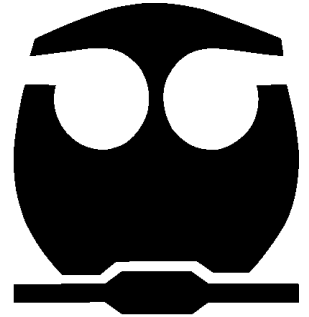




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS *Entamoeba histolytica*
MEDIANTE EL MÉTODO DE INMUNOCROMATOGRAFÍA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA-FARMACÉUTICA-BIÓLOGA

PRESENTA:

KARINA SUÁREZ ÁLVAREZ

MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Quiero agradecer a todas las personas que han creído en mi durante este largo camino. Este proyecto se logró gracias a su amor, cariño, apoyo, comprensión, sus consejos, su paciencia y su fe en mi.

A mi mami, por hacerme la persona que soy. Valió la pena arrancar tantas hojas del cuaderno.

A mi papi, por toda la motivación que encontré en cada recadito.

A mi hermana, por todo su apoyo y sus palabras.

A mis abuelos por ser mi gran ejemplo de vida.

A mis primos y tíos por su interés y apoyo.

A Jacobo por su apoyo incondicional.

A mis amigos que los considero mis hermanos.

A todos aquellos compañeros que un día me ayudaron en una clase, en una tarea, en una práctica e inclusive en un examen.

A todos aquellos maestros que vieron más allá de una calificación y apreciaron mi esfuerzo y dedicación.

A mi tutor por su infinita paciencia.

Cada éxito logrado y cada fracaso vivido, formó la persona que soy. Y me enorgullece compartir este proyecto de vida con ustedes, las personas que amo. Gracias por ser mi inspiración y nuevamente gracias por haber creído en mi.

ÍNDICE

OBJETIVO GENERAL	6
OBJETIVOS PARTICULARES	6
INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO	9
1. Problemas a Nivel Salud Pública	9
2. Epidemiología	9
3. Morfología de <i>Entamoeba histolytica</i>	10
3.1 Trofozoíto	10
3.2 Quiste	12
4. Forma de transmisión	13
5. Ciclo de Vida	15
6. Patogenia	16
6.1 Adherencia	17
6.2 Penetración	17
6.3 Propagación	17
7. Inmunología	19
8. Manifestaciones clínicas	20
8.1 Sintomática – Asintomática	20
8.2 Amibiasis crónica	21
8.3 Amibiasis aguda	22

8.4 Colitis amibiana	22
8.5 Disentería amibiana fulminante	22
8.6 Amibiasis extraintestinal	23
8.7 Absceso hepático	23
9. Tratamiento	24
10. Diagnóstico	25
10.1 Técnicas microscópicas	25
10.2 Técnicas isoenzimáticas	27
10.3 Pruebas inmunológicas	27
10.3.1 Prueba de ELISA	28
10.3.2 Detección de antígenos	29
10.3.3 Inmunocromatografía	29
10.4 Pruebas basadas en ADN	34
11. Fosfopeptidoglicano	35
METODOLOGÍA	
○ Ensayos entre Antígenos y Anticuerpos homólogos	37
<u>Técnica de Precipitación</u>	37
<u>Técnica de Aglutinación</u>	38
○ Desarrollo de Técnicas Inmunocromatográficas	39
RESULTADOS	
○ Ensayos entre Antígenos y Anticuerpos homólogos	41
<u>Técnica de Precipitación</u>	41
<u>Técnica de Aglutinación</u>	42

○ Desarrollo de Técnicas Inmunocromatográficas	43
PROPUESTA DEL PROYECTO	44
I. Preparación del Oro Coloidal	44
• Precauciones del material y reactivos	44
• Antígeno	44
• Oro Coloidal	44
• Amortiguadores	45
• Conjugación	45
II. Desarrollo de tiras rápidas inmunocromatográficas	46
III. Estandarización y validación de la Técnica de Inmunocromatografía	47
- Prueba de especificidad	47
- Prueba de sensibilidad	48
DISCUSIÓN	49
✓ Técnica de Precipitación	49
✓ Técnica de Aglutinación	51
✓ Desarrollo de la Técnica Inmunocromatográfica	52
✓ Oro Coloidal	54
CONCLUSIÓN	57
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXO I	63
ANEXO II	64

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar el diseño de una prueba diagnóstica mediante la técnica inmunocromatográfica para identificar anticuerpos de *Entamoeba histolytica*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Diseñar en base a la literatura, una prueba rápida capaz de identificar anticuerpos de *Entamoeba histolytica*.
2. Construir una tira rápida utilizando anticuerpos monoclonales y un complejo de oro coloidal.
3. Diseñar un método para estandarizar y validar la prueba diagnóstica.

INTRODUCCIÓN

La amibiasis es una infección parasitaria causada por *Entamoeba histolytica*, la cual se considera una de las más comunes a nivel mundial. Las manifestaciones que se presentan durante la amibiasis incluyen disentería y enfermedades invasivas extraintestinales.

Entamoeba histolytica es un protozooario Rhizopodo, no flagelado, el cual se puede encontrar en forma de trofozoíto o quiste. Su forma infectante es el quiste y su forma invasiva es el trofozoíto. Se caracteriza por causar disentería amibiana y absceso hepático. El trofozoíto se identifica por su núcleo, mientras que el quiste por su resistencia a la desecación y al ácido gástrico. La infección con *Entamoeba histolytica* ocurre debido al esparcimiento fecal en agua y alimentos

contaminados. El absceso hepático ocurre debido a la migración del parásito vía vena porta. El diagnóstico se realiza, generalmente, por técnicas coproparasitológicas. Sin embargo, el diagnóstico microscópico conlleva limitaciones, como no tener la capacidad de distinguir las especies patógenas (*E. histolytica*) de las especies no patógenas a nivel morfológico (*E. dispar* y *E. moshkovskii*).

Actualmente existen distintas pruebas diagnósticas que sobrepasan la detección microscópica del parásito y facilitan su identificación. Las pruebas inmunológicas están diseñadas para detectar la presencia de anticuerpos producidos en respuesta al agente infeccioso. La ventaja que presentan es que los anticuerpos pueden permanecer en el suero de los sujetos infectados por periodos prolongados y son detectables aun en casos en los que la infección es asintomática. En la actualidad se utilizan los métodos automatizados en cámaras de multipozos tipo ELISA, así como las pruebas rápidas, en las cuales los anticuerpos a detectar se fijan a una tira de membrana que se sumerge directamente en los reactivos de detección y revelado, con obtención en pocos minutos del resultado. Las pruebas rápidas son tiras diagnósticas que tienen como principio la inmunocromatografía para identificar antígenos o anticuerpos; un reactivo (antígeno o anticuerpo) es reconocido por otro reactivo (anticuerpo o antígeno respectivamente) contenido en un líquido que migra a través de membranas.

Para mejorar el diagnóstico de la amibiasis se han evaluado técnicas como la inmunocromatografía, la cual permite visualizar la reacción antígeno-anticuerpo

por la acumulación del oro coloidal del conjugado en zonas específicas en membranas de nitrocelulosa donde se fijan previamente anticuerpos de captura. La sensibilidad de la prueba es de 95% en comparación con un análisis por microscopia¹¹.

La inmunocromatografía permite comprobar que el complejo de oro coloidal con los antígenos migran sobre una membrana de nitrocelulosa para reaccionar específicamente con los anticuerpos inmovilizados en la membrana, dando bandas coloreadas por la acumulación del oro coloidal del conjugado. La membrana de nitrocelulosa permite la migración por capilaridad del líquido y solutos y a la vez conserva activos los anticuerpos fijados.

La preparación del complejo de oro coloidal con los antígenos depende de algunas interacciones como la atracción electrónica entre las partículas de oro cargadas negativamente y los sitios del antígeno cargados positivamente, el fenómeno de adsorción incluyendo la cavidad hidrofóbica en la unión del antígeno con la superficie del metal, y el potencial del enlace covalente del oro para liberar los grupos sulfhidrilos.

MARCO TEÓRICO

1. Problemas a Nivel Salud Pública:

Las infecciones intestinales provocadas por parásitos (protozoarios y helmintos) se encuentran entre las 20 principales causas de enfermedad en nuestro país. La amibiasis, con sus diferentes manifestaciones clínicas, se encuentra dentro de las primeras 5 enfermedades. La mayoría de las infecciones intestinales provocadas por parásitos son infecciones múltiples. Esto le brinda gran complejidad al diagnóstico de las infecciones intestinales parasitarias.

2. Epidemiología

La amibiasis es una infección parasitaria causada por *Entamoeba histolytica*, la cual se considera una de las más comunes a nivel mundial. Esta enfermedad se presenta en un 10% de la población mundial, infectando aproximadamente 50 millones de personas y causando hasta 100 mil muertes al año por complicaciones. Así, la enfermedad se coloca en segundo lugar después de la malaria en mortalidad por parásitos protozoarios. Este protozoario se caracteriza por tener una distribución global y una alta prevalencia en países donde predomina la pobreza socioeconómica y la falta de condiciones sanitarias. En países desarrollados como Europa y Estados Unidos, la prevalencia se debe a viajeros que son infectados al visitar regiones endémicas, e inmigrantes de un país en vías de desarrollo. Los portadores sanos tienen un papel muy importante de manera epidemiológica, ya que se consideran la primera fuente de

diseminación de la infección. La prevalencia de infección amibiana en hombres homosexuales es alta, ya que logra confundirse con *Entamoeba dispar*, el cual es un protozooario no patógeno bastante frecuente. La mayoría de los individuos infectados son portadores asintomáticos, ya que *Entamoeba histolytica* se considera patógeno y es la principal causa de amibiasis invasora¹⁴.

Las personas que padecen amibiasis, pueden o no presentar manifestaciones clínicas. Aproximadamente el 10% de los casos presentan síntomas, principalmente, a nivel intestinal y extraintestinal.

3. Morfología de *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica es un protozooario Rhizopodo que se mueve por pseudópodos. Se presenta en dos estados morfológicos principales: trofozoíto, y quiste.

3.1 Trofozoíto

El trofozoíto se caracteriza por un notable pleomorfismo y por su movimiento. Se multiplica por fisión binaria y es muy sensible al jugo gástrico y a agentes externos. Su tamaño es muy variable y oscila entre los 10 y 60 µm; sin embargo, es más frecuente entre 15 y 30 µm. Se localiza generalmente en el lumen del intestino grueso. El trofozoíto presenta un citoplasma dividido en dos porciones: la externa llamada ectoplasma, la cual ocupa aproximadamente la tercera parte del parásito; y una porción interna denominada endoplasma de gránulos finos que contiene por lo general glóbulos rojos en varias etapas de desintegración, vesículas y vacuolas pero no bacterias. El ectoplasma es hialino, transparente,

retráctil y casi sin granulaciones. Los pseudópodos son prolongaciones del ectoplasma y proporcionan movilidad al parásito. Se puede encontrar organelos como vacuolas que contienen eritrocitos, bacterias, restos celulares; esto le da una apariencia granular cuando se observa en fresco. Los ribosomas se disponen en el citoplasma amibiano en forma de cúmulos helicoidales, los cuales se agregan en los quistes y en los trofozoítos en reposo. Consta de un núcleo, el cual, no tiene posición fija en el citoplasma; mide de 5 a 7 micras de diámetro. La cromatina nuclear se encuentra en forma de pequeñas granulaciones de tamaño uniforme. El trofozoíto se nutre por fagocitosis a expensas de los tejidos disueltos y hematíes, y se ayuda de los pseudópodos. Al microscopio electrónico no se logra detectar el aparato de Golgi, microtúbulos del citoplasma, ni retículo endoplásmico rugoso.^{31,32,35}



