

10 300627
24



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA

INCORPORADA A LA

U. N. A. M.

«Obtención de anti-inmunoglobulina G y anti-inmunoglobulina M,
para la elaboración de un conjugado que se propone como
posible reactivo de diagnóstico para amibiasis en las
técnicas de inmunofluorescencia y ELISA».

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N

MARIA EUGENIA FERNANDEZ ZERMEÑO

MARIA DEL CARMEN PATRICIA MARTINEZ
PALACIOS

MEXICO, D. F.

1987



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 está 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.

INDICE

Resumen.	1
Introducción.	2
- Planteamiento del problema	
- Hipótesis de trabajo	
Información general sobre el tema	4
Parte experimental.	15
- Programa de trabajo	
- Metodología empleada	
- Resultados	
Discusión	41
Conclusiones	47
Bibliografía	48

RESUMEN

En este trabajo se comprobó la utilidad de los anticuerpos anti-IgG y anti-IgM en la elaboración de reactivos de diagnóstico para la determinación de anticuerpos anti-E. histolytica utilizando las técnicas de inmunofluorescencia y ELISA.

Primeramente se empleó un modelo animal, así se obtuvo IgM e IgG anti- E. histolytica a partir de sueros inmunes de conejo. Con las inmunoglobulinas purificadas se elaboraron los sueros anti-gammaglobulina respectivas, con los cuales se prepararon los conjugados, tanto para la técnica de inmunofluorescencia, como de ELISA. Una vez evaluados, se procedió al análisis seroepidemiológico con sueros de individuos clínicamente sanos, utilizando el método de ELISA que resultó ser el de mayor sensibilidad además de ser más práctico; en esta parte se utilizó gammaglobulina humana polivalente liofilizada para obtener las anti-gammaglobulinas con las que se hicieron los conjugados.

INTRODUCCION.

Planteamiento del Problema.

Amibiasis es el término utilizado para definir la infección causada por Entamoeba histolytica con o sin síntomas clínicos (1).

Esta parasitosis tiene distribución universal, afectando en promedio al 10% de la población mundial. Estudios realizados en 1981, proponen de manifiesto que 480 millones de personas estaban infectadas con E. histolytica (2).

En varias regiones del mundo representa un gran problema social y de salud, principalmente en los países subdesarrollados, donde las condiciones sanitarias inadecuadas, junto con la pobreza, la ignorancia, la sobrepoblación y la presencia de cepas altamente virulentas se combinan para sostener una alta incidencia de esta enfermedad -- (3,4).

En México, la amibiasis es un problema de salud pública, resultando ser uno de los países con mayor incidencia de esta parasitosis, tanto en su forma sintomática como asintomática. En un muestreo de diversas regiones del país, Gutiérrez y col.(5), encontraron anticuerpos humorales contra este parásito en el 6% de 19,422 individuos analizados, lo que indica que en algún momento de su vida padecieron amibiasis invasora; de aquí la importancia del estudio de E. histolytica en nuestro país.

Hipótesis de trabajo

La anti-IgG y la anti-IgM, son de utilidad en la elaboración de

reactivos de diagnóstico para amibiasis, ya que pueden ser conjugadas favorablemente para las técnicas de inmunofluorescencia y ELISA, permitiendo así la identificación de los anticuerpos contra --
E. histolytica.

Planteamiento del problema.

La multiplicación de este parásito sigue un proceso de reproducción binaria; después de varias divisiones, la motilidad de la amiba decrece, el organismo muestra menos pseudópodos y viene siendo más redondo y pequeño con menos material en su citoplasma. Este estado es conocido como prequiste, el cual es inmediatamente seguido por la secreción de una membrana delgada y dos fisiones o más del núcleo para formar un quiste nuevamente. La transmisión al hombre y otros huéspedes, ocurre cuando la amiba se encuentra en esta forma y los principales vectores de contaminación son con frecuencia vegetales y otros alimentos que han sido lavados con aguas contaminadas o manejados por personas con malos hábitos higiénicos. En cuanto el quiste llega al estómago, su cápsula se rompe y el citoplasma se divide tantas veces como núcleos existan o más. Este estado es conocido como metaquiste. Cuando esta pequeña amiba alcanza la luz del intestino, incrementa su tamaño y se convierte en trofozoito, de esta manera se complementa el ciclo de vida de E.histolytica. (6)

El ser humano es el huésped natural de E.histolytica. Una gran proporción de los infectados son portadores sanos y sólo una minoría enferma como consecuencia de la invasión tisular amibiana. Las razones para el diferente comportamiento de trofozoitos comensales y patógenos de E.histolytica se desconocen, ya que las diferencias bioquímicas y estructurales entre los microorganismos patógenos y no patógenos no han sido demostradas (7). Sin embargo, ciertos factores inherentes al huésped y al parásito podrían estar implicados en el comportamiento invasivo de esta amiba. Con respecto al parásito, se

han hecho estudios en diferentes cepas de E. histolytica en donde se han observado diferencias entre las de baja y alta virulencia, encontrándose que las más virulentas presentan ciertas propiedades -- de superficie tales como: susceptibilidad de aglutinarse con conca-- navalina A, ausencia de carga eléctrica negativa en la superficie y mayor grado de fagocitosis (8,9).

Con respecto al huésped, se han sugerido algunos factores que pueden estar implicados, como son: genéticos, que determinan el gra-- do de susceptibilidad de los individuos a padecer amibiasis; nutri-- cionales, una alimentación deficiente con dietas bajas en protef-- nas y altas en grasas y carbohidratos; otros factores podrían ser -- los hormonales y el alcoholismo o la frecuente exposición a la in-- fección en condiciones insalubres (10).

Características generales de la respuesta inmune.

La respuesta inmunológica aparece tan solo en vertebrados. Es ta constituye el principal medio de defensa, tanto frente a los mi-- croorganismos y a los virus patógenos como frente a las propias cé-- lulas del huésped que presentan una degeneración maligna. La res-- puesta inmune se produce a través de moléculas de anticuerpo que di-- funden libremente (inmunidad humoral) y a través de linfocitos es-- pecíficamente reactivos (inmundidad celular).

En la inmunidad humoral se producen anticuerpos que son gamma-- globulinas llamadas inmunoglobulinas, de pesos moleculares entre -- aproximadamente 150,000 y 900,000 (11,12).

Características fisicoquímicas y de actividad biológica de la IgM -
e IgG (13)

	<u>IgM</u>	<u>IgG</u>
Peso molecular	900 KD	150 KD
Coefficiente de Sedimentación	19 S..	7 S
Paso por placenta	-	+++
Presencia en leche	±	+
En secreciones	±	+
Valencia	10	2
Estabilidad a 56°C, 1 hr.	+	+
Vida media (días)	3 -10	25-35
Producción mg/Kg/día	5- 8	28-36
Carbohidratos (%)	10	2.5
Fijación a macrófagos	-	+++

Inducción para la formación de anticuerpos

La formación de anticuerpos se produce después de la primera inyec
ción de inmunógeno. Para detectarlos, es necesario esperar cierto ---
tiempo, este período latente o de inducción puede durar de algunas ho-
ras a varios días, según el tipo y la cantidad de antígeno que se uti-
lice, la vía de administración, la especie receptora, el estado de sa-
lud del animal y la sensibilidad de la prueba utilizada para medir el
anticuerpo; debe encontrarse anticuerpo entre el quinto y décimo día.

El período de latencia no indica el tiempo necesario para que se-
inicie la producción de anticuerpos a nivel celular. Si se sacan c^{élu}
las productoras de anticuerpos del animal inmunizado, se pueden obser-

var síntesis de anticuerpos desde 20 minutos después de la exposición al antígeno. Como sólo producen anticuerpos en este momento -- unas cuantas células son necesarios a veces varios días antes de que se pueda medir el anticuerpo en sangre. Otra consideración importante es el hecho de que las primeras moléculas de anticuerpo que pasan a la sangre pueden encontrar todavía antígeno en la circulación. Si las moléculas de antígeno y anticuerpo se combinan, será difícil medir el anticuerpo por las pruebas serológicas habituales. La excepción de estos complejos antígeno-anticuerpo es muy rápida, de manera que la primera manifestación de anticuerpos libres sólo se produce -- algunos días después del paso a la sangre de las primeras moléculas de anticuerpos. Por lo tanto, la inyección de una gran cantidad de antígeno tiende a prolongar el período de latencia.

Al final del período de latencia, es posible observar la respuesta primaria de anticuerpos en el animal. El título de anticuerpos aumenta progresivamente en el curso de algunos días o semanas, -- se estabiliza y luego empieza a disminuir. La forma general de la respuesta primaria es una curva sigmoidea típica. La forma exacta -- de la respuesta depende de muchos factores.

Si más tarde se vuelve a exponer el mismo animal al antígeno, la respuesta de anticuerpos es de tipo secundaria y difiere profundamente de la respuesta primaria. Esta respuesta secundaria se presenta -- inicialmente como una disminución brusca del anticuerpo circulante, -- que forma complejos con el antígeno recién inyectado. Pero de inmediato, en menos de dos a tres días en condiciones ordinarias, se ob-

serva un notable aumento del contenido de anticuerpo en sangre. Este aumento continúa varios días y, finalmente, el título resulta considerablemente mayor que el de la respuesta de tipo primaria.

