formada por una película de solución de agarosa al 1.5% en agua destilada.

2.- Secarlas a 37°C.

3.- Revestir las placas de vidrio (20cm x 8.3) con 20 ml del medio de soporte que consiste en una solución de agarosa al 1%; el espesor del gel será de 1 a 2 mm.

4.- Dejar enfriar el gel. Se pueden conservar así en una cámara húmeda.

5.- Hacer los pozos por pares, formando 8 columnas verticales. El diámetro de los pozos es de 5 mm y la distancia entre los mismos es de 3 mm.

6.- Con un capilar se coloca el suero del lado del ánodo.

7.- El antígeno de E. histolytica HK-9 se utiliza a una concentración de 2.2 mg de N en 1 ml de solución amortiguadora de veronal pH 8.6, fuerza iónica 0.01 M, y se deposita con un capilar en el pozo que queda del lado del cátodo.

Preparación de la cámara electroforética.-

1.- Depositar a cada lado de la cámara 50 ml de la solución amortiguadora de veronal pH 8.6 fuerza iónica

0.05 M, para establecer un sistema electroforético discontinuo.

2.- Colocar las placas unidas por un puente de papel filtro previamente humedecido con el amortiguador de la cámara y otros puentes de papel filtro que conecten al amortiguador puesto en la cámara con las placas.

3.- Aplicar 30 miliamperios por placa (12-13 voltios por centímetro) durante 45 minutos.

Lectura de las placas.-

1.- Lavar las placas en baños sucesivos de solución salina aproximadamente por dos horas.

2.- Para sacarlas se les pone un papel filtro sobre el gel de agar y se les expone a una corriente de aire.

3.- Teñir las placas con el rojo de Ponceau, dejándolas durante 15 minutos en el colorante.

4.- Lavar las placas con agua corriente y dejarlas secar a temperatura ambiente.

5.- Se colocan las placas sobre un negatoscopio y se hacen las lecturas con ayuda de una lupa.

6.- Interpretación:

Se considera negativo, cuando no hay ninguna banda entre los dos pozos.

Se considera positivo:

Quando se formó una sola banda de precipitación	+
Quando se forman dos bandas de precipitación.	++
Quando se forman tres bandas de precipitación.	+++
Quando se forman cuatro bandas de precipitación	++++

(76).

RESULTADOS

Determinación de anticuerpos contra E. histolytica en sueros humanos provenientes del estado de Oaxaca.

De los 53 sueros utilizados, provenientes del estado de Oaxaca, que fueron ensayados por los métodos de FC, HAI y CIE, para detectar la presencia de los anticuerpos contra el antígeno HK-9 de E. histolytica; se encontró que la prueba de FC es la menos sensible (3.8 positivos), después la CIE (13.2% de positivos) y la HAP mostró un porcentaje más elevado de reacciones positivas (34% de positivos), (Tabla 1).

Determinación de anticuerpos contra E. histolytica en sueros de individuos con absceso hepático amibiano.

Se determinaron los títulos de anticuerpo anti-amibiano por la técnica de HAI y CIE en 40 sueros de pacientes con absceso hepático amibiano. Encontrándose que 30 sueros fueron positivos en ambas técnicas. En 7 sueros se encontraron títulos positivos para HAP y una reacción negativa por CIE. Además se observó que tres sueros dieron negativos en HAI y positivos en CIE, (Tabla 2).

Tomando en cuenta los resultados de la tabla 2, la HAI tiene un porcentaje un poco mayor (92.5%) de casos positivos al obtenido por la reacción CIE (82.5%) en pacientes con absceso hepático. (Tabla 3).

Determinación de anticuerpos contra E. histolytica en el suero de familiares de pacientes con absceso hepático amibiano.

Realizando estas pruebas en los familiares de los pacientes con amibiasis hepática, los cuales no mostraban evidencia de amibiasis invasora, se encontró una marcada diferencia en la positividad de estas dos pruebas : un 27% de reacciones positivas por HAI y un 15.4% por CIE. Hay que hacer notar que en 5 casos la HAI dió títulos positivos mientras que la CIE los dió negativos. Sólo se observaron 2 casos donde se manifestó lo contrario. (Tabla 4).

Determinación de anticuerpos contra E. histolytica en el suero de pacientes hospitalizados, con enfermedades de etiología no amibiana.