Figura 1A: Trofozoíto de *Entamoeba histolytica*.³⁵

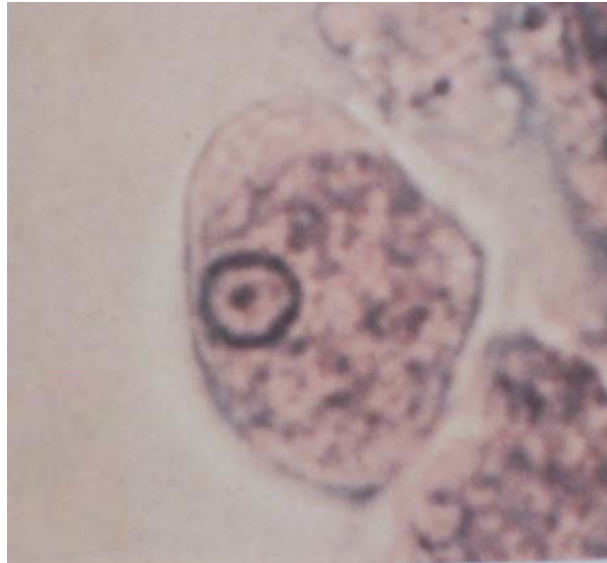


Figura 1B: Trofozoito de *E. histolytica*/ *E. dispar*.³⁵

3.2 Quiste

El quiste es la forma infectante. Es redondo u oval y mide entre 10 y 16 μm de diámetro. Posee una pared lisa entre 0.5 y 0.6 μm . Es resistente al jugo gástrico y factores ambientales externos como el cloro. Se forma por evolución del trofozoíto. Los quistes jóvenes son uninucleares, tienen algunos cuerpos cromáticos y vacuolas de glucógeno. Después de un periodo de 24 horas, el núcleo se divide dos veces hasta formar el quiste maduro, el cual posee 4 núcleos y desaparece el glucógeno, y los cuerpos cromáticos se hacen poco visibles. El núcleo mide entre 2 y 3 μm de diámetro y tiene la misma estructura que el núcleo del trofozoíto. Cabe mencionar, que sólo los quistes maduros son infectantes.

31,32,35

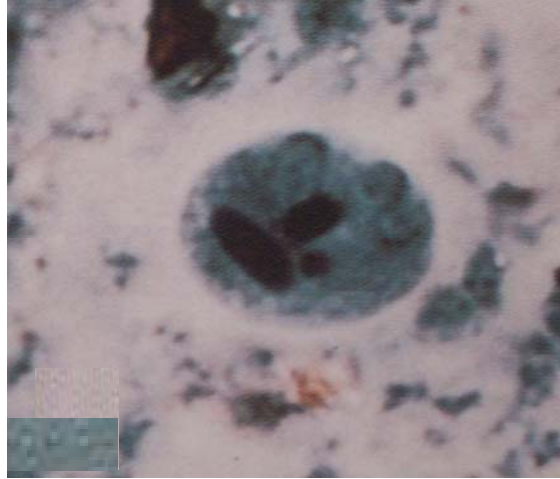


Figura 2: Quiste de *Entamoeba histolytica*/*E. dispar*.³⁵

4. Forma de transmisión:

Se considera que la fuente de infección y diseminación de *Entamoeba histolytica* es el hombre, por lo cual se le considera como el principal reservorio. La transmisión puede realizarse por contacto directo, fomites o participación de transmisores biológicos en el arrastre mecánico de quistes.

En el contacto directo, el parásito pasa de persona a persona en forma de trofozoíto, mediante el coito per anus. En los caso de lactantes con amibiasis intestinal aguda, los trofozoítos se establecen en la piel adyacente.

Dentro de fómites, los más comunes son: ropa sucia, monedas, transporte público, etc. El agua y alimentos contaminados con quistes son otra fuente importante de contaminación. Esto se debe a que no existen buenos hábitos de higiene y no se llevan a cabo las reglas de sanidad.

Los transmisores biológicos son generalmente los insectos como las moscas y las cucarachas como principales responsables de transmitir hacia los alimentos los quistes de *Entamoeba histolytica*.

La forma infectante de *E. histolytica* son los quistes, los cuales pueden permanecer durante varios días en las heces y llegan a sobrevivir hasta por 8 días en el suelo a temperaturas entre 28 y 34°C. También pueden sobrevivir en su forma infectante en el agua. Las formas más frecuentes de transmisión son la contaminación de alimentos y de agua. El mayor riesgo está asociado con los portadores asintomáticos de quistes, especialmente si están dedicados al manejo y preparación de los alimentos. Otro riesgo es la forma en que se eliminan las deposiciones humanas. La contaminación fecal de las manos por falta de higiene y la contaminación del agua a través del fecalismo al aire libre lleva las heces a depósitos de agua, lo cual incrementa el riesgo de transmisión. De igual manera, la ruptura de tuberías en drenaje o las inundaciones han resultado fuentes importantes de contaminación del sistema de agua potable. El conocimiento sobre la resistencia de los quistes de *E. histolytica* a sustancias químicas ha sido de gran importancia en el tratamiento de agua potable y en la desinfección de objetos o áreas que pueden contaminarse con facilidad. El proceso de cloración para purificar el agua es muy útil para matar enterobacterias y bacterias coliformes; sin embargo es insuficiente para matar los quistes de *E. histolytica* que se originan por la contaminación fecal³⁵.

5. Ciclo de vida:

El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* es el siguiente esquema (Figura 3):

Los quistes son transmitidos a través de las heces. La infección con *Entamoeba histolytica* ocurre por la ingestión de quistes maduros en agua, alimento o manos contaminadas con materia fecal. El quiste maduro desciende en el tubo digestivo hasta llegar al intestino, donde previo al contacto y resistencia con jugos digestivos, se inicia el proceso de desenquistamiento; en el cual la pared de resistencia se reblandece, los núcleos se duplican a ocho y finalmente se liberan pequeñas formas trofozoíticas llamadas amébulas metaquísticas, las cuales crecen hasta convertirse en trofozoítos maduros que migran hacia el intestino grueso. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria formando quistes, los cuales son expulsados mediante las heces. Gracias a la protección que les confieren sus paredes, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el ambiente exterior y son los responsables de la transmisión. (los trofozoítos también pueden ser expulsados mediante la diarrea, pero son rápidamente destruidos una vez que salen del organismo por agentes físicos, y en caso de que sean ingeridos no sobreviven la exposición al ambiente gástrico. En muchos casos, los trofozoítos se mantienen en el lumen intestinal (infección no invasiva) de los individuos que son portadores asintomáticos, eliminando quistes en las heces. En algunos individuos, los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (enfermedad intestinal), o a través del flujo sanguíneo, sitios extraintestinales como el hígado, cerebro y pulmones (enfermedades extraintestinales), resultando en manifestaciones patológicas.⁴⁰

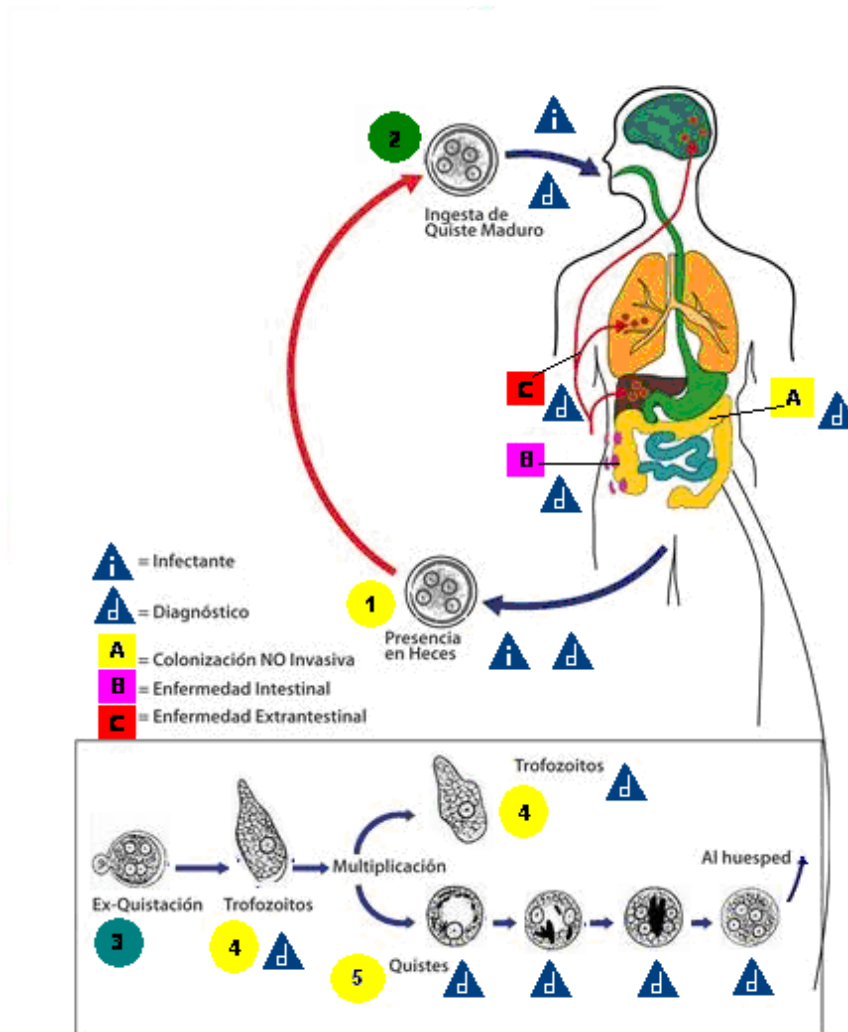


Figura 3: Ciclo de vida *Entamoeba histolytica*.³⁷

6. Patogenia:

Las amebas se multiplican como trofozoítos no invasivos en la luz intestinal, colonizando el colon y transformándose posteriormente en quistes. En los cuadros sintomáticos el proceso evoluciona en tres fases:

6.1 Adherencia: “in Vitro” se produce tanto en las cepas virulentas como en las no virulentas. “In Vivo” los trofozoítos en forma comensal se adhieren con las células del epitelio de descamación. ⁴⁰

6.2 Penetración: para llevar a cabo esta fase, es necesario la alteración de la mucosa. La penetración se realiza por las zonas interglandulares del epitelio debido a la menor resistencia de estas áreas. Como consecuencia de la adherencia se lisan las células del epitelio, destrucción que es potenciada por la fagocitosis que realiza la propia ameba. La penetración se realiza con la intervención de las enzimas líticas como proteasas y con ayuda del propio movimiento amibiano. Una vez que los trofozoítos penetran en la mucosa, se forman en ella pequeños nódulos a consecuencia de la reacción inflamatoria tisular, que se ulceran en el centro. Los trofozoítos se extienden lateralmente por la submucosa, produciendo así un trastorno de riego sanguíneo de la mucosa que la necrosa y la ulcera. Las úlceras miden entre 1 y 3 cm de diámetro y están rodeadas de una zona de edema y reacción inflamatoria, donde abundan las células plasmáticas, eosinófilos y linfocitos. Las amebas sobreviven en las lesiones, ya que son resistentes a la acción del complemento y en parte a la fagocitosis. ⁴⁰

6.3 Propagación: los parásitos pueden emigrar a zonas adyacentes del intestino y provocar una intensa reacción inflamatoria. En ocasiones, los trofozoítos pueden entrar en el torrente circulatorio y a través del sistema portal llegan a cualquier

parte del organismo, especialmente al hígado, y dan origen a la llamada amibiasis extraintestinal. Al alcanzar el hígado, las amebas producen inicialmente una reacción inflamatoria con posterior necrosis tisular y formación de uno o varios abscesos, principalmente en el lóbulo hepático derecho. En las lesiones, los trofozoítos, al igual que ocurre a nivel intestinal, se localizan en la periferia. En la amibiasis hepática la lesión tisular puede estar diseminada o localizada. Otras formas de amibiasis extraintestinal suelen tener su origen en los abscesos hepáticos que se abren directamente al pulmón, pericardio o por vía hemática al pulmón, cerebro, etc. En el caso de amibiasis cutánea se presenta normalmente en las proximidades del ano debido a la propagación de los parásitos a partir de úlceras rectales. El daño que produce *Entamoeba histolytica* se debe a la acción de sus enzimas (mucinasas, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, etc.) las cuales lisan los tejidos y permiten la invasión de órganos, aparatos y sistemas del hospedero. Otro mecanismo de daño se basa en la capacidad de los trofozoítos de introducir eritrocitos que posteriormente son destruidos en el citoplasma amibiano. Y un tercer mecanismo de daño se basa en el traumatismo directo tisular que los trofozoítos ejercen al golpear directa y constantemente los tejidos, con lo que se van separando una célula de otra. Sin embargo, el más importante es el mecanismo enzimático.⁴⁰

7. Inmunología:

Tanto en el sujeto portador, como en el sujeto con invasión de tejidos, se induce una respuesta inmune, desencadenando una respuesta inmunológica tanto humoral como celular.