La respuesta secundaria se llama muchas veces respuesta de memoria, anamnésica o de reforzamiento. Todo ocurre como si el organismo previamente inmunizado estuviera prevenido contra este antígeno, y listo para responder en forma acelerada a su presencia. Las mismas variables que regulan la respuesta primaria afectan también - hasta cierto grado la respuesta de reforzamiento o secundaria, pero éste tiene un período latente menor, un título final mayor y dura -- más el lapso durante el cual es posible identificar el anticuerpo, - en comparación con la respuesta primaria.

Otros hechos interesantes acerca de la respuesta secundaria son:

- 1.- No es el resultado de una liberación brusca de anticuerpos formados previamente y almacenados, sino que se debe a síntesis masiva de anticuerpos nuevos.
- 2.- La respuesta secundaria se puede obtener en casi cualquier momento después de la respuesta primaria. Incluso varios años más tarde, cuando el título primario casi no se detecta, se logra todavía respuesta secundaria. Quizá no sea tan intensa como en caso de reforzamiento más próximo a la respuesta inicial en el tiempo, y no se observa la fase negativa inmediata; pero se desarrolla una respuesta - secundaria auténtica.
- 3.- La respuesta secundaria se puede repetir varias veces, hasta alcanzar el límite fisiológico del animal de prueba para el antígeno -

utilizado. Esto puede requerir de tres a cinco inyecciones de re---
fuerzo con este antígeno.

4.- Los antígenos que producen reacción cruzada dan lugar a la mis-
ma respuesta. En este caso, el grado de respuesta secundaria está -
relacionado con el parecido entre los dos antígenos: Cuanto más se -
asemejen, mayor será la respuesta.

5.- Puede ocurrir respuesta anamnésica inespecífica. El origen de -
los anticuerpos se encuentra en el tejido linfoide. Cualquier tra-
tamiento del animal inmunizado que produzca lisis o hiperplasia de -
las células productoras de anticuerpos, dará lugar a una respuesta -
secundaria mínima.

6.- La disminución del título de anticuerpos parece más lenta des-
pués de la respuesta secundaria que después de la primaria. Esto se
debe probablemente a dos factores; en primer lugar, intervienen más-
células en la producción de anticuerpos. Si algunas de estas célu-
las son de vida relativamente larga y siguen sintetizando anticuer-
pos, la producción de éste abarcará un período mayor después de la -
respuesta secundaria que después de la primaria. En segundo lugar, -
los anticuerpos en la respuesta anamnésica son cualitativamente dis-
tintos de los que se obtienen en la respuesta primaria. Residen en
IgG, cuya vida media es de 25 a 35 días. Los anticuerpos de la res-
puesta primaria residen fundamentalmente en IgM, cuya vida media só-
lo es de 3 a 10 días. La proporción de IgG e IgM, en las respuestas
primaria y secundaria, se presenta en la Fig. 1. La respuesta secun-
daria de IgM sólo es la décima parte de la IgG; por esta razón, los-
sueros hiperinmunes contienen principalmente IgG. La IgG se ha lla-

LOG DEL TITULO DE ANTICUERPOS

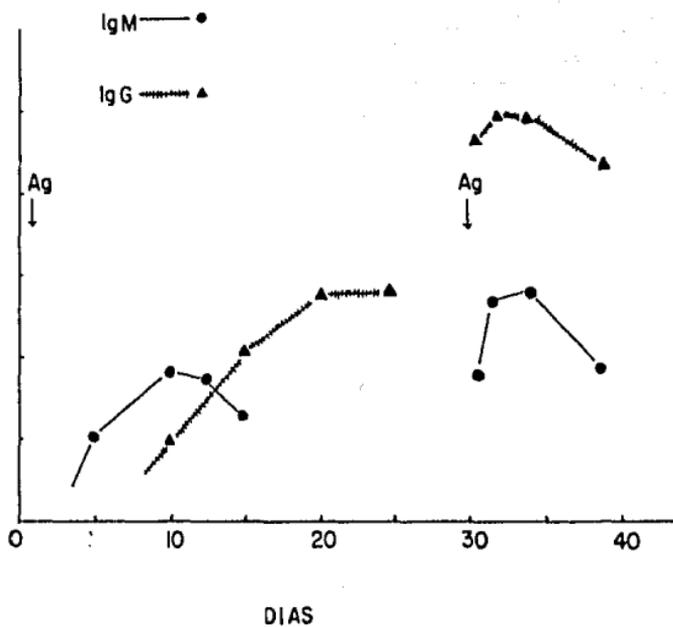


Fig. 1 Respuestas inmunitarias primaria y secundaria de IgG e IgM. La respuesta de IgG es tardía después de la primera inyección, pero representa la principal inmunoglobulina al cabo de algunos días, y sobre todo en el caso de la respuesta secundaria. La respuesta primaria de IgM precede la respuesta de IgG, pero en el refuerzo, la respuesta de IgM es débil.

mado "componente de memoria", lo que significa que no hay anámnesis de IgM. Esto sólo es cierto en parte, pues de hecho, los niveles secundarios de IgM son algo mayores que los niveles primarios. (14)

Respuesta Inmune a E. histolytica.

Respuesta Inmune Celular.

Los estudios sobre la inmunidad mediada por células en pacientes con absceso hepático amibiano (15,16) mostraron una baja frecuencia de estados de hipersensibilidad con reacción de tipo retardado con antígeno amibiano utilizando pruebas intradérmicas, la producción del factor-inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) también se vió disminuída con respecto a los individuos utilizados como control, indicando que la respuesta mediada por células está restringida en etapas iniciales del padecimiento, revelando un estado de anergia transitoria provocada por la aplicación de antígeno amibiano. Estos resultados sugieren que en etapas iniciales de la amibiasis, la respuesta inmunológica es al parecer de naturaleza humoral y que la inmunidad celular se presenta en la etapa de recuperación de la enfermedad. (17)

Respuesta inmune humoral.

Los trozofitos de E. histolytica inducen una marcada respuesta inmune humoral en los pacientes con amibiasis invasiva (18). Se desconoce cual es el papel de los anticuerpos en el rechazo de la infección, ya que aparentemente a pesar de elevados títulos de anticuerpos, la infección persiste con manifestaciones clínicas. En estudios in vitro, se ha observado que los anticuerpos no son efectivos para inducir lisis significativa de los trofozoitos en presencia de complemento diluído -- (19), y que esta resistencia de los trofozoitos, se debe probablemente-

a las propiedades dinámicas de la membrana plasmática (20,21). Según estas observaciones, se manifiesta una aparente ineficiencia de la respuesta inmune humoral en la infección amibiana, lo que hace necesario el planteamiento de estudios tanto para comprobar la relevancia de los anticuerpos en la amibiasis invasora como para establecer que antígenos de la amiba son reconocidos por éstos; además es importante la medida de anticuerpos y, en consecuencia, la utilización de métodos serológicos sensibles que pudieran aplicarse al inmunodiagnóstico de la amibiasis.

Pruebas serológicas de diagnóstico.

Aunque la identificación morfológica de los parásitos o sus huevos en las heces, sangre o tejidos constituye el método de mayor difusión en el diagnóstico de enfermedades parasitarias, existen situaciones en que es preciso un diagnóstico serológico. A medida que se perfeccionen nuevos reactivos comerciales, dichas pruebas serológicas pueden llegar a adquirir una mayor difusión (22).

En uno u otro tiempo, se han utilizado virtualmente todos los métodos serológicos clásicos para enfermedades parasitarias, sin embargo, muy pocos de estos métodos han ganado gran aceptación debido a su complejidad o a que no tienen la adecuada sensibilidad o especificidad.

Los métodos que utilizan gel como la doble difusión, difusión radial y contraelectroforesis (CIEF), tienen como desventajas que requieren grandes cantidades de antígeno y los resultados generalmente se conocen después de varias horas o días. Sin embargo, tanto la difusión doble como la CIEF han sido utilizadas exitosamente para el diagnóstico en la detección de anticuerpos de E. histolytica (23).

Otro método ampliamente utilizado en el diagnóstico de amibiasis, ha sido la aglutinación pasiva (24).

Sin duda, la principal preocupación de los últimos años ha sido - perfeccionar las pruebas de los reactivos marcados. El marcaje permite la identificación y cuantificación del anticuerpo o antígeno marcado con alta sensibilidad. Para la detección de anticuerpo, el método indirecto o del "emparedado" es muy común, en él, el suero de prueba se hace reaccionar con un antígeno inmovilizado seguido por la adición de las antiglobulinas marcadas.

La inmunofluorescencia fué el primero de estos métodos que se -- introdujo para parasitología y fué utilizada exitosamente en casi todas las enfermedades parasitarias (25). Aún ahora se considera como una de las pruebas de elección para dichas enfermedades.

Esta técnica es un método excelente pero tiene varios inconvenientes, ya que necesita de una interpretación por expertos, es laboriosa, se requiere de equipo especializado no disponible en cualquier laboratorio y los sueros inmunes marcados son inestables.