En otro grupo de personas sin evidencia de amibiasis, pero que no fueron hospitalizados por tener enfermedades de otro origen, se encontró un porcentaje similar al presentado en la tabla anterior, ya que de 34 casos probados 15 eran positivos por HAI y 5 por CIE, al antígeno amibiano. (Tabla 5).

Resultados acumulados.

Resumiendo los resultados anteriores en la tabla 6, podemos observar que los títulos de las pruebas de CIE y HAI no muestran mucha diferencia porcentual, sin embargo

en el total de las personas sin evidencia amibiana (tablas 4 y 5) la HAI se encuentra positiva en el 33.3% de las personas ensayadas, mientras que la CIE unicamente es positiva en un 15%, (Tabla 6).

Tratamiento de los sueros con 2-mercaptometanol (ME) para determinar la clase de inmunoglobulina involucrada en las reacciones serológicas estudiadas.

Como puede observarse en la tabla 7, los títulos de los sueros obtenidos por HAI fueron afectados por el tratamiento con ME; en algunos casos inclusive, los títulos se volvieron negativos (títulos 1:128); sin embargo la prueba de CIE no mostró cambios en sus títulos al tratar los sueros con ME (Tabla 7).

Tabla 1.- Frecuencia de títulos de hemaglutinación indirecta, inmunolectroforesis cruzada y fijación de complemento a antígeno HK-9 de E. histolytica en la población de Oaxaca.

HAI			CIE		FC		
TITULO	NUM.	FREC. %	NUM.	FREC. %	TITULO	NUM.	FREC. %
Negat.			Negat.		Negat.		
≤1:32	35	66	46	86.8	≤1:50	51	96.2
1:64	0	0					
Posit.			Posit.		Posit.		
1:128	4	7.6	7	13.2	≥1:50	2	3.8
1:256	0	0					
1:512	6	11.3					
≥1:2048	8	15.1					
TOTAL	53	100	53	100		53	100
%POSITIVOS		34	13.2				3.8

Tabla 2.-Título de las reacciones de hemaglutinación indirecta y contraimmunoelectroforesis en pacientes con absceso hepático.

Núm.	HAI	CIE
1	16,384	+
2	4,096	+
3	1,024	+
4	>65,536	+
5	256	+
6	65,536	+
7	256	+
8	4,096	+
9	1,024	+
10	16,384	+
11	>65,536	+
12	4,096	+
13	1,024	+
14	256	+
15	256	+
16	256	+
17	4,096	+
18	1,024	+
19	4,096	+
20	1,024	+
21	1,024	+
22	512	+
23	8,196	+
24	256	+
25	4,096	+
26	256	+
27	1,024	+
28	65,536	+
29	1,024	+
30	16,384	+
31	65,536	-
32	8,196	-
33	512	-
34	1,024	-
35	2,048	-
36	16,384	-
37	4,096	-
38	-	+
39	-	+
40	-	+

Tabla 3.- Comparación entre las pruebas de contra-
 inmunolectroforesis (CIE) y hemaglutinación indirecta
 (HAI), en sueros de pacientes con diagnóstico de amibia-
 sis invasora.

HAI			CIE	
TITULO	NUMERO	FREC.%	NUMERO	FREC.%
Negativos ≤ 1:64	3	7.5	Negativos 7	17.5
Positivos 1:128	0	0	Positivos 33	82.5
1:256	7	17.5		
1:512	2	5		
1:1024	9	22.5		
≥ 1:2048	19	47.5		
TOTAL	40	100	40	100
%POSITIVOS		92.5	82.5	

Tabla 4.- Comparación entre los títulos de HAI y CIE en sueros de familiares de pacientes con absceso hepático amibiano.

Núm.	HAI			CIE		
	Título	Número	Frec. %	Título	Número	Frec. %
1	-	Negat.		-	Negat.	
2	-			-		
3	-			-		
4	-			-		
5	-			-		
6	-			-		
7	-			-		
8	-			-		
9	-			-		
10	-	19	73	-	22	84.6
11	-			-		
12	-			-		
13	-			-		
14	-			-		
15	-			-		
16	-			-		
17	-			-		
18	-			+		
19	-			+		
20	1:256	Posit.		+	Posit.	
21	1:256	2	7.7	-		
22	1:1024			-		
23	1:1024			-	4	15.4
24	1:1024	3	11.5	-		
25	1:16384	1	3.9	+		
26	1:65536	1	3.9	-		
TOTAL		26	100			100
%POSITIVOS			27			15.4

Tabla 5.- Grupo control de pacientes hospitalizados con enfermedades de etiología no amibiana en los que se practicó la determinación de anticuerpos contra E. histolytica.

