

616 (04)

57  
E  
1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

REACCION DE FIJACION  
DE COMPLEMENTO EN EL  
DIAGNOSTICO DE AMIBIASIS

MA. DE LA LUZ MANON ARROYO

MEXICO, D. F.

1956



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.

616(04)

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS**

**REACCION DE FIJACION**  
**DE COMPLEMENTO EN EL**  
**DIAGNOSTICO DE AMIBIASIS**

**T E S I S**

**PRESENTADA POR**

**MA. DE LA LUZ MAÑON ARROYO**

Para el Examen Profesional correspondiente

a la carrera de

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**MEXICO, D. F.**

**1 9 5 6**

Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Protozoología del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, bajo la dirección del Dr. Ernesto Gutiérrez Ballesteros y el Sr. Faustino Navarrete, a quienes hago patente mi agradecimiento.

### **Agradecimiento:**

Expresamos nuestro agradecimiento a los Laboratorios E. Lilly & Co. por facilitarnos el antígeno que utilizamos en este trabajo.

A los Dres. M. Flores Aparicio, Dir. del Hospital de Ferrocarriles, y J. Flores Espinosa, Subdirector del Hospital General, por habernos proporcionado material de personas que padecían de *E. histolytica*. Al Q. B. P. J. Olarte Jefe de Bacteriología del Hospital Infantil, por su contribución en este trabajo al hacer las determinaciones de *Shigella* y *Salmonella*. A la Q. F. B. Sra. Paula Coppla de Rivas por haberme sugerido el presente tema.

## **INDICE**

### **REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO EN EL DIAGNOSTICO DE AMEBIASIS**

- I.—Introducción.
- II.—Importancia del Tema.
- III.—Técnicas Conocidas.
- IV.—Técnica Empleada.
  - a).—Titulación de la hemolisina.
  - b).—Titulación del Complemento.
- V.—Resultados Obtenidos.
- VI.—Conclusiones.
- VII.—Resumen.
- VIII.—Bibliografía.

## INTRODUCCION

Para la búsqueda de protozoarios intestinales se utilizan diversos métodos, siendo el más simple, el que consiste en poner una pequeña porción de la materia fecal diluida con suero fisiológico entre porta y cubre objetos, si es compacta, observándose en casos positivos formas quísticas o vegetativas de protozoarios, sin embargo, este método con el que podemos examinar movimientos, cuerpos cromatoides, y datos del animal vivo, no nos permiten ver con claridad otros detalles, y por eso posteriormente se utilizó para el diagnóstico de especie de los quistes, en lugar de solución salina, solución de lugol que fué estandarizada por D'Antoni, J. S. (1937), que permite que los nucleos, algunos tipos de vacuolas y otras estructuras resalten grandemente. Como los protozoarios no siempre existen en abundancia en las muestras enviadas al laboratorio de manera que sea fácil encontrarlos por examen directo y las investigaciones en estas condiciones serian muy largas y laboriosas, para evitar esto se han ideado métodos diferentes de enriquecimiento de la muestra, teniendo en cuenta que el más sencillo de éstos se obtuvo por simple lavado del excremento, posterior centrifugación, y examen del sedimento, más tarde se usaron métodos de concentración por flotación con sulfato de cinc, Faust, E. C. (1938), el método de concentración por sedimentación de Carles Barthelemy, etc. Además de los métodos de concentración tenemos los métodos de tinción que sirven para poner de manifiesto las estructuras celulares finas, facilitando la investigación de los elementos por investigar. Posteriormente se ha tenido éxito con los medios de cultivo para protozoarios. Parecería que con todo este bagaje en la técnica de demostración

## INTRODUCCION

Para la búsqueda de protozoarios intestinales se utilizan diversos métodos, siendo el más simple, el que consiste en poner una pequeña porción de la materia fecal diluída con suero fisiológico entre porta y cubre objetos, si es compacta, observándose en casos positivos formas quísticas o vegetativas de protozoarios, sin embargo, este método con el que podemos examinar movimientos, cuerpos cromatoides, y datos del animal vivo, no nos permiten ver con claridad otros detalles, y por eso posteriormente se utilizó para el diagnóstico de especie de los quistes, en lugar de solución salina, solución de lugol que fué estandarizada por D'Antoni, J. S. (1937), que permite que los núcleos, algunos tipos de vacuolas y otras estructuras resalten grandemente. Como los protozoarios no siempre existen en abundancia en las muestras enviadas al laboratorio de manera que sea fácil encontrarlos por examen directo y las investigaciones en estas condiciones serian muy largas y laboriosas, para evitar esto se han ideado métodos diferentes de enriquecimiento de la muestra, teniendo en cuenta que el más sencillo de éstos se obtuvo por simple lavado del excremento, posterior centrifugación, y examen del sedimento, más tarde se usaron métodos de concentración por flotación con sulfato de cinc, Faust, E. C. (1938), el método de concentración por sedimentación de Charles Barthelemy, etc. Además de los métodos de concentración tenemos los métodos de tinción que sirven para poner de manifiesto las estructuras celulares finas, facilitando la investigación de los elementos por investigar. Posteriormente se ha tenido éxito con los medios de cultivo para protozoarios. Parecería que con todo este bagaje en la técnica de demostración

de los protozoarios ya tendríamos suficiente, pero aquellas personas familiarizadas con la investigación de protozoarios intestinales, han comprendido que aún no es completa y cuanto más se enriquezca será mejor. No sólo eso, sino que algunos piensan, Faust (1952), que quizás pronto se harán diagnósticos de rutina por medio de la serología.

