UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

# APLICACION DE UNA PRUEBA DE ELISA, DISEÑADA CON ANTIGENOS AMIBIANOS PRESERVADOS SIN INHIBIDORES ENZIMATICOS

Por

PERLA CARRILLO DUARTE

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad
en Microbiología Médica

MAYO DE 2000

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

# FACULTAD DE MEDICINA

## APLICACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA, DISEÑADA CON ANTÍGENOS AMIBIANOS PRESERVADOS SIN INHIBIDORES ENZIMÁTICOS

**Por**

**PERLA CARRILLO DUARTE**

**Como requisito parcial para obtener el grado de**
**MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad**
**en Microbiología Médica**

**MAYO, 2000**

**APLICACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA, DISEÑADA CON ANTÍGENOS AMIBIANOS PRESERVADOS SIN INHIBIDORES ENZIMÁTICOS**

**Aprobación de la Tesis:**

**DRA. MARIA DEL SOCOR -2X RO FLORES DE CASTAÑEDA**
Presidente

DRA. IRMA RIVERA MORALES
Secretario

DR. ROLANDO TIJERINA MENCHACA
1er. Vocal

M.C. ELBA GUADALUPE RODRIGUEZ PEREZ
2do. Vocal

**DR. FRANCISCO J. BOSQUES PADILLA**
**3er.** Vocal

DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

*El presente trabajo se desarrolló en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L., bajo la asesoría de la Dra. María del Socorro Flores de Castañeda y la coasesoría del Dr. med. RolandoTijerina Menchaca.*

*El presente proyecto fué aprobado por:*
*SIRREYES 19980602010 y PAICyT SA 255-99*

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme recursos económicos que me permitieron realizar estos estudios.

Al Sistema de Investigación Regional Alfonso Reyes y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica, por colaborar para la realización de mi trabajoexperimental.

Al Dr. Jesús Ancer Rodríguez, por el enorme apoyo brindado.

Al Dr. med. Rolando Tijerina Menchaca, agradezco el haberme permitido su confianza y aprecio, así como sus consejos y atenciones.

A la Dra. Ma. del Socorro Flores de C., por permitirme formar parte de su línea de investigación y asesorar mi trabajo de tesis.

Al Dr. Feo. Javier Bosques Padilla, por su valiosa colaboración y siempre buena disposición.

A la Dra. Irma Rivera Morales, por la amistad y amables consejos con que me distinguió.

A la M.C. Elba Gpe. Rodríguez Pérez, agradezco sus consejos y el haberme brindado su amistad y confianza.

Al Dr. Armando Isibasi Araujo, por haber donado la cepa utilizada.

Al Dr. Antonio Luna, por haber realizado el trabajo fotográfico que permitió la presentación oral de esta tesis.

A todos los miembros de los diferentes laboratorios del C.R.C.E.I. En especial a Marcela, Socorro y Ma. de Jesús. Así también, a Elvira, Blanca y Lucy por su enorme paciencia y disposición cuando requerí su area de trabajo.

A Rosaura, Angeles, Callos y Sra. Eva, por su amabilidad y grata amistad.

A los trabajadores del Depto. de Microbiología, Nora, Aracely, Elba, Patty, Juany, Lupita, Bruna y Don Pancho. A todos, gracias por la gran amistad con que me distinguieron y ayudarme tan amablemente cuando fue necesario.

A todo el Depto. de Microbiología. Gracias.

## DEDICATORIAS

A Dios, por permitirme crecer como ser humano y en mi vida profesional, por darme fortaleza y paciencia a cada paso.

A mis Padres, Sres. Juan Manuel Camilo Santaniego y Amelia Duarte de Canillo, al igual que a mi hermano Jesús Manuel, por el gran amor y apoyo con que han abrazado mi vida, por la confianza y respeto con que han visto' mi dirección y han sido maravillosamente únicos.

A Zulma Ayala y Audelia Elizalde, por la amistad que hemos compartido y por tantas atenciones que han llenado de satisfacción y cariño mi vida personal.

Al Dr. Eduardo Llausás Magaña, por apoyarme y brindarme su valiosa amistad, por creer en mí y en mis sueños, sin cuestionar dónde empiezan las razones para otorgar una razón más.

A Julio Henoc Monjardín Heráldez, por reconfortar mis sentimientos con su especial forma de conducirse y hacerme sentir que en el camino siempre existen razones para seguir luchando de pie y elevar nuestro ser.
Por el inigualable amor entregado, gracias.

# TABLA DE CONTENIDO


| Capítulo | Página |
|---|---|
| 1. INTRODUCCIÓN. | 1 |
| 1.1 Definición. | 1 |
| 1.2 Antecedentes Históricos. | 1 |
| 1.3 Clasificación. | 2 |
| 1.4 Mecanismos de Transmisión. | 3 |
| 1.5 Ciclo de Vida. | 3 |
| 1.6 Manifestaciones Clínicas. | 4 |
| 1.7 Datos Epidemiológicos. | 5 |
| 1.8 Diagnóstico. | 7 |
| 1.9 Justificación. | 11 |
| 2. OBJETIVOS. | 12 |
| 2.1 Objetivo General. | 12 |
| 2.2 Objetivos Específicos. | 12 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS. | 14 |
| 3.1 Origen y Clasificación de las Muestras de Suero. | 14 |

**Página**


3.2 Origen de los reactivos. 15

3.3 Equipo. 16

3.4 Prueba de Hemaglutinación Indirecta. 17

3.4.1 Reactivos de la Prueba Cellognost Amoebiasis. 17

3.4.2 Preparación de Reactivos de IHA. 17

3.4.3 Determinación Cuantitativa de Anticuerpos anti-A. *histolytica.* 18

3.4.4 Lectura y Valoración de Resultados. 18

3.5 Origen de la Cepa. 19

3.6 Cultivo de *E. histolytica.* 19

3.6.1 Preparación de la Base TYI. 20

3.6.2 Preparación de la Mezcla Vitamínica #18. 20

3.6.3 Preparación de Medio de Cultivo TYI-S-33. 21

3.6.4.Resiembra de Trofozoítos de *E. histolytica* 21

3.6.5 Obtención de Trofozoítos de *E. histolytica* 21

3.6.6 Liofilización de Trofozoítos de *E. histolytica* 22

3.6.7 Lavado del Material de Vidrio Utilizado en el Cultivo. 22

3.7 Preservación de los Antígenos de *E. histolytica.* 23

3.8 Determinación de la Concentración de Proteínas. 23

3.8.1 Procedimiento Estándar. 24

3.9 Prueba de ELISA. 24

3.9.1 Preparación de Antígeno de *E. histolytica* para ELISA. 24

3.9.2 Anticuerpos Conjugados Utilizados en ELISA. 25

3.9.3 Procedimiento de ELISA. 25

3.9.4 Determinación de Indices de Absorbancia en la Prueba de ELISA. 26

**Página**


3.2 Origen de los reactivos. 15

3.3 Equipo. 16

3.4 Prueba de Hemaglutinación Indirecta. 17

3.4.1 Reactivos de la Prueba Cellognost Amoebiasis. 17

3.4.2 Preparación de Reactivos de IHA. 17

3.4.3 Determinación Cuantitativa de Anticuerpos anti-E. *histolytica.* 18

3.4.4 Lectura y Valoración de Resultados. 18

3.5 Origen de la Cepa. 19

3.6 Cultivo de *E. histolytica.* 19

3.6.1 Preparación de la Base TYI. 20

3.6.2 Preparación de la Mezcla Vitamínica #18. 20

3.6.3 Preparación de Medio de Cultivo TYI-S-33. 21

3.6.4.Resiembra de Trofozoítos de *E. histolytica* 21

3.6.5 Obtención de Trofozoítos de *E. histolytica* 21

3.6.6 Liofilización de Trofozoítos de *E. histolytica* 22

3.6.7 Lavado del Material de Vidrio Utilizado en el Cultivo. 22

3.7 Preservación de los Antígenos de *E. histolytica.* 23

3.8 Determinación de la Concentración de Proteínas. 23

3.8.1 Procedimiento Estándar. 24

3.9 Prueba de ELISA. 24

3.9.1 Preparación de Antígeno de *E. histolytica* para ELISA. “ ’ 24

3.9.2 Anticuerpos Conjugados Utilizados en ELISA. 25

3.9.3 Procedimiento de ELISA. 25

3.9.4 Determinación de Indices de Absorbancia en la Prueba de ELISA. 26

**Página**


3.9.5 Determinación de las Unidades de ELISA. 27

3.9.6 Interpretación de los Resultados. 27

3.9.7 Determinación de Parámetros para la Prueba de ELISA. 27

3.10 Evaluación de los Resultados. 28

4. RESULTADOS. 29

4.1 Hemaglutinación Indirecta. 29

4.2 Comparación de las Pruebas de IHA y WB. 32

4.3 Estandarización de la Prueba de ELISA. 34

4.4 Prueba de ELISA. 41

4.4.1 Resultados de ELISA en Sueros de Pacientes con AHA y Sujetos Sanos. 41

4.4.2 Determinación de Parámetros para la Utilidad Clínica de la Prueba de ELISA. 44

4.4.3 Resultados de ELISA en Sueros de Sujetos con Parasitosis Intestinal. 45

4.4.4 Resultados de ELISA en Sueros de Sujetos Sanos, Individuos con Parasitosis Intestinal y Pacientes con AHA. 47

4.4.5 Comparación del Examen Coproparasitoscópico y la Prueba de ELISA, en Individuos con Parasitosis Intestinal. 49

4.4.6 Comparación de las Pruebas de IHA y ELISA para Amibiasis Invasiva. 52

5. DISCUSION. 53

**Página**

6. CONCLUSIONES. 59

7. PERSPECTIVAS. 60

8. REFERENCIAS. 61

APENDICE A 66

# LISTA DE TABLAS


| Tabla | | Página |
|---|---|---|
| 1. | Resultados Obtenidos en la Prueba de IHA con Sueros de Pacientes con AHA, Diversas Hepatopatías o Parasitosis Intestinal. | 29 |
| 2. | Comparación de los Resultados de IHA en el Suero de Sujetos con Parasitosis Intestinal con los Obtenidos en el Examen Coproparasitoscópico. | 31 |
| 3. | Comparación de las Pruebas de IHA y WB, en Sueros de Pacientes con AHA o con Diversas Hepatopatías. | 32 |
| 4. | Comparación de la Utilidad Clínica de las Pruebas de IHA y WB. | 33 |
| 5. | Recuperación de Proteínas en la Preparación de Antígeno de *E. histolytica,* en Diversos Amortiguadores. | 34 |
| 6. | Indices de Absorbancia en ELISA, Utilizando Diferentes Concentraciones de Antígeno en Solución de Carbonatos. | 35 |
| 7. | Indices de Absorbancia en ELISA, Utilizando Diferentes Diluciones del Suero del Paciente. | 36 |
| 8. | Indices de Absorbancia en ELISA, Utilizando Diferentes Anticuerpos Conjugados con Peroxidasa y Albúmina como Bloqueador. | 37 |

**Página**

9. Indices de Absorbancia en ELISA, Utilizando Diferentes Anticuerpos Conjugados con Peroxidasa y Gelatina como Bloqueador.

10. Reproducibilidad en la Prueba de ELISA.

11. Unidades de ELISA en Sueros de Sujetos Sanos.

12. Unidades de ELISA en Sueros de Pacientes con AHA.

13. Comparación de los Resultados en ELISA en Sueros de Pacientes con AHA y Sujetos Sanos.

14. Determinación de Parámetros para la Utilidad Clínica de la Prueba de ELISA.

15. Unidades de ELISA en Sueros de Sujetos con Parasitosis Intestinal.

16. Comparación de los Resultados de ELISA en Sueros de Sujetos Sanos, Individuos con Parasitosis Intestinal y Pacientes con AHA.

17. Examen CPS de Sujetos con Parasitosis Intestinal y Prueba de ELISA Positiva.

Comparación del Examen CPS y la Prueba de ELISA, en Individuos con Parasitosis Intestinal.

Comparación del Examen CPS Positivo para *E.histolytica/E. dispar* con los Resultados Obtenidos en ELISA.



I

**Página**

20. Comparación de los Resultados de IHA y ELISA en
Sueros de Pacientes con AHA versus Sueros de Individuos
con Parasitosis Intestinal. 52

# LISTA DE FIGURAS

**Figura**

1. Unidades de ELISA Obtenidas con los Sueros de Sujetos Sanos y AHA.

2. Unidades de ELISA Obtenidas con los Sueros de Sujetos Sanos, Diversas Parasitosis Intestinales y AHA.

# NOMENCLATURA

| | |
|---|---|
| AHA | Absceso hepático amibiano |
| ASB | Albúmina sérica bovina |
| °C | Grados Celsius |
| CN | Control negativo |
| cois. | Colaboradores |
| CPS | Coproparasitoscópico |
| g | Gramos |
| Fig. | Figura |
| HC1 | Ácido Clorhídrico |
| = | Igual a |
| IA | Indice de absorbancia |
| IC:MC | Antígenos amibianos preservados sin inhibidores enzimáticos |
| IHA | Hemaglutinación indirecta |
| kDa | Kilodaltons |
| L | Litros |
| Ib | Libras |
| M | Concentración molar |
| 2 ME | 2 mercaptoetanol |
| Mg | Microgramos |
| ML | Microlitros |
| pm | Micrómetros |
| mg | Miligramos |
| min | Minutos |

| | |
|---|---|
| mL | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| > | Mayor o igual que |
| > | Mayor que |
| < | Menor que |
| N | Concentración normal |
| nm | Nanómetros |
| n | Número de muestra |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos |
| p/v | Relación peso/volumen |
| pH | Logaritmo del recíproco de la concentración de iones hidrógeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes |
| UE | Unidades de ELISA |
| v/v | Relación volumen/volumen |
| WB | Western Blot |

| | |
|---|---|
| mL | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| > | Mayor o igual que |
| > | Mayor que |
| < | Menor que |
| N | Concentración normal |
| nm | Nanómetros |
| n | Número de muestra |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos |
| p/v | Relación peso/volumen |
| pH | Logaritmo del recíproco de la concentración de iones hidrógeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes |
| UE | Unidades de ELISA |
| v/v | Relación volumen/volumen |
| WB | Western Blot |

# RESUMEN

Perla Carrillo Duarte Fecha de Graduación: 2000

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
Título del Estudio: APLICACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA, DISEÑADA CON ANTÍGENOS AMIBIANOS PRESERVADOS SIN INHIBIDORES ENZIMÁTICOS

Número de páginas: 67

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología Médica

Area de Estudio: Microbiología Médica.

Propósito y Método del Estudio: Las pruebas de diagnóstico para amibiasis invasiva existentes en el mercado, han demostrado ser útiles en zonas donde la amibiasis no es un problema endémico, pero al aplicarse en zonas endémicas no muestran la misma eficiencia. Con las evidencias reunidas tras años de estudio, los antígenos amibianos preservados sin inhibidores enzimáticos, utilizados en una prueba de W.B. desarrollada por Flores-Castañeda, han demostrado ser la elección correcta en pruebas de diagnóstico, es por esto que, el investigar la utilidad clínica de una prueba de ELISA diseñada con estos antígenos, puede contribuir de manera importante al estudio de la amibiasis.

Se practicó la prueba de IHA a sueros de pacientes con AHA o diversas hepatopatías y los resultados se compararon con los obtenidos en la prueba de W.B. Se estandarizó la prueba de ELISA y se practicó a sueros de pacientes con AHA y sujetos sanos. Se investigó la aplicación de la prueba en una población de individuos con diversas parasitosis intestinales y se comparó con la prueba de IHA practicada a este grupo.

Contribuciones y conclusiones: La prueba de ELISA diseñada con antígenos amibianos preservados sin inhibidores enzimáticos, demostró mayor sensibilidad que la prueba de IHA que actualmente se encuentra en el mercado y es considerada como la prueba estándar en la detección de amibiasis invasiva. La prueba de W.B. fué superior que IHA y ELISA.

Se demostró que la prueba de ELISA no da reacción cruzada con los anticuerpos presentes en sueros de individuos con diversas parasitosis intestinales. Aunque la prueba no permite distinguir entre una infección pasada y una reciente, puede ser muy útil para el estudio epidemiológico de la amibiasis.

FIRMA DEL ASESOR:

Dra. Ma. del Socorro Flores González

FIRMA DEL COASESOR:

Dr. med. Rolando Tijerina Menchaca

# RESUMEN

Perla Carrillo Duarte Fecha de Graduación: 2000

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
Título del Estudio: APLICACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA, DISEÑADA CON ANTÍGENOS AMIBIANOS PRESERVADOS SIN INHIBIDORES ENZEVIÁTICOS

Número de páginas: 67

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología Médica

Area de Estudio: Microbiología Médica.

Propósito y Método del Estudio: Las pruebas de diagnóstico para amibiasis invasiva existentes en el mercado, han demostrado ser útiles en zonas donde la amibiasis no es un problema endémico, pero al aplicarse en zonas endémicas no muestran la misma eficiencia. Con las evidencias reunidas tras años de estudio, los antígenos anúblanos preservados sin inhibidores enzimáticos, utilizados en una prueba de W.B. desarrollada por Flores-Castañeda, han demostrado ser la elección correcta en pruebas de diagnóstico, es por esto que, el investigar la utilidad clínica de una prueba de ELISA diseñada con estos antígenos, puede contribuir de manera importante al estudio de la amibiasis.

Se practicó la prueba de IHA a sueros de pacientes con AHA o diversas hepatopatías y los resultados se compararon con los obtenidos en la prueba de W.B. Se estandarizó la prueba de ELISA y se practicó a sueros de pacientes con AHA y sujetos sanos. Se investigó la aplicación de la prueba en una población de individuos con diversas parasitosis intestinales y se comparó con la prueba de IHA practicada a este grupo.