DIAGNOSTICO	HAI	CIE
Cirrosis	3/10	4/10
Colitis	0/3	1/3
Hepatitis	2/4	0/4
Hernia	2/5	0/5
Úlcera péptica	0/3	0/3
Pancreatitis	1/5	0/5
Sangrado del tubo digestivo	1/4	0/4
Piocolicite	2/3	0/3
Coleocolitiasis	2/4	0/4
Colecistitis	0/3	0/3
TOTAL	13/34	5/34

Tabla 6.- Comparación entre las pruebas de contra-
inmunolectroforesis y hemaglutinación indirecta en pa-
cientes con absceso hepático amibiano y en sujetos sin e
videncia de amibiasis.

Individuos	Pruebas	Resultados Posit/Total	%-Positivos
Con evidencia de absceso hepático amibiano	CIE	33/40	82.5
	HAI	37/40	92.5
Sin evidencia de amibiasis	CIE	9/60	15.0
	HAI	20/60	33.3

Tabla 7.- Efecto del 2-mercapto-etanol (ME) en las reacciones serológicas de la amibiasis invasora.

Núm.	HAI*		CIE	
	Sueros sin tratar	Sueros tratados con ME	Sueros sin tratar	Sueros tratados con ME
1	16,384	4,096	+	+
2	16,384	4,096	+	+
3	4,096	256	+	+
4	65,536	16,384	+	+
5	4,096	1,024	+	+
6	1,024	4	+	+
7	4,096	1,024	+	+
8	65,536	1,024	+	+
9	65,536	16,384	+	+
10	4,096	32	+	+
11	65,536	65,536	+	+
12	4,096	32	+	+
13	1,024	16	+	+
14	8,192	2,048	+	+
15	16,384	1,024	+	+
16	4,096	64	+	+
17	256	64	+	+
18	256	64	+	+
19	2,048	512	+	+
20	1,024	128	-	-
21	512	128	-	-
22	1,024	16	-	-
23	1,892	128	-	-
24	2,048	32	-	-
25	256	4	-	-

*Nota: El título se expresa como la recíproca de la última dilución del suero que dió una reacción positiva.

DISCUSION

Los resultados aquí presentados indican que la prueba de hemaglutinación indirecta (HAI) es la de mayor sensibilidad cuando se compara con las reacciones de contra inmunoelectroforesis (CIE) y la de fijación del complemento en estudios epidemiológicos de la amibiasis producida por E. histolytica.

Nuestros estudios también nos indican que durante la amibiasis invasora se encuentran presentes dos clases de inmunoglobulinas; una de las cuales es resistente y la otra sensible al tratamiento con el agente reductor 2-mercaptoetanol (ME). La resistencia o la sensibilidad se atribuyen a la presencia de IgG e IgM respectivamente. Este tipo de comportamiento es el esperado en una respuesta inmune donde sabemos que generalmente después de 24-48 hr de un contacto primario con un antígeno, aparecen primero los anticuerpos IgM. Si el organismo que ha tenido una respuesta primaria se pone nuevamente en contacto con el mismo antígeno, producirá una respuesta de tipo secundario, caracterizada por la presencia de IgG. Estas diferencias en las clases de inmunoglobulina producidas durante una respuesta primaria o una secundaria, son de importancia cuando se realizan estudios epidemiológicos, ya que es necesario utilizar una técnica que determine ambas clases de inmunoglobulinas.

Considerando la diferente sensibilidad y la capacidad para poner de manifiesto a las diferentes clases de inmunoglobulinas podemos inferir que la reacción de hemaglutinación indirecta (HAI) es no sólo la de mayor sensibilidad sino la de elección cuando se traten de realizar estudios epidemiológicos. Por otra parte, a pesar de que la reacción de contrainmunolectroforesis (CIE), determina anticuerpos IgG, es sin embargo un método fácil y rápido que puede utilizarse y ser de gran ayuda en el diagnóstico de la amibiasis invasora. Un resultado negativo por (CIE) descartaría este padecimiento. Un resultado positivo tendría que correlacionarse con el diagnóstico clínico, particularmente por la circunstancia de que la IgG permanece por largo tiempo tanto en individuos que han padecido absceso hepático amibiano, como en aquellos que han tenido un contacto prolongado con E. histolytica, sin presentar sintomatología clínica. Este último hecho podemos comprobarlo en nuestros resultados, donde encontramos resultados de CIE positivos en pacientes internados con otras enfermedades distintas del absceso hepático amibiano o aún en individuos que no presentan manifestaciones clínicas de la amibiasis (ver tablas 4,5 y 6).