En la respuesta humoral participan las inmunoglobulinas (Ig): IgM, IgG, IgA, IgE; en la celular hay linfocitotoxicidad, actividad amebicida de los macrófagos y los polimorfonucleares.

En experimentos "*in vitro*", se ha demostrado que los anticuerpos específicos contra el parásito llegan a inhibir el crecimiento de los protozoarios. Existe un fenómeno denominado "formación de casquete" mediante el cual un trofozoíto que tiene anticuerpos fijos rodeando su superficie, los moviliza hasta un punto y los elimina. En caso de amibiasis invasora, se han detectado títulos altos de anticuerpos específicos contra *Entamoeba histolytica*, los cuales han persistido después de la resolución clínica y curación del problema; incluso se ha logrado detectar anticuerpos hasta tres años después de un cuadro amibiano resuelto, sin aparente presencia de infecciones. Se han interpretado la presencia de anticuerpos séricos anti-amibianos en un individuo como evidencia de invasión tisular intestinal y extraintestinal, sin embargo, se ha demostrado que estos anticuerpos pueden producirse por diferentes mecanismos como la absorción intestinal del antígeno amibiano debido a la exposición crónica del parásito, lo cual sucede en zonas endémicas de infección amibiana. En la amibiasis intestinal, pueden llegar a presentarse anticuerpos de predominio IgG, una semana después de la aparición de los primeros síntomas. En cambio, en la amibiasis hepática, el

100% de los casos tienen anticuerpos séricos anti-amibianos. Por lo tanto, las pruebas serológicas están limitadas en la amibiasis intestinal. Los anticuerpos y el complemento previenen la adherencia del parásito, actuando como primera barrera inmunitaria en el huésped. Sin embargo, no parecen evitar el proceso invasor o prevenir las infecciones subsecuentes cuando *Entamoeba histolytica* ha logrado su adherencia; incluso hay mecanismos de evasión de la amiba, como movilización de los anticuerpos a su casquete polar, los cuales pueden internalizar o fagocitar.^{10,15,32,34}

8. Manifestaciones clínicas:

La amibiasis se puede clasificar por sus manifestaciones clínicas en sintomática y asintomática. Por su localización en intestinal y extraintestinal; y por su evolución en aguda y crónica.

8.1 Sintomática - Asintomática

El 90% de las infecciones humanas son asintomáticas o gradualmente sintomáticas. La evacuación asintomática de quistes es la manifestación común de *Entamoeba histolytica*. La desventaja que presenta, es que, aquellos pacientes colonizados de manera asintomática por más de un año, pueden desarrollar colitis o enfermedades extraintestinales. Cuando la infección es sintomática, incluyen dolor abdominal, escalofríos y disentería amibiana. La ventaja, cuando se presentan síntomas es que a nivel microscópico, los trofozoítos son detectados en el tejido de la submucosa intestinal o en muestras

fecales teñidas permanentemente. Desde que invade la mucosa del colon, las heces son prácticamente positivas para la sangre oculta. La presencia de cristales de Charcot-Leyden y sangre son el hallazgo más común en una etapa aguda. En caso de disentería amibiana, a nivel microscópico también se observan macrófagos y células polimorfonucleares. La fiebre tiende a ser inusual, ocurriendo en menos del 40% de los pacientes. Ocasionalmente, los individuos desarrollan colitis amibiana, con abundante diarrea y presencia de sangre, una pronunciada leucocitosis y un extenso dolor abdominal, generalmente con signos peritoneales y una amplia intervención en el colon. ^{11,32,34,35}

La amibiasis intestinal tiende a ser asintomática en la mayoría de los casos presentados, donde su eliminación concluye de manera espontánea si los parásitos viven en la luz del colon o puede llegar a ser invasiva si atraviesan la mucosa. Se considera amibiasis intestinal invasiva cuando los trofozoítos colonizan la pared del colon causando lesiones; ésta se puede dar de manera crónica o aguda.

8.2 Amibiasis crónica

La amibiasis crónica es la más frecuente de las formas sintomáticas de la amibiasis intestinal. Presenta colitis amibiana, sin embargo, no presenta cuadro disentérico. Se caracteriza principalmente por dolor abdominal y cambios en el ritmo de la defecación, el cual consiste en el aumento o disminución del número de deposiciones. Además puede presentar plenitud postprandial, náuseas y flatulencias. No se considera grave y no requiere de hospitalización. ^{11,32,34,35}

8.3 Amibiasis aguda

La amibiasis intestinal aguda se desarrolla en pacientes con lesiones ulcerosas extensas en el colon. Se caracteriza por presentar dolor abdominal intenso, disentería amibiana. Un síntoma característico de la amibiasis aguda es la presencia de un gran número de deposiciones, las cuales, al principio tienden a ser abundantes y blandas y conforme pasan los días disminuye el volumen de la deposición la cual va a presentar moco y sangre; esto produce pujo, esputo rectal y tenesmo.^{11,32,34,35}

8.4 Colitis amibiana

La colitis ulcerativa amibiana se observa en el colon y en el recto. Se manifiesta como un dolor abdominal o diarrea con presencia de abundante agua, sangre e inclusive moco. Microscópicamente, los trofozoítos se detectan en el tejido de la submucosa o en muestras fecales con tinciones permanentes y se observa la presencia de cristales de Charcot-Leyden.^{11,32,34,35}

8.5 Disentería amibiana fulminante

El megacolon tóxico también llamado disentería amibiana fulminante corresponde a una amibiasis hiperaguda. El colon se encuentra distendido por la inflamación y es muy dolorosa al tratar de movilizarlo. Se muestra destrucción masiva de la mayor parte de la pared del intestino grueso. La perforación es la regla, con peritonitis aguda purulenta. Puede causar la muerte.^{11,32,34,35}

8.6 Amibiasis extraintestinal

La amibiasis extraintestinal es secundaria a la colonización del intestino grueso. Los órganos comúnmente afectados son el hígado, el pulmón, pericardio, el sistema nervioso central y genitourinario.^{11,32,34,35}

8.7 Absceso hepático

El absceso hepático es la complicación extraintestinal más frecuente de la amibiasis extraintestinal invasora. Hace más de un siglo, se consideraba un padecimiento fatal, sin embargo, desde que se introdujeron tratamientos efectivos y pruebas inmunológicas y de diagnóstico rápido, el rango de mortalidad ha disminuido a 1 hasta 3%. Se caracteriza por un dolor abdominal en el cuadrante superior derecho, hepatomegalia y fiebre. También se acompaña de anorexia, náuseas, vómito, tos o pérdida de peso. Hay sensibilidad a la presión en la pared abdominal o en los espacios intercostales, puede encontrarse edema de la pared y aumento de temperatura local. En grandes abscesos puede palparse la fluctuación y puede verse una deformación del borde costal y enrojecimiento de la piel; hay leucocitosis con neutrofilia y aumento de la fosfatasa alcalina. La lesión es única y se genera en el lóbulo derecho del hígado. El absceso hepático es causado cuando el trofozoíto invasivo se disemina por el torrente circulatorio y a través de la vena porta, logra alcanzar al hígado. El lóbulo derecho del hígado recibe la sangre del colon ascendente; esto explica por que la lesión se genera en este lóbulo. A nivel microscópico, generalmente es negativa la prueba fecal, ya

que no se observa la presencia de quistes ni trofozoítos. Ultrasonidos o tomografías abdominales no son confiables para diagnosticar amibiasis hepática. Para un buen diagnóstico se utilizan pruebas serológicas con imágenes abdominales. La complicación que existe es el rompimiento y extensión de tejidos vecinos como parénquima, pericardio, pulmonar, etc. ^{11,32,34,35}



Figura 4: Drenaje de lóbulo derecho del hígado con diagnóstico de absceso hepático amibiano. ³⁸

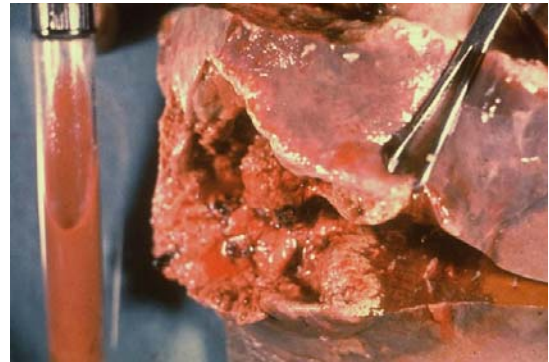


Figura 5: Absceso hepático amibiano. ³⁸

9. Tratamiento:

Existen fármacos con acción antiamebiana a diferentes niveles de los tejidos del hospedero como son los de acción luminal, tisular en el intestino, tisular fuera del intestino, de concentración selectiva hepática y de acción mixta. Dentro de los fármacos con acción luminal están las quinoleínas, las diiodohidroxiquinoleínas que son las más utilizadas; y la quinfamida de acción luminal. Los fármacos con acción tisular intestinal son la clefamida y etofamida; de acción sistémica el metronidazol y algunos otros imidazoles como tinidazol, zecnidazol, ornidazol, etc. ⁴

10. Diagnóstico:

10.1 Técnicas microscópicas

Las principales técnicas microscópicas empleadas en el diagnóstico clínico son preparaciones en fresco, de concentración y preparaciones teñidas, las cuales requieren una muestra fecal para su diagnóstico. Las técnicas microscópicas tienen la ventaja de demostrar la presencia de quistes, ya que la mayoría de los pacientes asintomáticos, generalmente sólo presentan quistes en la muestra fecal; sin embargo, la desventaja que presentan es que son métodos con poca sensibilidad, lo cual puede provocar confusión, causando resultados falsos-positivos, ya que los trofozoítos pueden confundirse con macrófagos (Figura 6), y los quistes con polimorfonucleares (Figura 7). Otra desventaja que presenta es que los trofozoítos se degradan rápidamente, por lo que la muestra fecal debe utilizarse lo antes posible y no se recomienda refrigerar las muestras; generalmente se preservan las muestras con un fijador. Otra técnica de diagnóstico es aislar mediante cultivos xénicos o axénicos *Entamoeba histolytica*. Se puede obtener muestras fecales, biopsias rectales y biopsias hepáticas, según sea el caso. A pesar que esta técnica es la más utilizada por los laboratorios clínicos de rutina, suele presentar falsos positivos, ya que no es fácil diferenciar las distintas especies de *Entamoeba* y su sensibilidad es menor que las técnicas microscópicas. Cultivar parásitos es costoso, difícil y requiere una gran labor para mantener dicho cultivo en el laboratorio^{5,11}.

