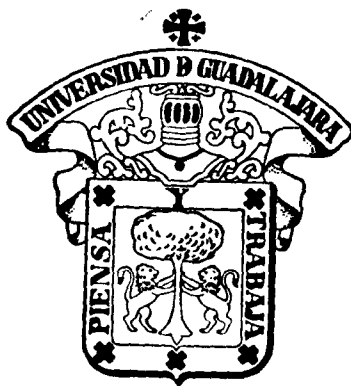


CAL-87-B

COD. 080456824

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



**" DIAGNOSTICO DE ABSCESO HEPATICO AMIBIANO POR
EL METODO INMUNOENZIMATICO (E.L.I.S.A.) "**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

MARIA DOLORES HUIZAR CONTRERAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDUARDO VAZQUEZ VALLS

GUADALAJARA, JAL.

MARZO 1990

"DIAGNOSTICO DE ABSCESO HEPATICO AMIBIANO POR EL METODO
INMUNOENZIMATICO (E.L.I.S.A.)"

14289/019003
E. I. S. A.
P. A. I. S.
G. I.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	3
- Ciclo de vida y características biológicas de la <u>E.histolytica</u>	5
- Inmunología de <u>La amibiiasis</u>	6
- Diagnóstico.....	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
HIPOTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	11
MATERIAL Y METODOS.....	11
- Obtención de antígeno de membrana de <u>E.histolytica</u>	11
- <u>Determinación</u> de proteínas por el método de Lowry.....	12
- Obtención de muestras.....	13
- Preparación de microplacas.....	18
- <u>Determinación</u> de anticuerpos anti- <u>E.histolytica</u> por el método inmunoenzimático (E.L.I.S.A.).....	18
- <u>Determinación</u> de anticuerpos anti- <u>E.histolytica</u> por el método de doble-inmuno-difusión.....	19
- <u>Determinación</u> de anticuerpos anti- <u>E.histolytica</u> por hemaglutinación indirecta.....	19
RESULTADOS.....	21
DISCUSION.....	28
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFIA.....	32

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

La amibiasis invasora en especial el absceso hepático amibia no es un problema de salud pública en México.^{1,2,3,4,5,6}

En la actualidad existe mucho interés por el estudio de la amibiasis, y muchas de las aportaciones en este campo se atribuyen a investigadores mexicanos.

El diagnóstico de la amibiasis invasora se hace en base a un conjunto de características como: signos y síntomas, identificación de trofozoitos móviles de E.histolytica mediante un examen microscópico el cual tiene complicaciones, que debe realizarse inmediatamente y requiere de personal capacitado con experiencia en la identificación de los trofozoitos; es un examen que tiene baja sensibilidad y especificidad.

Actualmente el diagnóstico de la parasitosis depende de técnicas serológicas.²⁴ Son muchas las técnicas serológicas que se han utilizado para detectar anticuerpos contra amiba tales como precipitación en gel,²⁴ hemaglutinación indirecta,^{38,39,40} inmunofluorescencia,²⁶ contrainmunolectroforesis,²⁷ el problema que tienen estos métodos es que la sensibilidad y/o especificidad es baja.

El objeto de este trabajo es estandarizar un método inmunoenzimático para detectar anticuerpos contra E.histolytica en amibiasis invasora ya que no se cuenta con un método sensible, específico y rápido para el diagnóstico de absceso hepá

tico amibiano.^{2,8} Por otra parte los equipos comerciales para detectar anticuerpos contra E.histolytica utilizan antígenos que provienen de cepas extranjeras.

A N T E C E D E N T E S .

La amibiasis es una enfermedad parasitaria ocasionada por el protozooario E.histolytica.^{1,2,3,4,5,6} Actualmente se le ha definido como la presencia del parásito con o sin manifestaciones clínicas.^{1,4} Entamoeba histolytica se clasifica en el phylum Protozoa, sub-phylum Sarcodina, super-clase Rhizopoda, clase Lobosea, orden Amoebida, familia Entamoebidae.^{1,5} Esta enfermedad está relacionada con insalubridad y bajos niveles socioeconómicos,^{1,2} así como factores ecológicos; la amibiasis está distribuida mundialmente, se estima que 480 millones de personas están infectadas con E.histolytica de las cuales 36 millones han desarrollado algún tipo de amibiasis invasora y 75 mil murieron.²

En México la frecuencia de amibiasis es de las más elevadas del mundo ocupando el cuarto lugar como causa de muerte. Los datos estadísticos que se conocen de la amibiasis obtenidos mediante encuestas serológicas nacionales son de 5.9% y en el caso de absceso hepático amibiano se reporta una frecuencia de 2.10% y una mortalidad de 2.6%.^{1,2,4,5,6}

La infección por E.histolytica se ha clasificado en: amibiasis intestinal y amibiasis invasora. La amibiasis intestinal se puede presentar con o sin manifestaciones clínicas; la amibiasis invasora primero invade a la mucosa intestinal provocando la disentería amibiana o amebona y cuando el trofozoito circula en la sangre origina lesiones extraintestina-

les provocando daños muy graves a órganos como el riñón, el pulmón y más frecuente al hígado ocasionando un absceso hepático amibiano siendo esta forma de amibiasis un problema de salud pública en México.^{1,4,7}

El absceso hepático amibiano es un foco de necrosis en el hígado que se presenta con dolor espontáneo acentuado y persistente en el área hepática, fiebre alta y hepatomegalia - leucocitosis discreta y neutrofilia.^{1,7}

Se sabe que existen diferencias entre las cepas de E.histolytica aisladas de pacientes con amibiasis intestinal asintomática y las cepas aisladas de pacientes con amibiasis invasora; estas diferencias se observan con patrones isoenzimáticos de los cuales se concluye que la banda alfa de la enzima GP1 puede ser el marcador de patogenicidad.⁸ El 50% de casos de absceso hepático amibiano se presenta en pacientes con una historia clínica invasora intestinal.⁵ Existen varios estudios que reportan que es más frecuente en el sexo masculino y entre 30 y 50 años de edad.