La baja positividad mostrada por la reacción de fijación del complemento no era la esperada, ya que sabemos que esta técnica puede determinar tanto anticuerpos IgM como IgG. Sin embargo otros autores también han encontrado resultados similares a los aquí presentados (52, 66). Una posible explicación es que la IgG implicada en

la infección por E. histolytica no fije complemento. En estudios realizados en nuestro laboratorio, se ha encontrado que la IgG de la amibiasis no produce una reacción de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) en cobayos (Zamacona, Battle y Ortiz-Ortiz, en prensa), ni sensibiliza el íleon de estos animales para producir una reacción de Schultz-Dale (Arellano y Ortiz-Ortiz, manuscrito en preparación). Además se ha observado que la IgG en ausencia del complemento puede destruir los trofozoitos de E. histolytica (Chévez, Sepúlpeda y Ortiz-Ortiz, manuscrito en preparación). Todos estos hallazgos apuntan fuertemente al hecho de que la IgG no fije el complemento.

Uno de los problemas prácticos encontrados cuando se realizan pruebas de HAI, consiste en la laboriosidad de la prueba, particularmente en lo que respecta a la sensibilización de los eritrocitos y su poca estabilidad. Con el advenimiento de métodos para preservar eritrocitos por largo tiempo, sin el peligro de que se lisen, es posible ahora sensibilizar eritrocitos con diferentes antígenos y tenerlos listos en cualquier momento. Esto permitirá usar fácilmente la técnica de la hemaglutinación indirecta (HAI) en estudios epidemiológicos de la amibiasis y poder en un momento dado, administrar el tratamiento profiláctico adecuado para combatir y prevenir esta enfermedad.

CONCLUSIONES

1.- En la amibiasis invasora se encontró la participación de dos clases de inmunoglobulinas, cuyas características corresponden a IgM e IgG.

2.- El método de hemaglutinación indirecta (HAI) es el más sensible para la determinación de anticuerpos contra amiba. Esto es debido a que la presencia de anticuerpos IgM, no son determinados por las técnicas de precipitación.

3.- La prueba de contrainmunolectroforesis es de gran utilidad en el diagnóstico del absceso hepático amibiano.

4.- La reacción de fijación del complemento no dió la sensibilidad esperada, debido posiblemente a que está determinando solamente anticuerpos del tipo IgM.

5.- En estudios epidemiológicos se recomienda el uso de la reacción de HAI por detectar los dos tipos de anticuerpos antes mencionados.

6.- La combinación de HAI y pruebas de precipitación son de gran ayuda en el tratamiento preventivo de la amibiasis.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Soberón, P.G. y F.D. Peláez. 1964. Parasitología Médica y Patología Tropical. Primera Edición, Librería de Medicina, México, 29.
- 2.- Martuscelli, Q.A., F.F. Navarrete, E. Robledo, J. Santoyo y F.F. Biagi. 1960. Frecuencia de las parasitosis intestinales en México. Rev. Méd. Hosp. Gen., 23:579.
- 3.- Flores, B.F., V. Núñez y F.F. Biagi. 1959. Observaciones amibianas en material de autopsia. Prensa Méd. Méx., 24: 141.
- 4.- Brown, W.H. 1970. Parasitología Clínica. Tercera Edición, Editorial Interamericana, S.A., México, 25.
- 5.- Jackson, G.J., R. Herman and I. Singer. 1970. Immunity to Parasitic Animals. Appleton-Century-Crofts, New York, 439.
- 6.- González, M.F. 1971. Influencia del sexo y la edad en la amibiasis invasora del hígado. Arch. Inv. Méd. Méx., 2: 395.
- 7.- García-Sáinz M., R. Silvia-Arteaga y R. de la Huerta. 1971. Amibiasis de órganos genitales en ambos sexos Arch. Inv. Méd. Méx., 2: 367.
- 8.- Izar, G. 1914. Studies über amoben enteritis. Arch. Schiffes Tropenhyg, 18: 5.
- 9.- Craig, C.F. 1927. Observations upon the hemolytic, cytolytic and complement binding properties of extracts of Entamoeba histolytica. Amer. J. Trop. Med.