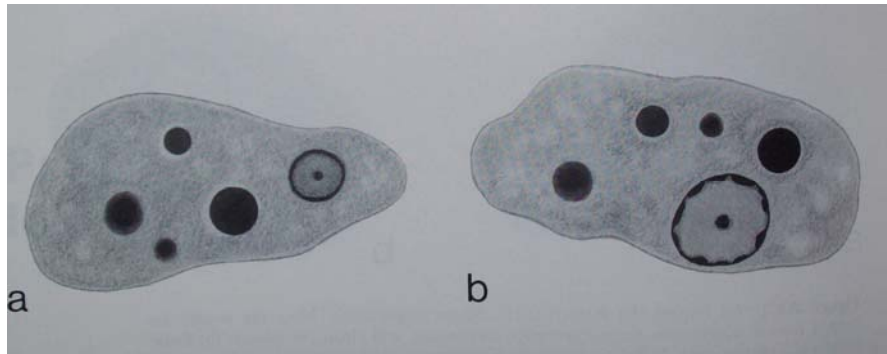


Figura 6: a) Trofozoíto *Entamoeba histolytica*. Se observa un arreglo uniforme de la cromatina nuclear, el cariosoma compacto central y glóbulos rojos en el citoplasma. b) Macrófago humano. La clave para diferenciar un macrófago de *E. histolytica* es el tamaño. Pacientes que presentan diarrea o disentería es común confundir *E. histolytica* y macrófagos, causando un diagnóstico falso-positivo de amibiasis.³⁵

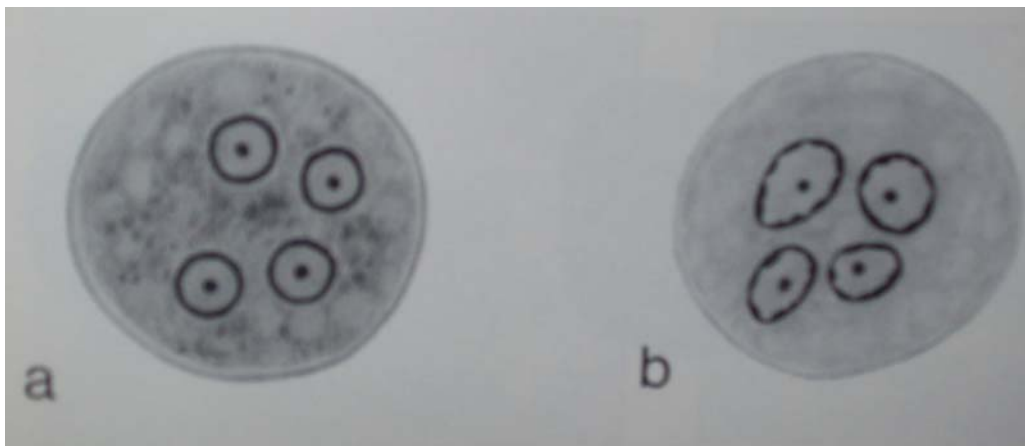


Figura 7: a) Quiste de *Entamoeba histolytica/E. dispar*. Se observan los cuatro núcleos de tamaño y forma concisos. b) Polimorfonucleares (PMN). Se observa el núcleo roto en cuatro fragmentos, los cuales simulan ser cuatro núcleos con cromatina periférica y un cariosoma central. Cuando las células polimorfonucleares han pasado un tiempo en el intestino y se empiezan a desintegrar, su morfología nuclear se puede confundir con quistes de *E. histolytica/E. dispar*. Sin embargo, las células humanas son frecuentes en muestras fecales en pacientes con diarrea, ya que al presentar una rápida evacuación intestinal, no pasa el tiempo necesario para formar quistes. Por consiguiente, pacientes que presenten diarrea o disentería, se sospecha primeramente de células polimorfonucleares y no de quistes de *E. histolytica/E. dispar*.³⁵

10.2 Técnica isoenzimática

Actualmente existen distintas pruebas diagnósticas que sobrepasan la detección microscópica del parásito y facilitan su identificación. Se puede realizar un análisis isoenzimático, basado en zimodemos con el fin de diferenciar las especies de *Entamoeba*. Este análisis es de gran utilidad, ya que permite diferenciar *Entamoeba histolytica* de *Entamoeba dispar*. Se basa en compartir el mismo patrón electroforético y la movilidad de varias enzimas en una cepa de amibas; sin embargo, presenta muchas desventajas, entre ellas: requiere mucho tiempo llevarla a cabo, depende totalmente del cultivo de amibas, ya que requiere un gran número de células para el análisis enzimático, además se requiere gran experiencia para cultivar los parásitos, el proceso se considera complejo y es costoso. Fue considerada como criterio estándar para diagnosticar amibiasis antes del desarrollo de nuevas técnicas basadas en DNA¹¹.

10.3 Pruebas inmunológicas

Las pruebas inmunológicas están diseñadas para detectar anticuerpos circulantes, los cuales se producen a partir de una respuesta inmune generada contra agentes infecciosos. La detección de anticuerpos es de gran ayuda cuando los pacientes presentan absceso hepático y el parásito no es detectable en las heces. La ventaja de esta técnica es que los anticuerpos pueden permanecer en el suero de los sujetos infectados por periodos prolongados y son detectables aun en casos en los que la infección es asintomática¹¹.

La ventaja que presenta detectar anticuerpos de *Entamoeba histolytica* en el suero de pacientes con absceso hepático es del 100%. Algunos ensayos realizados para detectar anticuerpos son: hemaglutinación indirecta, aglutinación en latex, inmunoelectroforesis, inmunodifusión, fijación del complemento, inmunofluorescencia indirecta y la prueba de ELISA (Ensayo por inmovinabsorción ligado a enzimas). En la actualidad se utilizan los métodos automatizados en cámaras de multipozos tipo ELISA y las pruebas rápidas, en las cuales los antígenos a detectar se fijan a una tira de membrana que se sumerge directamente en los reactivos de detección y revelado, con obtención en pocos minutos de un resultado^{10,11,19}.

10.3.1 Prueba de ELISA

La prueba de ELISA es la más utilizada en los laboratorios clínicos a través del mundo para estudiar la epidemiología de enfermedades asintomáticas y en este caso, para dar un buen diagnóstico de amibiasis sintomática después de un examen fecal. De igual manera, se puede utilizar para la evaluación de infecciones intestinales o extraintestinales donde se sospecha de amibiasis, pero no se detecta el parásito en las heces. Otra ventaja que presenta la identificación de anticuerpos es la persistencia de que las Ig G en el suero del paciente por varios años después de haber sido infectados por *Entamoeba histolytica*; mientras que la presencia de IgM indican que la infección es reciente, ya que estas inmunoglobulinas tienen una vida más corta y sólo se encuentran presente

durante la infección. La prueba de ELISA está diseñada para detectar IgM del suero del paciente^{5,10,11,12,19}.

10.3.2 Detección de antígenos

La detección de antígenos es otra prueba que se realiza para diagnosticar la presencia de *Entamoeba histolytica*. Existen kits para la prueba de ELISA basada en antígenos específico de *Entamoeba histolytica*; esto se logra, ya que se utilizan anticuerpos monoclonales contra lectinas galactosa-N-acetil-D-galactosamina o antígenos de superficie ricos en serinas. Debido a que las lectinas son altamente inmunológicas y antigénicamente diferentes, es posible diferenciar *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*. La desventaja que presenta detectar antígenos, es que aquellos detectados, suelen ser desnaturalizados al fijar la muestra, por lo que limita a realizarse únicamente en muestras frescas; sin embargo, ha demostrado buena sensibilidad y especificidad^{10,11}.

10.3.3 Inmunocromatografía

Para mejorar el diagnóstico de amibiasis se han evaluado técnicas como la inmunocromatografía, la cual es una técnica basada en la migración de una muestra (antígeno-anticuerpo) contenida en un líquido a través de una membrana de nitrocelulosa (tiras diagnósticas). La sensibilidad de la prueba es de 95%. La inmunocromatografía permite comprobar que el complejo de oro coloidal con los antígenos migran sobre la membrana de nitrocelulosa para reaccionar

específicamente con los anticuerpos inmovilizados, dando bandas coloreadas por la acumulación del oro coloidal del conjugado. El papel de nitrocelulosa permite la migración por capilaridad del líquido y solutos y a la vez conserva activos los anticuerpos fijados^{11,25}.

Las tiras diagnósticas constan de cuatro zonas: la zona de prueba, la zona del conjugado, la zona de captura que a su vez se divide en dos partes: línea de prueba y línea control, y la zona de absorción (Figura 8).

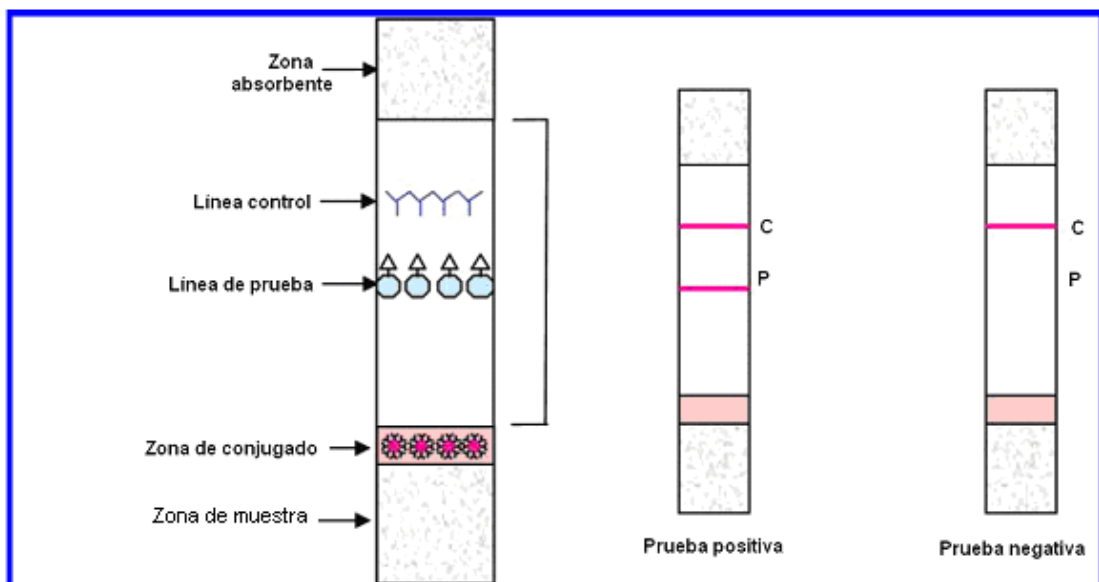


Figura 8: Diagrama de una tira rápida mediante inmunocromatografía.
C: línea control; P: línea de prueba²⁵.

La muestra pasa por la zona del conjugado, la cual se caracteriza por contener al anticuerpo específico de uno de los epítopos del antígeno a detectar y un reactivo de detección. Si la muestra contiene el antígeno a detectar, éste se une al conjugado formando un complejo inmune, el cual migrará a través de la membrana de nitrocelulosa; si la muestra no contiene el antígeno, no hay

formación del complejo. La zona de captura consta de una membrana de nitrocelulosa, la cual consta de dos líneas: la línea de prueba y la línea control. La línea de prueba contiene un segundo anticuerpo específico el cual generalmente es contra otro epítipo del antígeno. Este segundo anticuerpo se encuentra marcado con un cromóforo, de manera que cuando la muestra pasa por esta zona, los complejos inmunes formados quedan retenidos y la línea se coloreará dando lugar a una muestra positiva. En caso contrario, si la muestra no contiene al antígeno, no hay retención en la zona de captura y no se muestra coloración, indicando una muestra negativa. La línea control consta de un tercer anticuerpo, el cual reconoce al reactivo de detección, es decir, al conjugado. El anticuerpo contenido en la línea control también está marcado con un cromóforo, de manera que se colorea siempre, sin importar el resultado (positivo o negativo)^{8,23,24,26,27}.