Contribuciones y conclusiones: La prueba de ELISA diseñada con antígenos amibianos preservados sin inhibidores enzimáticos, demostró mayor sensibilidad que la prueba de IHA que actualmente se encuentra en el mercado y es considerada como la prueba estándar en la detección de amibiasis invasiva. La prueba de W.B. fué superior que IHA y ELISA.

Se demostró que la prueba de ELISA no da reacción cruzada con los anticuerpos presentes en sueros de individuos con diversas parasitosis intestinales. Aunque la prueba no permite distinguir entre una infección pasada y una reciente, puede ser muy útil para el estudio epidemiológico de la amibiasis.

FIRMA DEL ASESOR:

Dra. Ma. del Socorro Flores González

FIRMA DEL COASESOR:

Dr. med. Rolando Tijerina Menchaca

# CAPÍTULO 1

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 Definición

La amibiasis es una de las enfermedades más comunes ocasionadas por parásitos y de las que tienen mayor impacto sobre la salud (Treviño García-Manzo y cois., 1994). El término amibiasis ha sido utilizado para describir tanto la infección como la enfermedad causadas por *Entamoeba histolytica,* sin embargo, para distinguir entre ambos estados de infección, se utiliza el término amibiasis invasiva para el estado de enfermedad y amibiasis intestinal se utiliza para el estado de portador de quistes (Gómez y cois., 1997).

## 1.2 Antecedentes Históricos

La forma de trofozoíto de *Entamoeba histolytica* fue descrito por Lósch en 1875, a partir de organismos encontrados en un paciente con disentería crónica. La evidencia clínica de la asociación de este organismo con la disentería fue descrito por Councilman y LaFleur en 1891. Quincke y Roos describieron la forma de quiste en 1893 y en 1903, Schaudinn dió el nombre de *Entamoeba*

*histolytica* a este organismo (Bruckner, 1992). En 1925, Brumpt propuso que los quistes cuadrinucleados de *Entamoeba histolytica* eran un complejo de dos especies, una forma patogénica e invasiva y otra forma no patogénica y no invasiva a la cual llamó *Entamoeba dispar* (Marshall y cois., 1997). La hipótesis de Brumpt fué descartada por otros expertos y transcurrieron más de 50 años antes de ser apoyada.

En 1978, Peter Sargeaunt y sus colegas demostraron que *E. histolytica* podía ser dividida en dos grupos, los cuales correlacionaban con las características clínicas de la infección. Sargeaunt comparó los patrones electroforéticos de las isoenzimas hexoquinasa y fosfoglucomutasa. de más de 6,000 aislados clínicos de *E. histolytica,* y encontró que los patrones obtenidos mostraban diferencia entre las cepas aisladas de pacientes asintomáticos y las obtenidas de pacientes con colitis y absceso hepático (Sargeaunt y cois., 1978). Esto reveló que la amibiasis invasiva es producida por cepas que tienen patrones característicos de isoenzimas (zimodemos). distintos a los de las amibas presentes en los individuos portadores de quistes (Martínez-Palomo y Espinosa-Cantellano. 1998).

En los últimos años, han sido descritos un gran número de marcadores genéticos, inmunológicos y bioquímicos, que permiten distinguir entre las amibas patogénicas y las no patogénicas (Clark y Diamond, 1994) y en 1993, se publicó una redescripción formal de *E. histolytica* en la cual era separada como especie diferente a *E. dispar* (Diamond y Clark, 1993).

## 1.3 Clasificación

Todas las amibas verdaderas en los humanos están agrupadas en el Phylum Sarcomastigophora, Subphylum Sarcodina, Superclase Rhizopoda. Clase

*histolytica* a este organismo (Bruckner. 1992). En 1925, Brumpt propuso que los quistes cuadrinucleados de *Entamoeba histolytica* eran un complejo de dos especies, una forma patogénica e invasiva y otra forma no patogénica y no invasiva a la cual llamó *Entamoeba dispar* (Marshall y cois., 1997). La hipótesis de Brumpt fué descartada por otros expertos y transcurrieron más de 50 años antes de ser apoyada.

En 1978, Peter Sargeaunt y sus colegas demostraron que *E. histolytica* podía ser dividida en dos grupos, los cuales correlacionaban con las características clínicas de la infección. Sargeaunt comparó los patrones electroforéticos de las isoenzimas hexoquinasa y fosfoglucomutasa. de más de 6,000 aislados clínicos de *E. histolytica,* y encontró que los patrones obtenidos mostraban diferencia entre las cepas aisladas de pacientes asintomáticos y las obtenidas de pacientes con colitis y absceso hepático (Sargeaunt y cois., 1978). Esto reveló que la amibiasis invasiva es producida por cepas que tienen patrones característicos de isoenzimas (zimodemos), distintos a los de las amibas presentes en los individuos portadores de quistes (Martínez-Palomo y Espinosa-Cantellano, 1998).

En los últimos años, han sido descritos un gran número de marcadores genéticos, inmunológicos y bioquímicos, que permiten distinguir entre las amibas patogénicas y las no patogénicas (Clark y Diamond, 1994) y en 1993, se publicó una redescripción formal de *E. histolytica* en la cual era separada como especie diferente a *E. dispar* (Diamond y Clark, 1993).

## 1.3 Clasificación

Todas las amibas verdaderas en los humanos están agrupadas en el Phylum Sarcomastigophora, Subphylum Sarcodina, Superclase Rhizopoda. Clase

Lobosea. Subclase Gymnamoebia, Orden Amoebida y Familia Endamoebidae (Levine y cois., 1980), el término *Entamoeba* corresponde al Género. *E. histolytica* y *E. dispar* corresponden a la categoría taxonómica Especie (Martínez-Palomo y Espinosa-Cantellano, 1998).

## 1.4 Mecanismos de Transmisión

La transmisión del parásito es básicamente debido a la eliminación de los quistes maduros de *E. histolytica* o *E. dispar* en las heces de individuos infectados y la ingestión de los quistes por un receptor susceptible. La contaminación a través de la manipulación de alimentos, irrigación de vegetales con agua contaminada, transmisión por insectos y el contacto de persona a persona son las formas más frecuentes de transmisión del parásito. La transmisión intrafamiliar es una fuente muy importante de infección causada por estos parásitos (Gómez y cois., 1997).

## 1.5 Ciclo de Vida

Después que los quistes (forma infectiva) son ingeridos, la pared del quiste es digerida en la parte superior del tracto gastrointestinal, el parásito se desenquista y se divide dando lugar a ocho trofozoítos uninucleados que posteriormente migran al colon donde se establecen y proliferan. Los trofozoítos que constituyen la forma invasiva del parásito, pueden penetrar la mucosa intestinal y diseminarse a otros órganos, o bien, cuando las condiciones no son propicias se inicia el proceso de enquistamiento y los trofozoítos se convierten en

quistes que finalmente serán eliminados con las heces. Los quistes no pueden desarrollarse dentro de los tejidos, pero son capaces de permanecer viables en un ambiente húmedo por varios días y ocasionar infección. Contrario a esto, los trofozoítos tienen un tiempo de vida muy corto fuera del cuerpo y no sobreviven el paso a través del tracto gastrointestinal, después de su ingestión. (Martínez-Palomo, 1987; Martínez-Palomo y Espinosa-Cantellano, 1998).

## 1.6 Manifestaciones Clínicas

Las cepas de *Entamoeba histolytica* pueden invadir la mucosa y el tejido del intestino grueso, causando diferentes tipos de lesiones pero también pueden ingresar al torrente sanguíneo y causar lesiones extraintestinales (Treviño García-Manzo y cois., 1994). Dependiendo del órgano afectado, las manifestaciones clínicas de la amibiasis son intestinal o extraintestinal. Ambas localizaciones pueden ocurrir al mismo tiempo, pero usualmente se manifiestan por separado. Existen 4 formas clínicas de amibiasis intestinal invasiva que generalmente son de naturaleza aguda: l)disentería o diarrea sanguinolenta, 2)colitis fulminante, 3)apendicitis amébica y 4)ameboma del colon. *E. histolytica* puede infectar casi cualquier órgano del cuerpo, incluyendo el hígado, cerebro, pulmón y piel. La forma más frecuente de amibiasis extraintestinal es el absceso hepático amibiano (AHA) que tiene gran importancia clínica y epidemiológica. Las complicaciones toráxicas son secundarias al absceso hepático. Las lesiones que involucran al sistema nervioso central son muy raras y se presentan como lesiones pequeñas simples o múltiples. La amibiasis cutánea es usualmente una complicación de la amibiasis intestinal con disentería y puede ocurrir en la región perianal o en la región abdominal en casos de absceso hepático (Martínez-Palomo y Espinosa-Cantellano, 1998). En las presentaciones clínicas extraintestinales, el

quistes que finalmente serán eliminados con las heces. Los quistes no pueden desarrollarse dentro de los tejidos, pero son capaces de permanecer viables en un ambiente húmedo por varios días y ocasionar infección. Contrario a esto, los trofozoítos tienen un tiempo de vida muy corto fuera del cuerpo y no sobreviven el paso a través del tracto gastrointestinal, después de su ingestión. (Martínez-Palomo, 1987; Martínez-Palomo y Espinosa-Cantellano, 1998).

## 1.6 Manifestaciones Clínicas

Las cepas de *Entamoeba histolytica* pueden invadir la mucosa y el tejido del intestino grueso, causando diferentes tipos de lesiones pero también pueden ingresar al torrente sanguíneo y causar lesiones extraintestinales (Treviño García-Manzo y cois., 1994). Dependiendo del órgano afectado, las manifestaciones clínicas de la amibiasis son intestinal o extraintestinal. Ambas localizaciones pueden ocurrir al mismo tiempo, pero usualmente se manifiestan por separado. Existen 4 formas clínicas de amibiasis intestinal invasiva que generalmente son de naturaleza aguda: l)disentería o diarrea sanguinolenta, 2)colitis fulminante, 3)apendicitis amébica y 4)ameboma del colon. *E. histolytica* puede infectar casi cualquier órgano del cuerpo, incluyendo el hígado, cerebro, pulmón y piel. La forma más frecuente de amibiasis extraintestinal es el absceso hepático amibiano (AHA) que tiene gran importancia clínica y epidemiológica. Las complicaciones toráxicas son secundarias al absceso hepático. Las lesiones que involucran al sistema nervioso central son muy raras y se presentan como lesiones pequeñas simples o múltiples. La amibiasis cutánea es usualmente una complicación de la amibiasis intestinal con disentería y puede ocurrir en la región perianal o en la región abdominal en casos de absceso hepático (Martínez-Palomo y Espinosa-Cantellano, 1998). En las presentaciones clínicas extraintestinales, el

comportamiento de la enfermedad tiende a ser más severo, y en consecuencia es mayor su letalidad (Escandón-Romero y cois., 1996).

Los casos de AHA han sido reportados en pacientes de todas las edades, pero predomina en adultos cuya edad fluctúa entre los 20 y 60 años. Se ha observado una marcada preferencia de la formación de abscesos en el lóbulo hepático derecho y es al menos, tres veces más frecuente en hombre que en mujeres. Interesantemente, es diez veces más común en adultos que en niños (Sepúlveda y cois., 1986).

## 1.7 Datos Epidemiológicos

La infección por *Entamoeba histolytica* es cosmopolita, pero la incidencia más alta se presenta en comunidades con condiciones socioeconómicas deficientes e higiene inadecuada. Es una de las parasitosis más comunes y constituye la tercera causa de muerte dentro de todas las parasitosi's que afectan al ser humano (Martínez-Palomo y Martínez-Baez, 1983; Reed, 1992). Se ha estimado que existen alrededor de 500 millones de sujetos infectados en el mundo, aunque aproximadamente el 90% de ellos se mantienen asintomáticos (Walsh, 1986) y que un número mayor de 110,000 muertes anualmente pueden ser atribuidas a complicaciones de la enfermedad (World Health Organization, 1985). Aproximadamente el 10% de las personas infectadas al año tienen síntomas clínicos; el 80 - 98 % de estos pacientes tienen síntomas relacionados con la mucosa intestinal, y en el 2 -20% restantes, las amibas invaden más allá de la mucosa intestinal (Marshall y cois., 1997).

Se conoce que la amibiasis es un proceso que se presenta principalmente en regiones con características climáticas cálidas o templadas (Martínez-Palomo y Martínez-Baez, 1983) y la mayor incidencia observada en la primavera y el

verano, muestra claramente que las condiciones ambientales y ecológicas tienen un efecto importante sobre la ocurrencia del padecimiento (Escandón-Romero y cois.. 1996). La distribución geográfica de los pacientes con absceso hepático amibiano es una condición prevalente en el este y sureste de Africa, sureste de Asia, México y la porción oeste de Sudamérica (Elsdon-Dew, 1968).

La información epidemiológica sobre la ocurrencia de la amibiasis en México, es aún parcial e incompleta. Se han realizado estudios para conocer la prevalencia de portadores de quistes de *Entamoeba histolytica,* la forma infectante del parásito. Esta prevalencia varía en las diferentes regiones geográficas donde se ha estudiado (Escandón-Romero y cois., 1996). En la Ciudad de México se notificó una prevalencia del 55% en niños de 5 a 14 años que viven en zonas marginadas y por consiguiente insalubres (Del Muro y cois., 1990). En Michoacán se refirió una prevalencia del 1.8% en el medio urbano y del 7.2% en el medio rural, en niños de 6-13 años (Lara-Aguilar y cois., 1990). En Oaxaca, en el medio rural, la prevalencia fue del 24% en niños de 2 a 14 años (Navarrete-Espinoza y cois., 1993). En población militar adulta, la prevalencia global de parasitosis por *Entamoeba histolytica* fue del 24% (Islas Marroquín, 1993) , aunque mayor en el Valle de México con un 38% y en la ciudad de Tampico, Tamaulipas con 32%, que en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas donde fue de 20% (Escandón-Romero y cois., 1996).

En México, la amibiasis es motivo de consulta frecuente. Se ha estimado que en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), institución que brinda seguridad social a cerca de la mitad de la población mexicana, se atienden más de medio *millón* de casos de amibiasis intestinal cada año (Treviño García-Manzo, 1994) , por lo que a nivel nacional habría qué esperar más de un millón de pacientes con manifestaciones clínicas de infección intestinal por amiba (Escandón-Romero y cois., 1996).

Existe información derivada de encuestas seroepidemiológicas con determinación de anticuerpos contra el parásito. Un estudio realizado en 1994.

con individuos pertenecientes a los 32 estados de la República Mexicana, en el que se analizaron casi 68 000 muestras de suero representativas de la población en términos de edad, status socioeconómico y origen rural o urbano, detectó por medio de la prueba de Hemaglutinación Indirecta (IHA), una prevalencia de anticuerpos contra el parásito de 8.4% a nivel nacional. La seroprevalencia de la amibiasis en el país fue de > 9.0 % en las regiones Centro Sur, Pacífico Sur y Península de Yucatán; mientras que las regiones del Norte, Noreste y Golfo de México mostraron una seroprevalencia de < 8.0 %. Interesantemente, la prevalencia de anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* es mayor en las regiones del sur que en las del norte de México (Caballero-Salcedo, 1994).

En otro estudio realizado en 1976 por Gutiérrez y cois., se analizaron cerca de 20 000 muestras de suero de individuos que habitaban en 46 regiones urbanas de México y se encontró una prevalencia de anticuerpos anti-amiba de 5.95%, utilizando la técnica de Contrainmunoelectroforesis (CIE) para la determinación. Las diferencias encontradas en estudios estudios, no reflejan necesariamente un incremento en la seroprevalencia de la población mexicana, ya que puede deberse al tipo de poblaciones estudiadas (uno de los estudios incluyó solamente áreas urbanas) así como a la metodología aplicada, IHA en uno de los casos y CIE en el otro.

## 1.8 Diagnóstico

La detección de *E. histolytica* en el laboratorio se realiza rutinariamente por medio del examen coproparasitoscópico (CPS), en el cual se analizan un mínimo de tres muestras de heces mediante la observación microscópica. Este examen presenta las desventajas de que requiere personal altamente capacitado

para su realización ya que las amibas pueden ser confundidas con otros parásitos o con detritus celulares, su sensibilidad es relativamente baja y deben obtenerse varias muestras de heces frescas para la identificación del parásito (Martínez-Palomo y Espinosa-Cantellano, 1998). Además, existen ciertas sustancias y medicamentos que interfieren con la detección de los protozoarios intestinales, ya que no pueden ser recuperados después de una o varias semanas de la administración de compuestos como el aceite mineral, bario, bismuto, antibióticos, agentes antimalariales y algunas preparaciones antidiarréicas (García y cois., 1995).

Por otra parte, si una muestra de heces es positiva para quistes o trofozoítos de amibas, no puede especificarse si se trata de una cepa patógena o no patógena, por lo que el examen CPS debe reportarse como positivo para *E. histolytica* / *E. dispar,* resultado que según la Organización Mundial de la Salud, no es favorable para los individuos asintomáticos con CPS positivo ya que no se recomienda el tratamiento a menos que se sospeche infección por *E. histolytica* (Ackers y cois., 1997).

El estándar para la diferenciación entre *E. histolytica* y *E. dispar* es la identificación de su patrón de isoenzimas por electroforesis (análisis de zimodemos), pero es un procedimiento lento, costoso y requiere cultivar la amiba a partir de las heces, por lo tanto no es aplicable rutinariamente (Martínez-Palomo y Espinosa-Cantellano, 1998). Existen pruebas que utilizan anticuerpos monoclonales y ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa, éstos también permiten la diferenciación (Saíd-Fernández y Flores-Castañeda, 1996); otras pruebas utilizadas para la detección de amibiasis en ELISA, Contrainmunoelectroforesis, Radioinmunoensayo han sido desarrolladas, sin embargo, no se encuentran al alcance de cualquier laboratorio ni están disponibles comercialmente.