A partir del hallazgo de *Entamoeba histolytica* por Lösch (1875), y confirmada su patogenicidad adquirió mayor interés el estudio de los protozoarios intestinales, y puesto que invade los tejidos genera anticuerpos, que técnicamente nos permite demostrarlo con las diversas pruebas antigénicas. Aún así fué en un tiempo relativamente reciente cuando Izar (1914), usó por primera vez el diagnóstico de *E. histolytica* mediante reacciones basadas en principios inmunológicos, utilizando sueros de pacientes con disenteria amibiana en los que encontró anticuerpos específicos fijadores del complemento utilizando antígenos preparados a partir de materias fecales y del pus de abscesos hepáticos. Scalas (1921), confirma los resultados de Izar, usando un antígeno de extractos acuosos de porciones de moco presentes en materias fecales de personas con disenteria amibiana. Estos estudios fueron continuados por Craig (1927), quien sistematizó la prueba de fijación de complemento, elaborando una técnica análoga a la descrita por Wassermann para el diagnóstico de sífilis. Numerosos investigadores continuaron estos trabajos entre los que podemos citar a Spector (1932), que usó extractos alcohólicos y salinos, de cultivos de *E. histolytica* demostrando que hay reacciones inmunológicas específicas de dicha especie. Inyectando conejos con extractos de amibas observó que la producción de anticuerpos fué muy rápida, dos a cuatro semanas después de la primera inyección. Los resultados de la prueba de fijación de complemento en el suero de estos conejos fué positiva y la prueba fué negativa en el suero de conejos sin inmunizar, los resultados parecen demostrar que hay una especificidad de los anticuerpos para *E. histolytica*. Además hizo pruebas de precipitación con sueros inmunes y con el antígeno anteriormente usado observando un anillo blanco en la interface de éste y el suero inmune, después de incubar media hora a treinta y siete grados centígrados y dejar otra media hora a temperatura del laboratorio. Sherwood y Heathman (1932),

llaman la atención hacia la obtención de antígenos cuya especificidad sea mayor, así elaboran técnicas basadas en la extracción de fracciones antigénicas por tratamiento con alcohol metílico, y hacen una comparación con otros antígenos obtenidos con solución salina, encontrando que los extractos alcohólicos son superiores a los salinos. Heathman (1932), prepara un antígeno con amibas en su forma vegetativa trituradas y lavadas con solución salina, empleándolo en pruebas de aglutinación, precipitación y fijación del complemento. Tsuchiya (1934) obtiene antígenos por lavados de cultivos con solución salina y tratando el sedimento de los lavados con alcohol absoluto incubando tres días a treinta y siete grados centígrados y filtrando. Weiss y Arnold (1934) (1934a) obtuvieron antígenos salinos y alcohólicos a partir de cultivos en medio de Cleveland y Collier (1930). Stone (1935) utilizó un antígeno de quistes lavados y triturados con perlas de vidrio en presencia de alcohol absoluto filtrando posteriormente y utilizándolo en un lapso no mayor de dos semanas después de su preparación, ya que después de este tiempo pierde sus propiedades fijadoras del complemento. Observaron además que con estos antígenos no hay reacciones cruzadas con sueros luéticos. Rees y Col. (1942) obtienen antígenos del lavado de cultivo con solución salina centrifugando posteriormente y congelado durante cuatro horas, almacenándolo a diez grados centígrados, demostrando la especificidad del antígeno en un grupo de ciento un casos, de los cuales nueve presentaban colitis, ulcerativas, tres colitis mucosas, no amebianas, y una disenteria bacilar, dando todos ellos reacción negativa a la prueba de fijación de complemento. Cinco casos presentaron infección con *Entamoeba coli*, dos con *Endolimax nana*, uno con *Iodameba bütschlii*, uno con *Chilomaxtis mesnili*, y dos con *Giardia lamblia*. Excepto en los casos en que presentaron infección conmitante con *E. histolytica*, todas las infecciones que presentaron otras especies de protozoarios dieron la prueba de fijación de complemento negativo. Terry y Bozicevich (1948) emplearon extractos salinos de cultivos con adición de merthiolato al 1:1000. Bozicevich (1950), preparó un antígeno con quistes de amibas trituradas, que fueron cultivadas en medio de Rees y Col. (1942). Fulton (1951), usó un antígeno preparado por congelación y descongelación de trofozoitos de *E. histolytica*. Mc. Dear-

man y Dunham (1952) emplearon la fórmula del antígeno comercial de Bozicevich, congelando y descongelando.

Tratando de encontrar la especificidad de la reacción K. L. Hussey y W. H. Brown (1950), llevaron a cabo una prueba de fijación de complemento en 49 casos de pacientes con enfermedades hepáticas originadas por diversos agentes etiológicos, entre los cuales se citan Kala-azar, cirrosis hepática, hepatitis infecciosa por virus, carcinoma hepático, quiste hidatídico, colecistitis, sprué, sífilis, y algunos otros padecimientos que involucran a este órgano, las conclusiones fueron en sentido de negatividad franca a la reacción de fijación de complemento.

Mc. Dearman y Dunham (1952), al igual que Hussey y Brown (1950) reportaron los resultados de la prueba empleando un antígeno comercial de *E. histolytica*, obteniendo 86% de reacciones positivas en casos de amibiasis intestinal.

Se pensó durante mucho tiempo que uno de los escollos difíciles en la obtención de un antígeno altamente específico y sensible, es la presencia de bacterias acompañantes que se desarrollan en los medios en que se cultiva *E. histolytica*. Según los mismos autores citados anteriormente, prepararon antígenos con estos gérmenes y con las conclusiones de sus experiencias de fijación de complemento crean haber demostrado que tales gérmenes no interfieren en la especificidad y potencia del antígeno frente a los anticuerpos específicos elaborados por *E. histolytica*.

del antígeno comercial.

de la reacción K. L.

hizo una prueba de fijación

de pacientes con enfermeda-

des etiológicos, entre

los cuales se citan Kala-azar, cirrosis hepática, hepatitis infecciosa

por virus, carcinoma hepático, quiste hidatídico, colecistitis,

sprué, sífilis, y algunos otros padecimientos que involucran a este

órgano, las conclusiones fueron en sentido de negatividad franca

a la reacción de fijación de complemento.