La capacidad que tiene E.histolytica de diseminarse extra-intestinalmente es específica de cada cepa y depende de varios factores como la virulencia de la cepa, rapidez del crecimiento del trofozoito y rapidez de destrucción celular del mismo. Se han identificado dos formas con las que el trofozoito produce daño celular: daño directo e indirecto. El daño directo es llamado también citolisis por contacto; ocurre cuando existe contacto del trofozoito con la célula-

blanco. En este mecanismo están implicados fosfolipasas, -- ácidos grasos libres, un factor anfipático potenciador de -- la actividad lítica de los ácidos grasos libres, la protefina formadora de poros. En el daño indirecto es un mecanismo multifactorial y sus componentes no están totalmente identificados, hasta ahora se sabe que es ocasionado por citolisinas de origen leucocitario.⁹

Ciclo de vida y características biológicas de E.histolytica:

El ciclo vital de la amiba consta de cuatro fases: trofozoito, prequiste, quiste y metaquiste. El trofozoito se reproduce por división binaria, después de dos divisiones nucleares sucesivas producen quistes cuadrinucleares protegidos por una membrana rígida que contiene quitina. De cada quiste sale una amiba metaquística cuadrinucleada que al dividirse origina ocho amibas uninucleares.^{4,5} El trofozoito de la amiba vive generalmente como comensal en la luz del intestino grueso en donde se multiplica y adopta la forma resistente llamada quiste y es este estadio la única forma infectante de la amiba, es causante de la transmisión de la enfermedad y se encuentra en alimentos y aguas contaminadas. Los quistes son redondos o ligeramente ovalados de 8 a 20 μm de diámetro y su pared de 125 a 150 nm de grosor, permanecen viables e infectantes varios días a 28 y 34°C⁴ más de un mes a 10°C⁵. Los trofozoitos son anaerobios facultativos, -- uninucleados, los que se observan en tejidos son mayores y

pueden medir hasta 60µm. Cuando contienen eritrocitos carecen de algunos organelos celulares que generalmente están presentes en las células como retículo endoplásmico, aparato de golgi, mitocondrias.

Los estudios con microscopía electrónica reportan que los trofozoitos tienen una cubierta exterior o glucocálix y al parecer en estos elementos se encuentran localizados la mayor proporción de componentes antigénicos.^{10,11}

Inmunología de la Amibiasis.

Los mecanismos de defensa inmunológica contra la infección con E.histolytica no han sido completamente caracterizados y es prácticamente desconocida la respuesta inmune antiambiiana en la mucosa intestinal.¹² Lo que actualmente se conoce es relativamente nuevo ya que hasta 1968 se cultivó - - axénicamente E.histolytica¹³ siendo de gran importancia para el campo de la inmunología y a partir de este avance se ha intentado purificar antígenos y caracterizarlos ya que son éstos la clave para los estudios de inmunología.^{11,14} -- E.histolytica posee múltiples determinantes antigénicos sobre su superficie y aun no han sido identificados totalmente.¹⁵

En 1978 Parkhouse y colaboradores, identificaron antígenos de membrana de E.histolytica a partir de trofozoitos de las cepas HK9, HM2 y HM15. De la cepa HK9 aisló cuatro glucoproteínas de 20,000, 30,000, 81,000 y 150,000 daltons, de la -

cepa HM2 una de 81,000 daltons dada esta semejanza de fracciones antigénicas entre estas cepas se presenta reacción cruzada;¹⁶ lo cual hace pensar en la existencia de antígeno común en el género *Entamoeba*.¹¹ Por otra parte Muñoz y colaboradores reportaron un antígeno de superficie de 67,000 daltons y caracterizó las principales glucoproteínas de la membrana de *E.histolytica* aisladas mediante concanavalina A inmovilizada en sepharosa de la cepa HM1: IMSS seis con los siguientes pesos moleculares 35,000, 43,000, 56,000, 60,000, 67,000 y 81,000 daltons.¹⁷

En 1982 Jiménez y col. aislaron de los trofozoitos de la cepa HM1: IMSS por radioyodación antígenos de superficie en dos picos, del pico 1 obtuvo una glucoproteína de 130,000 y otra de 125,000 daltons y del pico 2, aisló tres de los siguientes pesos moleculares 30,000, 40,000 y 90,000 daltons, al probarse frente a sueros de pacientes con absceso hepático amibiano, presentaron identidad completa entre los dos picos.¹⁸ En 1984, Rivera y col. aislaron seis antígenos de superficie de la cepa KH9: INH de 40,000, 45,000, 55,000, 70,000, 130,000 y 220,000 daltons con anticuerpos anti Hk9.¹⁹

En 1986 Calderón y colaboradores utilizando microscopía electrónica y electroforesis en geles de poliacrilamida aislaron tres antígenos de superficie con pesos moleculares -- arriba de 43,000 daltons.²⁰

En 1987, Torian y colaboradores identificaron con anticuer-

pos monoclonales un antígeno de superficie de 96,000 daltons.

En la amibiasis las reacciones inmunológicas se ajustan a los principios generales de la inmunología en donde participan tanto la inmunidad celular como la humoral.^{8,22} La inmunidad celular se demuestra por la positividad de pruebas como la intradermo reacción con antígeno antiamibiano, inhibición de la migración de macrófagos en pacientes con absceso hepático amibiano.¹⁴ En estudios posteriores se observa que las linfoquinas actúan interfiriendo el metabolismo celular y disminuyendo la síntesis de D N A lo cual inhibe el crecimiento del parásito.⁸

La respuesta inmune humoral en la amibiasis intestinal y extraintestinal reside predominantemente en la fracción IgG. En el caso de anticuerpos de la clase IgM, se ha reportado que en abscesos hepáticos amibianos se elevan los niveles de IgM un período de tiempo corto y después del tratamiento desaparece. Utilizando inmunofluorescencia indirecta se detectaron niveles bajos de IgM específica en 40% de pacientes con amibiasis intestinal y en el 83% de pacientes con absceso hepático amibiano y para IgG se encontró un 100% de casos.²³ De estos estudios se puede concluir que la presencia simultánea de IgM e IgG específicas denotan infección reciente y activa, mientras que la presencia de IgG y ausencia de IgM sugieren enfermedad pasada. Además en secreciones intestinales de pacientes con absceso hepático amibiano se han encontrado anticuerpos específicos de la clase IgA y

tal vez éstos sean los que impiden la adherencia de los trofozoitos a la superficie intestinal y los de la clase IgM -- activen el sistema de complemento.⁸

Los estudios in vitro demuestran la acción de los anticuerpos sobre los trofozoitos paralizándolos y alterando su morfología. En otros estudios han identificado anticuerpos específicos en suero de las clases IgA e IgE.⁸

Diagnóstico.