Las pruebas serológicas son las más empleadas en la detección de amibiasis extraintestinal ya que en esta enfermedad las amibas generalmente no

son observadas en el exámen microscópico de las heces y por lo tanto éste último no se considera útil para su detección (Wilson y cois., 1995). En cambio, la búsqueda de anticuerpos anti-amibas en el suero de los pacientes constituye una clave importante para establecer el diagnóstico de amibiasis extraintestinal.

Desde 1905, innumerables investigadores mediante técnicas serológicas han tratado de encontrar el método más específico y práctico para el diagnóstico de la amibiasis. Sin embargo, la autodegradación de los preparados amibianos hace que sea difícil estandarizar técnicas de diagnóstico altamente reproducibles (Perez-Monfort y cois., 1987). Mundialmente, se utilizan inhibidores enzimáticos para disminuir la actividad de las proteasas amibianas, sin embargo, no son totalmente efectivos ya que la degradación de las proteínas se lleva a cabo aún en presencia de ellos y los antígenos amibianos no son estables ni siquiera en condiciones de congelación. En solución a este problema, Flores-Castañeda logró preservar las moléculas antigénicas presentes en extractos de trofozoítos amibianos utilizando solventes orgánicos y calor, a la fracción obtenida se le denominó IC:MC, en la cual la actividad de las proteasas amibianas fué satisfactoriamente eliminada sin usar- inhibidores enzimáticos (Flores-Castañeda, 1992; Flores-Castañeda, 1995). Eos antígenos preparados con este método son estables por períodos de tiempo mayores que los preparados que contienen inhibidores y son ideales para usarse en pruebas de diagnóstico.

Utilizando los antígenos preservados sin inhibidores enzimáticos, Flores-Castañeda diseñó una prueba de alta resolución y sensibilidad para diagnosticar amibiasis invasiva por Western Blot (W.B.) y logró establecer un patrón de proteínas reconocido exclusivamente por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con amibiasis invasiva (intestinal o extraintestinal). El patrón está constituido por seis bandas antigénicas y no es reconocido por los anticuerpos presentes en los sueros de los sujetos sin amibiasis que habitan en una zona endémica, ni por los anticuerpos de sujetos asintomáticos con exámen CPS

son observadas en el exámen microscópico de las heces y por lo tanto éste último no se considera útil para su detección (Wilson y cois., 1995). En cambio, la búsqueda de anticuerpos anti-amibas en el suero de los pacientes constituye una clave importante para establecer el diagnóstico de amibiasis extraintestinal.

Desde 1905, innumerables investigadores mediante técnicas serológicas han tratado de encontrar el método más específico y práctico para el diagnóstico de la amibiasis. Sin embargo, la autodegradación de los preparados amibianos hace que sea difícil estandarizar técnicas de diagnóstico altamente reproducibles (Perez-Monfort y cois., 1987). Mundialmente, se utilizan inhibidores enzimáticos para disminuir la actividad de las proteasas amibianas, sin embargo, no son totalmente efectivos ya que la degradación de las proteínas se lleva a cabo aún en presencia de ellos y los antígenos amibianos no son estables ni siquiera en condiciones de congelación. En solución a este problema, Flores-Castañeda logró preservar las moléculas antigénicas presentes en extractos de trofozoítos amibianos utilizando solventes orgánicos y calor, a la fracción obtenida se le denominó IC:MC, en la cual la actividad de las proteasas amibianas fué satisfactoriamente eliminada sin usar inhibidores enzimáticos (Flores-Castañeda, 1992; Flores-Castañeda, 1995). Eos antígenos preparados con este método son estables por períodos de tiempo mayores que los preparados que contienen inhibidores y son ideales para usarse en pruebas de diagnóstico.

Utilizando los antígenos preservados sin inhibidores enzimáticos, Flores-Castañeda diseñó una prueba de alta resolución y sensibilidad para diagnosticar amibiasis invasiva por Western Blot (W.B.) y logró establecer un patrón de proteínas reconocido exclusivamente por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con amibiasis invasiva (intestinal o extraintestinal). El patrón está constituido por seis bandas antigénicas y no es reconocido por los anticuerpos presentes en los sueros de los sujetos sin amibiasis que habitan en una zona endémica, ni por los anticuerpos de sujetos asintomáticos con exámen CPS

positivo para *E. histolytica* / *E. dispar* (Flores-Castañeda y cois., 1991; Flores-Castañeda. 1992; Saíd-Fernández y Flores-Castañeda, 1996).

Por otro lado, se ha observado que el patrón característico de amibiasis invasiva obtenido en la prueba de W.B., no muestra correlación con los títulos de anticuerpos determinados con la técnica de IHA utilizada en México para el diagnóstico de amibiasis invasiva, ya que en el suero de algunos pacientes con absceso hepático amibiano (AHA) se encontró el patrón de W.B. característico de amibiasis invasiva y la prueba de IHA detectó títulos de anticuerpos de 1:512 o menores, considerados como negativos en zonas endémicas (Flores-Castañeda, 1995). Estos datos sugieren fuertemente que el método de W.B. es más confiable para sustentar un diagnóstico de AHA que el método de IHA. Con el patrón de amibiasis invasiva por W.B., se ha diagnosticado a más de 300 pacientes del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y esto ha servido para validar la utilidad diagnóstica de la prueba ya que los pacientes respondieron satisfactoriamente al tratamiento antiparasitario.

En la actualidad, el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta, Georgia, utiliza como su estándar de referencia para el serodiagnóstico de amibiasis, la prueba de IHA en la que títulos de anticuerpos menores de 1:256 se consideran negativos. Se ha demostrado que la prueba de IHA. detecta anticuerpos específicos para *Entamoeba histolytica* a títulos de >1:256 en aproximadamente el 95% de los pacientes con amibiasis extraintestinal, 70% de los pacientes con amibiasis intestinal activa y 10% de individuos portadores de quistes del parásito. Los títulos positivos pueden persistir por meses o años aún después del tratamiento, por lo que la presencia de títulos de anticuerpos no necesariamente indica una infección aguda o reciente. La especificidad de la prueba es excelente, por lo que un resultado falso positivo a títulos de >1:256, raramente ocurre (Healy, 1988).

Varios reactivos incluyendo la IHA, ensayos inmunoenzimáticos (ElA) (Knobloch y Mannvveiler, 1983) y por inmunodifusión, se encuentran disponibles comercialmente en Estados Unidos. A pesar de que la prueba de inmunodifusión es específica, es menos sensible que la prueba de IHA y requiere un mínimo de 24 horas para obtener un resultado, en cambio la IHA requiere sólo 2 horas para su realización. Las pruebas de IHA y EIA, son más recomendables para los laboratorios que frecuentemente reciben muestras para serología de amibiasis (Linn y cois., 1989).

## 1.9 Justificación

Las pruebas de diagnóstico para amibiasis invasiva existentes en el mercado, han demostrado ser útiles en zonas donde la amibiasis no es un problema endémico, sin embargo, en lugares como nuestro país donde este problema tiene todos los factores condicionantes a su favor, las pruebas desarrolladas no muestran la misma eficiencia.

Con las evidencias reunidas después de varios años de estudio, los antígenos amibianos preservados sin inhibidores enzimáticos, utilizados en la prueba de Western Blot para amibiasis invasiva (Flores-Castañeda, 1992; Flores-Castañeda, 1995), han demostrado ser la elección correcta en pruebas diagnósticas, es por esto que, el investigar' la utilidad clínica de una prueba de ELISA diseñada con estos antígenos amibianos, puede contribuir de manera importante al estudio de la amibiasis y ofrecer resultados a un costo más accesible que la prueba de Western Blot.

Varios reactivos incluyendo la IHA, ensayos inmunoenzimáticos (EIA) (Knobloch y Mannweiler, 1983) y por inmunodifusión. se encuentran disponibles comercialmente en Estados Unidos. A pesar de que la prueba de inmunodifusión es específica, es menos sensible que la prueba de IHA y requiere un mínimo de 24 horas para obtener un resultado, en cambio la IHA requiere sólo 2 horas para su realización. Las pruebas de IHA y EIA, son más recomendables para los laboratorios que frecuentemente reciben muestras para serología de amibiasis (Linn y cois., 1989).

## 1.9 Justificación

Las pruebas de diagnóstico para amibiasis invasiva existentes en el mercado, han demostrado ser útiles en zonas donde la amibiasis no es un problema endémico, sin embargo, en lugares como nuestro país donde este problema tiene todos los factores condicionantes a su favor, las pruebas desarrolladas no muestran la misma eficiencia.

Con las evidencias reunidas después de varios años de estudio, los antígenos amibianos preservados sin inhibidores enzimáticos, utilizados en la prueba de Western Blot para amibiasis invasiva (Flores-Castañeda, 1992; Flores-Castañeda. 1995), han demostrado ser la elección correcta en pruebas diagnósticas, es por esto que, el investigar la utilidad clínica de una prueba de ELISA diseñada con estos antígenos amibianos, puede contribuir de manera importante al estudio de la amibiasis y ofrecer resultados a un costo más accesible que la prueba de Western Blot.

# CAPÍTULO 2

# OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo General

Investigar la aplicación de una prueba de ELISA diseñada con antígenos amibianos preservados sin inhibidores enzimáticos.

## 2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Realizar las Pruebas de Hemaglutinación Indirecta, a los Sueros de Pacientes con Diagnóstico Presuntivo de Absceso Hepático Amibiano, de Diversas Parasitosis Intestinales o de Diversas Hepatopatías.

2.2.2 Comparar los Resultados Obtenidos en la Prueba de WB, con los Títulos de Anticuerpos Obtenidos en la Prueba de IHA para Amibiasis Invasiva.

2.2.3 Obtener la Fracción IC:MC a Partir de los Trofozoítos de *E. histolytica.*

2.2.4 Utilizar la Fracción IC:MC, como Antígeno en la Prueba de ELISA para el Diagnóstico de Amibiasis Invasiva.

# CAPÍTULO 2

# OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo General

Investigar la aplicación de una prueba de ELISA diseñada con antígenos amibianos preservados sin inhibidores enzimáticos.

## 2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Realizar las Pruebas de Hemaglutinación Indirecta, a los Sueros de Pacientes con Diagnóstico Presuntivo de Absceso Hepático Amibiano, de Diversas Parasitosis Intestinales o de Diversas Hepatopatías.

2.2.2 Comparar los Resultados Obtenidos en la Prueba de WB, con los Títulos de Anticuerpos Obtenidos en la Prueba de IHA para Amibiasis Invasiva.

2.2.3 Obtener la Fracción IC:MC a Partir de los Trofozoítos de *E. histolytica.*

2.2.4 Utilizar la Fracción IC:MC, como Antígeno en la Prueba de ELISA para el Diagnóstico de Amibiasis Invasiva.

*2.2.5* Confirmar que la Prueba de ELISA para el Diagnóstico de Amibiasis Invasiva, da Positiva con los Anticuerpos Presentes en el Suero de Sujetos con Absceso Hepático Amibiano.

2.2.6 Confirmar que la Prueba de ELISA para el Diagnóstico de Amibiasis Invasiva, no da Positiva con los Anticuerpos Presentes en el Suero de Sujetos Clínicamente Sanos, que Habitan en Zonas Endémicas.

2.2.7 Determinar la Sensibilidad, Especificidad, Exactitud y Valores Predictivos Positivo y Negativo de la Prueba de ELISA, para la Detección de Amibiasis Invasiva.

2.2.8 Comparar los Resultados Obtenidos en la Prueba de ELISA de los Sueros de Pacientes con Amibiasis Invasiva, con los Resultados de los Sueros de Individuos con Diversas Parasitosis Intestinales.

2.2.5 Confirmar que la Prueba de ELISA para el Diagnóstico de Amibiasis Invasiva, da Positiva con los Anticuerpos Presentes en el Suero de Sujetos con Absceso Hepático Amibiano.

2.2.6 Confirmar que la Prueba de ELISA para el Diagnóstico de Amibiasis Invasiva, no da Positiva con los Anticuerpos Presentes en el Suero de Sujetos Clínicamente Sanos, que Habitan en Zonas Endémicas.

2.2.7 Determinar la Sensibilidad, Especificidad, Exactitud y Valores Predictivos Positivo y Negativo de la Prueba de ELISA, para la Detección de Amibiasis Invasiva.

2.2.8 Comparar los Resultados Obtenidos en la Prueba de ELISA de los Sueros de Pacientes con Amibiasis Invasiva, con los Resultados de los Sueros de Individuos con Diversas Parasitosis Intestinales.

Los sueros utilizados en este trabajo fueron clasificados en los siguientes grupos:

GRUPO 1: En este grupo se incluyeron 66 sueros pertenecientes a pacientes con diagnóstico de AHA, demostrado por ecografía y/o tomografía axial computarizada, datos clínicos y resultado positivo en la prueba de W.B. para amibiasis invasiva.

GRUPO 2: En este grupo se incluyeron 86 pacientes con hepatopatías de diversa etiología: como carcinoma (10), hepatitis C (4), hepatitis B (1), hepatopatía alcohólica (35), quistes hepáticos (2), cirrosis (5) y otras hepatopatías (29).

GRUPO 3: En este grupo se incluyeron 87 individuos que presentaron diversas parasitosis intestinales: individuos con una parasitosis intestinal (46), dos parasitosis intestinales (20), tres parasitosis (6), cuatro parasitosis (2), con levaduras (3), examen coproparasitoscópico negativo (10).

GRUPO 4: En este grupo se incluyeron 33 sueros de sujetos clínicamente sanos, sin antecedentes de haber padecido amibiasis invasiva y con Western Blot negativo.

## 3.2 Origen de los Reactivos

Para la prueba de Hemaglutinación Indirecta se utilizó el reactivo Cellognost Amoebiasis de Behring Diagnostics GmbH (Alemania), el procedimiento se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

De Sigma (St. Louis, Mo. EUA) se adquirieron los anticuerpos antihumano marcados con peroxidasa, así como también, albúmina sérica bovina, Tween 20, y orto-feniléndiamina.

El cloruro de sodio, extracto de levadura, clorhidrato de L-cisteína, ácido ascórbico, cloruro de potasio, peróxido de hidrógeno, las vitaminas utilizadas en

el cultivo de amibas y el ácido cítrico, fueron adquiridos de la casa comercial Merck (México).

De la marca Monterrey (México), se utilizaron el fosfato dibásico de potasio, fosfato monobásico de potasio y fosfato dibásico de sodio.

La peptona de caseína fué de la marca BBL. Las placas de microtitulación para ELISA fueron de la marca Costar / Biorad. De la marca Baker se adquirieron la glucosa, el ácido sulfúrico y el etanol. De Analityka se utilizó el ácido fosfórico.

El suero bovino de adulto se adquirió en Microlab (México) y el reactivo azul brillante de Coomassie G-250 en Biorad (Hercules, CA, EUA).

## 3.3 Equipo

Para la realización de este trabajo se utilizó un potenciómetro Orion Research digital pH / millivolt meter 611, una balanza analítica (Sartorious Analytic Ac 1205), Congeladores de -40 °C y -70°C de Cryo Fridge American Scientific Products, una campana de flujo laminar (Purifier Class II Safety Cabinet) y un sistema de liofilización modelo Lyph Lock 4.5 marca Labconco, un fabricador de hielo marca Rosstemp, una incubadora modelo CI-46 de American Scientific Products (Water Jacketed Incubator), un microscopio Carl-Zeiss, una centrífuga marca Beckman modelo J-6B, un invertoscopio Zeiss West Germany, un espectrofotómetro modelo 340 de Sequoia Turner Corporation, una plancha-agitador Pyro-magnestir Lab-line modelo 1179, un sonicador (Virsonic 300) de The Virtis Company Inc., un agitador de placas de ELISA (Micro-Shaker II) de Dynatech Products y un Lector de ELISA (Benchmark Microplate Reader) de la marca BIORAD.

## 3.4 Prueba de Hemaglutinación Indirecta

Esta prueba se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Behring Diagnostics GmbH, Alemania) y se practicó a todos los sueros incluidos en el estudio, pertenecientes a pacientes con AHA, diversas hepatopatías y sujetos con parasitosis intestinales. Los resultados obtenidos fueron comparados con los de la pruebas de Western Blot y ELISA.

### 3.4.1 Reactivos de la Prueba Cellognost Amoebiasis.

1. Cellognost Amoebiasis (Reactivo de amebiasis IHA): Liofilizado, integrado por eritrocitos O humanos estabilizados. Estos eritrocitos han sido sensibilizados con antígeno soluble purificado de *E. histolytica* cepa HK-9.
2. Suero control positivo de la amebiasis: Es un inmunosuero de cabra, liofilizado.
3. Suero control negativo parasitológico: Es una fracción estabilizada de suero humano.
4. Solución tampón tris pH 8.0: Tris-(hidroximetil-)aminometano 0.1 M con suero inactivado de conejo como estabilizador.

### 3.4.2 Preparación de Reactivos de IHA.

1. Reconstituir el reactivo IHA en la cantidad de agua destilada indicada en la etiqueta, agitar suavemente e incubar a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C) por lo menos dos horas o, mejor aún, toda la noche entre 2 y 8 °C. Después de este procedimiento el reactivo está listo para su uso.
2. Diluir el suero control positivo en la cantidad de agua destilada indicada en la etiqueta.

## 3.4 Prueba de Hemaglutinación Indirecta

Esta prueba se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Behring Diagnostics GmbH, Alemania) y se practicó a todos los sueros incluidos en el estudio, pertenecientes a pacientes con AH A, diversas hepatopatías y sujetos con parasitosis intestinales. Los resultados obtenidos fueron comparados con los de la pruebas de Western Blot y ELISA.