Tratando de encontrar la especificidad de la reacción K. L.

Hussey y W. H. Brown (1950), llevaron a cabo una prueba de fijación

de complemento en 49 casos de pacientes con enfermedades hepáticas

originadas por diversos agentes etiológicos, entre los cuales se citan

Kala-azar, cirrosis hepática, hepatitis infecciosa por virus, carcinoma

hepático, quiste hidatídico, colecistitis, sprué, sífilis, y algunos otros

padecimientos que involucran a este órgano, las conclusiones fueron en

sentido de negatividad franca a la reacción de fijación de complemento.

Tratando de encontrar la especificidad de la reacción K. L.

Hussey y Brown (1950), llevaron a cabo una prueba de fijación de

complemento en 49 casos de pacientes con enfermedades hepáticas

originadas por diversos agentes etiológicos, entre los cuales se citan

Kala-azar, cirrosis hepática, hepatitis infecciosa por virus, carcinoma

hepático, quiste hidatídico, colecistitis, sprué, sífilis, y algunos otros

padecimientos que involucran a este órgano, las conclusiones fueron en

sentido de negatividad franca a la reacción de fijación de complemento.

Tratando de encontrar la especificidad de la reacción K. L.

Hussey y Brown (1950), llevaron a cabo una prueba de fijación de

complemento en 49 casos de pacientes con enfermedades hepáticas

originadas por diversos agentes etiológicos, entre los cuales se citan

Kala-azar, cirrosis hepática, hepatitis infecciosa por virus, carcinoma

hepático, quiste hidatídico, colecistitis, sprué, sífilis, y algunos otros

padecimientos que involucran a este órgano, las conclusiones fueron en

sentido de negatividad franca a la reacción de fijación de complemento.

## IMPORTANCIA DEL TEMA

Existen varios métodos para demostrar la presencia de protozoarios intestinales, pero Craig (1944), observó, que por exámenes repetidos de materias fecales de enfermos con síntomas clínicos sugerentes de absceso hepático amibiano, no siempre era posible demostrar formas quísticas o vegetativas de *E. histolytica*, mientras que la reacción de fijación de complemento casi siempre acusaba fuerte positividad. En estos casos la intervención quirúrgica comprobó la existencia de un absceso hepático producido por *E. histolytica*, encontrándose el parásito en las paredes de la cavidad del absceso. Teniendo en cuenta lo anteriormente dicho debemos considerar que la prueba de fijación de complemento es de valor práctico en casos sospechosos de abscesos hepáticos amibianos o de otros órganos aunque no se pueda demostrar la presencia de *E. histolytica*, ya que de cualquier manera se genera la formación de anticuerpos en las personas parasitadas y la prueba de fijación de complemento es positiva. En casos sospechosos de absceso hepático amibiano la aspiración puede ser contraindicada, y aún si se hace como señala Faust (1952), el material aspirado puede ser negativo para *E. histolytica*. Hay que tener presente que en algunas ocasiones se encuentran abscesos hepáticos amibianos después que la infección intestinal ha desaparecido, Craig (1937). También se usa la prueba de fijación de complemento para controlar la acción terapéutica de drogas amebicidas. De acuerdo con lo expresado anteriormente observamos que la prueba de fijación de complemento adquiere mayor validez.

Los antecedentes históricos sobre la prueba de fijación de complemento demuestran una carencia de antígenos altamente es-

pecíficos como es de desearse, y se encuentra en una etapa experimental a pesar de todo, de acuerdo con lo dicho por Faust (1952), siendo necesarias mayores investigaciones en las propiedades inmunológicas de los antígenos que den por resultado técnicas más adecuadas y sobre todo con fines prácticos de aplicación al diagnóstico de esta parasitosis.

Fueron todas estas causas más la idea desarrollada por Craig (1950), un poco antes de su muerte, relacionada con el mejoramiento de la técnica y los antígenos usados, las que nos sugirieron hacer el presente trabajo, máxime que en nuestro medio ha sido practicada la reacción de fijación de complemento con antígenos de *E. histolytica* en contadas ocasiones y con resultados dudosos, además ganaríamos experiencia personal, y comprobaríamos el grado de especificidad del antígeno comercial de la Casa Elly Lilly & Company, preservado con merthiolato al 1:1000.

## TECNICAS CONOCIDAS

De hecho se conocen varias técnicas para verificar la reacción de fijación de complemento, aunque las más recomendables por la casa Elly Lilly & Co., para utilizar el antígeno que elabora son las que a continuación ennumeramos:

- 1.—Técnica de Bengston modificada de fijación de complemento. (Bengston I. A. 1944).
- 2.—Prueba de fijación de complemento con cincuenta por ciento de hemólisis. (Bozicevich J, and W. M., Walston 1946).
- 3.—Técnica micro Kolmer de fijación de complemento modificada por Michael Kenney, del Microbiology Reference Laboratory 1952.

## MATERIAL Y METODOS

La prueba de fijación de complemento empleada en el presente trabajo se desarrolló con el suero de personas que clasificamos de la siguiente manera:

a).—Personas que padecían amibiasis tanto intestinal como extraintestinal.

b).—Personas que no albergaban *E. histolytica*, pero que presentaban otros protozoarios intestinales.

c).—Personas que albergaban *Shigella* o *Salmonella*.

d).—Personas libres de cualquier protozoario intestinal y de bacterias del grupo *Shigella* o *Salmonella*.