Actualmente el diagnóstico de las parasitosis depende sobre todo de técnicas serológicas.²⁴ en las cuales se detectan la presencia de anticuerpos específicos, En la amibiasis son varios los métodos o técnicas serológicas que se han utilizado siendo los más importantes métodos indirectos ya que es muy difícil demostrar la presencia de E.histolytica sobre todo en el caso de absceso hepático amibiano.^{22,25} Los métodos serológicos más utilizados son: precipitación en gel, hemaglutinación indirecta,²⁴ inmunofluorescencia²⁶ y contrainmunoelectroforesis.²⁷ La sensibilidad y especificidad de cada prueba es diferente.

En 1975 Sepúlveda reportó que la precipitación en gel tiene poca sensibilidad y la hemaglutinación indirecta es más sensible y específica y muy similar a la contrainmunoelectroforesis.⁸

Recientemente se ha abierto un campo de diagnóstico para --

amibiasis utilizando el método inmunoenzimático (E.L.I.S.A.) para detectar anticuerpos y antígenos. Este método fue propuesto por primera vez por Envall y Perlman en 1975, y consiste en combinar el uso de antígenos o anticuerpos inmóviles sobre una fase sólida con un antígeno o un anticuerpo conjugado a una enzima que da como resultado un análisis -- con alta sensibilidad y especificidad, además es fácil de realizar, rápida, requiere de pequeñas cantidades de muestra y reemplaza métodos radiactivos que son muy costosos y complicados, se realizan con reactantes estables con alto período de vida.^{28,29,30} En 1975 Bos H.J., utilizó el método E.L.I.S.A. para detectar anticuerpos contra E.histolytica - sus resultados muestran que es más sensible y específico - E.L.I.S.A. que inmunofluorescencia y precipitación en gel.³¹ En 1978 Root³² y Palacios,³⁰ utilizaron este mismo método para determinar antígeno amibiano en heces fecales, el método E.L.I.S.A. resultó ser más sensible y específico que el examen microscópico. En 1985 Kumar,³³ montó un E.L.I.S.A. para detectar anticuerpos contra antígenos solubles de cultivos axénicos de E.histolytica sus resultados muestran mayor sensibilidad por el método E.L.I.S.A. que por hemaglutinación indirecta. En el mismo año Beth L. usando anticuerpos monoclonales en el método E.L.I.S.A. para detectar E.histolytica en heces fecales reportó 82% de sensibilidad y 98% de especificidad. Dada la dificultad de demostrar la presencia de E.histolytica sobre todo en caso de absceso hepático se requiere más investigación en este campo y perfeccionamiento

to de métodos de diagnóstico para amibiasis.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La amibiasis es un problema de salud pública en México ocupa el cuarto lugar como causa de muerte. Actualmente en nuestro medio no se cuenta con un método de laboratorio sensible y específico para el diagnóstico de absceso hepático amibiano.

HIPOTESIS.

El método inmunoenzimático (E.L.I.S.A.) para detectar anticuerpos contra E.histolytica es sensible y específico por lo cual es un instrumento confiable para el diagnóstico de absceso hepático amibiano.

OBJETIVOS.

- 1.- Implementar el método E.L.I.S.A. para detectar anticuerpos contra E.histolytica en suero de pacientes con absceso hepático amibiano.
- 2.- Comparar los resultados obtenidos entre el método E.L.I.S.A., doble inmunodifusión y hemaglutinación indirecta.

MATERIAL Y METODOS.

Obtención de antígeno de E.histolytica.

Se cosecharon trofozoitos de E.histolytica de la cepa HM1;- IMSS después de 72 hrs. de crecimiento en medio de cultivo-

TyI-s33³³ complementado con suero bovino, vitaminas y antibióticos. Se lavaron los trofozoitos 3 veces con una solución amortiguadora de fosfato de potasio 19mM, pH 7.2 adicionada de NaCl 0.27 M en frío, centrifugado a 1,300 rpm durante 10 minutos. El paquete celular se resuspendió en una solución tris HCl pH 7.5 adicionada con MgCl₂ 10mM.. Se añaden 50 l de fenil metil sulfonil fluoruro (SIGMA) 30mM, metil maleimida 100 mM (SIGMA) y etilendiaminotetra-acético 50mM por cada 5 ml, éstos como inhibidores de proteasas. Posteriormente las células se homogenizan manualmente y se centrifuga durante 30 minutos a 10,000 rpm a 4⁰C. Se separó el sobrenadante, y el precipitado que constituye el antígeno de membrana, se resuspendió en tris HCL. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas por el método Lowry.³⁴

Determinación de proteínas por el método de Lowry.

Solución a:

- a) Sulfato de cobre pentahidratado al 1% 0.1 ml.
- b) Tratado doble de sodio y potasio al 2% 0.1 ml.
- c) Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1N 10 ml.
 - Solución estandar de: albúmina bovina con 100 µg por ml.
 - Reactivo de folin 1 N.

Material.

- Tubos de ensayo Pyrex de 10 ml.

- Pipetas graduadas 1 y 5 ml.
- Gradillas espectrofotómetro.

Método.

- 1.- Se coloca en tubos de ensayo 0.1 ml. de las diluciones de la muestra (1:10, 1:100, 1:1000).
- 2.- Se completan a 1 ml. con agua destilada.
- 3.- Se incluyen diluciones del standar de albumina de 100,- 50, 25 y 12.5 mg. por ml. y un blanco con agua destilada.
- 4.- Se añaden 3 ml. de la dilución A.
- 5.- Se agitan dejándose posteriormente en reposo 10 minutos a temperatura ambiente.
- 6.- Se añaden a cada tubo 0.3 ml. de reactivos de Folin.
- 7.- Se agitan y dejan 30 minutos en reposo a temperatura ambiente.
- 8.- Se lee en el espectrofotómetro a 750 nm.
- 9.- Se grafica concentración contra densidad óptica.

Obtención de Muestras.

Las muestras se dividen en 2 grupos:

Grupo I Control Positivo.- 21 sueros de pacientes con absceso hepático amibiano clínicamente comprobado, obtenidos de pacientes del Hospital Civil de Guadalajara.