Actualmente las tiras inmunocromatográficas utilizan anticuerpos monoclonales específicos para antígenos de superficie de 29 kilo-Daltones para *Entamoeba histolytica*. Al utilizar anticuerpos específicos, estamos asegurando que el antígeno específico de la muestra será capturado e inmovilizado en la membrana. Esta técnica tiene mayor sensibilidad (96%-100%) y especificidad (99.1%-100%) que la técnica de ELISA y técnicas microscópicas. La ventaja que presenta es que se lleva a cabo en menos de 15 minutos en muestras frescas.^{11,17}

La preparación del complejo de oro coloidal con los antígenos depende de algunas interacciones como la atracción electrónica entre las partículas de oro cargadas negativamente y los sitios del antígeno cargados positivamente, el fenómeno de adsorción incluyendo la cavidad hidrofóbica en la unión del antígeno

con la superficie del metal, y el potencial del enlace covalente del oro para liberar los grupos sulfhidrilos^{2,3,24,25}.

El fundamento de la inmunocromatografía es confirmar la presencia o ausencia de algún componente específico; el compuesto a considerar puede ser un analito o un derivado metabólico. Los anticuerpos contra dicho analito son de gran utilidad para reconocerlos. Existen diversos formatos que describen la técnica de inmunocromatografía. Estos formatos son elegidos dependiendo del analito. Los dos diseños posibles son: un formato competitivo (Fig. 9a) y un formato tipo sándwich (Fig. 9b).

a. Formato competitivo:

El formato competitivo es empleado cuando el analito a detectar tiene un peso molecular pequeño o presenta un único determinante antigénico, es decir, un epítotope, por ejemplo un hapteno. En este formato, la zona de conjugación contiene anticuerpos que ya están unidos al analito a identificar o a un análogo de éste. Si el analito a identificar está presente en la muestra, éste no se unirá al conjugado y permanecerá sin marcar. A manera que la muestra migra a lo largo de la membrana y llega a la zona de captura, un exceso de analito sin marcar se une al anticuerpo inmobilizado y bloquea la captura del conjugado, de manera que la línea de prueba no muestra coloración. El conjugado sin unirse, entonces, se unirá con el anticuerpo de la línea control produciendo una línea visible, la cual actúa de manera independiente de la presencia del analito a detectar; esto

confirma que el desarrollo de la prueba se realizó correctamente. De manera inversa, se tendría una prueba negativa, si se obtienen las dos bandas coloreadas de manera visible, tanto la línea de prueba como la línea control.^{26,41}

b. Formato sándwich :

Por otro lado, el ensayo tipo sándwich es empleado para detectar analitos que presenten varios epítopes. Este sistema puede emplear anticuerpos monoclonales o policlonales que enlazan diferentes epítopes del analito. Un antígeno marcado es impregnado en la zona de conjugado, el cual servirá como agente detector; mientras que el anticuerpo monoclonal (específico al analito) es impregnado en la línea de prueba de la membrana de nitrocelulosa el cual servirá como agente de captura. Un anticuerpo específico adicional se utiliza para detectar anticuerpos, lo cual se llevaría a cabo en la línea control. Cuando un extracto de muestra se pone en contacto con la zona de muestra, el líquido empieza a migrar por fuerzas de capilaridad, y el agente detector es liberado. Se ha comprobado que algunos de los analitos se unen al anticuerpo detector (policlonal) y otros pasan de manera libre en la solución. De manera subsecuente, la mezcla pasa a través de la línea de captura y ambos se desenlazan para unirse al anticuerpo de captura (monoclonal). La respuesta en la línea de prueba es directamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra; por lo tanto, si existe la presencia del analito, la línea de prueba es visible y la línea control recordemos que siempre debe estar visible, por lo tanto, tendríamos dos bandas.

El ensayo tipo sándwich presenta dos desventajas significativas: la señalización de la línea de prueba se ve comprometida cuando la concentración del analito a detectar excede un valor crítico y el analito a detectar debe unirse de manera simultánea tanto al anticuerpo detector como al anticuerpo de captura, el cual se encuentra inmobilizado.²⁶

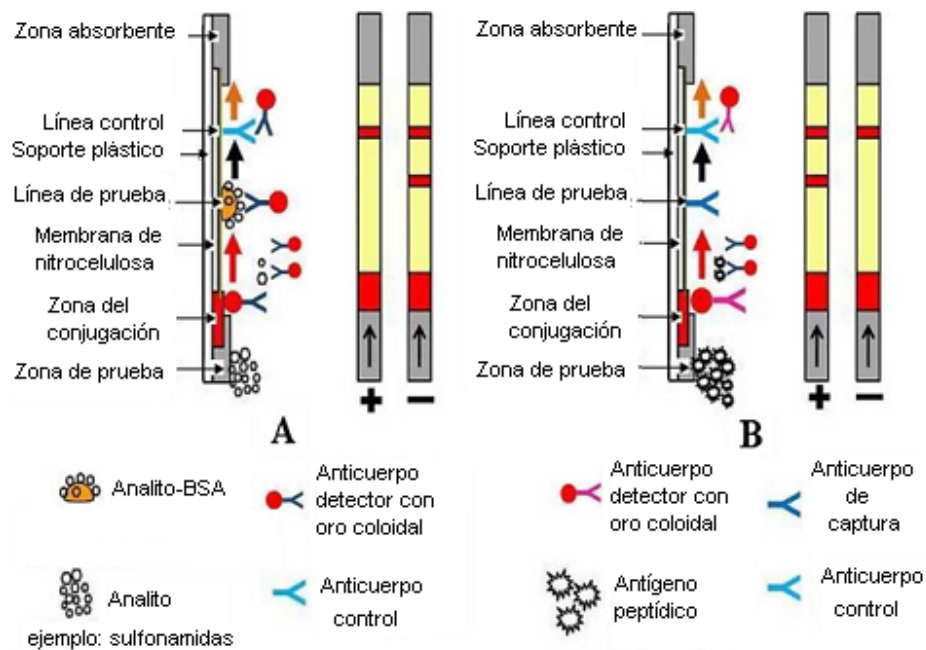


Fig. 9: Representación esquemática de un formato competitivo (A) y un formato sándwich (B). En el formato competitivo la señalización de color en la línea de prueba es inversamente proporcional a la concentración del analito.²⁶

En contraste, en el formato sándwich la respuesta en la línea de prueba es directamente proporcional a la concentración del analito. (+) = positivo; (-) = negativo. La línea superior corresponde a la línea control; mientras que la inferior corresponde a la línea de prueba.²⁶

10.4 Pruebas basadas en ADN

Por mencionar otras técnicas, se realizan ensayos basados en ADN; sin embargo, sólo se llevan a cabo en países desarrollados. Suele ser costoso y muy elaborado, ya que las muestras fecales son consideradas complejas para

utilizarse en pruebas de PCR (Reacción Polimerasa en Cadena) directas, ya que presentan inhibidores de PCR como el grupo hemo, bilirrubinas, sales biliares y carbohidratos complejos, los cuales suelen extraerse junto con el DNA patógeno. La prueba de PCR es utilizada para estudios clínicos y epidemiológicos en países desarrollados. La ventaja que presenta esta técnica es que la muestra puede ser fecal o algún tipo de tejido; además de que presenta una sensibilidad 100 veces mayor que el mejor kit ELISA^{5,11}.

11. Fosfopeptidoglicano:

El fosfopeptidoglicano (Anexo I) es una macromolécula localizada en la superficie del trofozoíto de *Entamoeba histolytica*, que se comporta como patrón molecular asociado a patógenos (PAMP); de manera que puede ser reconocido por receptores del sistema inmune innato y receptores tipo Toll (TLR). En un principio, el fosfopeptidoglicano se identificó como antígeno; ya que se detectaron anticuerpos tipo IgG anti-amiba después de una inoculación intracecal de trofozoítos en ratas. De igual manera, se han encontrado células plasmáticas anti-amiba en sangre periférica de pacientes con absceso hepático. Actualmente, se sabe que el fosfopeptidoglicano, también es reconocido por el sistema inmune adaptativo, de manera que también se observa la presencia de anticuerpos IgG anti-fosfopeptidoglicano en presencia del absceso hepático^{16,22}.

La estructura del fosfopeptidoglicano se conoce de manera parcial. Se sabe que la molécula contiene la siguiente proporción: 85% carbohidratos, 8% péptidos, 2.5% lípidos y 1% fosfato. Contiene un polipéptido ácido con residuos de serina

que forma enlaces fosfodiéster con la región del polisacárido, el cual está formado por glucosa y galactosa mediante enlaces α (1-6) y β (1-6). El polipéptido también está enlazado a una etanolamina, la cual a su vez está acoplada a un grupo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) la cual contiene galactosa, manosa y glucosamina. El grupo glicosil-fosfatidil-inositol está enlazado a una cadena de ácidos grasos, la cual no se ha sido caracterizada aún. El peso molecular del fosfopéptidoglicano está entre 100 y 190kDa^{16,22}.

El fosfopéptidoglicano es esencial para la supervivencia y virulencia del parásito, por lo cual es la macromolécula que se encuentra en mayor proporción en la superficie del trofozoíto de las cepas virulentas de *Entamoeba histolytica*, las cuales, se caracterizan por tener una alta densidad de fosfopéptidoglicano en la superficie; mientras que las cepas no virulentas presentan una baja densidad de dicha molécula en la superficie^{16,22}.

METODOLOGÍA

○ **Ensayos entre Antígenos y Anticuerpos homólogos:**

Se realizaron reacciones antígeno-anticuerpo mediante la técnica de precipitación y aglutinación.

a. Técnica de Precipitación:

Para la técnica de inmunoprecipitación, se utilizó un antígeno soluble y un anticuerpo anti-*Entamoeba histolytica*. Se realizaron diluciones seriadas del anticuerpo anti-*Entamoeba histolytica* con solución salina isotónica. Las diluciones fueron las siguientes: 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 y 1:243. Para ello, se colocó 1.0mL de solución salina isotónica en cada uno de los tubos previamente rotulados. Al tubo 1 se agregó 0.5mL de anticuerpo soluble y se mezcló dando lugar a la disolución 1:3. Al tubo 2 se adicionó 0.5mL del tubo 1 proporcionando la disolución 1:9. Se repitió el procedimiento hasta el tubo 5 (dilución 1:27 hasta 1:243). Mediante un capilar se absorbió el antígeno soluble hasta llegar a la mitad de su volumen, manteniendo el dedo índice en el otro extremo del mismo. Posteriormente se quitó el dedo índice del extremo y se absorbió la respectiva dilución del anticuerpo y se mezcló. Tapando con un dedo un extremo del capilar, se insertó éste de manera vertical en una base de plastilina, dejando un espacio de varios milímetros con aire entre la solución y la plastilina. Este procedimiento se repitió con las diluciones restantes. Los capilares se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas. Finalizado este tiempo, se midió en cada capilar la cantidad de precipitado con una regla graduada en milímetros.



Figura 10: Reacción antígeno-anticuerpo mediante precipitación.

b. Técnica de aglutinación:

Para la técnica de aglutinación se utilizó un antígeno particulado color rosa, un antígeno particulado color azul y un anticuerpo policlonal. Se realizaron diluciones del anticuerpo policlonal con solución salina (1:3 hasta 1:243). Posteriormente se rotuló una placa de vidrio donde se dispuso una gota de la solución respectiva de disolución de anticuerpo policlonal y se agregó inmediatamente una gota del antígeno particulado color rosa. Se mezcló utilizando un aplicador de madera. Una vez mezclado se dejó en reposo por 2 minutos y al final se observaron los resultados obtenidos. Se realizó el mismo procedimiento sustituyendo el antígeno particulado color rosa por el antígeno particulado color azul utilizando las mismas diluciones del anticuerpo (1:3 a 1:243).