### 3.4.1 Reactivos de la Prueba Cellognost Amoebiasis.

1. Cellognost Amoebiasis (Reactivo de amebiasis IHA): Liofilizado, integrado por eritrocitos O humanos estabilizados. Estos eritrocitos han sido sensibilizados con antígeno soluble purificado de *E. histolytica* cepa HK-9.
2. Suero control positivo de la amebiasis: Es un inmunosuero de cabra, liofilizado.
3. Suero control negativo parasitológico: Es una fracción estabilizada de suero humano.
4. Solución tampón tris pH 8.0: Tris-(hidroximetil-)aminometano 0.1 M con suero inactivado de conejo como estabilizador.

### 3.4.2 Preparación de Reactivos de IHA.

1. Reconstituir el reactivo IHA en la cantidad de agua destilada indicada en la etiqueta, agitar suavemente e incubar a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C) por lo menos dos horas o, mejor aún, toda la noche entre 2 y 8 °C. Después de este procedimiento el reactivo está listo para su uso.
2. Diluir el suero control positivo en la cantidad de agua destilada indicada en la etiqueta.

3. El suero control negativo y la solución tampón están listos para su uso.

### 3.4.3 Determinación Cuantitativa de Anticuerpos anti- *Entamoeba histolytica.*

1. Colocar sobre una base húmeda, una placa de microtitulación de 96 pozos con fondo en "V".
2. Realizar a cada uno de los sueros a probar y al suero control positivo, las diluciones especificadas por el proveedor del reactivo: colocar 100 pL de suero control positivo prediluído 1:8 en solución tampón tris pH 8.0 o suero del paciente, en los pozos 1A hasta 1H. En los pozos restantes, a excepción de Al2, se colocan 50 pL de solución tampón tris. En A12 se aplican 50 pL de suero control negativo prediluído 1:16.
3. Mediante traspaso de 50 pL de la fila 1 correspondiente, por medio de pipeta multicanal o de microdilutores precalibrados, se obtienen series geométricas de diluciones; el suero control positivo en la fila A se diluye solamente hasta la cavidad 10 que corresponde a la dilución 1:4096.
4. Agregar 25 pL del reactivo preparado IHA en los pozos de la fila No. 2 hasta la fila No. 12, que corresponden a las diluciones a partir de 1:16.
5. Mezclar la placa manualmente o con un agitador.
6. Dejar reposar a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C) sobre una superficie exenta de vibraciones.
7. Leer después de 2 a 3 horas.

### 3.4.4 Lectura y Valoración de Resultados.

1. La lectura no debe efectuarse antes de transcurridas dos horas de la iniciación de la prueba. La observación se realiza sobre un fondo blanco o con la ayuda de un espejo.

2. La prueba tiene valor cuando el suero control positivo alcanza el título de 1:512 indicado (± 1 grado en la escala de dilución), el suero control negativo reacciona negativamente y las células en el control del reactivo IHA han sedimentado.
3. Para la interpretación debe utilizarse el control negativo y se realiza de la siguiente manera:

   -Resultado positivo: aglutinación completa de las células (formación en tapiz).

   -Resultado positivo débil: aglutinación con formación anular.

   -Resultado negativo: sedimentación de las células (formación puntiforme o anular').

## 3.5 Origen de la Cepa

Se utilizaron trofozoítos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HMLIMSS, proporcionados por el Dr. Armando Isibasi Araujo de la Unidad de Investigación en Inmunoquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

## 3.6 Cultivo de *Entamoeba histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* fueron cultivados en medio axénico TYI-S-33 (Diamond, 1978).

### 3.6.1 Preparación de la Base TYI.

Para preparar la base TYI, se pesaron las siguientes sustancias: 1.0 g de fosfato dibásico de potasio, 0.6 g de fosfato monobásico de potasio, 2.0 g de cloruro de sodio, 20.0 g de peptona de caseína digerida, 10.0 g de extracto de levadura, 10.0 g de glucosa, 1.0 g de clorhidrato de L-cisteína, 0.2 g de ácido ascórbico y 22.8 mg de citrato de amonio férrico. Posteriormente, se disolvieron en un volumen final de 800 mL de agua destilada o desionizada y se ajustó el pH a 6.8 con hidróxido de sodio 1N.

Se colocaron 11 mL de la base TYI en tubos de borosilicato de 16 x 125 mm con tapón de rosca y fondo redondo, después se procedió a esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 Ib de presión durante 15 min.

### 3.6.2 Preparación de la Mezcla Vitamínica #18.

Para la mezcla vitamínica #18, se deben preparar las siguientes soluciones:

A) Pesar 45.0 mg de niacinamida, 4.0 mg de clorhidrato de piridoxal, 23.0 mg de pantotenato de calcio, 5.0 mg de clorhidrato de tiamina y 1.2 mg de vitamina B12. Se disuelven y se llevan a un volumen final de 25 mL con agua destilada.

B) Disolver 7.0 mg de Riboflavina en agua utilizando la mínima cantidad de Hidróxido de sodio 0.1 N y llevar a un volumen final de 45 mL con agua destilada.

C) Disolver 5.5 mg de Ácido fólico en agua utilizando la mínima cantidad de Hidróxido de sodio 0.1 N y llevar a un volumen final de 45 mL con agua destilada.

D) Disolver 2.0 mg de D-Biotina en agua y llevar a un volumen final de 45 mL con agua destilada.

E) Disolver 1.0 mg de DL-6-8 Acido tióctico en 5 mL de etanol al 95 %, agregar 500 mg de Tween 80 y llevar a un volumen final de 30 nrL con agua destilada.

Mezclar las soluciones A, B. C y D, homogenizar. posteriormente agregar la solución E y llevar a un volumen final de 200 mL con agua destilada. La mezcla vitamínica obtenida debe ser esterilizada utilizando filtro de 0.22 pm.

### 3.6.3 Preparación del Medio de Cultivo TYI-S-33.

Para preparar el medio TYI-S-33, se agregaron 0.25 mL de la mezcla vitamínica #18 y LO mL de suero bovino adulto a cada uno de los tubos de borosilicato de 16 x 125 mm con tapón de rosca y fondo redondo, conteniendo la base TYI.

### 3.6.4 Resiembra de Trofozoítos de *E. histolytica.*

1. Colocar en baño de hielo durante 5 minutos, los tubos conteniendo el cultivo de *E. histolytica* en fase logarítmica.
2. Invertir los tubos varias veces y homogenizar su contenido.
3. Inocular asépticamente los tubos con medio de cultivo TYI-S-33, agregándoles 2 mL del cultivo de *E. histolytica.*
4. Incubar los tubos a 36.6 °C de temperatura y con una inclinación de 5$^{o}$ con respecto al eje horizontal, durante 72-96 horas.

### 3.6.5 Obtención de Trofozoítos de *E. histolytica.*

1. Colocar en baño de hielo durante 5 minutos, los tubos conteniendo el cultivo de *E. histolytica.*
2. Homogenizar por inversión el contenido de los tubos y vaciarlo en tubos cónicos de 50 mL para centrífuga.

3. Centrifugar en frío a 1500 rpm durante 10 minutos.
4. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento.
5. Lavar los trofozoítos con solución salina de fosfatos 0.15 M, pH de 7.2-7.4 (PBS) y centrifugar bajo las condiciones antes mencionadas.
6. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento.
7. Lavar 2 veces más utilizando PBS.
8. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento.
9. Colocar el sedimento resuspendido en viales para liofilización.
10. Congelar inmediatamente el contenido del vial, colocándolo en una mezcla de gas carbónico solidificado y acetona, ésta última se agrega sobre el hielo seco hasta cubrirlo completamente.
11 .Liofilizar inmediatamente.

3.6.6 Liofilización de Trofozoítos de *E. histolytica.*

1. Encender la liofilizadora y esperar a que la cantidad de vacío formada sea la adecuada.
2. Colocar con mucha precaución, los viales conteniendo los trofozoítos de *E. histolytica* congelados.
3. ' Permitir que el proceso de secado se realice hasta que la muestra haya sido correctamente liofilizada.
4. Sellar correctamente los viales conteniendo el material de *E. histolytica* hasta que la preservación de los antígenos amibianos se realice.

3.6.7 Lavado del Material de Vidrio Utilizado en el Cultivo de *E. histolytica.*

L Lavar con extrán las pipetas, tubos y botellas de vidrio a utilizar en el cultivo de *E. histolytica.*

*2.* Enjuagar con agua corriente y escurrir.

3. Colocar el material en una solución de cloro al *1%* durante 12-24 horas.
4. Enjuagar con agua corriente y escurrir.
5. Colocar el material en una solución de ácido clorhídrico al 1% durante 12-24 horas.
6. Lavar con abundante agua corriente y posteriormente con agua destilada.
7. Secar los tubos en el horno a 180 °C de temperatura durante 1 hora.

## 3.7 Preservación de los Antígenos de *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* fueron preservados antigénicamente de acuerdo al procedimiento desarrollado por Llores-Castañeda y se obtuvo la fracción IC:MC, caracterizada por poseer una baja actividad proteolítica y antígenos estables por períodos de tiempo prolongados (Llores-Castañeda, 1992; Llores-Castañeda, 1995).

## 3.8 Determinación de la Concentración de Proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método descrito por Bradford en 1976. Este método emplea como colorante el azul brillante de Coomassie G-250 (CBB G-250) cuya unión con las proteínas puede ser medida espectrofotométricamente determinando su absorbancia a 595 nra.

Este procedimiento es muy sensible trabajando en el rango de 0.2 - 1.4 mg de proteína por mL para el ensayo estándar y de 5 - 100 mg de proteína por mL en el microensayo.

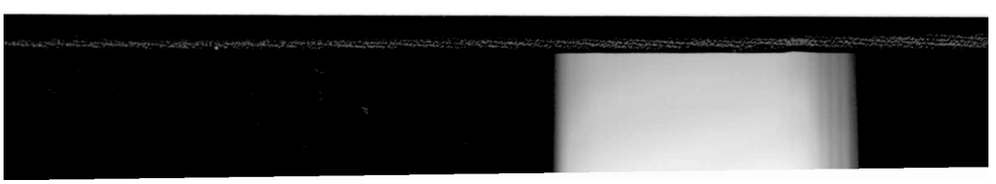
3.8.1 Procedimiento Estándar.

1. Preparar un stock de albúmina sérica bovina (ASB stock) a una concentración de 1 mg/mL de proteína.
2. Preparar una serie de estándares de albúmina de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL de proteína para realizar una curva de calibración.
3. Colocar 100 pL de los estándares de albúmina preparados anteriormente y de la muestra problema (conteniendo de pg/mL de proteína) en tubos de vidrio de 13 x 100 mm.
4. Agregar 5.0 mL de reactivo de Bradford a cada uno de los tubos incluidos en el ensayo.
5. Homogenizar correctamente.
6. Dejar reposar durante 30 min a temperatura ambiente.
7. Medir la absorbancia a 595 nm contra un blanco preparado con 0.1 mL de PBS y 5.0 mL de reactivo de Bradford.

## 3.9 Prueba de ELISA (Flores-Castañeda, 1999)

3.9.1 Preparación de Antígeno de *E. histolytica* para ELISA.

1. Pesar- 10 mg de antígeno de *E. histolytica* preservado antigénicamente.
2. Resuspender el antígeno en solución amortiguadora.
3. Hervir.
4. Enfriar-.
5. Sonicar.
6. Centrifugar.
7. Decantar el sobrenadante.



3.8.1 Procedimiento Estándar.

1. Preparar un stock de albúmina sérica bovina (ASB stock) a una concentración de 1 mg/mL de protema.
2. Preparar una serie de estándares de albúmina de 0.2. 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL de protema para realizar una curva de calibración.
3. Colocar 100 pL de los estándares de albúmina preparados anteriormente y de la muestra problema (conteniendo de pg/mL de proteína) en tubos de vidrio de 13 x 100 mm.
4. Agregar 5.0 mL de reactivo de Bradford a cada uno de los tubos incluidos en el ensayo.
5. Homogenizar correctamente.
6. Dejar reposar durante 30 min a temperatura ambiente.
7. Medir la absorbancia a 595 nm contra un blanco preparado con 0.1 mL de PBS y 5.0 mL de reactivo de Bradford.

## 3.9 Prueba de ELISA (Flores-Castañeda, 1999)

3.9.1 Preparación de Antígeno de ***E. histolytica*** para ELISA.

1. Pesar 10 mg de antígeno de *E. histolytica* preservado antigénicamente.
2. Resuspender el antígeno en solución amortiguadora.
3. Hervir.
4. Enfriar.
5. Sonicar.
6. **Centrifugar.**
7. Decantar el sobrenadante.

8. Determinar la concentración de proteínas en el sobrenadante.

### 3.9.2 Anticuerpos Conjugados Utilizados en ELISA.

Durante el proceso de estandarización de la prueba de ELISA para amibiasis invasiva, se probaron los siguientes anticuerpos anti-gamma globulinas humanas, conjugados con peroxidasa:

a) IgG de conejo anti-inmunoglobulinas humanas diluido 1:20 000.
b) IgG de conejo anti-inmunoglobulinas humanas diluido 1:60 000.
c) IgG de cabra anti-inmunoglobulinas humanas diluido 1:7 000.
d) IgG de cabra anti-inmunoglobulinas humanas diluido 1:14 000.
e) Inmunoglobulinas de cabra anti-IgA humana (cadena alfa) diluido 1:5 000.
f) IgG de cabra anti-IgM humana (cadena p) diluido 1:20 000.
g) Inmunoglobulinas de cabra anti-IgG humana (cadena a) diluido 1:10 000.

### 3.9.3 Procedimiento de ELISA.

1. Colocar el antígeno de *E. histolytica,* en cada pozo de una placa de microtitulación de fondo plano.
2. Incubar a 4°C.
3. Ambientar la placa y decantar el contenido sobre una tira de papel absorbente.
4. Realizar 3 lavados con 300 pL de solución de lavado (PBS 0.1M pH 7.2-7.4 + Albúmina sérica bovina al 0.01% + Tween 20 al 0.05%).
5. Agregar solución bloqueadora (PBS 0.1M pPI 7.2-7.4 + Albúmina sérica bovina al 3% + Tween 20 al 0.05%).
6. Incubar durante 1 hora a 37°C.
7. Realizar 3 lavados con 300 pL de solución de lavado.
8. Agregar el suero del paciente diluido 1:100 en solución de lavado.

8. Determinar la concentración de proteínas en el sobrenadante.

### 3.9.2 Anticuerpos Conjugados Utilizados en ELISA.

Durante el proceso de estandarización de la prueba de ELISA para amibiasis invasiva, se probaron los siguientes anticuerpos anti-gamma globulinas humanas, conjugados con peroxidasa:

a) IgG de conejo anti-inmunoglobulinas humanas diluido 1:20 000.
b) IgG de conejo anti-inmunoglobulinas humanas diluido 1:60 000.
c) IgG de cabra anti-inmunoglobulinas humanas diluido 1:7 000.
d) IgG de cabra anti-inmunoglobulinas humanas diluido 1:14 000.
e) Inmunoglobulinas de cabra anti-IgA humana (cadena alfa) diluido 1:5 000.
f) IgG de cabra anti-IgM humana (cadena p) diluido 1:20 000.
g) Inmunoglobulinas de cabra anti-IgG humana (cadena a) diluido 1:10 000.

### 3.9.3 Procedimiento de ELISA.

1. Colocar el antígeno de *E. histolytica,* en cada pozo de una placa de microtitulación de fondo plano.
2. Incubar a 4°C.
3. Ambientar la placa y decantar el contenido sobre una tira de papel absorbente.
4. Realizar 3 lavados con 300 pL de solución de lavado (PBS 0.1M pH 7.2-7.4 + Albúmina sérica bovina al 0.01% + Tween 20 al 0.05%).
5. Agregar solución bloqueadora (PBS 0.1M pPI 7.2-7.4 + Albúmina sérica bovina al 3% + Tween 20 al 0.05%).
6. Incubar durante 1 hora a 37°C.
7. Realizar 3 lavados con 300 pL de solución de lavado.
8. Agregar el suero del paciente diluido 1:100 en solución de lavado.

9. Incubar a 37°C.
10. Realizar 3 lavados igual que en el paso 4).
11 .Agregar los anticuerpos polivalentes anti-gamma globulinas humanas conjugados con peroxidasa, diluidos en solución de lavado.
12.Incubar a 37°C.
13. Realizar 3 lavados igual que en el paso 4).
14. Agregar 100 pL de sustrato - cromógeno (solución amortiguadora de citratos 0.1 M pH 5.0 + o-feniléndiamina + peróxido de hidrógeno).
15.Incubar en la oscuridad.
16. Agregar 40 pL de $H,S0_4$ 1 N.
17. Determinar la absorbancia a 490 nm, en un lector de ELISA.

El procedimiento se realizó de acuerdo a la patente obtenida por Flores-Castañeda en 1999. Se analizaron por ELISA los sueros de pacientes con AH A, de individuos con diversas parasitosis intestinales y de sujetos sanos.

3.9.4 Determinación de Indices de absorbancia en la prueba de ELISA.

La determinación de índices de absorbancia se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$IA = \frac{ABS\ AH\ A}{ABS\ CN}$$

donde:

IA = Indice de absorbancia.

ABS AH A = Valor de absorbancia del suero de AH A en la prueba de ELISA.

ABS CN = Valor de absorbancia del suero control negativo (perteneciente a sujetos sanos del grupo 4) en la prueba de ELISA.

### 3.9.5 Determinación de las Unidades de ELISA.

Las Unidades de ELISA para los sueros de pacientes con AHA. sujetos clínicamente sanos e individuos con diversas parasitosis intestinales, fueron obtenidas con la siguiente ecuación:

$$UE = \frac{100}{0.060} \times D.O.\ Pb$$

donde:

UE = unidades de ELISA.