Grupo II Control Negativo.- Se dividió en 2 subgrupos: 1er. subgrupo 16 sueros de individuos aparentemente sanos, obte-

nidos de estudiantes de la Facultad de Ciencias y la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guadalajara.-
2o. subgrupo 16 sueros de individuos con amibiasis intestinal comprobada con el examen microscópico, obtenidos del Hospital Civil de Guadalajara y del Laboratorio de Biología Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Los requisitos que reunieron las muestras de los tres grupos fue llenar un cuestionario diseñado en base a los factores que consideramos más importantes para cada grupo:

BIBLIOTECA CENTRAL

AMIBIASIS EXTRAINTestinal

FECHA _____

MUESTRA _____

NOMBRE _____ SALA _____

EDAD _____ SEXO _____ CAMA _____ EXPEDIENTE _____

DIAGNOSTICO _____

ANTECEDENTES

AMIBIASIS INTESTINAL PREVIA: SI _____ NO _____
 RECIENTE _____ PASADA _____

MANIFESTACIONES

1.- HEPATOMEGALIA _____	5.- ANOREXIA _____
2.- HIPERtermIA _____	6.- PERDIDA DE PESO _____
3.- DIAFORESIS _____	7.- ASTENIA _____
4.- ICTERICIA _____	8.- ADENEMIA _____

TRATAMIENTO: _____

PRUEBAS DE GABINETE

GAMAGRAFIA _____

SONOGRAFIA _____

PRUEBAS DE LABORATORIO

1.- BIOMETRIA
 LEUCOCITOS _____ Hg _____ ERITROCITOS _____

2.- PERFIL HEPATICO
 BILIRRUBINAS DIRECTAS _____ TRANSAMINASAS TGO _____
 " INDIRECTAS _____ " TGP _____
 FOSFATASA ALCALINA _____

3.- EXAMEN GENERAL DE ORINA
 PIGMENTOS BILIARES _____ LEUCOCITOS _____

4.- COPROPARASITOSCOPICO _____

PRUEBAS SEROLOGICAS

1.- DOBLEINMUNODIFUSION _____

2.- HEMAGLUTINACION INDIRECTA _____

3.- E.L.I.S.A. _____

AMIBIASIS INTESTINAL

FECHA _____
 MUESTRA _____
 NOMBRE _____ SALA _____
 EDAD _____ SEXO _____ CAMA _____ EXPEDIENTE _____
 DIAGNOSTICO _____

MANIFESTACIONES

1.- ANOREXIA	_____	6.- RETORTIJON	_____
2.- TENESMO	_____	7.- EVACUACION CON MOCO	
3.- PERDIDA DE PESO	_____	Y SANGRE	_____
4.- PUJO	_____	8.- ASTENIA	_____
5.- EXTREÑIMIENTO	_____	9.- ADINAMIA	_____

TRATAMIENTO:

PRUEBAS DE LABORATORIO

1.- BIOMETRIA
 LEUCOCITOS _____ Hb _____ ERITROCITOS _____

2.- COPROPARASITOSCOPICO _____

3.- EXAMEN DIRECTO DE HECES _____

PRUEBAS SEROLOGICAS

1.- DOBLEINMUNODIFUSION _____

2.- HEMAGLUTINACION INDIRECTA _____

3.- E.L.I.S.A. _____

C O N T R O L E S S A N O S

FECHA _____

MUESTRA _____

NOMBRE _____

EDAD _____ SEXO _____ PROCEDENCIA _____

A N T E C E D E N T E S :

1.- TRATAMIENTO CON ANTIAMIBIANOS:

NO _____ SI _____ RECIENTE _____

PASADO _____

2.- HABITOS ALIMENTICIOS:

BUENOS _____ MALOS _____ REGULARES _____

3.- HABITOS HIGIENICOS. SE LAVAN LAS MANOS:

ANTES DE LOS ALIMENTOS _____

DESPUES DE IR AL BAÑO _____

P R U E B A S D E L A B O R A T O R I O :

EXAMEN MICROSCOPICO _____

P R U E B A S S E R O L O G I C A S :

1.- DOBLEINMUNODIFUSION _____

2.- HEMAGLUTINACION INDIRECTA _____

3.- E.L.I.S.A. _____

Preparación de Microplacas.

El antígeno de membrana de E.histolytica se fijó en placas con tiras desmontables de polipropileno para microelisa - - (DIFCO) por el método de Voller a.;³⁵ como se menciona a continuación: se diluyó en una solución de carbonatos pH 9.6; - se colocaron 10.35µg de antígeno de membrana por pozo en -- las columnas pares, y en las columnas nones se colocó albúmina bovina (Ortho Diagnostic Systems) al 2% como blancos; - se dejaron las placas a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, se lavaron las placas con PBS-Tween-20 al 0.05% pH 7.4, 3 veces, posteriormente se añadió a los pozos con antígeno (columnas pares) 100µl de albúmina bovina al 1% para bloquear sitios activos inespecíficos, se dejó nuevamente toda la noche a temperatura ambiente, se continuó al día siguiente con los lavados, se dejó secar paraposteriormente almacenarse en refrigeración a 4°C.

Determinación de Anticuerpos anti E.histolytica por el mé todo inmunoenzimático (E.L.I.S.A.).

Se utilizaron las tiras en las que previamente se fijó antígeno de membrana de E.histolytica. Primero se colocaron- 50µl de suero diluído 1:100 en el pozo con antígeno y en - el pozo con albúmina (blanco). Las placas se incubaron a - 37°C durante 1 hora, después se lavaron 3 veces con PBS - Tween 20. El siguiente paso fué colocar 50 µl de un conjugado anti IgG humana acoplada a fosfatasa alcalina dil. -

1:800 (Sigma). Se incubó nuevamente 1 hora a 37°C y se lavaron con PBS- Tween 20 finalmente se colocaron 50µl de sustrato (para nitrofenilfosfato Sigma) diluido en una solución amortiguadora de carbonatos-bicarbonatos y se incubaron a 37°C por 30 minutos, se para la reacción con 50µl de NaOH 2 M por pozo. Se lee a 405 nm en un espectofotómetro para placas de microelisa.

Determinación de anticuerpos anti E.histolytica por el método de doble-inmunodifusión (Ouchterlony).

Preparación de placas con Agar.- Se colocaron 3 ml de Agar bacteriológico (Bioxon) diluido en amortiguador salino de fosfato pH 7.4 en cada portaobjetos, se dejan enfriar y una vez gelificado se guarda a 4°C en cámara húmeda durante 12 horas, para luego hacer un orificio central y cuatro periféricos separados entre sí por 5 mm.