- 7: 225.
- 10.- Weiser, R.S., Q.N. Myrvik y N.N.Pearsall. 1970. Inmunología. Primera Edición, Editorial Interamericana, S.A., México, 122.
 - 11.- Kabat, E.A., Ph. D. 1968. Inmunoquímica Experimental. Segunda Edición, Editorial La Prensa Médica Mexicana, México, 110,123.
 - 12.- Cohen, S. and R.R. Porter. 1965. Structure and activity of immunoglobulins. IV.- Complement fixation. Adv. Immunol. 4: 336.
 - 13.- Maddison, S.F. and R. Elsdon- Dew. 1961. Non-specific antibodies in amebiasis. Exp. Parasitol., 11:90.
 - 14.- Ali Khan, Z. and E. Meerovith. 1968. A comparative study of the antigens of the "histolytica- type" strains of Entamoeba. A qualitative and quantitative evaluation of antigens by indirect hemagglutination, gel precipitation and immunoelectrophoresis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 17: 528.
 - 15.- Craig, C.F. 1933. Further observations upon the complement fixation test in the diagnosis of amoebiasis. J. Lab. Clin. Med., 18: 873.
 - 16.- Paulson, J. and J. Andrews. 1938. Complement fixation test in amebiasis. A comparative evaluation in clinical practice. Arch. Interm. Med., 61: 562.
 - 17.- Terry, L.L. and J. Bozicevich. 1948. The importance of the complement fixation test in amebic hepatitis and liver abscess. Southern M. J., 41: 691.

- 18.- Hussey, K.L. and H.W. Brown. 1950. The complement fixation test for hepatic amebiasis. Amer. J. Trop. Med., 30: 147.
- 19.- Bozicevich, J.E. 1950. Discussion on amoebiasis panel. Amer. J. Trop. Med., 30: 154.
- 20.- McDearman, S.C. and W.B. Dunham. 1952. Complement fixation tests as an aid in the differential diagnosis of extra-intestinal amebiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1:182.
- 21.- Elsdon-Dew, R. and S.F. Maddison. 1952. Amoebic complement fixation reaction. J. Trop. Med. Hyg., 55 : 208.
- 22.- Juniper, K. Jr. 1970. Clinical use of indirect hemagglutination test for amebiasis (U). Final Report. Army Medical Research. November.
- 23.- Lewis, W.P. and J.F. Kessel. 1961. Hemagglutination in the diagnosis of toxoplasmosis and amebiasis. Arch. Opth., 66: 471.
- 24.- Cole, B.A. and J.F. Kent. 1953. Immobilization of E. histolytica in vitro by antiserum produced in the rabbit. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 83:811.
- 25.- Biagi, F.F. and L. Buentello. 1961. Immobilization reaction for the diagnosis of amebiasis. Exp. Parasit., 11: 188.
- 26.- Beltrán, H.F., F.F. Biagi, P.S. Ortega y C. Rivas. 1965. Observaciones sobre la reacción de inmunofluorescencia y las reacciones de inmovilización con E. histolytica. Gaceta Méd. Méx., 30: 491.

- 27.- Biagi, F.F. y L. Buentello. 1961. Nuevo método serológico para el diagnóstico de la amibiasis. Nota previa. Gastroenterol. Méx., 26: 11.
- 28.- Beltrán, H.F. y F.F. Biagi. 1962. Anticuerpos contra E. histolytica a distintas edades. Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx., 19: 441.
- 29.- Biagi, F.F. y H.F. Beltrán. 1966. La reacción de inmovilización de E. histolytica. Gastroenterol. Méx. 31: 133.
- 30.- Zaman, U. 1960. Studies with the immobilization in the genus Entamoeba. Ann, Trop. Med. Parasit., 54 : 381.
- 31.- Barret, J.T. 1972. Inmunología. Primera Edición. Editorial Interamericana. México, 99,124.
- 32.- Powell, S.J. 1968. The capillary tube precipitin test. A rapid serologic aid to clinical diagnosis in invasive amebiasis. Amer. J. Trop. Med., 17:840.
- 33.- Ouchterlony, O. 1962. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy, 6: 30.
- 34.- Maddison, S.F., S.J. Powell and R. Elsdon-Dew. 1965. Application of serology to the epidemiology of amebiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 14: 554.
- 35.- Nakamura, M. and E.E. Baker. 1957. Agar diffusion precipitin technic for the detection of antibodies against E. histolytica. Bacteriol. Proc., 57: 95.
- 36.- Sen A., S.N. Grosh, S. Mukerjee and J.C. Ray. 1961. Antigenic structure of E. histolytica. Nature, 192: 4805.