100 = valor constante en la ecuación.

0.060 = densidad óptica obtenida a 490 nm, con el suero control positivo de AHA.

D.O. Pb = densidad óptica obtenida a 490 nm, con la muestra problema.

### 3.9.6 Interpretación de los Resultados.

El valor de corte en la prueba de ELISA para amibiasis invasiva se estableció en 80 UE. Un resultado superior a 80 UE en la prueba de ELISA para amibiasis invasiva, se interpreta como positivo y un valor inferior a 80 UE se considera negativo. Los sueros con 80 UE se consideran indeterminados ya que se encuentran en una zona gris que no permite identificarlos como positivos o negativos.

### 3.9.7 Determinación de Parámetros para la Prueba de ELISA.

Con los resultados obtenidos en los ensayos realizados se determinaron los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor

predictivo negativo y exactitud, correspondientes a la prueba de ELISA para amibiasis invasiva. Para llevar a cabo estas determinaciones se utilizaron las siguientes ecuaciones (Friedman, 1987):

| Prueba de ELISA | Amibiasis invasiva | Otro diagnóstico |
|---|---|---|
| Positivo | (a) | (b) |
| Negativo | ( c ) | (d) |

Donde:

Sensibilidad = ( a / a + c ) x 100

Especificidad = ( d / b + d ) x l 0 0

Valor predictivo positivo = ( a / a + b ) x 100

Valor predictivo negativo = ( d / d + c ) x l 0 0

Exactitud = (a + d/ a + b + c + d)x 100

## 3.10 Evaluación de los Resultados.

Se estimó el rendimiento diagnóstico de las pruebas de IHA y WB. Las comparaciones se realizaron con la prueba de $X^1$ con corrección de Yates y la diferencia se consideró significativa al obtener un valor de $p < 0.05$ bimarginal.

predictivo negativo y exactitud, correspondientes a la prueba de ELISA para amibiasis invasiva. Para llevar a cabo estas determinaciones se utilizaron las siguientes ecuaciones (Friedman, 1987):

| Prueba de ELISA | Amibiasis invasiva | Otro diagnóstico |
|---|---|---|
| Positivo | (a) | (b) |
| Negativo | (c ) | (d) |

Donde:

Sensibilidad = ( a / a + c ) x 1 0 0

Especificidad = ( d / b + d ) x 1 0 0

Valor predictivo positivo = ( a / a + b ) x 1 0 0

Valor predictivo negativo = ( d / d + c ) x 1 0 0

Exactitud = ( a + d / a + b + c + d ) x 1 0 0

## 3.10 Evaluación de los Resultados.

Se estimó el rendimiento diagnóstico de las pruebas de IHA y WB. Las comparaciones se realizaron con la prueba de $X^2$ con corrección de Yates y la diferencia se consideró significativa al obtener un valor de $p < 0.05$ bimarginal.

# CAPÍTULO 4

# RESULTADOS

## 4.1 Hemaglutinación Indirecta

### TABLA 1

### RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE IHA CON SUEROS DE PACIENTES CON AHA, DIVERSAS HEPATOPATÍAS O PARASITOSIS INTESTINAL

| Títulos en IHA | Sueros de pacientes con | | |
|---|---|---|---|
| | AHA n = 66 | Hepatopatía n = 86 | Parasitosis intestinal n = 87 |
| < 1:256 | 12 | 86 | 82 |
| 1:256 | 0 | 0 | 3 |
| 1:512 | 11 | 0 | 2 |
| 1:1024 | 4 | 0 | 0 |
| 1:2048 | 7 | 0 | 0 |
| 1:4096 | 27 | 0 | 0 |
| 1:8192 | 2 | 0 | 0 |
| 1:16384 | 3 | 0 | 0 |

De acuerdo a las especificaciones del reactivo de IHA para amibiasis invasiva, títulos de anticuerpos >1:256 son considerados como positivos, sin

embargo, en zonas endémicas de amibiasis como nuestro país, se requieren títulos >1:512 para la interpretación de un resultado positivo.

Considerando como valor de corte títulos de 1:256. de los 66 sueros de pacientes con AHA analizados, 12 dieron resultado negativo y 54 positivo. Por otra parte, si tomamos como valor de corte títulos de 1:512, en este estudio se encontró que, 54 sueros de los pacientes con AHA dieron positiva la prueba y el resto mostró un resultado negativo.

La tabla 1 nos muestra que con los sueros analizados por IHA en este trabajo, coincidentalmente se obtuvo el mismo número de resultados positivos utilizando ambos valores de corte para la prueba (1:256 y 1:512), esto se debe a que ningún suero con AHA mostró títulos de anticuerpos de 1:256, los 54 sueros positivos en la prueba presentaron títulos > 1:512.

Los 86 sueros de pacientes con diversas hepatopatías y prueba de WB negativa para amibiasis invasiva, dieron negativa la prueba de IHA (títulos <1:256). De los individuos con parasitosis intestinal (n=87), 82 tuvieron un resultado negativo en la prueba de IHA, 3 fueron positivos con títulos de 1:256 y 2 presentaron títulos de 1:512.

Es importante tomar en cuenta que 5 de los 87 individuos con parasitosis intestinal, dieron positiva la prueba de IHA (títulos de anticuerpos >1:256) y todos ellos reportaron un solo parásito intestinal en su examen coproparasitoscópico.

## TABLA 2

## COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE IHA EN EL SUERO DE SUJETOS CON PARASITOSIS INTESTINAL CON LOS OBTENIDOS EN EL EXAMEN COPROPARASITOSCÓPICO

| No. sujetos analizados | Títulos en IHA | Examen coproparasitoscópico |
|---|---|---|
| 1<br>9 | 1:256<br>< 1:256 | ***Blastocystis hominis*** |
| 1<br>9 | 1:256<br>< 1:256 | ***Giardia duodenalis*** |
| 1<br>1<br>3 | 1:256<br>1:512<br>< 1:256 | ***Hymenolepis nana*** |
| 1<br>2 | 1:512<br>< 1:256 | ***Ascaris lumbricoides*** |

El examen coproparasitoscópico de los individuos con IHA positiva, mostró la presencia de un solo parásito intestinal en cada caso (Rodríguez- Pérez y cois., 1999). De los 87 sueros de sujetos con parasitosis intestinal analizados, 5 dieron positiva la prueba de IHA (títulos de IHA >1:256), los 82 restantes tuvieron un resultado negativo.

En la tabla 2 podemos apreciar que de 10 individuos infectados con ***Blastocystis hominis,*** sólo 1 tuvo títulos de IHA =1:256 y 9 dieron negativa la prueba. Esto mismo ocurre en el caso de los individuos infectados con ***Giarclia duodenalis.***

De un total de 5 sujetos con examen CPS positivo para ***Hymenolepis nana,*** 2 mostraron positiva la prueba de IHA y 3 fueron negativos. En el caso de los individuos parasitados con ***Ascaris Iumbricoides***, 1 resultó positivo en la prueba y 2 más dieron resultado negativo.

## 4.2 Comparación de las Pruebas de IHA y WB

### TABLA 3

### COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS DE IHA Y WB, EN SUEROS DE PACIENTES CON AHA O CON DIVERSAS HEPATOPATÍAS

| Sueros de pacientes | IHA 1:256 | IHA 1:512 | Western Blot |
|---|---|---|---|
| | + | + | + |
| AHA + (n = 66) | 54 12 | 54 12 | 66 0 |
| AHA- (n = 86) | 0 86 | 0 86 | 0 86 |

La comparación de las pruebas de IHA y WB, se efectuó con los resultados en W.B. obtenidos en los sueros de pacientes con AHA (n=66) y con hepatopatías de diversa etiología (n=86), realizados por Tamez-Treviño y cois.

Los resultados en la tabla 3, muestran que si utilizamos títulos de 1:256 como valor de corte para la prueba de IHA (como lo indica el proveedor del reactivo), en lugar de títulos de 1:512 (considerados como positivos en zonas endémicas de amibiasis), la sensibilidad y especificidad de la prueba no varían ya que con ambos valores de corte se obtuvo el mismo número de sueros positivos y negativos. Lo anterior se explica con los resultados mostrados en la tabla 1, donde se aprecia que ninguno de los sueros de pacientes con AHA utilizados en este trabajo obtuvo títulos de 1:256, ya que los 54 sueros positivos en IHA presentaron títulos de anticuerpos >1:512.

## 4.2 Comparación de las Pruebas de IHA y VVB

### TABLA 3

### COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS DE IHA Y WB, EN SUEROS DE PACIENTES CON AHA O CON DIVERSAS HEPATOPATÍAS

| Sueros de pacientes | IHA 1:256 + | IHA 1:512 + | Western Blot + |
|---|---|---|---|
| AHA + (n = 66) | 54 12 | 54 12 | 66 0 |
| AHA- (n = 86) | 0 86 | 0 86 | 0 86 |

La comparación de las pruebas de IHA y WB, se efectuó con los resultados en W.B. obtenidos en los sueros de pacientes con AHA (n=66) y con hepatopatías de diversa etiología (n=86), realizados por Tamez-Treviño y cois.

Los resultados en la tabla 3, muestran que si utilizamos títulos de 1:256 como valor de corte para la prueba de IHA (como lo indica el proveedor del reactivo), en lugar de títulos de 1:512 (considerados como positivos en zonas endémicas de amibiasis), la sensibilidad y especificidad de la prueba no varían ya que con ambos valores de corte se obtuvo el mismo número de sueros positivos y negativos. Lo anterior se explica con los resultados mostrados en la tabla 1, donde se aprecia que ninguno de los sueros de pacientes con AHA utilizados en este trabajo obtuvo títulos de 1:256, ya que los 54 sueros positivos en IHA presentaron títulos de anticuerpos >1:512.

Así también, la tabla 3 nos permite apreciar que la prueba de IHA es superada de manera notoria por la prueba de Western blot, ya que ésta última detectó el 100 % de los sueros de pacientes con AHA utilizados y reveló un resultado negativo en el 100% de los sueros de pacientes con hepatopatía.

## TABLA 4

## COMPARACIÓN DE LAUTILIDAD CLÍNICA DE LAS PRUEBAS DE IHA Y WB

| Parámetro | IHA* 1:256 | Western Blot |
|---|---|---|
| Sensibilidad | 81.8 % | 100% |
| Valor predictivo positivo | 100 % | 100% |
| Valor predictivo negativo | 87.7 % | 100 % |
| Especificidad | 100 % | 100 % |
| Exactitud | 92.1 % | 100 % |

* Valor de corte en IHA = 1:256.

Los parámetros de la tabla 4 fueron calculados en base a los resultados obtenidos en las pruebas de IHA y WB, realizadas a 66 sueros de pacientes con AHA y 86 con diversas hepatopatías. Apreciamos como la prueba de Western Blot fué superior que la prueba de IHA, mostrando una exactitud del 100%, mientras que la de IHA muestra una exactitud del 92.1%. La sensibilidad y el valor predictivo negativo también son menores en la prueba de IHA con respecto a los valores del W.B.

## 4.3 Estandarización de la Prueba de ELISA

La fracción IC:MC obtenida a partir de los trofozoítos liofilizados de *Entamoeba histolytica,* fué sometida a varios procesos en los que se utilizaron diferentes soluciones amortiguadoras y condiciones, con el fin de encontrar el método más apropiado que permitiera recuperar la mayor cantidad posible de proteínas y al mismo tiempo, proporcionara las condiciones adecuadas para que dichas proteínas pudieran ser utilizadas como antígeno en la prueba de ELISA para amibiasis invasiva.

### TABLA 5

### RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA PREPARACIÓN DE ANTÍGENO DE *E. histolytica,* EN DIVERSOS AMORTIGUADORES

| Procesamiento de la fracción IC:MC | | | | | pg de proteína obtenidos por cada 10 mg de IC:MC |
|---|---|---|---|---|---|
| Solución amortiguadora utilizada | E | S | C | Sb | |
| Solución salina de fosfatos 0.1 M pH 7.2-7.4 | + | + | + | + | 176.05 |
| Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, 2-mercaptoetanol (2ME) | + | . | + | + | 2,047.5 |
| Carbonates pH 9.6 | + | + | + | + | 805.22 |
| Carbonates pH 9.6, 2ME 0.1M | + | + | + | + | 291.60 |
| Carbonates pH 9.6, 2ME, urea 8M | + | + | + | + | 1,386.2 |
| Acetatos 0.1 M pH 5.0 | + | + | + | + | 150.72 |
| Acetatos 0.1 M pH 5.0, 2ME 0.1 M, urea 8M | + | + | + | + | 907.76 |

E= Ebullición, S=Sonicación, C= Centrifugación
Sb= Obtención del sobrenadante

Las soluciones amortiguadoras que se utilizaron en este trabajo para procesar la fracción IC:MC, se muestran en la tabla 5. De todas ellas, se eligió la solución de carbonates pH 9.6-2ME-urea para el tratamiento del antígeno amibiano, ya que además de aportar' las condiciones adecuadas para que las proteínas amibianas fueran reconocidas de manera eficiente, por los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con AHA; proporcionó un rendimiento adecuado en cuanto a la recuperación de proteínas a partir de los extractos amibianos.

## TABLA 6

## ÍNDICES DE ABSORBANCIA EN ELISA, UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTÍGENO EN SOLUCIÓN DE CARBONATOS

| Sueros analizados* | Concentración de antígeno | | |
|---|---|---|---|
| AHA | 100 pg/mL | 50 pg/mL | 25 pg/mL |
| 7 | 2.7 ±0.06 | 2.6 ±0.77 | 2.4 ±0.14 |
| 11 | 2.0 ±0.30 | 2.0 ±0.32 | 1.9 ± 0.11 |
| 65 | 1.9 ± 0.11 | 2.0 ±0.32 | 1.8 ± 0.14 |

* Se usó como control negativo el suero No. 1.

Los índices de absorbancia presentados en la tabla 6 fueron calculados utilizando la ecuación descrita en el punto 3.9.4, a partir de las lecturas de absorbancia que presentaron los 3 sueros de pacientes con AHA (7, 11 y 65) y el suero control negativo No. 1 utilizados. El IA nos muestra cuántas veces es mayor la absorbancia obtenida por los sueros de los pacientes con AHA, con respecto al suero 1 empleado como control negativo. Los valores registrados, representan el promedio ± una desviación estándar, de los índices de absorbancia

obtenidos por cada uno de los sueros de pacientes utilizados en tres ensayos de ELISA realizados simultáneamente.

En la tabla 6 podemos apreciar que la reacción antígeno-anticuerpo, se mostró igualmente eficiente entre las concentraciones de 100, 50 y 25 pg de proteína/mL, utilizadas como antígeno en la prueba, por lo que se consideró que la concentración de 25 pg/mL era la más - apropiada al permitir mayor optimización del antígeno amibiano.

## TABLA 7

## ÍNDICES DE ABSORBANCIA EN ELISA, UTILIZANDO DIFERENTES DILUCIONES DE LOS SUEROS DE LOS PACIENTES

| Sueros analizados* | Dilución de suero 1:100 | | Dilución de suero 1:50 | |
|---|---|---|---|---|
| AHA | 50 pg/ml | 25 pg/mL | 50 pg/mL | 25 pg/mL |
| 7 | 2.3 | 2.3 | 1.5 | 1.5 |
| 11 | 1.8 | 1.8 | 1.3 | 1.2 |
| 65 | 1.9 | 1.8 | 1.4 | 1.3 |

* Se usó como control negativo el suero No. 1.

Después de elegir la concentración apropiada de antígeno para la realización de la prueba de ELISA, se decidió investigar la dilución del suero de los pacientes que permitiera en la determinación, una reacción antígeno-anticuerpo eficiente.

En la tabla 7 se muestran los índices de absorbancia calculados a partir de las lecturas obtenidas a 490 nm, en 3 sueros de pacientes con AHA (7, 11 y 65) diluidos 1:100 y 1:50 con respecto al suero control negativo No. 1, el cual se utilizó a la misma dilución que los problemas en cada ensayo. Se empleó como antígeno, la fracción IC:MC a la concentración de 50 y 25 pg de proteína/mL.

Como ya se había mencionado anteriormente, los índices de absorbancia más convenientes en la determinación serán aquellos que registren los valores más altos. Por lo tanto, al analizar los datos de la tabla 7 podemos ver que los mejores resultados en la prueba se obtienen utilizando el antígeno amibiano a la concentración de 25 pg de proteína/mL y el suero de los pacientes diluido 1:100.

## TABLA 8

## ÍNDICES DE ABSORBANCIA EN ELISA, UTILIZANDO DIFERENTES ANTICUERPOS CONJUGADOS CON PEROXIDASA Y ALBÚMINA COMO BLOQUEADOR

| Sueros analizados | | Conju gados utilizados t / sus diluciones | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | I | | II | | III | IV | V |
| AHA | SCN | 1:20 000 | 1:60 000 | 1:7 000 1 | 14 000 | 1:5 000 | 1:20 000 | 1:10 000 |
| 7 | 1 | 3.4 | 6.8 | 6.1 | 15 | 9 | 2 | 26 |
| 7 | 2 | 3.4 | 9.6 | 5.6 | 4.5 | 2.2 | 2.7 | 6 |
| 11 | 1 | 2.7 | 3.5 | 4.4 | 11 | 2.5 | 1.4 | 19 |
| 11 | 2 | 2.7 | 5 | 4 | 3.1 | 0.6 | 1.9 | 4.4 |

I = IgG de conejo anti-Inmunoglobulinas humanas, II = IgG de cabra anti-Ig humanas, III = Inmunoglobulina de cabra anti-IgA humana, IV = IgG de cabra anti-IgM humana, V = Inmunoglobulina de cabra anti-IgG humana, SCN1 = Suero control negativo No. 1, SCN2 = Suero control negativo No. 2.