Procesamiento de muestras.- En el orificio central se colocó 20µl de antígeno de membrana con una concentración de 1100µg por ml. y en los orificios periféricos se colocaron los sueros a investigar. SE incubaron en cámara húmeda a 4°C de 24 a 48 hrs.; posteriormente se observaron las bandas de precipitación.

Determinación de anticuerpos anti E.histolytica por hemaglutinación indirecta.

Para la prueba de hemaglutinación indirecta se utilizaron reactivos Cellognost-amibiasis (Behring). Se utilizaron pla

cas de microtitulación en forma de "U". En los pozos de la columna 1 se colocan 100 μ l de la muestra diluída 1:8 en - - amortiguador tris pH 8.0 incluyendo un control positivo y - un control negativo. En los pozos restantes se colocaron -- 50 μ l de tris, mediante traspaso de la columna 1 por medio de - microdilutores precalibrados de 25 μ l. se obtuvieron series geométricas de diluciones. Posteriormente se agregaron 25 μ l de eritrocitos sensibilizados con antígeno de E.histolytica de la cepa HK9 a cada pozo. Se deja la placa en reposo a -- temperatura ambiente dos horas.

La interpretación de una prueba positiva consiste, en la -- observación de eritrocitos dispersos en el fondo del pozo, - una prueba negativa, cuando se observó un botón de eritroc*í*tos en el centro del pozo; títulos positivos 1:8 y 1:16 se consideraron como una amibiasis intestinal y títulos igual- o mayores a 1:32 indican una amibiasis invasora actual o recientemente curada.

R E S U L T A D O S

Para formar el grupo control positivo se seleccionaron pacientes con absceso hepático amibiano clínicamente comprobados, con estas características se incluyeron 21 sueros de los cuales el 86% son hombres y el resto mujeres, la edad promedio fue 38 años. El grupo control negativo se dividió en dos subgrupos: el primer subgrupo se constituyó por 16 sueros obtenidos de personas con amibiasis intestinal comprobada con un examen parasitoscópico, cuya edad promedio fué de 32 años, el 70% fueron hombres y el resto mujeres. En el segundo subgrupo, estaba integrado por 16 sueros obtenidos de estudiantes de la Facultad de Ciencias aparentemente sanos con una edad promedio de 25 años en el cual el 87.5% eran mujeres (Cuadro 1).

De los 21 sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano comprobado clínicamente 15 presentaban bandas de precipitación por doble-inmunodifusión lo que representa el 72%. En el grupo control negativo tanto de enfermos con amibiasis intestinal como en el de estudiantes aparentemente sanos la doble-inmunodifusión no presentó ninguna banda de precipitación (Cuadro 2). La sensibilidad de esta prueba fué 88.23% y la especificidad 100% (Cuadro 6).

Por la técnica de hemaglutinación en 16 sueros del control positivo se detectó anticuerpos contra E.histolytica a diferentes títulos (Cuadro 3). Del control negativo con amibia-

sis intestinal 9 de 16 dieron la prueba positiva y del grupo control de estudiantes aparentemente sanos solo 1 de 16 fué positivo, teniendo una especificidad de 69% y sensibilidad de 94% (Cuadro 6).

El nivel de corte del método inmunoenzimático (E.L.I.S.A.)- se obtuvo tomando dos desviaciones estandar, con el promedio de las lecturas de nuestros controles se consideraron - positivas aquellas muestras con lecturas 0.100 y negativas - menores a este valor. Todas las lecturas se obtuvieron restando a la densidad óptica de cada problema la densidad - - óptica de su blanco (Gráfica 1).

Por E.L.I.S.A. 21/21 pacientes con absceso hepático amibiano fueron positivos, solo 2/16 enfermos con amibiasis intestinal y 0/16 estudiantes aparentemente sanos fueron positivos (Cuadro 4), obteniendo así una sensibilidad de 100% y - una especificidad de 93.25% (Cuadro 6). Aplicando la T Student se encontró una diferencia significativa entre el grupo control positivo y el grupo control negativo ($p \leq 0.05$).

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

C U A D R O 1

EDAD Y SEXO DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS

	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	
GRUPOS	PACIENTES CON ABSCESO HEPATICO AMIBIANO n = 21	PERSONAS CON AMIBIASIS INTESTINAL n = 16	PERSONAS APARENTEMENTE SANAS n = 16
EDAD	41 AÑOS	32 AÑOS	25 AÑOS
SEXO	86% HOMBRES	70% HOMBRES	30% HOMBRES

C U A D R O 2

DOBLE - INMUNODIFUSION PARA DETECTAR ANTICUERPOS
ANTI IgG CONTRA E. HISTOLYTICA

	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	
RESULTADOS	PACIENTES CON ABSCESO HEPATICO AMIBIANO n = 21	PACIENTES CON AMIBIASIS IN- TESTINAL n = 16	ESTUDIANTES APARENTEMEN- TE SANOS n = 16
POSITIVOS	15/21 (72%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)
NEGATIVOS	6/21 (29%)	16/16 (100%)	16/16 (100%)

C U A D R O 3

TITULOS OBTENIDOS POR HEMAGLUTINACION PARA DETECTAR
ANTICUERPOS IgG CONTRA E. HISTOLYTICA

TITULOS	1:16	1:32	1:64	1:256	1:512	1:1024	1:1048
PACIENTES CON ABSCESO HEPATICO AMIBIANO n = 17	1	2	2	2	5	4	1
ENFERMOS CON AMIBIASIS IN- TESTINAL n = 16	3	9					
ESTUDIANTES APARENTEMEN- TE SANOS n = 16		1					