- 37.- Atchley, F.O., A.H. Auerheimer and M.A. Wasley. 1963. Precipitate patterns in agar gel with sera from human amebiasis and E. histolytica antigen. J. Parasitol., 49: 313.
- 38.- Talis, B., M. Lahav and S. Ben-Efraim. 1963. Immunological study of some strains of E. histolytica. Bull. Res. Council of Israel, 108: 130.
- 39.- Sepúlveda, B., E. Lee, M. de la Torre y L. Landa. 1971. El diagnóstico serológico de la amebiasis invasora con la técnica de inmunolectroforesis cruzada. Arch. Inv. Méd. Méx., 2: 263.
- 40.- Powell, S.J., S.F. Maddison, A.J. Wilmot and R. Elsdon-Dew. 1965. Amoebic gel diffusion precipitin test. Clinical evaluation in amoebic liver abscess. Lancet, 2: 602.
- 41.- Powell, S.J., S.F. Maddison, R.G. Hodgson, R. Elsdon Dew. 1966. Amoebic gel diffusion precipitin test. Clinical evaluation in acute amoebic dysentery. Lancet, 1: 566.
- 42.- Auerheimer, A.H., F.O. Atchley and M.A. Wasley. 1966. Further studies of amebiasis by gel diffusion. J. Parasitol., 52: 950.
- 43.- Halpern, B., J.J. Young, J. Dolkart, P.D. Armour and R.E. Dolkart. 1967. The serologic response of patients with amebiasis compared by gel diffusion, hemagglutination and phagocytosis techniques with a common E. histolytica antigen preparation. J. Lab. Clin. Med., 69: 467.

- 44.- Lavallo, A. Villalobos, et al. 1973. La utilidad de la inmunolectroforesis cruzada en el diagnóstico de la amibiasis invasora en niños. Rev. Mex. Ped., 42: 329.
- 45.- Elsdon- Dew, R. and S.F. Maddison. 1952. Amoebic fixation reaction. J. Trop. Med. Hyg., 55: 208.
- 46.- Talis, B. 1966. Detection of antibodies against E. histolytica in human sera. J. Protozool., 13:34.
- 47.- Gore, R.W. and E.H. Sadun. 1968. Soluble antigen fluorescent antibody test for amebiasis. Exp. Parasitol., 22: 316.
- 48.- Mancera-Massieu, R., A.Y. Lehmann, P.K. Kawshima Has himoto, S. Castro Vargas. 1971. Reacciones serológicas en la amibiasis invasora con la técnica de anticuerpos fluorescentes. I.- Prueba utilizando como antígeno trofozoitos de E. histolytica. Arch. Inv. Méd. Méx., 2: 255.
- 49.- Guerrero, A.M. y M. Tanimoto Weki. 1971. Reacciones serológicas en la amibiasis invasora con la técnica de anticuerpos fluorescentes. II.- Prueba utilizando como antígeno material de absceso hepático amibiano en el hamster. Arch. Inv. Méd. Méx., 2: 259.
- 50.- Toussaint, A.J. 1966. Improvement of the soluble antigen fluorescent antibody procedure. Exp. Parasitol., 19: 71.
- 51.- Kessel, J.F., W.P. Lewis, H. Kim. 1961. Preliminary report on a hemagglutination test for Entamoebae. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 106: 409.