La clasificación de los grupos anteriores fué llevada a cabo por medio de las siguientes pruebas:

I.—Las muestras de materias fecales fueron investigadas por:

a).—Examen directo con solución salina.

b).—Examen directo con lugol.

c).—Método de concentración por flotación con sulfato de cinc.

d).—Coloración con hematoxilina férrica (en casos dudosos con objeto de comprobar o no si se trataba de *E. histolytica*).

e).—Coprocultivos. (Para poner de manifiesto las bacterias del grupo *Shigella* o *Salmonella*).

La prueba de fijación de complemento ejecutada con el suero de las personas incluidas en los grupos anteriores fué la micro Kolmer modificada por Michael Kenney (1952), técnica que fué faci-

litada junto con el antígeno comercial por la casa Ely Lilly & Co. Indianópolis, U.S.A., y que se efectúa de la manera siguiente:

Suspensión de glóbulos de carnero lavados al dos por ciento con solución salina Kolmer, que se prepara agregando a solución de cloruro de sodio al 0.85 por ciento 10 Miligramos por ciento de sulfato de magnesio.

El antígeno en este caso para el lote empleado se diluyó con solución salina Kolmer en la proporción de 1:8, con objeto de obtener 2 unidades en 0.10 c.c.

Para obtener el suero no se requiere técnica aséptica si el suero se conserva en el congelador y se descongela poco antes de hacer la prueba (Congelar y descongelar varias veces el suero puede volverlo anticomplementario en algunas ocasiones). Inactivase treinta minutos a cincuenta y seis grados centígrados.

Hemolisina de conejo anti glóbulos rojos de carnero que se titula de la manera siguiente:

Se prepara una dilución al 1:250, diluyendo 0.2 c.c. de suero glicerinado a 50 c.c. con solución Salina y prepárense los tubos como sigue:

Tubo No.	Hemolisina	Sol. salina	Glob. de carnero. al 2 %
1	0.05	0.55	0.2
2	0.1	0.5	0.2
3	0.15	0.45	0.2
4	0.2	0.4	0.2
5	0.25	0.35	0.2
6	0.3	0.3	0.2
7	0.35	0.25	0.2
8	0.4	0.2	0.2
9	0.45	0.15	0.2
10	0.5	0.1	0.2

Agítese y déjese en temperatura ambiente. Agréguese treinta a cada tubo, agítados durante una hora a cada tubo, a una pequeña de hemolisina al 250, y el cociente es la cantidad de hemolisina que provee una unidad. Dos unidades o sea el doble de esta cantidad, se usan en la prueba.

Complemento.—Océngase sangre por punción cardíaca de curyes, (no deben emplearse animales grávidos), es conveniente que el animal se deje en ayunas para evitar que el complemento sea quíloso, una vez obtenida la sangre que fluya libremente de la jeringa al frasco enjuagado con solución salina. Evítense romper los glóbulos, refrigérese durante cuatro a seis horas. Decántese y centrifúguese para sacar los glóbulos rojos. Decántese el suero en tubos de ensayo con tapón de caucho contentivos de exactamente un centímetro cúbico. Congélese y consérvense congelados por lo menos un día antes de hacer la titulación.

Titulación del Complemento.—Se diluye al 1:40. Los glóbulos de carnero al dos por ciento son sensibilizados con la hemolisina titulada mezclando las dos substancias en proporciones iguales, quince minutos antes de usarlas, y colocándolas en el refrigerador hasta el momento de hacer la prueba. El complemento, la solución salina Kolmer y el antígeno deben estar refrigerados.

Tubo No.	Complemento ML	Sol. de carnero. al 2 %
1	0.10	
2	0.09	
3	0.08	
4	0.07	0.2
5	0.06	0.2
6	0.05	0.2
7	0.04	0.2
8	0.03	0.2
9	0.02	0.2
10	0.00	0.2

Se prepara una dilución al 1:250, diluyendo 0.2 c.c. de suero glicerinado a 50 c.c. con solución Salina y prepárense los tubos como sigue:

Agítese y déjese en temperatura ambiente. Agréguese treinta a cada tubo, agítados durante una hora a cada tubo, a una pequeña de hemolisina al 250, y el cociente es la cantidad de hemolisina que provee una unidad. Dos unidades o sea el doble de esta cantidad, se usan en la prueba.

Complemento.—Océngase sangre por punción cardíaca de curyes, (no deben emplearse animales grávidos), es conveniente que el animal se deje en ayunas para evitar que el complemento sea quíloso, una vez obtenida la sangre que fluya libremente de la jeringa al frasco enjuagado con solución salina. Evítense romper los glóbulos, refrigérese durante cuatro a seis horas. Decántese y centrifúguese para sacar los glóbulos rojos. Decántese el suero en tubos de ensayo con tapón de caucho contentivos de exactamente un centímetro cúbico. Congélese y consérvense congelados por lo menos un día antes de hacer la titulación.

Tubo No.	Complemento ML	Sol. de carnero. al 2 %
1	0.10	
2	0.09	
3	0.08	
4	0.07	0.2
5	0.06	0.2
6	0.05	0.2
7	0.04	0.2
8	0.03	0.2
9	0.02	0.2
10	0.00	0.2

Agítese y déjese en reposo durante diez minutos a la temperatura ambiente. Agréguese 0.2 c.c. de complemento diluido uno a treinta a cada tubo, agítese e incúbese a treinta y siete grados centígrados durante una hora a baño maria. Divídase la cantidad más pequeña de hemolisina que produce hemólisis completa por la dilución 250, y el cociente es la cantidad de hemolisina que provee una unidad. Dos unidades o sea el doble de esta cantidad, se usan en la prueba.