C U A D R O 4

HEMAGLUTINACION PARA DETECTAR ANTICUERPOS
ANTI IgG CONTRA E. HISTOLYTICA

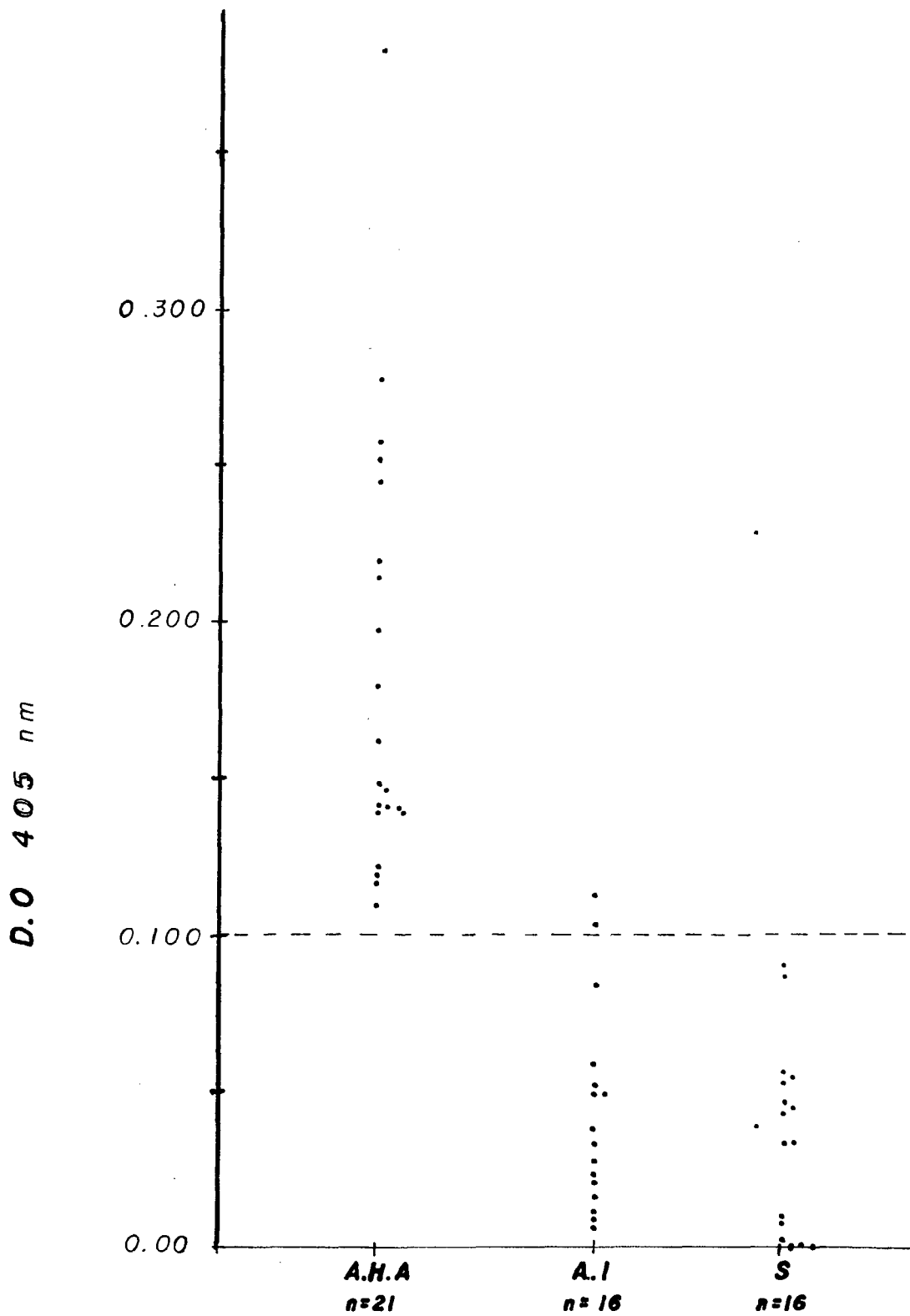
	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	
RESULTADOS	PACIENTES CON ABSCESO HEPATICO AMIBIANO n = 17	PACIENTES CON AMIBIASIS IN- TESTINAL n = 16	ESTUDIANTES APARENTEMENTE SANOS n = 16
POSITIVOS	16/17 (94%)	9/16 (56%)	1/16 (6.25%)
NEGATIVOS	1/17 (6%)	7/16 (44%)	15/16 (93.75%)

C U A D R O 5

E.L.I.S.A. PARA DETECTAR ANTICUERPOS
ANTI IgG CONTRA E. HISTOLYTICA

	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	
RESULTADOS	PACIENTES CON ABSCESO HEPATICO AMIBIANO n = 21	PACIENTES CON AMIBIASIS IN- TESTINAL n = 16	ESTUDIANTES - APARENTEMENTE SANOS n = 16
POSITIVOS	21/21 (100%)	2/16 (12.5%)	0/16 (0%)
NEGATIVOS	0/21 (0%)	14/16 (87.5%)	16/16 (100%)

27
Lecturas por el metodo de E.L.I.S.A para determinar anticuerpos contra *E. histolytica* en los grupos estudiados.
Linea punteada representa el valor del corte.



A.H.A Absceso Hepatico Amibiano
A.I Amibiasis Intestinal
S Sanos

D I S C U S I O N

Según la literatura existen varios métodos inmunológicos para detectar anticuerpos contra E.histolytica,^{3,24,26,27,31,33,37} todos con diferente sensibilidad y especificidad. En este trabajo se encontró que la doble-inmunodifusión tiene especificidad de 100% y una sensibilidad de 72% con lo cual se confirma lo reportado en otros trabajos.²⁴ Esta técnica no tiene la capacidad para detectar bajos niveles de anticuerpos circulantes por tal razón tiene baja sensibilidad, otras desventajas de la doble-inmunodifusión son: se requieren concentraciones altas de antígeno, los resultados tardan de 24 a 72 horas y son subjetivos.

La técnica de hemaglutinación tiene la ventaja de detectar anticuerpos contra E.histolytica en enfermos con amibiasis intestinal y pacientes con amibiasis extraintestinal de acuerdo a los títulos que presentan^{38,39,40,41} nosotros obtuvimos 100% de sensibilidad en pacientes con absceso hepático-amibiano con títulos 1:32 lo cual se correlaciona con lo especificado con la casa comercial que vende el equipo, en el cual se requiere para amibiasis intestinal títulos 1:32 En los enfermos con amibiasis intestinal tres presentaron título 1:16 (están en el rango de amibiasis intestinal) y 6 con título 1:32 los cuales ya pertenecen a una amibiasis invasora. En el grupo de estudiantes aparentemente sanos se detectó un resultado positivo con títulos 1:32 el estudiante no presentó manifestaciones clínicas ni antecedentes de ami

biasis intestinal teniendo en resumen buena sensibilidad - pero baja especificidad.