- **Desarrollo de Técnicas Inmunocromatográficas:**

Una vez realizados los ensayos entre antígenos y anticuerpos homólogos, se tomó la decisión de trabajar con el antígeno particulado. El antígeno particulado fue impregnado con un palillo en papel filtro estéril (25mm²), el cual se dejó reposar aproximadamente 30 minutos para un secado total. El glutaraldehído al 2% fue colocado en un cartucho totalmente limpio de una pluma fuente y se aplicó en membranas de nitrocelulosa con un grosor de 1mm, las cuales se dejaron secar totalmente durante 1 hora aproximadamente. El anticuerpo policlonal fue colocado en un cartucho nuevo y totalmente limpio de una pluma fuente. Se aplicó en la membrana de nitrocelulosa sobre la zona previamente impregnada con glutaraldehído al 2%, y de igual manera se dejó reposar aproximadamente 1 hora para su secado (Figura 11).



Figura 11: Membrana de nitrocelulosa con anticuerpos colocados con pluma fuente

La membrana de nitrocelulosa fue cortada de manera perpendicular a la línea de inyección. Posteriormente se construyó la tira reactiva (Figura 12) donde el

antígeno particulado fue colocado en la zona de conjugado y a un costado se colocó la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo policlonal.

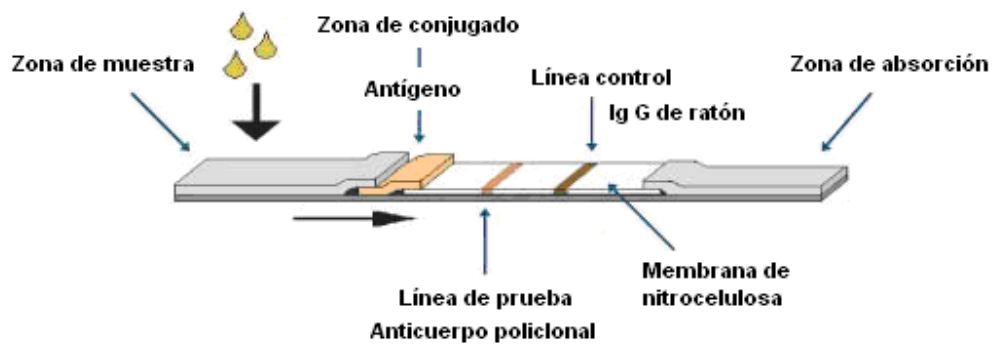


Figura 12: Tiras reactivas mediante inmunocromatografía para la identificación de anticuerpos IgG anti-amiba.³⁹

Posteriormente se realizó el mismo procedimiento para la construcción de nuevas tiras reactivas en donde el anticuerpo policlonal se sustituyó por anticuerpo monoclonal.

RESULTADOS

○ Ensayos entre Antígenos y Anticuerpos homólogos:

Se llevaron a cabo los ensayos antígeno-anticuerpo homólogos de manera satisfactoria, donde fue posible observar tanto en las pruebas de precipitación como de aglutinación resultados favorables.

a. Técnica de precipitación:

Después de 24 horas de estar en contacto el antígeno soluble con el anticuerpo policlonal se observó precipitación en los capilares. Cada dilución presentó una cantidad diferente de precipitado como se muestra a continuación:

Tabla 1: Pruebas de precipitación antígeno soluble- anticuerpo policlonal a diferentes diluciones.

Dilución anticuerpo policlonal	Cantidad de precipitado (mm)
1:3	1
1:9	0.5
1:27	0.7
1:81	0.3
1:243	1.4

La presencia de precipitado indica que existe un equilibrio entre la cantidad de antígeno-anticuerpo, lo cual nos favorece. La ventaja que presenta esta técnica es que nos permite observar dicha reacción de manera visible. En este caso, utilizamos esta prueba de manera cualitativa, sin embargo, construyendo una gráfica Antígeno vs. Anticuerpo es posible tener datos cualitativos.

b. Técnica de aglutinación:

Esta técnica permite observar los resultados en menos de 5 minutos. Las diluciones presentaron los siguientes resultados:

Tabla 2: Pruebas de aglutinación antígeno particulado color rosa- anticuerpo policlonal a diferentes diluciones.

Dilución anticuerpo policlonal	Aglutinación/ No aglutinación
1:3	Aglutinación
1:9	Aglutinación
1:27	Aglutinación
1:81	Aglutinación
1:243	Aglutinación

Tabla 3: Pruebas de aglutinación antígeno particulado color azul- anticuerpo policlonal a diferentes diluciones.

Dilución anticuerpo policlonal	Aglutinación/ No aglutinación
1:3	Aglutinación
1:9	Aglutinación
1:27	Aglutinación
1:81	Aglutinación
1:243	Aglutinación

Cabe mencionar, que la aglutinación con el antígeno particulado color rosa era más claro que el antígeno particulado color azul; esto se debe al colorante y no tiene relación con la reacción como tal.

- **Desarrollo de Técnicas Inmunocromatográficas:**

Se utilizó el antígeno particulado para el desarrollo de la línea de prueba de las tiras rápidas, ya que contiene un cromóforo como marcador, lo cual permite llevar a cabo la parte cualitativa del proyecto. En este caso, se utilizó un anticuerpo policlonal en un principio, y posteriormente se sustituyó por un anticuerpo monoclonal. La diferencia visual fue significativa, ya que era mucho más claro el resultado con el anticuerpo monoclonal.

Las tiras reactivas fueron puestas en contacto con el amortiguador PBS pH 7.4, mostrando coloración tanto en la línea control como en la línea de prueba. Esto indica que el anticuerpo Ig G anti-amiba se une al antígeno particulado de manera satisfactoria. (Figura 13)

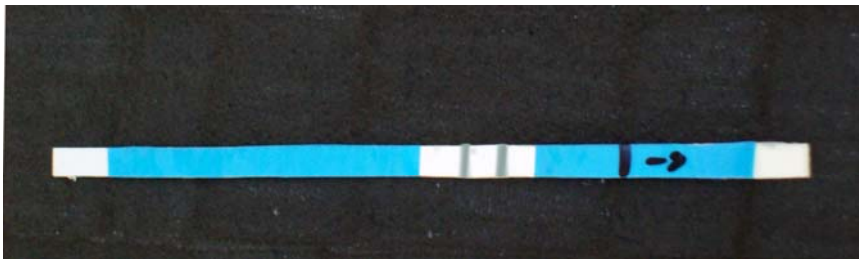


Figura 13: Tira reactiva muestra la reacción anticuerpos Ig G anti-amiba y antígeno particulado de manera satisfactoria.

PROPUESTA PROYECTO

I. Preparación del oro coloidal:

- **Precauciones del material y reactivos:**

Antes de llevar a cabo la conjugación, hay ciertos factores que se deben cuidar. Por ejemplo, el material de vidrio que se utilice debe estar perfectamente limpio y deberá ser previamente lavado con agua desionizada. Todos los reactivos que se utilicen deben ser de alto grado analítico y deberán ser filtrados inmediatamente antes de ser utilizados.

- **Antígeno:**

El día que se lleve a cabo la conjugación, el antígeno debe tener una concentración de 0.1 µg/mL utilizando como disolvente borax 2mM. Dicha solución deberá ser dializada por al menos 4 horas en un litro de borax a un pH de 9.

Posteriormente se centrifuga el antígeno a 10000rpm. Debe mantenerse a 4°C. El anticuerpo debe ajustarse a un pH de 9.2^{2,3}.

- **Oro coloidal:**

Existen protocolos que indican como preparar oro coloidal e inclusive del tamaño de partícula deseado. Actualmente, es más fácil conseguir un preparado de oro coloidal de alta calidad, el cual se encuentra previamente certificados. En este caso, se requieren partículas de oro coloidal que tengan un tamaño de partícula

de 40 nm de diámetro. La solución de oro coloidal deberá ser ajustada a un pH de 9 con 0.1M K_2CO_3 ^{2,3}.

- **Amortiguadores:**

Se requiere de una solución amortiguadora Tris/HCl (pH de 8.2) con albúmina de suero bovino al 1% y azida sódica al 0.1%^{2,3}.

- **Conjugación:**

Antes de conjugar el anticuerpo monoclonal y el oro coloidal, deberá determinarse la cantidad mínima de antígeno necesaria para estabilizar la solución de oro coloidal. Se liofilizará 0.1 mg del antígeno, el cual es colocado en tubos de ensaye previamente rotulados. Se disuelve en 1 mL de borax 2mM. 1 mL de oro coloidal se distribuye en cada uno de los tubos. Las disoluciones respectivas del antígeno (0-150 μ L) se adiciona a cada tubo. Los tubos se agitan por 1 minuto y posteriormente se incuban por 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionan 100 μ L de NaCl al 10% a cada tubo y se mezcla por 1 minuto. Si un tubo contiene la cantidad mínima de antígeno, el color de la solución de oro coloidal se observa una coloración roja. Para la conjugación 30 μ L de la solución de oro coloidal se mezcla gota a gota con 3 μ L de la solución del antígeno en un tubo con una agitación rápida. Después de 1 hora, 3.6 μ L de BSA al 10% se adiciona con el fin de bloquear la superficie residual de las partículas de oro coloidal y la mezcla se incuba por una hora a temperatura ambiente. La mezcla es centrifugada por 15 minutos a 10000 rpm y se descarta posteriormente el sobrenadante. Los

sedimentos son resuspendidos en 2mM de amortiguador de boratos (pH 7.2). La centrifugación se repite dos veces y finalmente los sedimentos se resuspenden en 3 mL de amortiguador de boratos 2mM (pH 7.2) conteniendo BSA al 1%, sacarosa al 1% y ácido hidrazoico al 0.05%.^{2,3,24}.

II. Desarrollo de tiras rápidas inmunocromatográficas:

Las tiras rápidas inmunocromatográficas consta de 4 zonas (zona de muestra, de conjugado, de captura mediante la membrana de nitrocelulosa y de absorción). La membrana de nitrocelulosa contiene la línea de prueba y la línea control. Se coloca un tapete de papel filtro previamente impregnado con oro coloidal en la zona de muestra. La zona del conjugado es impregnada con la solución que contiene un buffer de fosfato de sodio 20mM (pH 7.4), BSA al 1%, azida sódica al 0.05% y se deja secando por 1 hora a 60°C. Posteriormente, se aplican 5 µL del conjugado Antígeno-oro coloidal con una pluma fuente en papel filtro, la cual será colocada en la zona del conjugado (encima de la solución previamente absorbida). Antes de ser colocada se deja secar por 30 minutos a 37°C. La zona de absorción no requiere algún tratamiento. La línea de prueba y la línea control son inyectadas con 3 µL de anticuerpo monoclonal y 3 µL de anticuerpo IgG anti-ratón con conjugado respectivamente. Las membranas de nitrocelulosa se dejará secar por 30 minutos a 37°C. Todas las zonas (conjugado, captura y absorción) son adheridas a una lámina semi-rígida de polietileno^{24,25}.

III. Estandarización y validación de la Técnica de Inmunocromatografía:

Para llevar a cabo la estandarización y validación de la técnica es importante, primero, identificar los 4 posibles resultados a obtener:

⌘ Verdadero positivo (VP): Los anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* están presentes y se diagnostica al paciente con amibiasis.

⌘ Falso positivo (FP): Los anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* no están presentes, sin embargo, se diagnostica al paciente con amibiasis.

⌘ Verdadero negativo (VN): Los anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* no están presentes y se diagnostica al paciente como sano.

⌘ Falso negativo (FN): Los anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* están presentes pero no se detectan cuando el paciente tiene amibiasis.

Una prueba diagnóstica confiable, se basa en diagnosticar a los enfermos (verdaderos positivos) e identificar a los sanos (verdaderos negativos).

Prueba de especificidad:

La especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la capacidad de la prueba para detectar a los sanos.

Se utilizan anticuerpos IgG anti- protozoarios tales como *Entamoeba dispar*, *Entamoeba coli* y *Giardia lamblia*.

Se ponen en contacto directo con 1000 tiras reactivas. Se usa un control positivo, en este caso, se realiza con sueros positivos referenciados y como control negativo sueros negativos confirmados^{1,9,22}.

La especificidad se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

Prueba de sensibilidad:

La sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad, en este caso, amibiasis.