El radioinmunoanálisis es un método muy reciente de reactivos -- marcados que se utiliza en serología parasitaria (26). A pesar de esto, ha sido restringido debido a que es una técnica muy sofisticada y los reactivos marcados con isótopos son lábiles y riesgosos (27).

Actualmente, el mayor interés está enfocado al análisis inmunoenzimático, en el cual uno de los reactivos está marcado con una enzima (28). Este análisis es adecuado para antígenos solubles que se inmovilizan sobre superficies de plástico, tales como tubos o microplacas. Los anticuerpos de la muestra se hacen reaccionar con el an-

tígeno inmovilizado y después con la anti-globulina marcada con la - enzima, por último, se agrega el sustrato de la enzima. El resultado de la prueba es una solución colorida que puede ser valorada visual o fotométricamente. Este análisis tiene alta sensibilidad, es objetivo y no es laborioso. Esto explica el actual entusiasmo por la técnica de ELISA, que ha demostrado ser excelente para cuantificar anticuerpos en enfermedades parasitarias.

PARTE EXPERIMENTAL

Programa de Trabajo.

- 1.- Establecimiento del esquema de inmunización para la obtención de anticuerpos anti-E.histolytica en conejos.
- 2.- Purificación de la IgG anti-E.histolytica a partir de los sueros inmunes de conejo.
- 3.- Purificación de la IgM anti-E.histolytica a partir de los sueros inmunes de conejo.
- 4.- Purificación de IgG a partir de gammaglobulina humana polivalente liofilizada.
- 5.- Purificación de IgM a partir de gammaglobulina humana polivalente liofilizada.
- 6.- Obtención de anti-IgG y anti-IgM en cobayos.
- 7.- Obtención de anti-IgG y anti-IgM humana en conejos.
- 8.- Elaboración y evaluación de un conjugado para la técnica de inmunofluorescencia.
- 9.- Elaboración y evaluación de los conjugados para la técnica de -- ELISA.
- 10.- Análisis seroepidemiológico de muestras previamente probadas -- por la técnica de contrainmunolectroforesis, de individuos clínicamente sanos.

Metodología empleada.

- Establecimiento del esquema de inmunización.

Se inmunizaron subcutáneamente 10 conejos con el antígeno amibiano obtenido a partir de E.histolytica HMI-IMSS, utilizado adyuvante completo de Freund (ACF). Las inmunizaciones, con una concentración de 1mg de protefna/ml se repitieron cada 7 días, cada conejo recibió 10 dosis. Al 60. día, después de cada inmunización se determinó el título de anticuerpos por hemaglutinación indirecta (HAI). De esta manera se estableció el esquema de inmunización a seguir para la obtención de IgG anti-E.histolytica.

Para la obtención de anti-gammaglobulina, se utilizó el mismo esquema de inmunización.

El objeto de inmunizar los conejos fué el de aumentar la concentración de anticuerpos en el suero. El inmunógeno utilizado fué E.histolytica ya que es el antígeno en estudio de este trabajo.

- Obtención y purificación de IgG de conejo anti-E.histolytica.

Una vez determinado el título óptimo de anticuerpos, se sangraron los conejos en blanco por punción cardíaca. El suero se separó por centrifugación utilizando una centrífuga Sorvall a 3000 rpm durante 10 minutos. De este suero se obtuvieron las gammaglobulinas utilizando el método de precipitación con sulfato de amonio (29). Posteriormente se separaron las gammaglobulinas mediante cromatografía de intercambio iónico para lo cual se empacó una columna de cromatografía en posición vertical con DEAE Sephadex A-50 en solución -

amortiguadora de fosfato 0.01M, pH=7.2; la solución amortiguadora se mantuvo hasta el tope hasta que la mitad del DEAE quedó empacado, -- una vez que esto ocurrió, se eliminó el exceso de solución amortiguadora.

Se corrieron las gammaglobulinas (previamente dializadas contra solución amortiguadora de fosfatos 0.01M, pH=7.2 durante 4 días) dentro de la columna, evitando la sequedad de ésta. Bajo estas condiciones, todas las gammaglobulinas se retienen en la matriz de la columna, a excepción de la IgG, la cual se recolecta en el eluyente de la columna. Se descartaron los primeros mililitros y se colectaron los siguientes. Esta fracción se equilibró con PBS pH-7.2 por dialisis

A la IgG recolectada se le realizaron las siguientes pruebas de control: Determinación de proteínas por el método de Lowry (30), -- hemaglutinación (31), inmunolectroforesis (32) contra suero anti-gammaglobulina de conejo y contra inmunolectroforesis (33) contra -- antígeno amibiano para verificar la pureza y especificidad de dicha IgG.

- Obtención y purificación de la IgM de conejo anti-E.histolýtica.

Para inducir la producción de IgM, se inmunizaron 10 conejos -- con antígeno amibiano, utilizando como adyuvante ACF; la vía de inmunización fué la subcutánea. Los conejos se sangraron en blanco al 5o. día después de la inmunización por punción cardíaca. El suero -- se separó por centrifugación utilizando una centrífuga Sorvall a --- 3000 rpm durante 10 minutos. Cada 100 ml de suero se añadieron por goteo con agitación a 2 litros de solución de ácido bórico; esta ---

mezcla de suero-ácido bórico se dejó a temperatura ambiente durante media hora y a 4°C durante toda la noche para máxima precipitación. La proteína precipitada se recuperó por centrifugación en una centrifugadora Sorvall con cabezal tipo SA 600; el sobrenadante se decantó y se descartó. Los tubos con el precipitado se invirtieron sobre un papel --- toalla para permitir el drenaje del flujo residual. A cada tubo se le agregó 1 ml de TNB y se solubilizó el precipitado con una espátula. Los otros tubos se lavaron con un total de 2 ml; el lavado para la proteína solubilizada se agregó hasta obtener un volumen total de euglobulina de aproximadamente 10 ml. La proteína solubilizada se dializó --- contra algunos cambios de TNB. El material no soluble se removió por centrifugación en una centrifugadora Sorvall, después se determinó concentración de proteína (34).

Una vez obtenidas las gammaglobulinas, se fraccionaron mediante --- cromatografía de filtración en gel utilizando Sephadex G-200 para la --- purificación de IgM, que sale en el volumen vacío de la elución (35).

A la IgM recolectada se le realizaron las siguientes pruebas de --- control: Determinación de proteínas por el método de Lowry, hemaglutinación, inmunoelectroforesis contra suero anti-gammaglobulina de conejo y contrainmunoelectroforesis contra antígeno amibiano para corroborar la pureza y especificidad de dicha IgM.

- Obtención de IgG a partir de gammaglobulina humana.

La IgG se obtuvo a partir de gammaglobulina humana polivalente --- liofilizada que nos fué proporcionada por el Instituto Nacional de --- Higiene.

Se empleó un separador de fracciones con una columna de Sepharosa-

proteína A, se corrieron las gammaglobulinas previamente dializadas - contra PBS pH=7.2, posteriormente las IgG que quedaron retenidas en la columna se eluyeron con HCl-glicerina pH de 2.9.

A las IgG recolectadas, se les practicaron las siguientes pruebas de control: Determinación de proteínas por el método de Lowry, - inmunoelectroforesis contra suero anti-gammaglobulina humana polivalente, para comprobar la pureza de la IgG.

- Obtención de IgM a partir de gammaglobulina humana.

Las IgM se obtuvieron a partir de gammaglobulina humana polivalente liofilizada, de la misma manera que se hizo para la obtención de IgM de conejo.

A las IgM obtenidas se les practicaron las siguientes pruebas de control: Determinación de proteínas por el método de Lowry, - inmunoelectroforesis contra suero anti-gammaglobulina humana.

- Obtención de anti-IgG y anti-IgM en cobayos.

Se inmunizaron 10 cobayos con la IgG de conejo obtenida previamente y 10 cobayos con la IgM también obtenida con anterioridad. La vía de inmunización utilizada fué la intramuscular en el músculo de la nuca (36). Como adyuvante se utilizó ACF y se inoculó 1 mg de proteína a cada cobayo. Estos se inmunizaron cada 7 días durante un mes al cabo del cual se sangraron en blanco por punción cardíaca. - De esta sangre se obtuvieron los sueros por centrifugación a 3000 -- rpm durante 10 minutos en una centrífuga Sorvall.

Los sueros se procesaron por el método de precipitación con sulfato de amonio para obtener las anti-gammaglobulinas deseadas, a las

que se les realizaron las siguientes pruebas de control para asegurar su pureza y especificidad: determinación de proteínas (método de Lowry) e IEF contra IgG y contra IgM, respectivamente.

- Obtención de anti-IgG y anti-IgM humana en conejos.

Se inmunizaron dos conejos con IgG humana y dos con IgM humana - siguiendo el esquema de inmunización establecido anteriormente y sangrándolos en blanco por punción cardiaca al cabo de un mes. Los sueros se separaron por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Sorvall.

Para obtener las anti-gammaglobulinas purificadas, los sueros se procesaron por el método de precipitación con sulfato de amonio.