Los resultados encontrados en este trabajo con la técnica - de E.L.I.S.A. para detectar anticuerpos anti IgG nos indican claramente que es exclusiva para ayudar en el diagnóstico de - absceso hepático amibiano, ya que en el grupo de enfermos - de amibiasis intestinal y en el grupo de estudiantes aparentemente sanos la mayoría de las reacciones fueron negativas en diluciones del suero 1:100. Un resultado positivo por la técnica de E.L.I.S.A. aunque tenga alta sensibilidad y especificidad no puede afirmar que exista el padecimiento, solo si se adiciona con manifestaciones clínicas debido; ya que los anticuerpos tipo IgG persisten por meses e incluso años a una infección.

Se ha reportado que no existe correlación en los niveles de IgM sérica y enfermedad reciente,⁴² en este trabajo tampoco encontramos correlación de anticuerpos IgG e IgM en absceso hepático amibiano.

Las ventajas de la técnica E.L.I.S.A. son varias como ya se mencionó, alta sensibilidad y especificidad, se realiza fácilmente y en 3 horas se obtienen resultados; requiere poco - antígeno, detecta niveles bajos de anticuerpos y los reactivos son muy estables a 4⁰C.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Se logró una alta especificidad y sensibilidad en el método de E.L.I.S.A. elaborado.
- 2.- Su utilidad se limita exclusivamente al diagnóstico de AHA.
- 3.- No permite descartar si se trata de una infección actual o reciente de una infección pasada.
- 4.- La interpretación del resultado de la prueba de E.L.I.S.A. siempre deberá correlacionarse con los hallazgos clínicos, para darle un valor diagnóstico.
- 5.- Pruebas con anticuerpos IgM no permitieron hacer diagnósstico diferencial de infección temprana.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente

Número457/88.

SRITA. MARIA DOLORES HUIZAR CONTRERAS
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de Tesis "DIAGNOSTICO DE ABSCESO HEPATICO-
AMIBIANO POR EL METODO INMUNOENZIMATICO (E.L.I.T.S.A.) para ob-
tener la Licenciatura en Biología.

al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---
aceptado como Director de dicha Tesis el Dr. Eduardo Vázquez
Valls.

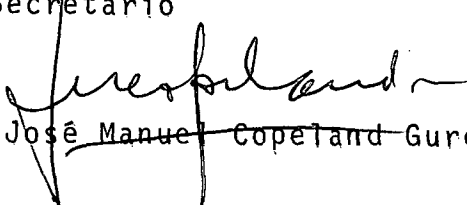
A T E N T A M E N T E
"AÑO ENRIQUE DIAZ DE LEON"
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Abril 18 de 1988
El Director



FACULTAD DE CIENCIAS

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario


Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

c.c.p. El Dr. Eduardo Vázquez Valls, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

Al contestar este oficio sírvase citar fecha y número

Guadalajara, Jal., Febrero 28 de 1990.

C.ING.ADOLFO ESPINOSA DE LOS MONTEROS
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

P R E S E N T E .

Por este conducto hago constar que la Pasante de la Carrera de: Licenciado en Biología, MARIA DOLORES - HUIZAR CONTRERAS, ha concluido la tesis titulada: "DIAGNOSTICO DE ABSCESO HEPATICO AMIBIANO POR EL METODO INMUNOENZIMATICO (E.L.I.S.A.)"; y después de haber revisado el manuscrito de la misma, considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad para que se imprima.

Sin otro particular quedo de Usted.

A T E N T A M E N T E


DR. EDUARDO VAZQUEZ VALLS

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

- 1.- Shirman Gaytan E.: Amebiasis. *Infectología*, Año 7, Núm.1, - 1987; 15-35.
- 2.- Walsh Julia A.: Amebiasis in the world. *Arch. Invest. Méd. - Méx.* 17 (Supl.1), 1986; 385-89.
- 3.- Ungar Beth L.P; Yolker Robert H.; Quinn Thomas C.: Use of a monoclonal antibody in an enzyme immunoassay for the detection of *Entamoeba histolytica* in fecal specimens. *Am. J. -- Trop. Med. Hyg.*, 34(3), 1985:465-72.
- 4.- Martínez Palomo A; Martínez Báez M.: Amibiasis. *Salud Pública, Méx.* 6(25), 1983; 563-73.
- 5.- Guerrant Richard L.: The global problem of amebiasis: - - current status research needs, and opportunities for progress. *Reviews of Infectious Diseases.* 2 (8). 1986; 218-27.
- 6.- Walsh Julia A.: Problems in recognition and diagnosis of - amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Reviews of Infectious Diseases.* 2(8): 1986; 228-38.
- 7.- Quintero Pérez N.; Campa Uribe G.; Pérez Ruvalcaba J.; Hernández Bugarin O.; Rodríguez Noriega E.: Absceso hepático - amebiano: clasificación de acuerdo a evolución y agresividad *Infectología*, Año 4, No.5, 1984; 127-31.
- 8.- Treviño García N.; O'Shea Alvarez.: Amibiasis: progresos recientes. *Méx. Gastroenterol. Méx.* 1987. 52:113-117.
- 9.- Said Fernández Salvador; Vargas Villarreal Javier; Castro - Garza Jorge.: Mecanismo multifactorial de la actividad citolítica de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. Méx. -- (Supl.)*, 1986; 173.
- 10.- Feria Velasco A.; Tapia Arizmendi; González del Pliego: Estudio de la superficie de trofozoito de *E.histolytica* con citoquímica de alta resolución y microscopía electrónica de barrido. *Arch. Invest. Méd. Méx.* 1980; 461-75.
- 11.- Ambroise P.; Thomas.: Inmunoparasitología: origen, estado actual y perspectivas. *Biol. of Sanit., Panam.* 101(3), 1986; 247-53.
- 12.- Campos Rodríguez R.; Andrade Patricia.; Acosta Gustavo; Berranco T. Claudia; Isabasi A.; Kumate R.J.: Inducción de -- una respuesta inmune humoral local contra antígenos de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. Méx.*, 17(Supl), 1986; 277.