- 52.- Kessel, J.F., W.P. Lewis, Molina-Pasquel, and J.A. Turner. 1965. Indirect hemagglutination and complement fixation test in amebiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 14: 540.
- 53.- Milgram, E.A., G.R. Healy and I.G. Kagan. 1966. Studies on the use of the indirect hemagglutination test in the diagnosis of amebiasis. Gastroenterol. 50: 645.
- 54.- Thompson, P.E., S.K. Graedel, C.R. Schneider, W.P. Stocki and R.M. Gordon. 1968. Preparation and evaluation of standardized amoeba antigen from axenic cultures of E. histolytica. Bull. Wld. Hlth. Org. 39: 349.
- 55.- Juniper, K. and M.C. Minshew. 1968. The indirect hemagglutination test in amebiasis. Gastroenterol., 54: 1248.
- 56.- Juniper, K.Jr. 1969. Clinical use of the indirect hemagglutination test for amebiasis (U). Supported by U.S. Army Medical Research. September.
- 57.- Krupp, I.M. 1970. Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. Amer. J. Trop. Med. 19: 57.
- 58.- Monroe, L.S., E.R. Korn and S.J. Fitzwilliam. 1972. A comparative study of the latex agglutination and gel diffusion precipitin test in the diagnosis of amebic liver abscess. Amer. J. Gastroenterol., 58: 52.

- 59.- Morris, M.N., S.J. Powell, R. Elsdon-Dew. 1970. Latex agglutination test for invasive amoebiasis. Lancet, 27: 1362.
- 60.- Bellanti, J.A. 1972. Inmunología. Primera Edición. Nueva Editorial Interamericana, S.A., México, 127.
- 61.- Marrack, J.R. 1963. Sensitivity of methods of detecting antibodies. Brit. Med. Bull., 19: 180.
- 62.- Maddison, S.E., I.G. Kagan and Elsdon-Dew. 1968. Comparison of intradermal and serologic test for the diagnosis of amebiasis. Amer. J. Trop. Med., 17: 540.
- 63.- Kretschmer, R.R., B. Sepúlveda, A. Almazan and F. Gamboa. 1972. Intradermal reactions to an antigen (Histolycina) obtained from axenically cultivated E. histolytica. Trop. Geogr. Med., 24: 275.
- 64.- Potter, E.V. and G.H. Stollerman. 1961. The posonization of bentonite particles by a globulin. J. Immunol., 87: 110.
- 65.- Das, S.R. and R.A. Neal. 1970. Immunological studies on amoebiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 64: 472.
- 66.- Krupp, I.M. and S.J. Powell. 1971. Antibody response to invasive amebiasis in Durban, South Africa. Amer. J. Med. Hyg., 20: 414.
- 67.- Juniper, K.Jr., C.L. Worrell, C.M. Minshew, L.S. Roth, H. Cypert and R.E. Lloyd. 1972. Serologic diagnosis of amebiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 21: 157.

- 68.- Maddison, S.E., S.J. Powell and R. Elsdon- Dew. 1965. Comparison of hemagglutination and precipitins in amebiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 14: 551.
- 69.- Ali Khan, Z. and E. Meerovitch. 1968. Serological characterization of M (19S) and G (7S) rabbit antibodies in response to E. histolytica antigens. Canad. J. Microbiol., 14: 1317.
- 70.- Goldsmith, R.S., I.G. Kagan, M.A. Reyes González y J. Cerdeño Ferreira. 1971. Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca, México. 1.- Encuesta de anticuerpos parasitarios mediante la prueba de hemaglutinación indirecta. Bol. Ofic. Sanit. Panamer., 69: 500.
- 71.- Campbell, D.H., J.S. Garvey, N.E. Cremer and D.H. Sussdorf. 1963. Methods in Immunology. W.A. Benjamin, Inc., New York, 175, 245.
- 72.- Nowotny, A. 1969. Basic Exercises in Immunochemistry. Springer- Verlag, New York Inc., 12.
- 73.- Krupp, J.M. 1969. Modification of the indirect hemagglutination test for amoebiasis. J. Clin. Path., 22: 530.
- 74.- Kagan, G.I. 1972. Manual Techniques. Center for Disease Control Atlanta. Georgia, U.S.A.
- 75.- Plescia, O.J., K. Amiraian and M. Heidelberger. 1957. Aspects of the immune hemolytic reaction. I. Dependence of the extent of hemolysis on concentrations of reactants. J. Immunol., 78: 147.

- 76.- Sepúlveda, B., M. Aubanel, L. Landa y G. Velázquez.
1972. Avances en la técnica de contra-inmuno-electroforesis para el estudio serológico de la amibiasis. Arch. Inv. Méd. Méx., 3: 363.

-----o-----