A dichas anti-gammaglobulinas se les realizaron las siguientes pruebas de control para asegurar su pureza y especificidad: Determinación de proteínas por el método de Lowry e inmunolectroforesis contra IgG e IgM respectivamente.

- Inmunofluorescencia. (37)

Conjugación.

Se pipetearon 2.5 ml de una solución de gammaglobulina dentro de un matraz en frío y se adicionaron 2.5 ml de solución amortiguadora - carbonato-bicarbonato pH=9.0. Se pesaron 500 g de isotiocianato de fluoresceína y se disolvieron en 0.5 ml de acetona; esta mezcla se adicionó inmediatamente por goteo y con agitación a la solución de gammaglobulina fría. Se cubrió el matraz y se dejó en agitación a 4°C durante toda la noche. El conjugado se dializó haciendo diez cambios de solución salina tamponada en un período de 3 a 4 días para

eliminar el exceso de fluoresceína no conjugada. En los casos que se formó precipitado, se eliminó por centrifugación en frío a 1800 rpm - durante 10 minutos, utilizando una centrífuga Sorvall con un cabezal de tipo SA 600.

- Eliminación del material no específico mediante absorción:

El conjugado se dializó haciendo dos cambios de PBS pH=7.2; en seguida se determinó el volumen de conjugado que se absorbió. Se pesó el polvo de tejido suficiente para dos absorciones, utilizando -- 100 mg de polvo por ml de conjugado. Cada una de las porciones se puso por separado en un tubo para la centrífuga y se adicionaron aproximadamente 9 ml de PBS a cada tubo, posteriormente se centrifugaron a 20000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y al polvo húmedo se le adicionó el volumen deseado de conjugado. Esta mezcla se dejó durante una hora a temperatura ambiente, resuspendiendo periódicamente el polvo por agitación; al cabo de este tiempo, se centrifugó a 20000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El conjugado absorbido se adicionó al segundo tubo de polvo húmedo y esta mezcla se volvió a dejar durante una hora a temperatura ambiente, centrifugándola posteriormente a 20000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El conjugado se colectó por centrifugación y se filtró a través de un filtro milipore. El conjugado filtrado se almacenó a -20°C.

- Evaluación del Conjugado.

Antes de usar estos conjugados en las pruebas, se compararon con -- conjugados de reactividad conocida en una prueba simultánea. Para -- ello, se hicieron diluciones del conjugado. Con cada una de estas -- diluciones, se tuvieron impresiones positivas conocidas, de acuerdo --

a la técnica de anticuerpo fluorescente (38), se tiñeron con colorante de contraste azul de Evans, luego se observaron al microscopio cuidadosamente y se anotaron los resultados obtenidos, según los siguientes criterios:

- a).- Intensidad de la tinción específica.
- b).- Cantidad de inclusiones y polvo antigénico.
- c).- Presencia y cantidad de fondo o tinción inespecíficos.

Los criterios se calificaron de 0 a 4.

- Análisis Inmunoenzimático (ELISA).

Conjugación: Técnica de Nakane (39)

Se disolvieron 5 mg de peroxidasa de rábano en 1 ml de bicarbonato de sodio 0.3M, pH=8.1; a esta solución se le añadieron 0.1 ml de -- fluorodinitrobenzeno al 1% en etanol absoluto, mezclando por agitación magnética durante una hora a temperatura ambiente; después se añadió 1 ml de peryodato de sodio en agua destilada 0.06M, mezclando por agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, el color de la solución se tornó verde-amarillo; se añadió 1 ml de etilén-glicol en agua destilada 0.16M, mezclando por agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución se dializó contra solución amortiguadora de carbonato de sodio 0.01M, pH=9.5 a 4°C, al término de la diálisis se agregaron 5 mg de anti-gammaglobulina a la solución de peroxidasa-aldehído mezclando por agitación de 2 a 3 horas a temperatura ambiente; transcurrido este tiempo, se añadieron 3 mg de borohidruro de sodio mezclando con agitador magnético, la solución se dejó a 4°C durante toda la noche, luego se dializó contra PBS a 4°C (en los casos en que se formó -- una pequeña cantidad de precipitado, éste se eliminó por centrifuga---

ción). Una vez dializada la muestra se pasó por columna de Shephardex G-200 equilibrada con PBS. El conjunto de fracciones de peroxidasa-anti-gammaglobulina clasificado, se colectó en el primer pico. Una vez colectado el conjugado, se repartió en alícuotas y se almacenó a -20°C , adicionándoles 10 mg de albúmina sérica bovina por -- ml.

Evaluación del conjugado.

Se sensibilizó una placa con 200 μl de antígeno amibiano por pozo, este antígeno contenía 1.5% de protefina; la placa se dejó -- a 4°C durante toda la noche, se lavó tres veces con PBS-tween, con intervalos de tres minutos cada lavado, después se agregaron 200 μl por pozo de cada dilución de gammaglobulina y se dejó incubando 2 - horas en cámara húmeda a 37°C , al término de la incubación se lavó la placa con PBS-tween con intervalos de 3 minutos cada lavado, luego se adicionaron 20 μl por pozo de conjugado peroxidasa-anti-gamma globulina a diferentes diluciones y se incubó durante 45 minutos a 37°C en cámara húmeda; pasado este tiempo, se lavó la placa 3 veces con PBS-tween y se agregaron 200 μl por pozo de revelador preparado recientemente (orto-fenilen-diamina al 0.01%) y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos en la obscuridad. Para pa----- rar la reacción, se usó ácido nítrico 2N. La interacción se evaluó basándose en la intensidad de color, el cual se percibe a simple - vista.

RESULTADOS.

1.- Titulación de anticuerpos anti-E.histolytica en el suero de los conejos, por el método de Hemaglutinación Indirecta.

El comportamiento de la respuesta inmune humoral fué muy similar en cada uno de los conejos. La respuesta inicial fué débil alcanzándose títulos de anticuerpos alrededor de 1:128 en las dos primeras inmunizaciones y se fué incrementando hasta alcanzar un título máximo de anticuerpos de 1:2048 en la cuarta inmunización.

Realizando un promedio de la respuesta inmune humoral de cada inmunización (Fig.2), se puede representar la respuesta inmune promedio de este grupo de conejos en las siete inmunizaciones en que se determinó el título de anticuerpos. Esta presentó dos máximos - en el título de anticuerpos, el primero en la 4a. inmunización con título de 1:2048 y el segundo en la séptima inmunización con título de 1:1024.

En la tabla 1 se aprecian los títulos de anticuerpos individuales y el promedio de cada inmunización.

(FIG.2).- Respuesta inmune humoral de conejo anti-E.histolytica.

Se representa el comportamiento de la respuesta inmune humoral - anti-E.histolytica de un grupo de 10 conejos. Se hizo un promedio de los títulos de hemaglutinación indirecta, obtenidos de cada una de -- las siete inmunizaciones en que se determinó el título de anticuer--- pos.

Cada punto representa el promedio de los recíprocos de los títulos de hemaglutinación.

RESPUESTA INMUNE HUMORAL DE CONEJO ANTI-E. HISTOLYTICA.

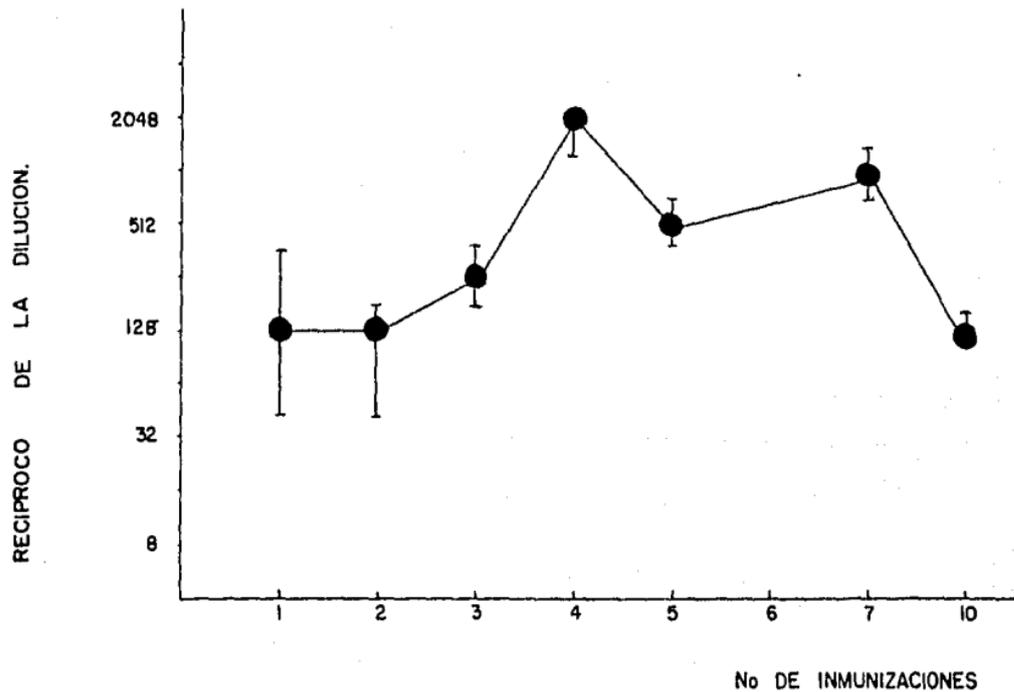


TABLA 1
 TITULACION DE SUEROS DE CONEJO ANTI-E.histolytica
 RECIPROCO DEL TITULO DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA^a

No. de conejo	Número de inmunizaciones						
	1a	2a	3a	4a	5a	7a	10a
1	256	256	256	2048	1024	2048	128
2	128	128	256	2048	512	1024	256
3	256	128	512	2048	1024	2048	256
4	512	256	256	1024	256	1024	256
5	128	64	256	2048	512	1024	128
6	128	128	256	2048	512	1024	128
7	64	64	128	2048	512	1024	128
8	256	128	256	2048	512	2048	256
9	64	64	256	2048	512	1024	256
10	128	64	256	2048	512	512	128
	128	128	256	2048	512	1024	128

^aTítulo promedio de tres ensayos.