Complemento.—Océngase sangre por punción cardíaca de curyes, (no deben emplearse animales grávidos), es conveniente que el animal se deje en ayunas para evitar que el complemento sea quíloso, una vez obtenida la sangre que fluya libremente de la jeringa al frasco enjuagado con solución salina. Evítense romper los glóbulos, refrigérese durante cuatro a seis horas. Decántese y centrifúguese para sacar los glóbulos rojos. Decántese el suero en tubos de ensayo con tapón de caucho contentivos de exactamente un centímetro cúbico. Congélese y consérvense congelados por lo menos un día antes de hacer la titulación.

Titulación del Complemento.—Se diluye al 1:40. Los glóbulos de carnero al dos por ciento son sensibilizados con la hemolisina titulada mezclando las dos substancias en proporciones iguales, quince minutos antes de usarlas, y colocándolas en el refrigerador hasta el momento de hacer la prueba. El complemento, la solución salina Kolmer y el antígeno deben estar refrigerados.

Tubo No.	Complemento ML	Solución Salina Kolmer ML	Antígeno ML*	Glóbulos de Carnero sensibilizados.**
1	0.10	0.05	0.10	0.10
2	0.09	0.06	0.10	0.10
3	0.08	0.07	0.10	0.10
4	0.07	0.08	0.10	0.10
5	0.06	0.09	0.10	0.10
6	0.05	0.10	0.10	0.10
7	0.04	0.11	0.10	0.10
8	0.03	0.12	0.10	0.10
9	0.02	0.13	0.10	0.10
10	0.00	0.15	0.10	0.10

\* Después de agregar el antígeno agítese y colóquese en baño maria a 37°C una hora.

\*\* Después de agregar los glóbulos agítese, y colóquese en baño maria a 37°C por treinta minutos. Léase.

Para la lectura búsqese el tubo con la menor cantidad de complemento que provee hemólisis completa.

Para hacer la prueba, dilúyase el complemento a fin de que 0.1 c.c. represente dos unidades exactas de acuerdo con la siguiente tabla:

Tubo No.	Complemento 1 unidad exacta	Complemento 2 unidades exactas	Proporción de dilución
1	0.10	0.20	1:20
2	0.09	0.18	1:22.2
3	0.08	0.16	1:25
4	0.07	0.14	1:28.6
5	0.06	0.12	1:33.3
6	0.05	0.10	1:40
7	0.04	0.08	1:50
8	0.03	0.06	1:66.6
9	0.02	0.04	1:100
10	Control	Control	Control

Nota.—La dilución D se calcula como sigue:  

$$D = \frac{40 \times 0.1}{2 U} \text{ Cuando } U = \text{unidad exacta de complemento.}$$
 V.G. Si el tubo No. 7 es una unidad exacta, entonces:  

$$D = \frac{40 \times 0.1}{2 U} = \frac{4}{0.08} \text{ Dilución al } 1:50.$$

**Técnica de la Prueba.**

Háganse diluciones dobles del suero como se indica a continuación:

Tubo No.	Solución Salina Kolmer MI.	Suero del paciente inactivado y sin diluir MI.	Dilución
1	0.02	0.02	1:2
2	0.02	0.02 del tubo 1	1:4
3	0.02	0.02 del tubo 2	1:8
4	0.02	0.02 del tubo 3	1:16

menor cantidad de

Los tubos se colocan en agua helada mientras se hace la prueba.

Los tubos se colocan en agua helada mientras se hace la prueba.

Tubo No.	Suero del paciente	Solución salina Kolmer MI.	Complemento titulado MI.	Antígeno ml.*	Glóbulos de Carneiro sensibilizados.**
1	0.05 sin diluir	0.10	0.10	—	0.10
2	0.05 sin diluir	—	0.10	0.10	0.10
3	0.05 del tubo de la dilución preliminar.	—	0.10	0.10	0.10
4	0.05 del tubo de la dilución preliminar.	—	0.10	0.10	0.10
5	0.05 del tubo de la dilución preliminar.	—	0.10	0.10	0.10
6	0.05 del tubo de la dilución preliminar.	—	0.10	0.10	0.10
7	—	0.05	0.10	0.10	0.10
8	—	0.15	0.10	—	0.10
9	—	0.15	—	0.10	0.10
10	—	0.25	—	0.10	0.10

Nota: D se calcula como sigue:  
 Cuando U = unidad exacta de complemento.  
 No. 7 es una unidad exacta.  

$$D = \frac{4}{0.08} \text{ Dilución al } 1:50.$$

Después de agregar...  
 Después de agregar...  
 indica a continuación:

Tubo No.	Suero del paciente	Dilución
Tubo No. 1 (Control del suero)	—	—
Tubo No. 7 (Control del antígeno)	—	—
Tubo No. 8 (Control del sistema hemolítico)	—	—
Tubo No. 9 (Control para probar la propiedad hemolítica del antígeno)	—	—
Tubo No. 10 (Control de los glóbulos)	—	—

Los tubos de control del 7 al 10 deben prepararse con cada serie de pruebas.

**Prueba Cuantitativa Final.**

Los tubos se colocan en agua helada mientras se hace la prueba.