El calcular índices de absorbancia en los ensayos de ELISA, permitió determinar cuáles eran los anticuerpos conjugados con peroxidasa que permitían establecer mayor diferencia entre los sueros de pacientes con AHA de los sueros de sujetos sanos. Sabemos que conforme aumenta el IA, se incrementa la diferencia entre las absorbancias obtenidas con los sueros de AHA y las obtenidas con los sueros de controles negativos, por lo tanto los anticuerpos conjugados

más recomendables para usarse en la determinación, serían aquellos que mostraran los índices de absorbancia más altos.

Los índices de absorbancia descritos en la tabla 8 fueron obtenidos a partir de las lecturas de absorbancia registradas por dos sueros de pacientes con AHA (7 y 11) y dos sueros controles negativos (1 y 2). Se utilizó como agente bloqueador la albúmina sérica bovina y como anticuerpos conjugados, los mencionados en el punto 3.9.2 del capítulo de materiales y métodos.

La tabla 8 nos muestra que las determinaciones que presentaron índices de absorbancia mayores, son aquellas en que se utilizaron como segundo anticuerpo los conjugados de Ig de cabra anti-IgG humana (V), la IgG de cabra anti-Ig humanas diluida 1:14 000 (II), la IgG de conejo anti-Ig humanas diluida 1:60 000 (I) y la IgG de cabra anti-Ig humanas diluida 1:7 000 (II).

Para la realización de la prueba de ELISA, se decidió utilizar como segundo anticuerpo la IgG de cabra anti-Ig humanas diluida 1:7 000 (II), que aunque obtuvo los IA más bajos de los cuatro anticuerpos anteriormente mencionados, fué el que mostró lecturas de absorbancia más altas y establecía la diferencia entre los sueros de pacientes con AHA y los controles negativos.

La albúmina sérica bovina utilizada como agente bloqueador en nuestros ensayos de ELISA, permitió obtener resultados satisfactoriamente reproducibles.

# TABLA 9

## ÍNDICES DE ABSORBANCIA EN ELISA, UTILIZANDO DIFERENTES ANTICUERPOS CONJUGADOS CON PEROXIDASA Y GELATINA COMO BLOQUEADOR

| Sueros analizados | | Conjugados utilizados y sus diluciones | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | I | | II | | III | IV | V |
| AHA | SCN | 1:20 000 | 1:60 000 | 1:7 000 1 | 14 000 | 1:5 000 | 1:20 000 | 1:10 000 |
| 7 | 1 | 2.5 | 8 | 2.4 | 5.5 | 4.5 | 1.4 | 5.5 |
| 7 | 2 | 2.8 | 6 | 3.4 | 5.5 | 18 | 2.5 | 3.5 |
| 11 | 1 | 2 | 5 | 2.1 | 4.3 | 1.7 | 1.2 | 4.7 |
| 11 | 2 | 2.3 | 3.7 | 3 | 4.3 | 7 | 2.2 | 3 |

I = IgG de conejo anti-Inmunoglobulinas humanas, II = IgG de cabra anti-Ig humanas, III = Inmunoglobulina de cabra anti-IgA humana, IV = IgG de cabra anti-IgM humana,V = Inmunoglobulina de cabra anti-IgG humana, SCN1 = Suero control negativo No. 1, SCN2 = Suero control negativo No. 2.

Los índices de absorbancia mostrados en la tabla 9, fueron obtenidos a partir de las lecturas de absorbancia registradas por dos sueros de pacientes con AHA (7 y 11) y dos sueros controles negativos (SCN1 y SCN2). Se utilizó como agente bloqueador la gelatina de pescado y como anticuerpos conjugados, los mencionados en el punto 3.9.2 del capítulo de materiales y métodos.

Las determinaciones que exhibieron IA mayores, son las que incluyeron como anticuerpo conjugado la Ig de cabra anti-IgA humana (III), la IgG de conejo anti-Ig humanas diluida 1:60 000 (I), la IgG de cabra anti-Ig humanas diluida 1:14 000 (II) y la Ig de cabra anti-IgG humana (V). Los resultados obtenidos no mostraron correlación, con los del experimento en que se utilizó albúmina sérica bovina como bloqueador.

Las lecturas de absorbancia registradas en la prueba de ELISA utilizando *como* agente b/oqueador gelatina de pescado, fueron mucho menores que las obtenidas al utilizar albúmina sérica bovina. Por lo tanto, optamos por utilizar una solución de albúmina como agente bloqueador **y como anticuerpo conjugado,** la IgG de cabra anti-Ig humanas diluida 1:7 000 (II), para la realización de la prueba.

## TABLA 10

## REPRODUCIBILIDAD EN LA PRUEBA DE ELISA

| Sueros analizados* AHA | Indice de Absorbancia promedio | Desviación estándar | Criterio analizado |
|---|---|---|---|
| 1 | 2.3 | ±0.108 | Intraensayo |
| 2 | 2.4 | ± 0.094 | |
| 13 | 2.3 | ±0.125 | Interensayo |
| 17 | 2.6 | ±0.317 | |
| 21 | 2.1 | ±0.116 | |

* Se usó como control negaüvo el suero No. 6.

Los resultados que se muestran en la tabla 10, corresponden al IA promedio calculado a partir de los IA obtenidos por 5 sueros de pacientes con AHA (1, 2, 13, 17, 21) en dos experimentos realizados y se calculó la desviación estándar correspondiente.

Se estudió la reproducibilidad de los resultados en la prueba de ELISA para amibiasis invasiva, bajo criterios intra e interensayo y se encontró que en ambos casos los resultados obtenidos son satisfactoriamente reproducibles.

## 4.4 Prueba de ELISA.

### 4.4.1 Resultados de ELISA en Sueros de Pacientes con AHA y en Sueros de Sujetos Sanos.

**TABLA 11**

**UNIDADES DE ELISA EN SUEROS DE SUJETOS SANOS**

| Suero | UE | Suero | UE |
|---|---|---|---|
| 1 | 50 | 17 | 71.66 |
| 2 | 63.33 | 18 | 46.66 |
| 3 | 63.33 | 19 | 46.66 |
| 4 | 66.66 | 20 | 65 |
| 5 | 98.33 | 21 | 58.33 |
| 6 | 55 | 22 | 48.33 |
| 7 | 20 | 23 | 76.66 |
| 8 | 51.66 | 24 | 48.33 |
| 9 | 78.33 | 25 | 61.66 |
| 10 | 61.66 | 26 | 73.33 |
| 11 | 70 | 27 | 48.33 |
| 12 | 55 | 28 | 40 |
| 13 | 71.66 | 29 | 58.33 |
| 14 | 38.33 | 30 | 73.33 |
| 15 | 43.33 | 31 | 31.66 |
| 16 | 70 | 32 | 51.66 |
| 17 | 71.66 | 33 | 41.66 |

La prueba de ELISA para amibiasis invasiva fué realizada, a 33 sueros de sujetos clínicamente sanos con Western Blot negativo. A partir de las lecturas de absorbancia obtenidas se determinaron las UE correspondientes, de acuerdo a la ecuación mostrada en el punto 3.9.5 del capítulo de materiales y métodos. Los resultados de la tabla No. 11 sirvieron para establecer el valor de corte de la prueba de ELISA.

# TABLA 12

## UNIDADES DE ELISA EN SUEROS DE PACIENTES CON AHA

| Suero | UE | Suero | UE | Suero | UE |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 133.33 | 26 | 171.66 | 51 | 138.33 |
| 2 | 136.66 | 27 | 153.33 | 52 | 146.66 |
| 3 | 113.33 | 28 | 151.66 | 53 | 175 |
| 4 | 151.66 | 29 | 146.66 | 54 | 56.66 |
| 5 | 106.66 | 30 | 158.33 | 55 | 81.66 |
| 6 | 141.66 | 31 | 146.66 | 56 | 143.33 |
| 7 | 158.33 | 32 | 146.66 | 57 | 148.33 |
| 8 | 136.66 | 33 | 153.33 | 58 | 160 |
| 9 | 118.33 | 34 | 160 | 59 | 153.33 |
| 10 | 141.66 | 35 | 146.66 | 60 | 145 |
| 11 | 140 | 36 | 98.33 | 61 | 133.33 |
| 12 | 150 | 37 | 85 | 62 | 148.33 |
| 13 | 136.66 | 38 | 150 | 63 | 70 |
| 14 | 156.66 | 39 | 146.66 | 64 | 125 |
| 15 | 148.33 | 40 | 73.33 | 65 | 88.33 |
| 16 | 131.66 | 41 | 151.66 | 66 | 118.33 |
| 17 | 151.66 | 42 | 113.33 | | |
| 18 | 160 | 43 | 90 | | |
| 19 | 153.33 | 44 | 133.33 | | |
| 20 | 110 | 45 | 143.33 | | |
| 21 | 130 | 46 | 76.66 | | |
| 22 | 170 | 47 | 156.66 | | |
| 23 | 105 | 48 | 148.33 | | |
| 24 | 155 | 49 | 125 | | |
| 25 | 150 | 50 | 148.33 | | |

La prueba de ELISA para amibiasis invasiva fué realizada, a 66 sueros de pacientes con AHA y Western Blot positivo. A partir de las lecturas de absorbancia obtenidas se determinaron las UE correspondientes, de acuerdo a la ecuación mostrada en el punto 3.9.5 del capítulo de materiales y métodos.

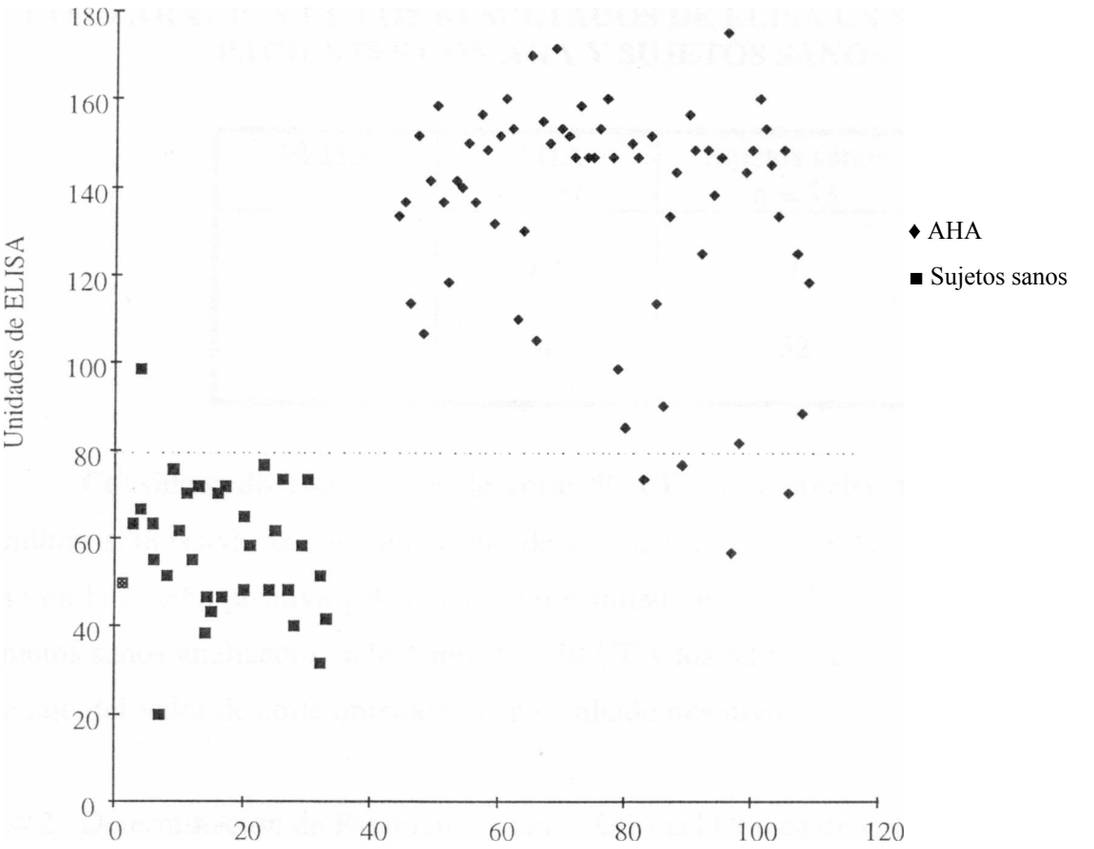



Figura 1. Unidades de ELISA obtenidas con los sueros de sujetos sanos y de pacientes con AHA.

En la figura 1 se muestran las unidades de ELISA (UE) obtenidas en los sueros de 33 sujetos sanos y de 66 pacientes con AHA. Las UE se muestran en el eje de las abscisas van desde 0 hasta 180, mostrando como valor de corte 80 UE. Todos los sueros con UE superiores al valor de corte se consideran positivos en la prueba de ELISA para amibiasis invasiva, por el contrario, todos los sueros con UE inferiores al valor de corte son considerados como negativos.

## TABLA 13

## COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE ELISA EN SUEROS DE PACIENTES CON AHA Y SUJETOS SANOS

| ELISA | AHA n = 66 | Sujetos sanos n = 33 |
|---|---|---|
| + | 62 | 1 |
| - | 4 | 32 |

Considerando como valor de corte 80 UE en la prueba de ELISA para amibiasis invasiva, encontramos que de 66 sueros de pacientes con AHA, 62 dieron la prueba positiva y 4 tuvieron un resultado negativo. De los 33 sueros de sujetos sanos analizados, sólo 1 mostró >80 UE y los 32 restantes se ubicaron por debajo del valor de corte obteniendo un resultado negativo.

4.4.2 Determinación de Parámetros para la Utilidad Clínica de la Prueba de ELISA.

## TABLA 14

## DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA UTILIDAD CLÍNICA DE LA PRUEBA DE ELISA

| | |
|---|---|
| Sensibilidad | 93.9 % |
| Especificidad | 96.9 % |
| Valor predictivo positivo | 98.4 % |
| Valor predictivo negativo | 88.8 % |
| Especificidad | 96.9 % |
| Exactitud | 94.9 % |

La determinación de los parámetros mostrados en la tabla 14 se realizó de acuerdo a las ecuaciones descritas en el punto 3.9.7 de material y métodos, a partir de los resultados obtenidos en la prueba de ELISA para amibiasis invasiva, realizada a 66 sueros de pacientes con AHA y 33 de sujetos clínicamente sanos.

La sensibilidad, especificidad y exactitud obtenidas en la prueba de ELISA, utilizando el suero de pacientes con AHA y el suero de sujetos sanos sin antecedentes de haber padecido amibiasis invasiva como controles negativos, demuestran que podemos utilizar dicha prueba serológica para detectar de manera confiable un cuadro de absceso hepático amibiano, con respecto a la población control usada en este estudio.

### 4.4.3 Resultados de ELISA en Sueros de Sujetos con Parasitosis Intestinal.

La prueba de ELISA para amibiasis invasiva fue aplicada a una población de individuos altamente infectados con protozoarios o helmintos intestinales.

# TABLA 15

## UNIDADES DE ELISA EN SUEROS DE SUJETOS CON PARASITOSIS INTESTINAL

| Suero | UE | Suero | UE | Suero | UE |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 136.66 | 30 | 60 | 59 | 71.66 |
| 2 | 100 | 31 | 88.33 | 60 | 68.33 |
| 3 | 73.33 | 32 | 56.66 | 61 | 60 |
| 4 | 55 | 33 | 88.33 | 62 | 65 |
| 5 | 80 | 34 | 48.33 | 63 | 125 |
| 6 | 100 | 35 | 58.33 | 64 | 66.66 |
| 7 | 61.66 | 36 | 38.33 | 65 | 56.66 |
| 8 | 81.66 | 37 | 50 | 66 | 61.66 |
| 9 | 71.66 | 38 | 55 | 67 | 73.33 |
| 10 | 41.66 | 39 | 55 | 68 | 63.33 |
| 11 | 48.33 | 40 | 63.33 | 69 | 83.33 |
| 12 | 75 | 41 | 36.66 | 70 | 31.66 |
| 13 | 66.66 | 42 | 100 | 71 | 55 |
| 14 | 63.33 | 43 | 91.66 | 72 | 71.66 |
| 15 | 61.66 | 44 | 120 | 73 | 58.33 |
| 16 | 88.33 | 45 | 80 | 74 | 38.33 |
| 17 | 56.66 | 46 | 45 | 75 | 28.33 |
| 18 | 80 | 47 | 101.66 | 76 | 73.33 |
| 19 | 86.66 | 48 | 81.66 | 77 | 50 |
| 20 | 58.33 | 49 | 71.66 | 78 | 101.66 |
| 21 | 71.66 | 50 | 43.33 | 79. | 55 |
| 22 | 51.66 | 51 | 105 | 80 | 60 |
| 23 | 66.66 | 52 | 80 | 81 | 73.33 |
| 24 | 93.33 | 53 | 66.66 | 82 | 83.33 |
| 25 | 88.33 | 54 | 61.66 | 83 | 81.66 |
| 26 | 66.66 | 55 | 53.33 | 84 | 110 |
| 27 | 58.33 | 56 | 71.66 | 85 | 100 |
| 28 | 78.33 | 57 | 96.66 | 86 | 60 |
| 29 | 105 | 58 | 86.66 | 87 | 61.66 |

La prueba de ELISA para amibiasis invasiva fué realizada a 87 sueros de individuos con parasitosis intestinal. A partir de las lecturas de absorbancia

obtenidas se determinaron las UE correspondientes, de acuerdo a la ecuación mostrada en el punto 3.9.5 del capítulo de materiales y métodos.