2.- Obtención de IgG de conejo anti-E.histolytica.

Las globulinas obtenidas a partir de los sueros inmunes, dieron un rendimiento del 81.33% de gamma-globulina.

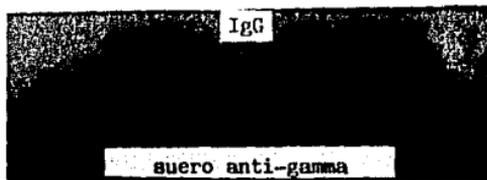
A partir de estas gamma-globulinas se purificó la IgG mediante una columna de cromatografía por intercambio iónico, obteniéndose un rendimiento del 100%.

A la IgG purificada se le realizaron las siguientes pruebas:

Hemaglutinación indirecta en la que dió un título de 1:2048, -- y en cuanto a su actividad inmunoprecipitante contra antígeno amibiano, se utilizó un sistema de inmunodifusión en gel, que involucra una reacción de precipitación antígeno-anticuerpo en un medio semisólido, comprobándose así la especificidad del anticuerpo por la formación de bandas de precipitación como puede verse a continuación:



Asimismo, se realizó la prueba de inmunolectroforesis, dando una banda característica de IgG, con lo que quedó comprobada su pureza. Lo anterior puede observarse en la siguiente fotografía.



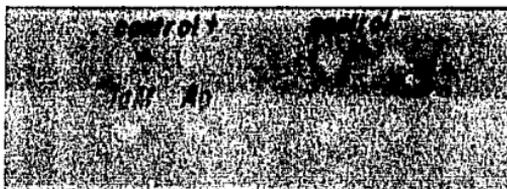
3.- Obtención de IgM de conejo anti-E.histolytica.

Las globulinas obtenidas a partir de los sueros inmunes, dieron un rendimiento de 72.65% de gamma-globulina.

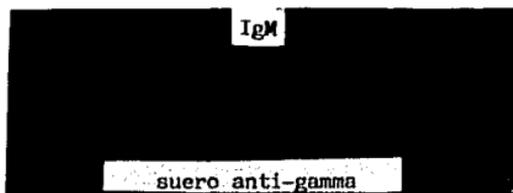
A partir de estas gamma-globulinas, se purificó la IgM mediante filtración en gel, obteniéndose un rendimiento del 60%.

A la IgM purificada se le realizaron las siguientes pruebas:

Hemaglutinación indirecta, dando un título de 1:1024 y en cuanto a su actividad inmunoprecipitante contra antígeno amibiano se utilizó un sistema de inmunodifusión en gel, comprobándose así la especificidad del anticuerpo por la formación de bandas de precipitación, como se observa a continuación:



También se realizó la prueba de inmunoelectroforesis, dando una banda característica de IgM, con lo que se probó su pureza. Lo anterior se puede apreciar a continuación.



4.- Obtención de IgG a partir de gamma-globulina humana liofilizada.

A la IgG purificada a partir de gamma-globulina humana liofilizada mediante Sepharosa-proteína A, se le realizaron las siguientes pruebas de control:

Determinación de proteínas dando una concentración de 63.5 --- mg/ml e inmunolectroforesis contra suero anti-gammaglobulina humana y dió una banda característica de IgG, quedando así comprobada su pureza.

5.- Obtención de IgM a partir de gammaglobulina humana liofilizada.

A la IgM purificada a partir de gammaglobulina humana liofilizada mediante precipitación con ácido bórico y posterior filtración por G-200, se le practicaron las siguientes pruebas de control:

Determinación de proteína y dió una concentración de 88.8 mg/ml e inmunolectroforesis contra suero anti-gammaglobulina humana y -- dió una banda característica de IgM quedando de esta manera comprobada su pureza.

6.- Obtención de anti-IgG y anti-IgM de conejo obtenidas en cobayo.

Las gammaglobulinas obtenidas a partir de sueros inmunes para anti-IgG dieron un rendimiento del 51.12% de gammaglobulina, y las obtenidas a partir de sueros inmunes para anti-IgM 50.62%.

Una vez obtenidas las gammaglobulinas, se realizó la prueba de inmunolectroforesis contra sus respectivos antígenos, comprobándose así la especificidad del anticuerpo por la formación de bandas de precipitación.

Ya probada su especificidad, se procedió a conjugadas, cada una por separado, para las técnicas de inmunofluorescencia y ELISA.

7.- Obtención de anti-IgG y anti-IgM humana en conejos.

Se obtuvo un rendimiento del 78.6% y del 75.0% de gammaglobulina para anti-IgG y anti-IgM respectivamente.

Una vez obtenidas las gammaglobulinas, se probaron contra sus respectivos antígenos por inmunoelectroforesis, comprobándose así la especificidad del anticuerpo por la formación de bandas de -- precipitación.

Ya probada su especificidad, se procedió a conjugadas, cada una por separado, para la técnica de ELISA.

8.- Técnica de inmunofluorescencia. Evaluación de los conjugados.

Los conjugados obtenidos anti-IgM-fluoresceína y anti-IgG-fluoresceína se compararon con conjugados de reactividad conocida en una prueba simultánea. Para ello se hicieron diluciones seriadas por un factor de dos.

Tanto las impresiones positivas como las negativas se observaron al microscopio, obteniéndose los siguientes resultados:

CRITERIOS	Diluciones del conjugado anti-IgM fluoresceína									
	1:2		1:4		1:8		1:16		1:32	
	conjugado +	imp. (+)	conjugado +	imp. (-)						
Intensidad específica	4+	0	4+	0	4+	0	3	0	2	0
Inclusiones y polvo	4+	0	4+	0	4+	0	3	0	2	0
Tinción inespecífica	3+	3+	2	2	1	1	1	1	1	1

CRITERIOS	Diluciones del conjugado anti-IgG fluorescencia									
	1:2		1:4		1:8		1:16		1:32	
	conjugado +		conjugado +		conjugado +		conjugado +		conjugado +	
	imp. (+)	imp. (-)	imp. (+)	imp. (-)	imp. (+)	imp. (-)	imp. (+)	imp. (-)	imp. (+)	imp. (-)
Intensidad específica	4+	0	4+	0	4+	0	4+	0	3	0
Inclusiones y polvo	4+	0	4+	0	4+	0	4+	0	2	0
Tinción inespecífica	4+	4+	3	3	2	2	1	1	1	1

Las diluciones 1:8 y 1:16 fueron las mejores para los conjugados anti-IgM fluoresceína y anti-IgG fluoresceína respectivamente, dado que en ellos se obtuvo la tinción más intensa y con la mayor eliminación del fondo inespecífico.

Una vez determinado el título de los conjugados se les diluyó con solución salina tamponada.

Estas diluciones de trabajo se fraccionaron en pequeñas alícuotas y se almacenaron a -20°C.

9.- Técnica de ELISA. Evaluación de los conjugados.

Para sensibilizar las placas de cloruro de polivinilo, se emplearon 200 μ l por pozo de antígeno amibiano a una concentración de 5 μ g/ml.

Los conjugados anti-IgM y anti-IgG tanto de conejo como de humano, se evaluaron en la misma placa, adicionando 200 μ l por pozo de IgM de conejo en el carril A, de IgM de humano en el carril C, de IgG de conejo en el carril E y de IgG de humano en el carril G, todos a una concentración de 50 μ g/ml.

Posteriormente se agregaron los conjugados anti-IgM tanto de conejo como de humano en los carriles A y C respectivamente y los conjugados anti-IgG de conejo y de humano en los carriles E y G respectivamente; se utilizaron varias diluciones partiendo de la columna 3 con una dilución de 1:100 y finalizando en la columna 12, con una dilución de 1:2000.

En la columna 1 se utilizó como segundo anticuerpo conjugado comercial 1:1000 como control positivo y en la columna 2, se utilizó PBS a manera de control negativo.

Al término de la reacción, se observó coloración hasta una dilución de 1:800 en el caso de los conjugados anti-IgM y de 1:1000 en el de los conjugados anti-IgG (figura 3). Estos resultados se corroboraron repitiendo la técnica 10 veces.

Una vez determinado el título de los conjugados, se les diluyó con PBS. Estas diluciones se fraccionaron en volúmenes de 20 ml y se almacenaron a -20°C .