Se hacen diluciones de muestras de sueros positivos referenciados con solución salina (1:3 a 1:243) y cada dilución se aplica a 1000 tiras rápidas. La última dilución que produzca un resultado positivo observable se compara con otro ensayo inmunológico^{1,7,9,22}.

La sensibilidad se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

DISCUSIÓN

○ **Ensayos entre Antígenos y Anticuerpos homólogos**

La unión entre antígeno y anticuerpo se da por interacciones no covalentes, ya sea por puentes de hidrógeno, puentes iónicos, interacciones hidrofóbicas o fuerzas de van der Waals. Esta interacción va a depender de la afinidad que exista entre el sitio de unión del antígeno con el anticuerpo. Dicha reacción se caracteriza por su especificidad, rapidez, espontaneidad y reversibilidad.

1. Técnica de Precipitación:

La presencia de precipitado indica que se mezclan en cantidades equivalentes el antígeno soluble y el anticuerpo anti-amiba. La formación de este precipitado consta de dos etapas. En la primera etapa ocurre el reconocimiento y recombinación del antígeno soluble con el anticuerpo anti-amiba, los cuales se unen formando un complejo primario, el cual se considera soluble. Generalmente esta etapa no es visible. La segunda etapa se caracteriza por la agregación de los complejos primarios, dando lugar a un aumento en el peso molecular formando un enrejado; a este fenómeno se le conoce como precipitación. Esta segunda etapa no es inmediata, por lo que puede tardar varios minutos hasta horas; y es dependiente de factores como temperatura, pH, fuerza iónica, y concentraciones del antígeno soluble y del anticuerpo.

La mayoría de las reacciones antígeno-anticuerpo se llevan a cabo a temperatura ambiente; sin embargo, un aumento en la temperatura de hasta 56° C puede acelerar la reacción debido a un incremento de la difusión y el movimiento de las

moléculas, y en ocasiones se aumenta dicha temperatura (37°C) para igualar condiciones fisiológicas, en este caso, no fue necesario. Debe cuidarse mucho este factor, ya que si aumentamos demasiado la temperatura, podemos causar una desnaturalización afectando la reacción. Por otro lado, se pueden utilizar temperaturas bajas (4°C aproximadamente) si se requiere que los resultados sean cuantitativos y estequiométricos. Debido a que los resultados obtenidos son cualitativos, no fue necesario disminuir la temperatura. En este caso, el ensayo se realizó a temperatura ambiente, ya que estas serán las condiciones en las que se llevará a cabo la reacción antígeno soluble-anticuerpo anti-amiba.³⁶

La reacción antígeno-anticuerpo se observa eficazmente en un intervalo amplio de pH entre 6.8 y 9.0. Si salimos de este rango, puede afectarse el estado iónico de grupos importantes que participan en esta interacción, tales como radicales amino y carboxilo. La fuerza iónica corresponde a la concentración de iones presentes en el medio de reacción, los cuales se requieren para disminuir las cargas de repulsión que impiden la formación de los agregados. Fuerzas iónicas bajas son recomendadas para tener una mayor afinidad durante el enlace antígeno-anticuerpo; mientras que a altos valores de fuerza iónica los grupos iónicos son neutralizados y por tanto se ve reducida su afinidad. El factor más importante es la concentración de antígeno soluble y anticuerpo anti-amiba; ambos deben ser equivalentes para llevar a cabo la precipitación. Si se da el exceso de uno de ellos, puede presentarse el fenómeno de zona, es decir, la inhibición de la formación del precipitado por efecto de la concentración del antígeno y el anticuerpo. Cuando existe un exceso de antígeno o de anticuerpo, a

pesar de la formación de los complejos primarios, no es posible llevar a cabo la precipitación, ya que no logran agregarse dichos complejos. Al llevar a cabo diluciones, se comprueba que se puede utilizar menor cantidad de anticuerpo y aún se conserva el equilibrio entre la cantidad de antígeno-anticuerpo. En este caso, la reacción de precipitación se llevó a cabo en todas las diluciones, sin embargo, se recomienda utilizar la media, es decir, la dilución 1:27 para asegurarnos que el resultado sea confiable. Únicamente nos interesa el resultado cualitativo, por lo que no fue necesario llevar a cabo la curva de precipitación cuantitativa. Cabe mencionar que en esta técnica es muy importante dejar un espacio de unos milímetros de aire entre la solución (antígeno y anticuerpo) y la plastilina, ya que de no ser así se puede dar una desnaturalización de la solución por contacto con la plastilina.³⁶

2. Técnica de Aglutinación:

Para llevar a cabo la reacción de aglutinación debe ponerse en contacto un anticuerpo con su antígeno específico el cual se encuentra en estado particulado, dando lugar a grumos, mejor conocidos como aglutinados. Los fundamentos de esta técnica son los mismos de la reacción de precipitación. Por lo tanto consta de dos fases: En la primera fase se lleva a cabo de la unión del anticuerpo con la superficie del antígeno, la cual también se conoce con el nombre de sensibilización. Dichas uniones son de tipo no covalentes ya sean puentes de hidrógeno, electrostáticas, de van der Waals o hidrofóbicas. Durante la segunda fase ocurre la unión de las partículas mediante puentes de anticuerpo, formando

el aglutinado, el cual en este caso es visible; esto se debe al vencimiento de las fuerzas de repulsión que mantienen normalmente separadas a las partículas. Una vez comprobada que todas las diluciones aglutinaron, se tomó la decisión de trabajar con un antígeno particulado, ya que éste tiene la ventaja de contener un cromóforo.³⁶

- **Desarrollo de la Técnica Inmunocromatográfica:**

Las tiras reactivas mostraron resultados confiables de acuerdo a las soluciones a las que fueron expuestas. Cuando las tiras reactivas fueron puestas en contacto con el amortiguador, la prueba fue negativa, ya que sólo se tiñó la línea de control. Esto se esperaba ya que el amortiguador es una disolución capaz de resistir cambios de pH debido a que contiene un ácido débil y su sal, o una base débil y su respectiva sal; por lo tanto, no contiene anticuerpos anti-amiba. Sin embargo, la prueba fue positiva, cuando se puso en contacto la tira reactiva con un suero que contenía anticuerpos Ig G anti-amiba.

Un factor esencial en la inmunocromatografía es el flujo, es decir el movimiento de la muestra líquida o del extracto que contenga al analito de interés. A lo largo de una tira de material polimérico, recorre varias zonas donde moléculas específicas se han adheridas, de manera que ejercen ciertas interacciones específicas con dicho analito.

Un formato típico de inmunocromatografía consiste en una capa superficial que transporta la muestra desde la zona de muestra hacia la zona de conjugación a lo largo de la tira hasta llegar a la zona de absorción. Cabe mencionar, que el líquido

(la muestra) se mueve por fuerzas de capilaridad con respecto al material de la tira; aquí es donde la zona de absorción lleva a cabo su función. La zona de absorción retira el líquido al final de la tira; y de esta manera mantiene el flujo.

La membrana se considera la parte más importante utilizada durante el proceso. La membrana se caracteriza por ser muy delgada y frágil, por lo que es adherida a una base de plástico o nylon para que se de un buen manejo de ésta. Generalmente la tira se pone dentro de un soporte de plástico, donde únicamente se observa la tira de muestra y la tira control; esto le brindará mayor protección a la tira. Las membranas más utilizadas son de nitrocelulosa, nylon, polietersulfona, polietileno o de sílica fundida. Dicho material puede interactuar con el flujo de la muestra líquida; esto genera el inicio de interacciones específicas que se llevarán a cabo durante todo el proceso cromatográfico. En este caso, se propone utilizar una membrana de nitrocelulosa ya que es la más utilizada y de fácil acceso. Existen diferentes tamaños de poros para la nitrocelulosa, los cuales oscilan entre 0.05 y 12 μ m; sin embargo, la importancia no radica tanto en los poros, sino en el tiempo de flujo capilar que puede llevar a cabo, lo cual también indica una ventaja para transportar el marcador. Otra de las ventajas que presenta este material es que se puede operar a temperatura ambiente y a una humedad moderada; sin embargo, a una baja humedad, se dificulta su manipulación por la acumulación de estática electrostática.

Los marcadores son cromóforos que puedes estar hechos de colorante o nanopartículas fluorescentes; oscilan en un tamaño de partícula entre 15 y 800nm, permitiendo un flujo continuo, ya que uno de sus requisitos es que no

deben causar algún impedimento durante el flujo a través de la membrana. Generalmente están hechos de oro coloidal o latex; en menor proporción, de selenio, carbón y liposomas. Las nanopartículas de látex son coloreadas para proporcionar una detección a simple vista; en los liposomas, fluorescentes o bioluminiscentes, se incorporan colorantes para permitir su visualización e inclusive para dar una respuesta cuantitativa.

Al menos dos líneas son impregnadas en la tira: una línea de prueba y una línea control. En la línea de prueba se da el reconocimiento del analito a detectar e indicará la respuesta.

Uno de los requisitos que indican, que la prueba rápida se está llevando a cabo de manera eficiente, es que la línea de control siempre muestre una respuesta, ya que esto confirma un fluido adecuado del líquido a través de la tira rápida.

- **Oro Coloidal:**

La inmunocromatografía en tiras rápidas es una técnica relativamente reciente, la cual no requiere personal calificado o equipo complejo para su desarrollo e interpretación; además de ser un método que provee de manera rápida la detección del analito, en este caso, anticuerpos anti-amiba. Las partículas de oro coloidal se utilizan frecuentemente en técnicas como inmunocitoquímica, Western blot y en general en pruebas inmuno-específicas como se aplica en este caso para el desarrollo de las tiras rápidas. De acuerdo a la literatura, hay una relación directamente proporcional entre la intensidad del color y el tamaño y calidad de

las partículas de oro coloidal. Se recomienda utilizar para el desarrollo de las tiras rápidas oro coloidal que tenga un diámetro mayor a 20nm y menor a 60nm. Se ha demostrado que tamaños de partícula de oro coloidal menores a 15nm son demasiado pequeñas para producir una coloración aceptable. Por otro lado, las partículas de oro coloidal con un diámetro mayor a 60 o 70nm producen fenómeno de autoagregación después de que las partículas han sido almacenadas a 4°C por varios días.

En cuanto a la conjugación, se espera que el antígeno sea directamente absorbido en las partículas de superficie y este proceso se lleve a cabo mediante enlaces no covalentes como fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas. La formación de la solución de oro coloidal es posible gracias al balance entre las fuerzas de repulsión y la atracción entre las partículas por la fuerza de van der Waals.

Es importante optimizar las condiciones del conjugado, ya que para tener un conjugado estable, se debe utilizar una cantidad mínima del antígeno. Por consiguiente, se recomienda realizar de manera preliminar diluciones seriales para determinar de manera cuantitativa la concentración mínima de antígeno que sea suficiente para obtener una absorción fuerte. Para determinar la cantidad mínima de antígeno suficiente, se agregan 0.5mL de NaCl al 10% y 1mL de partículas de oro coloidal que contienen diferentes cantidades de antígeno (diluciones) y se mezcla por 10minutos. Después de 5min, se mide su absorción a una longitud de onda entre 520 y 580nm. Para evaluar la cantidad mínima, se

observa la presencia del color rojo. Se determina la concentración óptima de antígeno, cuando la concentración más pequeña de antígeno cambia de color.

A pesar de que los anticuerpos policlonales responden con facilidad a su localización y fagocitosis, presentan desventajas con respecto a los anticuerpos monoclonales, los cuales son específicos y reconocen un único epítipo y a partir de uno, se pueden obtener varias clonas.