Tubo No.	Suero del paciente ML	Solución salina Kolmer MI.	Complemento titulado MI.	Antígeno ml.*	Glóbulos de Carneiro sensibilizados.**
1	0.05 sin diluir	0.10	0.10	—	0.10
2	0.05 sin diluir	—	0.10	0.10	0.10
3	0.05 del tubo No. 1 de la dilución preliminar.	—	0.10	0.10	0.10
4	0.05 del tubo No. 2 de la dilución preliminar.	—	0.10	0.10	0.10
5	0.05 del tubo No. 3 de la dilución preliminar.	—	0.10	0.10	0.10
6	0.05 del tubo No. 4 de la dilución preliminar.	—	0.10	0.10	0.10
7	—	0.05	0.10	0.10	0.10
8	—	0.15	0.10	—	0.10
9	—	0.15	—	0.10	0.10
10	—	0.25	—	0.10	0.10

\* Después de agregar el antígeno, agítase y colóquese en el refrigerador de un día para otro.  
 grados centígrados por treinta minutos, haciendo la primera lectura a los quince minutos.  
 \*\* Después de agregar los glóbulos rojos agítase y colóquese en baño maría a treinta y siete

Tubo No. 1 (Control del suero) Hemólisis Completa.  
 Tubo No. 7 (Control del antígeno) Hemólisis Completa.  
 Tubo No. 8 (Control del sistema hemolítico) Hemólisis Completa.  
 Tubo No. 9 (Control para probar la propiedad hemolítica del antígeno) No hemólisis.  
 Tubo No. 10 (Control de los glóbulos) No hemólisis.

Los tubos de control del 7 al 10 deben prepararse con cada serie de pruebas.

Compárense las lecturas con la escala colorimétrica preparada empleando diferentes proporciones de dilución de glóbulos de carnero (una parte de glóbulos de carnero al dos por ciento más seis partes de solución salina Kolmer y glóbulos de carnero hemolisados (usando tubos transparentes de la titulación de la hemolisina), ordenados como sigue:

Tubo No.	Dilución de glóbulos de carnero Ml.	Glóbulos de carnero hemolisados Ml.	Lectura
1	0.4	—	++++
2	0.2	0.2	+++
3	0.1	0.3	++
4	0.04	0.36	+
5	—	0.4	Negativo.

De las cien reacciones y tres sueros dieron el cuadro siguiente:

Casos Control Suero

1 H  
2 H  
3 H  
4 H  
5 H  
6 H  
7 H  
8 H  
9 H  
10 H  
11 H  
12 H  
13 H  
14 H  
15 H  
16 H  
17 H  
18 H  
19 H  
20 H  
21 H

colorimétrica preparada dilución de glóbulos de carnero al dos por ciento más seis partes de carnero hemolisados (usando tubos transparentes de la titulación de la hemolisina), or-

Casos Control Suero

Lectura

1 ++++  
2 +++  
3 ++  
4 +  
5 Negativo.

### RESULTADOS OBTENIDOS:

De las cien reacciones que se efectuaron, un grupo de cincuenta y tres sueros dieron resultados positivos como se puede observar en el cuadro siguiente:

Casos	Control	Suero sin diluir	Dilución 1:2	Dilución 1:4	Dilución 1:8	Dilución 1:16
1	H	+	+	+	+	H
2	H	+	+	+	H	H
3	H	+	+	+	+	H
4	H	+	+	H	H	H
5	H	+	+	+	H	H
6	H	+	+	H	H	H
7	H	+	+	H	H	H
8	H	+	+	+	H	H
9	H	+	+	H	H	H
10	H	+	+	H	H	H
11	H	+	+	H	H	H
12	H	+	+	H	H	H
13	H	+	+	H	H	H
14	H	+	+	H	H	H
15	H	+	+	+	H	H
16	H	+	+	+	H	H
17	H	+	+	+	H	H
18	H	+	+	+	H	H
19	H	+	+	+	H	H
20	H	+	+	+	H	H
21	H	+	+	+	H	H



- 39.—Eh(q) Ec(q) Al(h)  
 40.—Eh(q) En(q)  
 41.—Eh(q) En(q)  
 42.—Eh(q) Ib(q) En(q)  
 43.—Eh(q) Chm(q)  
 44.—Eh(q) Ec(q) Ib(q)  
 45.—Eh(q) Ec(q)  
 46.—Eh(q) Ec(q) Gl(q)  
 47.—Eh(q)  
 48.—Eh(q)  
 49.—Absceso hepático amibiano comprobado.  
 50.—Absceso hepático amibiano comprobado.  
 51.—Absceso hepático amibiano comprobado por biopsia.  
 52.—Shigella flexneri.  
 53.—Shigella flexneri.

Eh—Entamoeba histolytica; Ec—Entamoeba coli; Ib= Iodameba büschli; En—Eudolimax nana; Al—Ascaris lumbricoides; Hn—Hymenolepis nana; Tt—Trichuris trichiura; Chm= Chilomastix mesnili; Gl= Giardia lamblia; t—trofozoitos; q—quistes; h= huevecillos.

Obtuvimos cuarenta y siete series de tubos que presentaron hemólisis total, o sean reacciones negativas. En estas series quedaron incluidos sueros de personas de las que sus exámenes demostraron:

- I Eh(q)  
 II Eh(q)  
 III Eh(q)  
 IV Negativo.  
 V Negativo.  
 VI Negativo.  
 VII Negativo.  
 VIII Negativo.  
 IX Negativo.  
 X Negativo.  
 XI Negativo.  
 XII Negativo.  
 XIII Negativo.  
 XIV Negativo.

- XV Negati  
 XVI Negati Al(h)  
 XVII Ec(q)  
 XVIII Ec(q)  
 XIX Ec(q)  
 XX Ec(q) Chm(q)  
 XXI Ec(q)  
 XXII Ec(q)  
 XXIII Ec(q)  
 XXIV Ec(q) Gl(q)  
 XXV Ec(q)  
 XXVI Ec(q)  
 XXVII Ec(q) Comprobado.  
 XXVIII Ec(q) Comprobado por biopsia.  
 XXIX Ec(q)  
 XXX Ec(q)  
 XXXI Ec(q) Entamoeba coli; Ib= Iodameba büschli; En—Eudolimax nana; Al—Ascaris lumbricoides; Hn—Hymenolepis nana; Tt—Trichuris trichiura; Chm= Chilomastix mesnili; Gl= Giardia lamblia; t—trofozoitos; q—quistes; h= huevecillos.  
 XXXII Ec(q)  
 XXXIII Ec(q)  
 XXXIV Absceso hepático no amibiano, comprobado.  
 XXXV Absceso hepático no amibiano, comprobado.  
 XXXVI Salmonella grupo E.  
 XXXVII Salmonella grupo E.  
 XXXVIII Shigella sonnei.  
 XXXIX Shigella flexneri.  
 XL Shigella flexneri.  
 XLI Shigella dispar.  
 XLII Shigella boidii.  
 XLIII Shigella flexneri.  
 XLIV Shigella flexneri.  
 XLV Shigella.  
 XLVI Shigella.  
 XLVII Shigella sonnei.