10.- Análisis seroepidemiológico de sueros previamente probados -- por la técnica de contraelectroforesis, de individuos clínicamente sanos.

Los resultados obtenidos al realizar los métodos de inmuno-- fluorescencia y ELISA para el sistema E.histolytica, hicieron posible emplear el de mayor sensibilidad. Estas características permitieron llevar a cabo un análisis seroepidemiológico de la amibiasis.

Este método fué el inmunoenzimático ELISA. El arreglo de las - placas estuvo de acuerdo al número de diluciones establecidas para los sueros, esta distribución permitió el análisis de 8 sueros ----

por placa con sus controles respectivos. Bajo estas condiciones - se analizaron 100 sueros de individuos asintomáticos (Tabla 2). - En esta tabla, se aprecia el número total de sueros que resultaron positivos o negativos, tanto por la técnica de contrainmunoelectroforesis como por la de ELISA, así como el porcentaje de seropositividad en individuos asintomáticos.

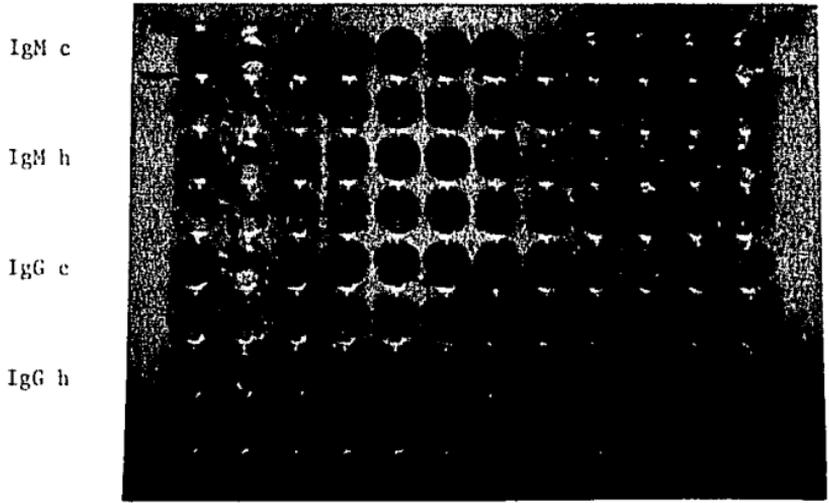
Los títulos de IgG e IgM determinados por el método de ELISA - en sueros de individuos asintomáticos que resultaron positivos pueden observarse en las figuras 4 y 5 respectivamente.

Al observar estas últimas figuras, se aprecia una seropositividad del 56% en el caso de IgG y del 4% en el caso de IgM en el total de los sueros probados de individuos asintomáticos.

Diluciones del Segundo Anticuerpo
(conjugado)

control (+)	control (-)								
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1000	1:1200	1:1400	1:1600
									1:1800
									1:2000

Primer anticuerpo



(FIG.3) Resultados de la evaluación de los conjugados anti-IgM y anti-IgG para la técnica de ELISA.

TABLA 2

Sueros Probados				
	Negativos	Positivos	Total	% de Seropositividad
CIEF	61	39	100	39.0%
ELISA (anti-IgG p _e roxidasa)	44	56	100	56.0%
ELISA (anti-IgM p _e roxidasa)	96	4	100	4.0%

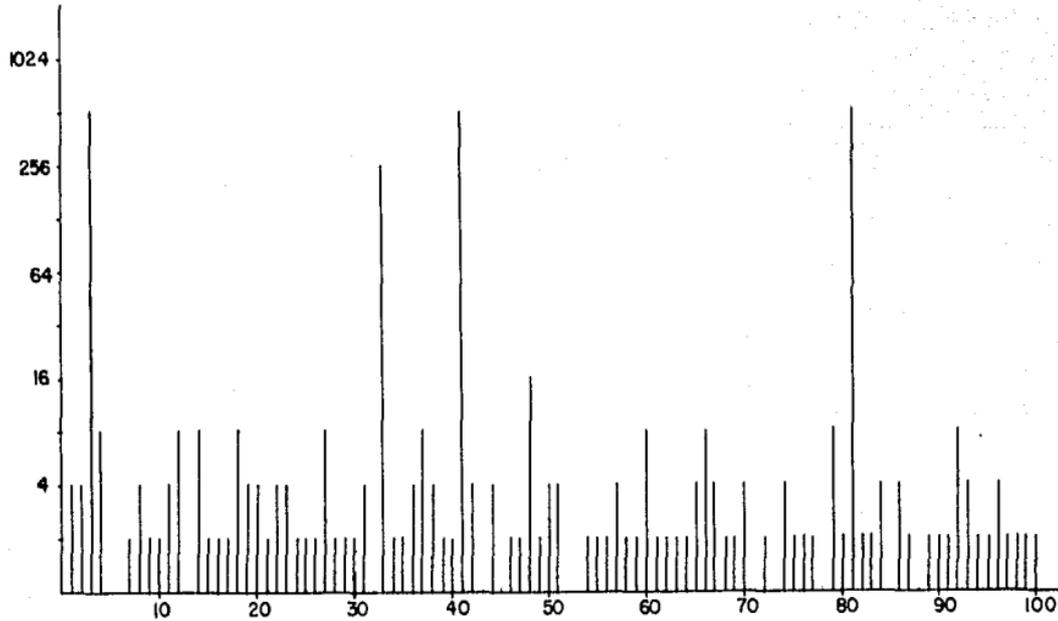
Los sueros probados fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Higiene.

(FIG.4) Niveles de IgM anti-E.histolytica en individuos clínicamente sanos.

Se probaron 100 sueros de individuos clínicamente sanos por el -- análisis inmunoenzimático ELISA. El título está representado por el - recíproco de la dilución hasta la cual se obtuvo una reacción posi--- tiva.

NIVELES IgM ANTI-E HISTOLYTICA EN INDIVIDUOS
SIN SINTOMATOLOGIA DE AMIBIASIS.

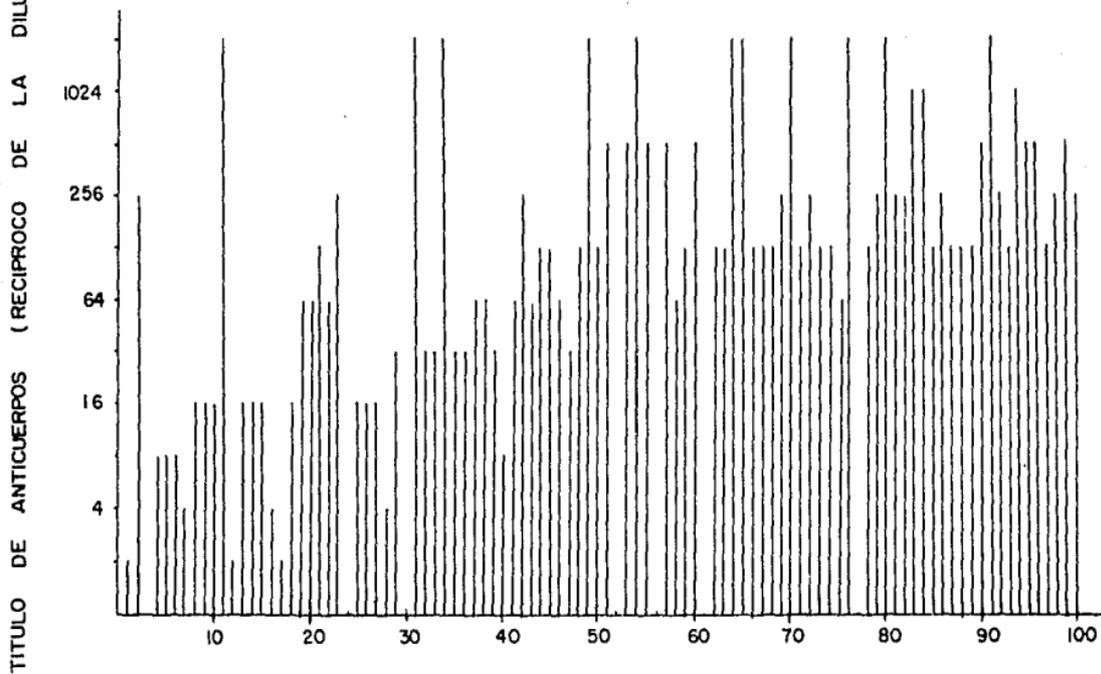
TITULO DE ANTICUERPOS (RECIPROCO DE LA DILUCION).



(FIG.5) Niveles de IgG anti-E.histolytica en individuos clínicamente sanos.

Se probaron 100 sueros de individuos clínicamente sanos por el análisis inmunoenzimático ELISA. El título está representado por -- el recíproco de la dilución hasta la cual se obtuvo una reacción positiva.

NIVELES IgG ANTI-E HISTOLYTICA EN INDIVIDUOS SIN SINTOMATOLOGIA DE AMIBIASIS



DISCUSION.