9. Escalante H, Benitez S, Castañeda A, Huamanchay O, Davelois K, Diaz E, Iglesias M. Estandarización y validación de la Inmunocromatografía para el diagnóstico de la taeniosis a través de la detección de coproantígenos. 2003.
10. Leo M, Haque, et al. Evaluation of *Entamoeba histolytica* Antigen and Antibody Point-of-Care Tests for the Rapid Diagnosis of Amebiasis. *J Clin Microbiol* 2006; 44(12): 4569-4571.
11. Fotedar R, et al.. Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species. *Clinical Microbiology Reviews* 2007; 20(3): 511-532.
12. WU J.X, Zhang S, Zhou X.P. Monoclonal antibody-based ELISA and colloidal gold-based immunochromatographic assay for streptomycin residue detection in milk and swine urine. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biodmedicine & Biotechnology)* 2010; 11(1): 52-60.
13. Shim, et al. Production of Monoclonal Antibody Against *Listeria monocytogenes* and Its Application to Immunochromatography Strip Test. *J Microbiol Biotechnol* 2007; 17(7): 1152-1161.
14. Ximénez Cecilia. Epidemiology of Amebiasis in Mexico: A Molecular Approach. *Archives of Medical Research* 2006; 37:263-265.
15. Gómez JC, Cortés JA, Cuervo SI, López MC. Amebiasis intestinal: Revisión de tema. *Asociación Colombiana de Infectología* 2007; 11(1): 36-45.
16. Wong-Baeza I, et al.. The Role of Lipopeptidophosphoglycan in the Immune Response to *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010; 1-2.

CONCLUSIÓN

Se consideran las tiras rápidas inmunocromatográficas desarrolladas con oro coloidal fáciles, rápidas, cuantitativas y competitivas para la determinación de anticuerpos de *Entamoeba histolytica*. El método incluye la utilización de un anticuerpo monoclonal único para identificar de manera selectiva fosfopeptidoglicano con un alto grado de sensibilidad y especificidad. La rápida observación de resultados de manera visible permite considerar esta técnica una plataforma analítica de un solo paso, rápido y de bajo costo. Actualmente, esta tecnología es aplicada en varios campos de investigación, tanto en diagnóstico clínico, veterinario, monitoreo en la industria alimenticia y pruebas ambientales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Engler K.J., et al. Immunochromatographic strip test for rapid detection of diphtheria toxin: description and multicenter evaluation in areas of low and high prevalence of diphtheria. *J Clin Microbiol* 2002; 4(1):80-83.
2. Beesley J. Colloidal gold. A new perspective for cytochemical marking. Royal Microscopical Society Handbook N.17. Oxford Science Publications. Oxford University Press; 1989.
3. Hermanson G. Bioconjugate Techniques. USA: Edit. Academic Press; 1996. p593-604.
4. Pritt B.S, et al. Amebiasis. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83(10): 1154-1160.
5. Stark D, et al. Comparison of Stool Antigen Detection Kits to PCR for Diagnosis of Amebiasis. *J Clin Microbiol* 2008; 46(5): 1678-1681.
6. Shim, et al.. Development of Immunochromatography Strip-Test Using Nanocolloidal Gold-Antibody Probe for the Rapid Detection of Aflatoxin B1 in Grain and Feed Samples. *J Microbiol Biotechnol* 2007; 17(10): 1629-1637.
7. Ying-song WU, La-mei LEI, Ming LI. Evaluation of a parasite lactate dehydrogenase-based colloid gold-immunochromatography assay for diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2005; 25(7): 761-765.
8. Escalante H, Huamanchay O, Davelois K. La Inmuncromatografía para el diagnostico de la infección por *Taenia solium* en *Mesocricetus auratus* mediante la detección de coproantígenos. *Rev Med Exp* 2001; 18(3-4): 57-

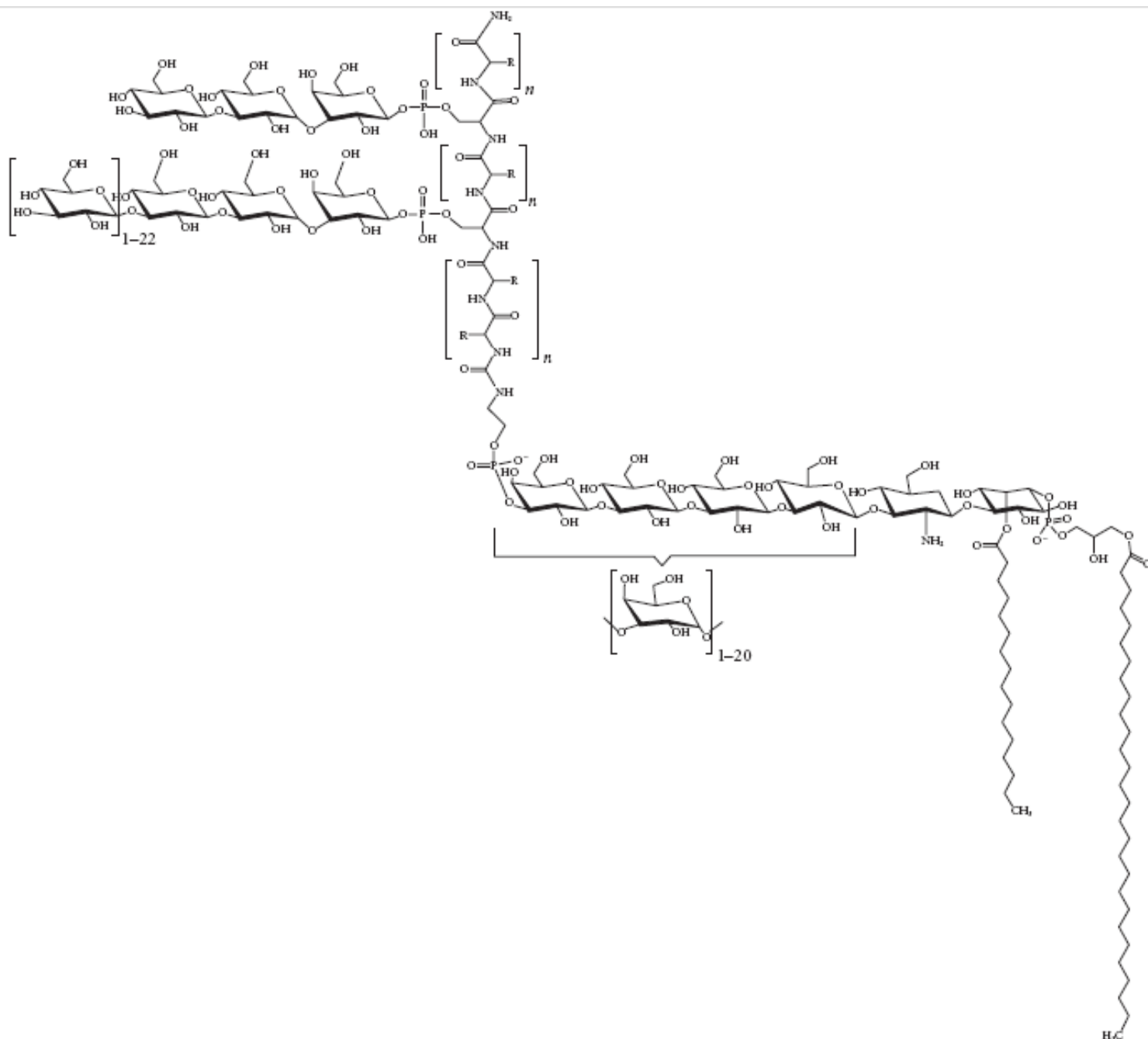
17. Shandil RK, Vinayak VK. Immunochemical characterisation of a 29-Kda surface-associated molecule of *Entamoeba histolytica* and its recognition by serum from patients with amoebiasis. *J Med Microbiol* 1992; 36: 41-45.
18. Ramos F, et al. High Prevalence Rate of *Entamoeba histolytica* Asymptomatic Infection in a Rural Mexican Community. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; 73 (1): 87-91.
19. González CR, et al. Prevalence of antibodies against *Entamoeba histolytica* in Mexico measured by ELISA. *Epidemiol Infect* 1995; 115: 535-543.
20. Bruckner David A. Amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 1992; 5(4): 356-369.
21. Baxt Leigh A, Singh Upinder. New Insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21(5): 489-494.
22. Vivanco-Cid H, et al. Lipopeptidephosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes. *Parasite Immunology* 2007; 29: 467-474.
23. Sithigorngul P, et al. A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of pathogenic isolates of *Vibrio harveyi*. *Journal of Microbiological Methods* 2007; 71: 256-264.
24. Omidfar K, et al. Colloidal Nanogold-Based Immunochromatographic Strip Test for the Detection of Digoxin Toxicity. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 160: 846-855.

25. Shim, et al. Immunochromatography Using Colloidal Gold-Antibody Probe for the Detection of Atrazine in Water Samples. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54: 9728-9734.
26. Ngom B, Guo Y, Wang X, Bi D. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Anal Bioanal Chem* 2010: 23 páginas.
27. Posthuma-Trumpie G.A, Korf Jakob, van Amerongen Aart. Lateral flow (inmuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and trets: A literature survey. *Anal Bioanal Chem* 2009; 393: 569-582.
28. Bhattacharya A, Prasad R, Sacks D. Identification and partial characterization of lipophosphoglycan form a pathogenic strain of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1992; 56: 161-168.
29. Prasad R, Tola M, Bhattacharya S. Recognition of *Entamoeba histolytica* lipophosphoglycan by a strain-specific monoclonal antibody and human immune sera. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1992; 56: 279-288.
30. Lotter H, et al. Natural Killer T Cells Activated by a Lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* Are Critically Important To Control Amebic Liver Abscess. *PLoS Pathog* 2009; 5(5): 11 páginas.
31. Kumar Rai Shiba, Uga Shoji, Kataoka Nobumasa, Matsumura Takeo. *Atlas of Medical Parasitology*. Primera edición. Kyokuseisya Co. Japón. 1996.
32. Gillespie & Richard D. Pearson. *Principles and Practice of Clinical Parasitology*. John Wiley & Sons. USA. 2001.

33. Marr J. Joseph, Nilsen Timothy W., Komuniecki Richard W. *Molecular Medical Parasitology*. Elsevier Academic Press. USA. 2003.
34. Bogiths Burton J., Carter Clint E., Oeltmann Thomas N. *Human Parasitology*. Elsevier Academic Press. USA. 2005.
35. Shore García Lynne. *Diagnostic Medical Parasitology*. 4th Ed. American Society for Microbiology Press. USA. 2001.
36. De León Chapa Saturnino, et. Al. *Manual de Prácticas de Inmunología*. Departamento de Biología. Facultad de Química. 2003.
37. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>
38. <http://www.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2006/Amoebiasis/clinicalpresentations.html>
39. http://www.khufash.com/bd/images/typical_lateral_flow_assay.jpg
40. Hinojosa Sada, Lourdes Elisa. Tesis Profesional: Búsqueda de quistes y huevos de parásitos intestinales en aguas de pozo de San Gregorio Zacapechpan, Mpo. de Cholula, Puebla. Universidad de las Américas Puebla (Escuela de Ciencias Departamento de Química y Biología). Cholula, Puebla, 2005. URL: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/hinojosa_s_le/portada.html
41. <http://www.rapidmicrobiology.com/test-methods/Lateral-flow-assay.php>

ANEXO I

Fosfopeptidoglicano de la superficie de *Entamoeba histolytica*¹⁶.



ANEXO II

Preparación de soluciones buffer:

1. Buffer Fosfato-Salina (PBS) pH 7.4

NaCl.....	0.800 g
KCl	0.020 g
KH ₂ PO ₄	0.014 g
Na ₂ HPO ₄	0.090 g
Agua Destilada	100 mL

2. Buffer Tris-Salina (TBS) pH 8.2

Tris (hidroximetil)aminometano.....	0.242 g
NaNO ₃	0.130g
NaCl.....	0.900g
BSA.....	0.100g
Agua Destilada.....	100mL

3. Buffer Boratos pH 7.2

Tetraborato de sodio.....	0.762g
Ácido bórico.....	0.124g
Agua destilada.....	100mL