### 4.4.4 Resultados de ELISA en Sueros de Sujetos Sanos, Individuos con Parasitosis Intestinal y Pacientes con AHA.

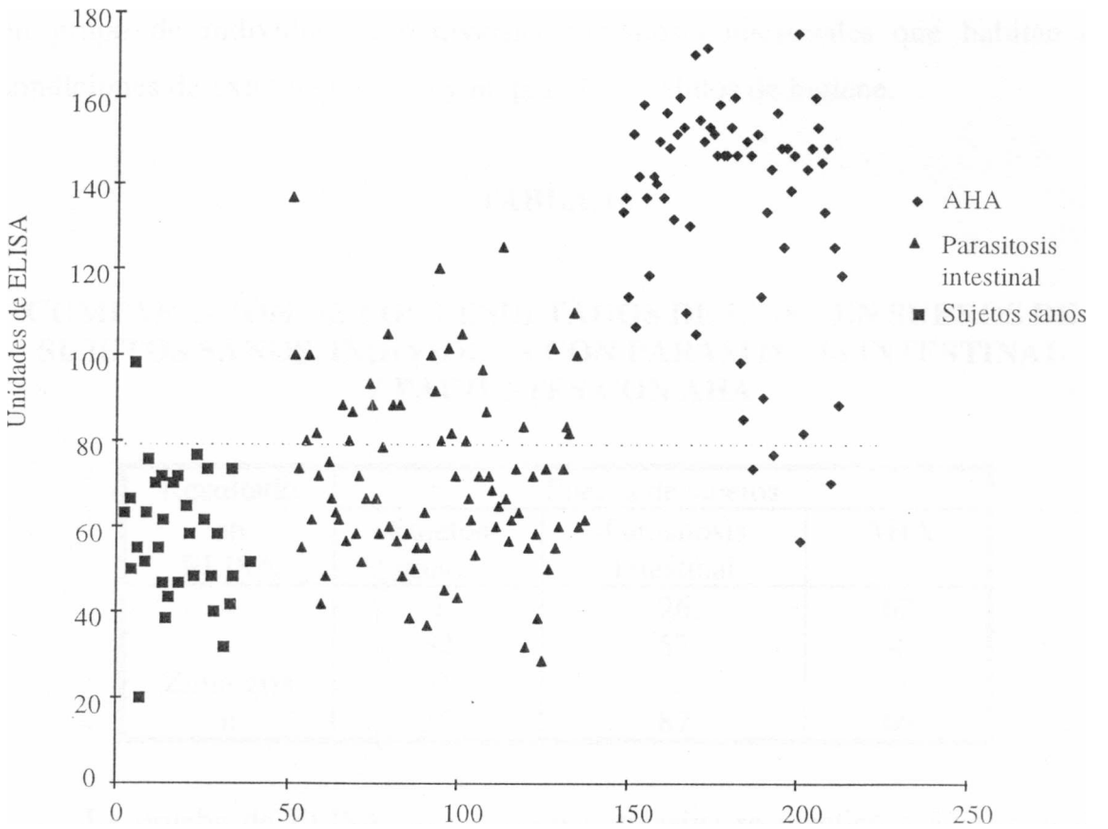



Figura 2. Comparación de las unidades de ELISA obtenidas con los sueros de sujetos sanos, de individuos con diversas parasitosis intestinales y de pacientes con AHA.

En la figura 2 se muestran las unidades de ELISA (UE) obtenidas en los sueros de 33 sujetos clínicamente sanos, 87 con diversas parasitosis intestinales y 66 pacientes con AHA. Las UE se muestran en el eje de las abscisas van desde 0

hasta 180. el valor de corte de esta prueba corresponde a 80 UE. Todos los sueros con UE superiores a 80 se consideran positivos en la prueba de ELISA para amibiasis invasiva y los sueros con valores inferiores a 80 UE se consideran negativos.

Después de establecer las condiciones óptimas para la realización de la prueba de ELISA para amibiasis invasiva y haberse probado con sueros de pacientes con AHA y sujetos clínicamente sanos, se decidió practicar la prueba a un grupo de individuos con diversas parasitosis intestinales que habitan en condiciones de extrema pobreza y no practican hábitos de higiene.

## TABLA 16

## COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE ELISA EN SUEROS DE SUJETOS SANOS, INDIVIDUOS CON PARASITOSIS INTESTINAL Y PACIENTES CON AHA

| Resultado en ELISA | Sueros de sujetos | | |
|---|---|---|---|
| | Sujetos sanos | Parasitosis intestinal | AHA |
| + | 1 | 26 | 62 |
| - | 32 | 57 | 4 |
| Zona gris | 0 | 4 | 0 |
| n | 33 | 87 | 66 |

La prueba de ELISA para amibiasis invasiva se practicó a 33 sueros de sujetos clínicamente sanos, 87 con parasitosis intestinal y 66 pacientes con AHA. Podemos apreciar que en los individuos con parasitosis intestinal, éste es un hallazgo que requiere atención y refleja en gran medida la pobreza extrema en que esta población se encuentra. La prueba fué positiva en 26 casos, en 57 mostró resultado negativo y 4 sueros se ubicaron en el valor de corte al obtener 80 UE, por lo que los sitúa en la zona gris de la prueba.

hasta 180. el valor de corte de esta prueba corresponde a 80 UE. Todos los sueros con UE superiores a 80 se consideran positivos en la prueba de ELISA para amibiasis invasiva y los sueros con valores inferiores a 80 UE se consideran negativos.

Después de establecer las condiciones óptimas para la realización de la prueba de ELISA para amibiasis invasiva y haberse probado con sueros de pacientes con AHA y sujetos clínicamente sanos, se decidió practicar la prueba a un grupo de individuos con diversas parasitosis intestinales que habitan en condiciones de extrema pobreza y no practican hábitos de higiene.

## TABLA 16

## COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE ELISA EN SUEROS DE SUJETOS SANOS, INDIVIDUOS CON PARASITOSIS INTESTINAL Y PACIENTES CON AHA

| Resultado en ELISA | Sueros de sujetos | | |
|---|---|---|---|
| | Sujetos sanos | Parasitosis intestinal | AHA |
| + | 1 | 26 | 62 |
| - | 32 | 57 | 4 |
| Zona gris | 0 | 4 | 0 |
| n | 33 | 87 | 66 |

La prueba de ELISA para amibiasis invasiva se practicó a 33 sueros de sujetos clínicamente sanos, 87 con parasitosis intestinal y 66 pacientes con AHA. Podemos apreciar que en los individuos con parasitosis intestinal, éste es un hallazgo que requiere atención y refleja en gran medida la pobreza extrema en que esta población se encuentra. La prueba fué positiva en 26 casos, en 57 mostró resultado negativo y 4 sueros se ubicaron en el valor de corte al obtener 80 UE, por lo que los sitúa en la zona gris de la prueba.

Como ya se mencionó anteriormente, la prueba detectó como positivos a 62 de los sueros de AHA y los 4 restantes fueron negativos, en cambio. 32 de los sujetos sanos dieron negativa la prueba y sólo 1 de ellos manifestó un resultado positivo.

4.4.5 Comparación del Examen Coproparasitoscópico y la Prueba de ELISA, en Sueros de Individuos con Parasitosis Intestinal.

**TABLA 17**

**EXAMEN CPS DE SUJETOS CON PARASITOSIS INTESTINAL Y PRUEBA DE ELISA POSITIVA**

| No. de sueros analizados por ELISA | Resultado obtenido en el examen coproparasitoscópico |
|---|---|
| 2 | *As caris lumbricoides* |
| 1 | *Endolimax nana* |
| 2 | *Blastocystis hominis* |
| 1 | *Entamoeba coli* |
| 1 | *Giardia duodenalis* |
| 3 | *Entamoeba histolytica / Entamoeba dispar* |
| 1 | *Entamoeba sp* |
| 3 | *Hymenolepis nana* |
| 2 | *Ascaris lumbricoides, Entamoeba histolytica/ Entamoeba dispar* |
| 1 | *Endolimax nana, Entamoeba coli* |
| 2 | *Giardia duodenalis, Hymenolepis nana* |
| 1 | *Blastocystis hominis, Endolimax nana* |
| 1 | *Entamoeba coli, Entamoeba histolytica / Entamoeba dispar* |
| 1 | *Entamoeba histolytica / Entamoeba dispar. Giardia duodenalis, Hymenolepis nana* |
| 1 | *Blastocystis hominis, Entamoeba coli, Giardia duodenalis* |
| 1 | *Blastocystis hominis, Entamoeba coli, Entamoeba sp* |
| 2 | Negativo |

El examen coproparasitoscópico realizado por Rodríguez-Pérez y cois., a las heces de 26 individuos cuya muestra de suero demostró un resultado positivo (UE >80) en la prueba de ELISA para amibiasis invasiva, reportó diversas especies de parásitos intestinales al momento de la determinación. En la tabla 17 podemos observar que los resultados positivos obtenidos en ELISA, no muestran correlación con algún parásito intestinal en particular.

## TABLA 18

## COMPARACIÓN DEL EXAMEN CPS Y LA PRUEBA DE ELISA, EN INDIVIDUOS CON PARASITOSIS INTESTINAL

| Resultado en el examen coproparasitoscópico | No. de sueros analizados | |
|---|---|---|
| | ELISA + | ELISA - |
| *Ascaris lumbñcoides* | 4 | 4 |
| *Hymenolepis nana* | 6 | 5 |
| *Blastocystis hominis* | 5 | 21 |
| *Endolimax nana* | 3 | 9 |
| *Entamoeba coli* | 5 | 12 |
| *Giardia duodenalis* | 5 | 13 |
| Negativo | 2 | 8 |

En la tabla 18 se muestra el parásito intestinal reportado en el examen coproparasitoscópico de los individuos que dieron positiva la prueba de ELISA para amibiasis invasiva, dicho parásito intestinal puede encontrarse solo o en combinación con otro, sin embargo, se decidió revisar por separado cada especie de parásito involucrado, lo cual permite apreciar que los resultados positivos en ELISA no se deben a una reacción cruzada entre la prueba y la parasitosis intestinal presente, ya que de ser así. todos los individuos infectados con los parásitos mencionados hubieran dado positiva la prueba.

Se puede observar que de 1J individuos infectados con *Hymenolepis nana.* sólo 6 dieron positiva la prueba de ELISA. En el caso de *Blastocystis hominis*, 5 de los 26 individuos parasitados dieron positiva la prueba. De 17 sujetos con examen coproparasitoscópico positivo para *Entamoeba col i,* 5 de ellos mostraron un resultado positivo en ELISA.

## TABLA 19

## COMPARACIÓN DEL EXAMEN CPS POSITIVO PARA *E.histolytica /E. dispar* CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ELISA

| Resultado en el examen coproparasitoscópico | No. de sueros analizados | |
|---|---|---|
| | ELISA + | ELISA - |
| *Entamoeba histolytica / Entamoeba dispar* | 7 | 10 |

Los resultados muestran que de 17 individuos infectados con *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* como único parásito intestinal presente o en combinación con otros, sólo 7 de ellos dieron positiva la prueba de ELISA, los 10 restantes mostraron UE<80 (resultado negativo). Esto nos indica que, probablemente los 7 sueros pertenecen a individuos parasitados con la especie patógena *E.histolytica* y los 10 restantes, probablemente sean portadores de la especie no patógena *Entamoeba dispar.* También existe la posibilidad de que los 7 positivos sean individuos que tuvieron amibiasis invasiva.

Se puede observar que de 11 individuos infectados con *Hymenolepis nana*, sólo 6 dieron positiva la prueba de ELISA. En el caso de *Blastocystis hominis*, 5 de los 26 individuos parasitados dieron positiva la prueba. De 17 sujetos con examen coproparasitoscópico positivo para *Entamoeba coli,* 5 de ellos mostraron un resultado positivo en ELISA.

## TABLA 19

## COMPARACIÓN DEL EXAMEN CPS POSITIVO PARA *E.histolytica* / *E. dispar* CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ELISA

| Resultado en el examen coproparasitoscópico | No. de sueros analizados | |
|---|---|---|
| | ELISA + | ELISA - |
| *Entamoeba histolytica / Entamoeba dispar* | 7 | 10 |

Los resultados muestran que de 17 individuos infectados con *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* como único parásito intestinal presente o en combinación con otros, sólo 7 de ellos dieron positiva la prueba de ELISA, los 10 restantes mostraron UE<80 (resultado negativo). Esto nos indica que, probablemente los 7 sueros pertenecen a individuos parasitados con la especie patógena *E.histolytica* y los 10 restantes, probablemente sean portadores de la especie no patógena *Entamoeba dispar*. También existe la posibilidad de que los 7 positivos sean individuos que tuvieron amibiasis invasiva.

4.4.6 Comparación de las Pruebas de IHA y ELISA para Amibiasis Invasiva.

**TABLA 20**

**COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE IHA Y ELISA EN SUEROS DE PACIENTES CON AHA versus SUEROS DE INDIVIDUOS CON PARASITOSIS INTESTINAL**

| Sueros de pacientes con | ELISA | | IHA* | |
|---|---|---|---|---|
| | + | - | + | - |
| AHA (n = 66) | 62 | 4 | 54 | 12 |
| Parasitosis intestinal** (n = 87) | 26 | 61 | 5 | 82 |

* Valor de corte en IHA = 1:256.

** 4 sueros dieron resultado en zona gris en ELISA.

Al comparar los resultados obtenidos en las pruebas de IHA y ELISA para amibiasis invasiva realizadas a los 66 sueros de pacientes con AHA, podemos apreciar que la prueba de ELISA fué capaz de detectar a 62 casos positivos, en cambio, la IHA detectó sólo 54 casos (tomando como valor de corte títulos de anticuerpos = 1:256).

En el caso de los 87 individuos con parasitosis intestinal, 26 fueron positivos por ELISA y sólo 5 individuos resultaron positivos en la prueba de IHA.

# CAPÍTULO 5

# DISCUSIÓN

La prueba de IHA para el diagnóstico de amibiasis invasiva, es mundialmente considerada como la prueba estándar para su detección, reportando una excelente especificidad y una sensibilidad del 95% (Healy, 1988). Estos datos no muestran correlación con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que al aplicar la prueba a una muestra de 66 sueros de pacientes con AHA y 86 con hepatopatías de diversa etiología, reportó una sensibilidad del 81.8% tomando como valor de corte títulos de anticuerpos de 1:256. La prueba demostró también, un 81.8% de sensibilidad al considerar títulos de 1:512 para reportar un resultado positivo, que como ya hemos mencionado, es el valor de corte utilizado en zonas endémicas de amibiasis.

Aunque la especificidad de la prueba de IHA mostró ser del 100% en este trabajo, la sensibilidad obtenida fué mucho menor que la reportada por otros autores. Esto demuestra lo particularmente difícil que resulta el estandarizar pruebas de diagnóstico reproducibles para la detección de amibiasis invasiva, que puedan ser aplicadas en zonas de alta endemicidad como nuestro país.

El diseñar una prueba de diagnóstico confiable para la detección de amibiasis invasiva, enfrenta el gran reto de obtener un preparado antigénico en el que la acción de las proteasas amibianas sea eliminada. A pesar del uso sistemático y obligatorio de inhibidores enzimáticos, no se han logrado establecer

# CAPÍTULO 5

# DISCUSIÓN

La prueba de IHA para el diagnóstico de amibiasis invasiva, es mundialmente considerada como la prueba estándar para su detección, reportando una excelente especificidad y una sensibilidad del 95% (Healy, 1988). Estos datos no muestran correlación con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que al aplicar la prueba a una muestra de 66 sueros de pacientes con AHA y 86 con hepatopatías de diversa etiología, reportó una sensibilidad del 81.8% tomando como valor de corte títulos de anticuerpos de 1:256. La prueba demostró también, un 81.8% de sensibilidad al considerar títulos de 1:512 para reportar un resultado positivo, que como ya hemos mencionado, es el valor de corte utilizado en zonas endémicas de amibiasis.

Aunque la especificidad de la prueba de IHA mostró ser del 100% en este trabajo, la sensibilidad obtenida fué mucho menor que la reportada por otros autores. Esto demuestra lo particularmente difícil que resulta el estandarizar pruebas de diagnóstico reproducibles para la detección de amibiasis invasiva, que puedan ser aplicadas en zonas de alta endemicidad como nuestro país.

El diseñar una prueba de diagnóstico confiable para la detección de amibiasis invasiva, enfrenta el gran reto de obtener un preparado antigénico en el que la acción de las proteasas amibianas sea eliminada. A pesar del uso sistemático y obligatorio de inhibidores enzimáticos, no se han logrado establecer

con dichos reactivos, las condiciones que permitan la obtención de antígenos amibianos que al incluirse en una prueba diangóstica sean estables por períodos de tiempo prolongados.

La prueba de Western Blot diseñada por Flores-Castañeda para la detección de amibiasis invasiva, que utiliza como antígeno los extractos amibianos preservados sin inhibidores enzimáticos (Flores-Castañeda, 1995), ha demostrado ser una excelente opción como herramienta diagnóstica, al revelar una especificidad, sensibilidad y exactitud de 100% en los estudios realizados, superando de manera evidente a la prueba de IHA.

Con lo anterior, podemos asegurar que la prueba de W.B. es más confiable para diagnosticar un cuadro de AHA que la prueba de IHA, y además, permite hacer el diagnóstico diferencial con otras patologías con que pueda confundirse un cuadro de amibiasis invasiva.

Debido a que la fracción IC:MC ha demostrado preservar antigénicamente las proteínas amibianas y ser estable por períodos de tiempo prolongados ya que en ella la acción de las proteasas es satisfactoriamente eliminada, se considera ideal para su uso en pruebas de diagnóstico. En base a que lo anterior, fué comprobado con la prueba de W.B., Flores-Castañeda diseñó una prueba de ELISA para la detección de amibiasis invasiva utilizando la fracción IC:MC como antígeno en la determinación (Flores-Castañeda, 1999).