Uno de los objetivos fundamentales de este trabajo fué el de contar con un método de seroinmunodiagnóstico para amibiasis, lo suficientemente sensible y práctico que permitiera posteriormente -- desarrollar un estudio seroepidemiológico del padecimiento. Para -- lograrlo, primero se comprobó la utilidad de los anticuerpos como -- reactivos de diagnóstico en las técnicas de inmunofluorescencia y - ELISA, para la determinación de anticuerpos anti-E.histolytica. Es to es, la inmunofluorescencia, prueba empleada en el diagnóstico se rológico de la amibiasis y el análisis inmunoenzimático, la más reciente adición a las pruebas serológicas de enfermedades parasita- rias, Voller y Col. (40)

Se compararon las características de ambos métodos, eligiéndose ELISA, para el análisis seroepidemiológico por ser más práctico y - tener mayor sensibilidad, lo cual concuerda con las observaciones - de Engvall y Carlson (41) con respecto a que, en los sistemas hasta ahora probados, ELISA es considerablemente más sensible que las --- pruebas serológicas tradicionales.

Obtención de anticuerpos específicos.

Las técnicas utilizadas para la obtención y purificación de anticuerpos específicos fueron efectivas, ya que tanto los rendimientos como la pureza lograda fué satisfactoria.

La utilidad de estos anticuerpos como reactivo de diagnóstico - quedó comprobada al realizar con buenos resultados las técnicas de inmunofluorescencia y ELISA.

- Análisis inmunoenzimático (ELISA)

Para la determinación de anticuerpos anti-E.histolytica en sueros de individuos clínicamente sanos, previamente probados mediante la técnica de CIEF con resultados dudosos o positivos, se utilizó el análisis inmunoenzimático, método comparable con el radioinmunoanálisis en cuanto a su sensibilidad; sin embargo, la técnica de ELISA presenta las siguientes ventajas: simplicidad, estabilidad de los reactivos, falta del riesgo de radiación, potencial para su automatización y equipo relativamente no costoso (42).

Aunque la prueba de ELISA, de acuerdo a varios autores es fácil de llevar a cabo (43), la aplicación de cualquier nueva técnica como ELISA implica una serie de problemas a resolver antes de poder usarse ampliamente y las condiciones para su desarrollo varían de acuerdo al sistema antígeno-anticuerpo bajo estudio. En nuestro caso, la manifestación de reacciones inespecíficas, durante los análisis preliminares, fueron el principal problema. La adición de un detergente no iónico tal como Tween 20 y la de albúmina sérica de bovino al 4% en el diluyente del conjugado, aumentó la especificidad en nuestros resultados. Estos reactivos no intervienen con la reacción antígeno-anticuerpo pero sí previenen la formación de nuevas interacciones hidrofóbicas entre las proteínas del conjugado y los sitios libres de la fase sólida que hayan quedado expuestos, después de la absorción del antígeno y que puedan ser el origen de reacciones inespecíficas. Además, el manejo de los controles adecuados como pozos con o sin antígeno, incubados con suero normal --

como primer anticuerpo lavados e incubados con el conjugado y el --
sustrato, fueron necesarios para descartar la posibilidad de apre--
ciaciones falsas.

La respuesta inmune humoral detectada por ELISA es una prueba -
indirecta de lesión de tejido por E.histolytica (44). Esto confir-
ma la utilidad de un método inmunológico confiable no como prueba -
definitiva de la etiología del padecimiento, sino como herramienta-
complementaria para una mejor interpretación diagnóstica y cuyas ca-
racterísticas pueden ser aprovechadas en el desarrollo de un estu-
dio seroepidemiológico de esta parasitosis.

- Inmunofluorescencia.

Esta técnica presenta el inconveniente de fluorescencia inespe-
cífica, lo que es más frecuente en los sistemas antígeno-anticuerpo
que involucran parásitos. Tal desventaja se resolvió utilizando --
como colorante de contraste azul de Evans de la misma manera que lo
hicieron Ambroise y Col. (45) con quienes se coincide en las obser-
vaciones.

Además se utilizaron controles adecuados que sirvieron de refe-
rencia para evitar interpretaciones erróneas. Finalmente, los re-
sultados obtenidos fueron satisfactorios en las diluciones óptimas-
que se indicaron en los resultados.

La inmunofluorescencia es ahora uno de los métodos de diagnós--
tico mejor establecidos en laboratorios de inmunología microbiológi-
ca y clínica. Sin embargo, la inmunofluorescencia es tardada, no -
es fácil de ejecutar de una manera automatizada (46), se requiere

de equipo especializado y de entrenamiento para su interpretación, por lo que para los fines que se persiguen en este trabajo, no es la más recomendable como para ser utilizada en el diagnóstico de rutina.

- Análisis seroepidemiológico.

El análisis de las muestras de suero de personas asintomáticas, se hizo mediante el análisis inmunoenzimático, después de haber probado su mayor sensibilidad con respecto a la técnica de inmunofluorescencia. Se ha sugerido que las características de ELISA podrían ser evaluadas para su uso en estudios seroepidemiológicos de la amibiasis, Kagan (47). Dichos estudios son importantes ya que permiten definir algunos aspectos sobre la frecuencia y distribución de esta enfermedad en una población dada. En este caso, se estudiaron 100 muestras de suero de personas pertenecientes todas ellas a una zona endémica de esta parasitosis, con el propósito de determinar el porcentaje de seropositividad y el título de IgG e IgM en individuos sin sintomatología de amibiasis, y de este modo establecer el estadio de la enfermedad.

En los resultados que se observan en las figuras 4 y 5 y en la tabla 2, puede apreciarse como el método ELISA puede ser aplicado en el desarrollo de un estudio seroepidemiológico.

En la tabla 2 puede verse que la técnica de ELISA es más sensible que CIEF, ya que los porcentajes de seropositividad en las mismas muestras son mayores. Estos resultados demostraron que el análisis inmunoenzimático permitió detectar anticuerpos séricos anti-E.histolytica en personas que no recuerdan haber mani--

festado sintomatología de amebiasis y los cuales podrían corresponder a casos de portadores asintomáticos de esta enfermedad.

Los sueros que mediante la técnica de ELISA resultaron tener anticuerpos de la clase IgG, corresponden a personas que han tenido -- contacto con E.histolytica. Es conveniente señalar aquí, que de --- acuerdo a nuestras condiciones de trabajo, los sueros con un título igual o mayor de 1:128 por la prueba de ELISA podrían considerarse como positivos, los resultados deberán correlacionarse con los antecedentes clínicos de las personas y con los resultados de otras pruebas de diagnóstico para que la infección amebiana (etiología y estado actual) pueda confirmarse.

Los sueros en los que se detectó anticuerpos de la clase IgM --- anti-E.histolytica, nos indican que la infección está en sus inicios.

En estudios seroepidemiológicos, del 81 al 100% de los pacientes con amebiasis invasiva o con absceso hepático, presentan anticuerpos de la clase IgG anti-E.histolytica (48). Generalmente los indivi--- duos con infección asintomática con menor frecuencia presentan res-- puesta de anticuerpos (49). Los resultados serológicos positivos se han aceptado como indicativos de invasión parasitaria recurrente o - primaria (44,50). Los títulos altos de anticuerpos están asociados con una parasitosis invasiva más reciente. (51,52). A pesar de que las IgG anti-E.histolytica pueden prevalecer durante dos a once ---- años (53), no hay evidencia de que el título de anticuerpos anti- --- E.histolytica esté relacionado con los síntomas clínicos. (54).

Finalmente, por su sencillez de aplicación y confiabilidad, el - análisis inmunoenzimático estandarizado demostró de esta forma su --

utilidad en el desarrollo de este tipo de estudios, La considerabile sensibilidad y especificidad de un método serológico como el ELISA no serán la solución a la necesidad de una prueba definitiva de diagnóstico sino más bien, como anteriormente se había discutido, sólo es una herramienta complementaria para una adecuada interpretación diagnóstica. Desde un punto de vista médico, podría establecer las bases de una medida preventiva del padecimiento ya que de acuerdo a nuestros resultados, permitió detectar anticuerpos en personas clínicamente sanas y cuyo control sería importante para su oportuno tratamiento, evitando de este modo las posibles consecuencias de una lesión más grave que sólo se haría manifiesta en etapas avanzadas de la enfermedad.

Es oportuno señalar aquí, que con el análisis de estos sueros se alcanzaron a cubrir los objetivos de este trabajo, sin embargo, hizo falta correlacionar nuestros resultados con cierto tipo de información como sería: Contar los antecedentes clínicos de cada una de las personas analizadas, conocer su condición de vida y todas aquellas situaciones que favorecen la persistencia y propagación de la amibiasis. Además de contar con un mayor número de muestras para poder inferir sobre la frecuencia y distribución de esta enfermedad. Aspectos que contribuirían a comprender de una forma más satisfactoria el papel que juegan las características inmunes en el humano, como uno de los factores que determinan el grado de susceptibilidad a la amibiasis entre los individuos de una zona endémica de esta parasitosis.

CONCLUSIONES.