De las cien reacciones que efectuamos, un grupo de cincuenta y tres dieron resultados negativos. En el grupo de reacciones negativas quedaron incluidos tres sueros de personas que albergaban E. Histolytica, y

- XV Negativo.  
 XVI Negativo.  
 XVII Ec(q)  
 XVIII Ec(q) En(q)  
 XIX Ec(q) En(q) Ib(q)  
 XX Ec(q)  
 XXI Ec(q)  
 XXII Ec(q)  
 XXIII Ec(q)  
 XXIV Ec(q)  
 XXV Ec(q) En(q)  
 XXVI Ec(q) En(q)  
 XXVII Ec(q)  
 XXVIII Ec(q) Chm(q)  
 XXIX Ec(q)  
 XXX Ec(q)  
 XXXI Ec(q) En(q)  
 XXXII Ec(q)  
 XXXIII Ec(q)  
 XXXIV Absceso hepático no amibiano, comprobado.  
 XXXV Absceso hepático no amibiano, comprobado.  
 XXXVI Salmonella grupo E.  
 XXXVII Salmonella grupo E.  
 XXXVIII Shigella sonnei.  
 XXXIX Shigella flexneri.  
 XL Shigella flexneri.  
 XLI Shigella dispar.  
 XLII Shigella boidii.  
 XLIII Shigella flexneri.  
 XLIV Shigella flexneri.  
 XLV Shigella.  
 XLVI Shigella.  
 XLVII Shigella sonnei.

De las cien reacciones que efectuamos, un grupo de cincuenta y tres dieron resultados positivos y cuarenta y siete nos dieron resultados negativos. En el grupo de reacciones negativas quedaron incluidos tres sueros de personas que albergaban E. Histolytica, y

que dieron reacción negativa. Igualmente dentro del grupo de reacciones positivas están incluidos dos sueros de personas que tenían Shigella. De acuerdo con lo dicho anteriormente tenemos los siguientes porcentajes:

96.23 por ciento de reacciones positivas verdaderas.

3.77 por ciento de reacciones falsas positivas.

93.62 por ciento de reacciones negativas verdaderas.

6.38 por ciento de reacciones falsas negativas.

Total de reacciones verdaderas 94.91 por ciento.

Total de reacciones falsas 5.07 por ciento.

## CONCLUSIONES

Por los datos que obtuvimos vemos que el por ciento de acuciosidad de la reacción fué de 94.91, que comparado con el de otras pruebas de fijación de complemento en otros procedimientos (sífilis), que es de 90 por ciento vemos que es bastante exacta, y observamos que la sensibilidad del antígeno para poner de manifiesto anticuerpos específicos para *E. histolytica* en las personas parasitadas con este protozooario proporciona cierto grado de seguridad en el diagnóstico de esta parasitosis, que aún no se ha logrado sea total.

Con excepción de los sueros 13 y 14 parece ser que mientras mayor es la invasión tisular por *E. histolytica*, la reacción de fijación de complemento es más intensamente positiva, como se observa en los casos de pacientes con disenteria amibiana o absceso hepático amibiano, que corresponden a los sueros, 2, 47, 49, 50 y 51.

Los hechos experimentales efectuados aquí podrían interpretarse diciendo que la reacción de fijación de complemento es un medio de apreciable valor en el diagnóstico de la amibiasis, sobre todo en aquellos casos que no es posible demostrar el agente etiológico por examen del contenido intestinal, tal como en los abscesos hepáticos amibianos, siendo la fijación del complemento, una prueba de laboratorio digna de ser tomada en consideración para establecer un diagnóstico adecuado, ya que se tiene como un hecho que la búsqueda del parásito en el pus obtenido por punción del absceso, es negativa. Una biopsia a ciegas no siempre puede ser tomada del sitio requerido, por eso le resta eficacia al producto, y la toma de la biopsia previa laparatomía, es poco usada por el peligro que presenta para el paciente.

## B E S U M E N

Basados en el estudio que hicimos de cien reacciones de fijación de complemento en sueros de personas que clasificamos en tres grupos que a continuación describimos:

a).—Sueros de personas en las que se demostró la presencia de *E. histolytica*. En este grupo quedan incluidos los de personas con absceso hepático amibiano.

b).—Sueros de personas que presentaron *Shigella* o *Salmonella*.

c).—Sueros de personas negativas a *E. histolytica*.

La clasificación anterior se hizo basándose en exámenes coprológicos directos, con solución salina y lugol, concentrado por flotación con sulfato de cinc, por tinción con hematoxilina férrica y por medio de coprocultivos (para demostrar las bacterias del grupo *Shigella* o *Salmonella*).

Obtuvimos los resultados siguientes en los sueros probados:

Reacciones positivas cincuenta y tres.

Reacciones negativas cuarenta y siete.

94.91% nos dieron resultados veraces.

5.07% dieron resultados falsos.