- 13.- Diamond Louis S.: Techniques of axenic cultivation of *E.histolytica shaudinn*. 1903 and *E.histolytica*-like amebae. The Journal of Parasitology. Vol.54; 1968; 1047-56.
- 14.- Sepúlveda B.: Inmunología de la amibiasis. En: B. Sepúlveda, L.S. Diamond, (eds.): Proceeding of the International Conference on amibiasis. Instituto Mexicano del Seguro Social, -- México, D.F. 1976; 668-681.
- 15.- Ximenez G.; Mendoza F.; Michalak C.: Caracterización inmunológica de un anticuerpo monoclonal específico para *E.histolytica*. Salud Pública, Méx., 27, 1985; 235-40.
- 16.- Parkhouse Michael; Cid Ma. E.; Calderón J.: Identificación de antígenos de membrana de *Entamoeba histolytica* con anticuerpos de pacientes de amibiasis. Arch. Invest. Med. Méx. 9(Supl.1), 1978; 211-18.
- 17.- Muñoz M.; Acosta V.; Calderón: Redistribución de antígenos superficiales de entamoeba y su caracterización inmunoquímica. Arch. Invest. Méd. Méx. 9(Supl.1), 1978; 185-95.
- 18.- Ximénez C.; Olvera S.; Kumate; Ortíz B.; Purificación parcial de algunos antígenos de superficie de *E.histolytica*. Investigación de la actividad biológica frente a sueros de pacientes con absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Med. Méx. 13(Supl.3), 1982; 282-89.
- 19.- Rivera P.; Carabez A.; Cortes A.; Isibasi A.; Kumate J.: Caracterización inmunoquímica de antígenos propios y del medio de cultivo en la membrana plasmática de *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Med. Méx. 4(15), 1984; 405-15.
- 20.- Calderón J.; Avila E.: Antibody-induced caps in *Entamoeba histolytica*: Isolation and electrophoretic analysis. The Journal of Infectious Disease 5(153), 1986; 927-32.
- 21.- Torian B.E.; Lukehart S.A.; Stamm W.E.: Use monoclonal antibodies to identify, characterize, and purify a 96,000 dalton surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. The Journal Infectious Diseases, 2(156), 1987; 334-43.
- 22.- Bruckner D.A.: Serologic and intradermal test for parasitic infections. Pediatric. Clin. North. Am. 1985; 63-75.
- 23.- Muñoz O.; Hernández V.R.; Cruz M.E.; Martínez Ma.del C.: ¿ Es posible distinguir entre infección hepática antigua y reciente mediante el análisis inmunoenzimático? Arch. Invest. Med. Méx. 17 (Supl.) 1986: 327-30.
- 24.- Sepúlveda B.: Reacciones de hemaglutinación y de precipitación con antígeno amibiano axénico en amibiasis invasora. Arch. Invest. Med. Méx. 1, 1970; 111-116.

- 25.- Healy George R.: Immunologic tools in the diagnosis of amibi-
biasis : epidemiology in the United States. REviews of Infec-
tious Diseases. 2(8), 1986;239-46.
- 26.- Gove Rufus W.; Sadus Elvie H.: Soluble antigen fluorescen an-
tibody test for amibiiasis. Pub. in Experimental Parasitology,
3(22) 1968; 316-320.
- 27.- Sepulveda B.; Aubanel M.; Landa L.; Velázquez G.: Avances en
la técnica de contra-inmunolectroforesis para el estudio se-
rológico de la amibiiasis. Arch. Invest. Med. Méx. 3(Supl.2),
1972; 364-70.
- 28.- Hernández L.; Santos A.: Aspectos relevantes del inmunoanáli-
sis enzimático (E.L.I.S.A.). Infectología, Año 4, No.2, 1985;
52-56.
- 29.- Santos A.; Hernández L.; Quezada Pascual; Estrada P.: Estan-
darización del inmunoanálisis enzimática. Infectología, Año 6,
No.1, 1986; 18-23.
- 30.- Palacios B.; De la Hoz R.; Sosa H.: Determinación del antige-
no amibiano en heces por el método ELISA. Arch. Invest. Méd.
Méx., 9(Supl.1), 1978; 339-48.
- 31.- Bos H.J.; Yan Den Eijk A.A.: Enzyme-linked immunosorbent -
assay (ELISA) in the serodiagnosis of amebiasis. En.: B. Se-
púlveda; L.S. Diamond, (eds).: Proceeding of the Internatio-
nal Conference on amebiasis. Instituto Mexicano del Seguro -
Social, Méx., D.F., 1976; 721-727.
- 32.- Root M.; Cole F.; Williamson J.: The development and standari-
zation of an ELISA method for the detection of Entamoeba his-
tolytica antigens in fecal samples. Arch. Invest. Med. Méx.,
9(Supl.1) 1978;203-210.
- 33.- Kumar S.; Band A.; Samataray J.C.; Dany N.; Talwar G.: A dot
enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies
against Entamoeba histolytica. J. Immunol. Methods, 83(1) -
1985;25-33.
- 34.- Lowry O.H.; Rosebrough N.J.; Farr : Protein measurement with
the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951; 195-265.
- 35.- Voller A.; Bidwel D.E.; Bartlett A.: The Enzyme linked immu-
nosorbent assay (ELISA). Dynatech Laboratories Inc. 1979.
- 36.- Galen Robert A. New math in the Lab. Combination Testint.
- 37.- Noriega Román J.; Mendoza Arturo; Gil F.: Utilidad de la de-
terminación de anticuerpos antiamebianos por contrainmuno-
lectroforesis, con un equipo comercial, en el diagnóstico -
de la amibiiasis invasora. Vol. 47; No.4; 1982; 223-228.

- 38.- García, R.J.; Alvarez, Ch.R.:Contrainmunolectroforesis y hemaglutinación indirecta en amibiasis. REv. Méx. - - Patol.Clin. 1986. 33:11-16.
- 39.- Keesel, J.f.; Lewis, W.P.; Malina-Pasquel, C.; y Turner J.: Indirect hemmaglutination and complement fixation - test in amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1965. 14:540.
- 40.- Healy, G.R.: Use of and limitations to the indirect - - hemmaglutination test in the diagnosis of intestinal -- amibiasis. J.L.S. 1968. 5:174.
- 41.- Juniper, K. Jr.: Clinical use of the indirect hemmaglu-tination test for amebiasis. University of Arkansas Me-dical Center. U.S. Army Medical Research and Development Command. 1969.
- 42.- Jackson, T.F.H.G.; Gathiram, V. y Simjee.A.E.: Seroepi-demiological study of antibody responses to the zymode-mes of Entamoeba histolytica. Lancet. 1985; 1:16.