- 1.- La anti-IgG y anti-IgM son de utilidad para la elaboración de reactivos de diagnóstico ambiental tanto para la técnica de inmunofluorescencia como para la de ELISA.
- 2.- ELISA resultó ser un método considerablemente más sensible y práctico que inmunofluorescencia.
- 3.- ELISA es un método útil y confiable en el desarrollo de estudios seroepidemiológicos de la amebiasis.
- 4.- La detección de altas concentraciones de IgM anti-E.histolytica indica que la amebiasis invasiva se encuentra en sus inicios.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- Guerrant, R.L.; "The global problem of amibiasis; current -- status, research needs, and oportunities for progress". Rev. Infect. Dis. 8/218-225 (1986)
- 2.- Walsh, J.A.; "Problems in recognition and diagnosis of amibiasis; Estimation of the global magnitude of morbidity and mor-- tality". Rev. Infect. Dis. 8/228-238 (1986)
- 3.- Haove, C.A.; "The comensal phase of E.histolytica". Exp. Pa-- rasit. 1/411 (1952)
- 4.- Martínez-Palomo, A.; "The biology of E.histolytica". Research Studies Press. (1974)
- 5.- Gutiérrez G.: "INVESTIGACION DE ANTICUERPOS CONTRA E.histoly-- tica EN LA REPUBLICA MEXICANA". Sepúlveda y Diamond Editores. INSS. México, (1976)
- 6.- Pérez Tamayo R.: "PROTOZOAL DISEASES" La Prensa Médica Mexica-- na. México (1970)
- 7.- Martínez-Palomo, A., Orozco, E. y González, A.: "E.histolyti-- ca: TOPOCHEMISTRY AND DYNAMICS OF THE CELL SURFACE". Van den Bosche Editor. Amsterdam (1981)
- 8.- Trisal, D. y Martínez-Palomo, A: "A comparative study of ---- several Entamoeba strains". J. Exp.Med. 145/652-665 (1977)
- 9.- Orozco, E., Martínez-Palomo, A. y Guarneros, G.: "Virulencia-- y propiedades de superficie de varias cepas axénicas de E.his-- tolytica". Arch. Invest. Med. 11/153 (1980)
- 10.- Brandt, H., Pérez Tamayo, R.: "AMIBIASIS". 1a. Edición. La - Prensa Médica Mexicana, México (1970)
- 11.- Guyton, A.C.; "TRATADO DE FISIOLOGIA MEDICA". 6a. Edición. - Nueva Editorial Interamericana, México (1984)
- 12.- Davis, B.D.; "TRATADO DE MICROBIOLOGIA". 2a. Edición. Salvat Editores, Barcelona (1983)
- 13.- García, E., Escobar, A.; "MANUAL DE PRACTICAS DE INMUNOLOGIA". Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. México (1978)
- 14.- Barret, J.T.; "TEXT BOOK OF INMUNOLOGY". 2nd. Edition. The - C.V. Mosby Company, Saint Louis (1974)
- 15.- Landa, L., Guerrero, M., Capín, N.R.; "Estudios sobre inmu-- nidad celular en amibiasis invasora". Conferencia Internacio-- nal sobre Amibiasis. Libro de resúmenes /103 (1975)

- 16.- Ortiz-Ortiz, L., Zamacona, G., Sepúlveda, B.; "Cell-mediated - immunity in patients with amebic abscess of the liver". Clin. Inm. Inmunopath. 4/127 (1975)
- 17.- Sepúlveda, B.; "Immunology of amebiasis". 6o. Seminario sobre Amibiasis. 686/702 (1976)
- 18.- Krupp, I.M.; "Antibody response to invasive amebiasis in Durban, South Africa". Am.J. Trop. Med. Hyg. 20/414 (1981)
- 19.- Calderón, J.; "Membrane properties that resist humoral immune lysis in E.histolytica". Fed. Proc. 40/1011 (1981)
- 20.- Calderón, J., Muñoz, J.L., Acosta, H.; "Surface redistribution and release of antibody-induced caps in Entamoeba". J. Exp. - Med. 180/184 (1980)
- 21.- Tovar, R., Calderón, J.; "Resistance to immune lysis induced - by antibodies in E.histolytica". Elsevier North-Holland Bio-- med. Press. Amsterdam (1980)
- 22.- Davidson, I.; "DIAGNOSTICO CLINICO POR EL LABORATORIO". 6a.--- Edición. Editorial Salvat, Barcelona (1982)
- 23.- Elwing, H. y Nilsson, L.A.; J. Immunol. Methods. 38/256 (1982)
- 24.- Kagan, I.G.; "MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY". 3rd.Edition. - American Society of Microbiology, Washington D.C. (1980)
- 25.- Houba, V.; "IMMUNOLOGICAL INVESTIGATION OF TROPICAL PARASITIC - DISEASES". Churchill Livingstone, Edinburg (1980)
- 26.- Sundaram, K. y Castellino, J.B.; Int. J. Nuclear Methods. ---- 89/200 (1980)
- 27.- Voller, A., Bartlett, A. y Bidwell, D.E.; "Immunoassays for -- the 80's". MTP Press., Lancaster, U.K. 1/508 (1981)
- 28.- Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D.E.; "The enzyme linked -- immunosorbent assay (ELISA)". MTP Press. 2/119 (1980)
- 29.- Kabat, E.A.; "INMUNOQUIMICA EXPERIMENTAL". La Prensa Médica - Mexicana, México (1968)
- 30.- Lowry, O.H.; "Protein measurement with the Folin phenol ----- reagent." J. Biol. Chem. 193/265 (1951)

- 31.- Kessel, J., Lewis, W.; "Indirect hemagglutination and complement fixation test in amebiasis". Am.J. Trop. Med. Hyg. ----- 14/540 (1965)
- 32.- Bradwell y Catty. "Bench manual of techniques for the preparation of immunological and immunodiagnostic reagents". World Health Organization (1981)
- 33.- Milford, W.A., Wicher, J.T.; "IMMUNOCHEMISTRY IN CLINICAL --- LABORATORY MEDICINE". University Park Press., Baltimore(1978)
- 34.- Garvey, J.S. Cremer, N.E., Sussdorf, D.H.; "METHODS IN IMMUNOLOGY", 3rd. Edition. W.A. Benjamin Inc., London (1977)
- 35.- Fischer, L.; "LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY". North-Holland Publishing Company, Amsterdam -- (1982)
- 36.- Williams, C.A., Chase, M.W.; "METHODS IN IMMUNOLOGY AND IMMUNOCHEMISTRY". 2nd. Edition. Academic Press. Inc. USA (1973)
- 37.- Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, N.R.; The demonstration of -- pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody". J. Immunol. 45/159-170 (1942)
- 38.- Larghi, O.P.; "Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia". Oficina Sanitaria Panamericana. 8/2/7-13 (1975)
- 39.- Nakane, P.K., Kawaoi, A.; "Peroxidase labelled antibody". J. - Histochem. Cytochem. 22/1084-1091 (1974)
- 40.- Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D.; "Enzyme immunoassay for parasitic diseases". Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 70/98 --- (1976)
- 41.- Engvall, E., Carlsson, H.E.; "Enzyme linked immunosorbent assay" First International Symposium Immunoenzymatic Tecyniques. 2/135 (1976)
- 42.- Stites, D.P., Stobo, J.D., Budenberg, H.H.; "INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA", 4a. Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de - C.V. México (1983)
- 43.- Memorandum. "The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)". -- Bull. World Health Organ. 54/129 (1979)
- 44.- Trisal, D.; "Immunology of E.histolytica in human and animal -- hosts". Rev. Infect. Disc. 4/'154-84 (1982)

- 45.- Ambroise, T.P., Grin, J.P., Riogaud, A.; "Modificación de la técnica inmunofluorescencia mediante la utilización de colorantes de contraste". La Prensa Médica. 74/2215 (1966)
- 46.- Voller, A., Bidsell, D.E., Bariett, A.; "The enzyme linked --- immunosorbent assay (ELISA)". Flowline Publications, Guernsey- (1977)
- 47.- Kagan, I.G.; "SEROEPIDEMIOLOGY OF AMEBIASIS". 6o. Seminario sobre amebiasis. Ed. Sepúlveda y Diamond, IMSS. México (1976)
- 48.- Patterson, M., Healy, G.R., Shabot, J.M.; "Serologic testing for amebiasis". Gastroenterology. 78/136-41 (1980)
- 49.- Juniper, K., Worrell, G.L.; "Serologic diagnosis of amebiasis". Am. J. Trop. Med. Hyg. 216157-68 (1972)
- 50.- Eldson-Dew, R.; "The serology of amebiasis". Trans. R. Soc. -- Med. Hyg. 64/18 (1970)
- 51.- Krupp, I.M.; "Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis". Am. J. Trop. Med. 19/57-62 (1970)
- 52.- Healy, G.R., Kagan, I.G., Gleason, M.N.; "Use of the indirect - hemagglutination test in some studies of seroepidemiology of --- amebiasis in the western hemisphere". Health Laboratory Science. 7/109-16 (1970)
- 53.- Healy, G.R., Visvesvara, G.S., Kagan, I.G.; "Observations on -- the persistence of antibodies to E.histolytica". Arch. Invest.- Med. 5/495-500 (1974)
- 54.- Krupp, I.M., Powell, S.J.; "Comparative study of the antibody - response in amebiasis". Am. J. Trop. Med. Hyg. 20/421-24 (1971)