## BIBLIOGRAFIA

- Bengston, I. A. (1944).—Complement Fixation in the Rickettsial Diseases. Technique of the Test. A. Publ. Health Rep. 59:402.
- Bozicevich, J. H. M., and Walston, V. M. (1946).—A Method of Conducting the 50 per Cent Hemolysis End Point Complement Fixation Test for Parasitic Diseases. Pub. Health Rep. 61:529.
- Bozicevich, J. (1950).—Discussion on Hussey, K. L., and Brown, H. W. Amer. J. Trop. Med. 30:154.
- Cleveland, L. R., and Collier, J. (1930).—Various Improvements in the Cultivation of *Entamoeba histolytica*. Amer. Jour. Hyg. 12:606.
- Craig, C. F. (1927).—Hemolytic, Cytolytic and Complement-binding Properties of Extracts of *Endamoeba histolytica*. Amer. Jour. Trop. Med. 7:255.
- Craig, C. F. (1934).—Amebiasis and Amebic Dysentery. Chales, C. Thomas.
- Craig, C. F. (1944).—The Etiology, Diagnosis and Treatment of Amebiasis. 8+382 p. Williams and Wildins Co. Baltimore.
- Craig, C. F. (1937).—Observations Upon the Practical Value of the Complement Fixation Test in the Diagnosis of Amebiasis. Amer. J. Pub. Health 27(7)689.
- Craig, C. F. (1950).—Amebiasis and the Complement-Fixation Test. U. S. Arm. Forces M. J. 1(11) 133-42. Trop. Dis. Bull. 48(3) 261-262.

- D'Antoni, Joseph S. (1937).—Standardization of the Iodine Staine for Wet Preparations of Intestinal Protozoa. *Amer. J. Trop. Med.* 17:79.
- Faust, E. C. et. al. (1938).—A Critical Study of Clinical Laboratory Technics for the Diagnosis for Protozoa Cysts and Helminth Eggs in Feces *Am. J. Trop. Med.* 18:169.
- Faust, E. C. (1952).—Modern Criteria for the Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Amer. Jour. of Trop. Med.* 1(1) 140.
- Fulton, J. D., Joyner, L. P., and Opwood Peice, I. N. (1951).—Studies on Protozoa Part. IV—A Complement Fixation Test for Amebiasis *Trop. Med. Hyg.* 54:27.
- Heathman, L. (1932).—Studies on the Antigenic Properties of Some Free Living and Patogenic Amebias, *Am. J. Hyg.* 16:97.
- Hussey, K. L., and Brown, H. W. (1950).—The Complement Fixation Test for Hepatic Amebiasis. *Amer. J. Trop. Med.* 30(9) 147.
- Izar, G. (1914).—Studien Uber Amobenteritis. *Arch. F. Schiffus-u. Tropen-Hyg.* 18:41 (Citado por N. P. Sherwood and L. Heathman *Am. J. Hyg.* 1932; 16:124).
- Kenney, M. (1952).—Micro Kolmer Complement Fixation Test for Amebiasis. *Am. J. Syph.* 4:278.
- Lösch, Von P. (1875).—Massenhafte Entwicklung Vorr Amöben im Dickdarm. *Archiv f. Pathol. Anat.*, Bd. 65:196.
- Mc. Dearman, S. C., and Dunham, W. B. (1952).—Complement Fixation Test as an Aid in the Differential Diagnosis of Extra-intestinal Amebiasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 1:182.
- Rees, C. W., Bozicevich, J., Reardon, L. V., and Jones, F. (1942).—Preliminary Note on Complement Fixation Test for Amebiasis with Antigens Prepared from *Endamoeba histolytica*. *Amer. J. Trop. Med.* 22:581.
- Scallan (1921).—Contributo allo Studio della Deviazione del Complemento nella Disenteria Amebica. *Riforma Med.* 37:103 (Citado por Craig, C. F., 1934. Amebiasis and Amebic Dysentery. Charles, C. Thomas).

- Sherwood, N. P., and Heathman, L. (1932).—Further Studies on the Antigenic Properties of Pathogenic and Free Living Amebas. II Complement Fixation in Amebic Dysentery. *Am. J. Hyg.* 16:124.
- Spector, B. K. (1932).—A comparative Study of Cultural and Immunological Methods of Diagnosing Infections with *Endamoeba histolytica*. *Am. J. Prev. Med.* 6:117. (Citado por Craig, C. F., 1944).
- Stone, W. S. (1935).—Bacteria Free Antigen for the Complement Fixation Test in Amebiasis. *Am. J. Trop. Med.* 15:685.
- Terry, L. L., and Bozicevich, J. (1948).—The Importance of the Complement Fixation Test in Amebic Hepatitis and Liver Abscess. *Southern Med. J.* 41:691.
- Tsuchiya, H. (1934).—Further Studies on the Cultivation of *Endamoeba histolytica* and Complement Fixation Test for Amebiasis. *J. Lab. E. Clin. Med.* 19:495.
- Weiss, W. and Arnold, L. (1934).—Complement Fixation Test for Amebiasis. *Am. J. Digest. Dis. E. Nutrition.* 19:495.
- Weiss, W. and Arnold, L. (1934a).—The Specificity of the Complement Fixation Test for Amebiasis. *Amer. J. Digest. E. Nutrition.* 1:548.



FACULTAD DE QUIMICA  
BIBLIOTECA

fecha de devolución

El lector se obliga a devolver este libro  
antes del vencimiento de préstamo, señalado  
por el último sello

1 JUN. 1956

TESIS  
1956  
AUTOR  
Mt-56  
TITULO

MAÑON ARROYO, M. de  
Reacción de fijación  
de complemento en el...

FECHA DE VENCIMIENTO	NOMBRE DEL LECTOR
9 JUN 1956	Francisco Pérez Arce



TESIS  
1956  
Mt-56  
MAÑON ARROYO