Debido a que cada vez que se cambian lotes de reactivos o marcas de placas de ELISA, se debe volver a estandarizar la prueba de ELISA. En el presente trabajo se probaron diferentes condiciones como por ejemplo: tipos de solución amortiguadora para resuspender el extracto amibiano, procesos de ebullición, sonicación, centrifugación, etc., con la finalidad de lograr un buen rendimiento en la recuperación de proteínas a partir de la fracción IC:MC. de proporcionar el medio apropiado para que las proteínas amibianas. pudieran adherirse favorablemente a la superficie de poliestireno de las placas de microtitulación requeridas para el ensayo y al mismo tiempo, permitieran el

reconocimiento de dichas proteínas por los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes.

Después de probar con diferentes soluciones amortiguadoras, pH. concentración de sales, etc., se decidió utilizar una solución de carbonatos de pH 9.6 con 2-mercaptoetanol y urea para resuspender el extracto amibiano que fué sometido a ebullición, sonicación, centrifugación y finalmente, se recuperó el sobrenadante obtenido para utilizarse como antígeno en la prueba de ELISA. Este proceso permitió la recuperación de 1.386 mg de proteína por cada 10 mg de antígeno amibiano (fracción IC:MC) utilizado y proporcionó las condiciones para que al adherirse las proteínas a la superficie sólida de poliestireno y ser reconocidas específicamente por los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con AHA, mostraran resultados reproducibles bajo criterios intra e interensayo.

Experimentos posteriores, condujeron a definir que la dilución apropiada del suero a utilizar en la prueba de ELISA era de 1:100 ya que permitía las mejores lecturas de absorbancia y establecía mayor diferencia con las densidades ópticas obtenidas en sueros de sujetos clínicamente sanos. El anticuerpo polivalente antihumano conjugado con peroxidasa desarrollado en cabra y diluido 1:7,000 demostró ser la mejor opción como segundo anticuerpo en la determinación. Así también, se probaron diferentes soluciones de bloqueo conteniendo albúmina sérica bovina o gelatina de pescado, sin embargo, con el reactivo con que se obtuvieron resultados completamente reproducibles fué con la solución de albúmina.

La prueba de ELISA usada en el trabajo presentado en esta tesis, se estandarizó utilizando sueros de pacientes con AHA y de sujetos sanos como control negativo. Una vez que fueron establecidas todas las condiciones para la realización de la prueba, ésta fué practicada a los 66 sueros de AHA y 33 de sujetos sanos incluidos en este trabajo. Posteriormente se estableció el valor de corte de la prueba en 80 UE, de esta manera, todos los sueros con lecturas

superiores al valor de corte se consideran positivos y aquellos sueros que obtengan valores inferiores a 80 UE, se interpretan como negativos. Las UE establecidas en la figura 1 (ver pp. 43), muestran satisfactoriamente una clara separación entre los pacientes de AHA y los sujetos sanos, sólo 1 de los controles negativos estudiados dió positiva la prueba, el resto mostró un resultado negativo. De los 66 sueros de AHA analizados, 62 fueron positivos y 4 se consideraron negativos.

Al comprobar que la prueba de ELISA para amibiasis invasiva, permitía discriminar los sueros de pacientes con AHA de los sueros de sujetos sanos, se decidió practicar la prueba a una población muy interesante de individuos con diversas parasitosis intestinales, con la finalidad de investigar su aplicación como herramienta diagnóstica.

La población a estudiar con la prueba de ELISA, comprende a un grupo de indígenas, procedentes del estado de Oaxaca que actualmente habitan en el Municipio Benito Juárez, Nuevo León. Son personas pobres, consumen sus alimentos en el suelo, carecen del servicio de agua potable y de letrinas, por lo que defecan al cúre libre y no practican hábitos de higiene. Las condiciones tan precarias en que viven, es un factor que diariamente los predispone a las infecciones por parásitos intestinales, es por eso que consideramos muy importante conocer la aplicación de la prueba de ELISA en una población de este tipo.

Al realizar la prueba de ELISA a la población de individuos con parasitosis intestinal, se encontró que 26 de los 87 sueros analizados tenían anticuerpos anti-amibas con valores superiores a 80 UE, es decir, con resultado positivo. Este hallazgo no es sorprendente ya que dadas las condiciones de extrema pobreza e inadecuada higiene en que se encuentran estos individuos, es muy probable que hayan tenido uno o varios cuadros de amibiasis invasiva durante su vida.

Sabemos que la prueba de ELISA, no nos permite discriminar entre una infección pasada ***y*** una reciente, sin embargo, a\ ser aptrcaAa a los sueros Ae.

pacientes con AHA y de sujetos sanos, demostró ser capaz de hacer la diferencia entre estas dos poblaciones. Esto es sustentado por el hecho de que la prueba mostró una sensibilidad de 93.9%, una especificidad de 96.9% y una exactitud de 94.9%, cuando se analizaron las poblaciones de sujetos sanos y de pacientes con AHA.

Al comparar los resultados obtenidos en la prueba de ELISA para amibiasis invasiva con el examen coproparasitoscópico de cada individuo (realizado por Rodríguez-Pérez y cois., en 1999), podemos asegurar que los resultados positivos en ELISA de 26 individuos, no se deben a una reacción cruzada entre la prueba y la parasitosis intestinal presente, ya que al analizar por separado cada parásito involucrado en los exámenes, nos damos cuenta que no todos los individuos con un determinado parásito dan positiva la prueba. Por ejemplo: en la tabla 18 (ver pp. 50) se muestra que, de un total de 26 individuos parasitados con *Blastocystis hominis* solo o en combinación con otro parásito, 5 dieron positiva la prueba de ELISA, el resto tuvieron un resultado negativo. De 17 individuos infectados con *Entamoeba coli* como único parásito intestinal o en combinación con otro, únicamente 5 fueron positivos en ELISA.

Así también, en la tabla 19 (ver pp. 51) se observa que solamente 7 de los 17 individuos con *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* en su examen coproparasitoscópico, fueron positivos en ELISA. Probablemente, los 7 sueros positivos pertenecen a individuos parasitados con la especie patógena *E. histolytica* y los 10 restantes sean portadores de la especie no patógena *E. dispar*, o bien, los sueros positivos pueden pertenecer a individuos que anteriormente estuvieron infectados con *E. histolytica* y desarrollaron anticuerpos anti-amibas durante esa infección previa.

Es necesario realizar más estudios que permitan validar la utilidad clínica de la prueba de ELISA, diseñada con antígenos amibianos preservados sin inhibidores enzimáticos, frente a sueros pertenecientes a una población de hepatópatas de diversa etiología. Sin embargo, en el presente trabajo comparando

sueros de sujetos sanos, sueros de pacientes con absceso hepático amibiano y sueros de la población multiparasitada se encontró que: al comparar la sensibilidad obtenida por cada prueba en las determinaciones realizadas en 66 sueros de pacientes con AHA, 62 fueron positivos por ELISA mostrando una sensibilidad de 93.9 %, en cambio, con la prueba de IHA se detectaron 54 sueros tomando como valor de corte títulos de anticuerpos de 1:256 (como lo indica el proveedor del reactivo) o 1:512 (utilizado en zonas endémicas de amibiasis) obteniendo una sensibilidad de 81.8%. Aunque la especificidad de la prueba de IHA a títulos de anticuerpos 1:256 y 1:512 es del 100% y supera la obtenida por la prueba de ELISA (96.9%), la sensibilidad de ésta última es notablemente mayor. Lo anteriormente mencionado, nos indica que la prueba de ELISA para amibiasis invasiva no supera a la de W.B., la cual tiene una especificidad, sensibilidad y exactitud del 100%. A pesar de esto, la prueba de ELISA presenta grandes ventajas como prueba diagnóstica: requiere menos cantidad de antígeno amibiano en cada ensayo permitiendo la optimización del mismo, su costo es menor y puede ser útil en la realización de estudios epidemiológicos de amibiasis, lo cual es evidente considerar.

Como sabemos, en México persisten las condiciones que propician la ocurrencia de la amibiasis y es indispensable disponer de una herramienta diagnóstica que a un bajo costo y en un período de tiempo razonable, permita obtener un resultado confiable para beneficio del paciente. Creemos que la prueba de ELISA para la detección de amibiasis invasiva, puede llegar a constituir un método de diagnóstico importante en nuestro medio, sin embargo, aún faltan estudios por realizar para poder establecer definitivamente su utilidad frente a sueros de pacientes con hepatopatías con los que haya que establecerse un diagnóstico diferencial con amibiasis hepática.

# CAPÍTULO 6

# CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede asegurar que la prueba de Western Blot para diagnosticar amibiasis invasiva, tiene mayor sensibilidad que la prueba de Hemaglutinación Indirecta que actualmente se encuentra en el mercado y es considerada como la prueba estándar para su detección.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se confirma que la prueba de ELISA diseñada con antígenos amibianos preservados sin inhibidores enzimáticos, para la detección de amibiasis invasiva, tiene mayor sensibilidad que la prueba de Hemaglutinación Indirecta.

La prueba de Western Blot tiene mayor sensibilidad y especificidad que la prueba de ELISA utilizada en esta tesis.

La prueba de ELISA para amibiasis invasiva, diseñada con antígenos preservados sin inhibidores enzimáticos, no da reacción cruzada con los anticuerpos presentes en los sueros de individuos con diversas parasitosis intestinales.

# CAPÍTULO 7

# PERSPECTIVAS

Validar la utilidad clínica de la prueba de ELISA para amibiasis invasiva, utilizando sueros de pacientes con hepatopatías de diversa etiología con los que haya que hacer diagnóstico diferencial.

# CAPÍTULO 8

# REFERENCIAS


Ackers, J., Clark, C.G., Diamond, L.S., Duchene, M., Espinoza-Cantellano, M., Jackson, T., Martínez-Palomo, A., Mirelman, D., Muñoz-Hernández, O., Pérez-Tamayo, R., Petri, W., Reed, S., Ruiz-Palacios, G., Samuelson, J., Santos-Preciado, J.I., Tannich, E., Takeuchi, T., Ximenez, C. (1997). Consulta con expertos en Amibiasis. Informe de la OMS / OPS / UNESCO. Boletín de Epidemiología. 14 (50) : 1-3.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principie of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-252.

Bruckner, D. A. (1992). Amebiasis. Clin. Microbiol. Rev. 5 : 306-369.

Caballero-Salcedo, A., Viveros-Rogel, M., Salvatierra, B., Tapia-Conyer, R., Sepulveda- Amor, R., Gutiérrez, G., Ortiz-Ortiz, L. (1994). Seroepidemiology of amebiasis in México. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50 : 412-419.

Clark, C.G. and Diamond. L.S. (1994). Pathogenicity, Virulence and *Entamoeba histolytica.* Parasitology Today. 10 (2) : 46-47.

Del Muro, R., Acosta, E., Merino, E., Glender, W., Ortiz-Ortiz. L. (1990). Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary antibody detection. J. Infect. Dis. 1623 : 1360-1364.

Diamond, L.S. (1978). A new médium for axenic cultivation for *Entamoeba histolytica* and other *Entamoebae.* Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72 : 431.

Diamond, L.S. and Clark, G. (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn 1903 (Entended Walker, 1911) Separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt 1925. J. Euk. Microbiol. 49 (3): 340-344.

Elsdon-Dew, R. (1968).The epidemiology of amoebiasis. Adv. Parasitol. 6 : 1-62.

Escandón-Romero, C., Treviño-García Manzo, N., Escobedo de la Peña, J., Hernández-Ramos, J.M., Olvera-Álvarez, J. y Cabral-Soto, J. (1996). La Amibiasis y el Absceso Hepático Amibiano en México, un Problema de Salud Pública de Actualidad. Rev. Gastroenterol Méx. 61 (4) : 378-386.

Flores-Castañeda, M.S., Torres-Lopez, E., Yañez-Rodriguez, A., Medina de la Garza, C.E. (1991). Enteroparasitosis in a student population of Monterrey, Nuevo León metropolitan area. Border epidemiological bulletin O.P.S.- O.M.S. 5:1-5.

Flores-Castañeda, M.S. (1992). Procedimiento para la preservación de moléculas antigénicas sin el uso de inhibidores enzimáticos. Expediente No. 928019, SECOFI / IMPI, México.

Flores-Castañeda, M.S; (1995). Procedure to preserve antigens of *Entamoeba histolytica* without enzymatic inhibitors. USA Patent. No. 5459042.

Flores-Castañeda, M.S. (1999). Preparation of preserved *Entamoeba histolytica* antigens without enzymatic inhibitors and their use in immunological methods. USA Patent No. 5861263.

Friedman, Gary D. (1987). Epidemiology, Medical Care, and the Health of the Community. Chapter 15, in Primer of Epidemiology. Third Edition. pp. 247-269.

García, L.S., Bullock-Iacullo, S., Palmer, J. and Shimizu, R.Y. (1995). Diagnosis of Parasitic Infections: Collection, Processing and Examination of

Specimens. In Murray / Baron / Pfaller / Tenover / Yolken. Manual of Clinical Microbiology. ASM PRESS. Sixth Edition. p. 1145-1158.

Gómez, A., Leyva, O., Martínez, M.C., Garduño, G., Ramos, F., Román, P., Melendro, E.I., Muñoz, O. and Ximenez, C. (1997). Prospective study of *Entamoeba dispar* infection in a cohort of mothers and their infants: relationship to serum antibody response. Am. J. Trop. Med. Hyg. 57 (5): 530-537.

Gutiérrez, G., Ludlow, A. (1976).Encuesta serológica nacional II. Investigación de anticuerpos contra *Entamoeba histolytica* en la República Mexicana, Proceedings of the International Conference on Amebiasis, eds. Sepúlveda, B., Diamond, L.S., Instituto Mexicano del Seguro Social, México. 599-608

Healy, G.R. (1988). Serology, p. 650-719. In J. I. Ravdin (ed.), Amebiasis: Human infection by *Entamoeba histolytica.* John Wiley & Sons, Inc., New York.

Islas Marroquín, J. (1993). Estudio piloto sobre amebiasis y la Giardiasis en el personal militar. Rev. Sanid. Milit. Méx. 47 : 123-125.

Knobloch, J. and E. Mannweiler. (1983). Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32:727-732.

Lara Aguilar, R., Aguilar Bucio, M.T., Martínez Toledo, L. (1990). Teniasis, amibiasis y otras parasitosis intestinales en niños de edad escolar del estado de Michoacán, México. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 47 : 153-159.

Levine, N.D., Corliss, J.O. (1980). A newly revised classification of the protozoa. J. Protozool. 27 : 37-58.

Linn, T.M., C.M. Schubert, D.J. Kiefer, S. Troy, R. Cort, J.L. Giegel, J.H. Lin and L. Neill. (1989).Two rapid and simple enzyme immunoassays for human antibodies to *Entamoeba histolytica.* J. Immunoassay, 10:301-313.

Marshall, M.M., Naumovitz, D., Ortega, Y. and Sterling, C.R. (1997) Waterbome Protozoan Pathogens. Clinical Microbiology Reviews. 10 (1): 67-85.

Martinez-Palomo, A. (1987). The Pathogenesis of Amebiasis. Parasitology Today. 3:111.

Martinez-Palomo, A. and Espinosa-Cantellano, M. (1998). Intestinal Amoebae. In Collier, L., Balows, A. and Sussman. M. Microbiology and Microbial Infections. Parasitology. Chapter 8. Ninth Edition. 5 : 157-177.

Martinez-Palomo, A., Martinez-Baez, M. (1983). Selective primaty health care: strategies for control of disease in the developing world. X. Amebiasis. Rev. Infect. Dis. 5 : 1093-1099.

Navarrete Espinoza, J., Navarrete Cadena, E., Escandón Romero, C., Escobedo de la Peña, J. (1993). Prevalencia de parasitosis intestinal en la población infantil de Santiago Jamiltepec, Oaxaca. Rev. Méd. IMSS (Méx). 31 : 157-161.

Perez-Monfort, R., Ostoa-Saloma, P., Velazquez-Medina, L., Monfort, I. and Becker, I. (1987). Catalytic class of proteinases of *Entamoeba histolytica.* Mol. Biochem. Parasitol. 26 : 87.

Reed, S.L. (1992). Amebiasis: an update. Clin. Infect. Dis. 14 : 385-393.

Rodríguez-Pérez, E.G., Salazar-Galván, M.S., Tamez-Treviño E., Avila, M.R., Tijerina-Menchaca, R., Flores-Castañeda, M.S. (1999). Detección de protozoosis y helmintiasis en una población marginal urbana de Cd. Benito Juárez, Nuevo León. XVII Congreso Nacional de Investigación Biomédica. Monterrey, N.L.

Saíd-Femández, S. y Flores-Castañeda, M.S. (1996). Diagnóstico molecular de amibiasis. Gac. Méd. Méx. 132 (3): 314-318.

Sargeaunt, P.G., Williams, J.E. and Grene, J.D. (1978). The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72 : 519-21.

Sepúlveda, B., Treviño-García Manzo, N. (1986).Clinical manifestations and diagnosis of amebiasis. Amebiasis, ed. Martinez-Palomo, A. Elsevier, Amsterdan, 169-88.

Tamez-Treviño, E. (2000).Validación de la utilidad clínica de una prueba de Western Blot para la detección de amibiasis invasiva. Tesis de Doctorado en Ciencias con especialidad en Microbiología Médica. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Treviño Garcia-Manzo, N., Escandon-Romero, C., Escobedo de la Peña, J., Hemandez-Ramos, J.M. and Fierro-Hemandez, H. (1994). Amebiasis in the Epidemiologic Transition in México: Its Morbidity and Mortality Trends in the Mexican Institute of Social Security. Archives of Medical Research. 2 (4) : 393-399.

Walsh, J.A. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8 : 228-237.

Wilson, M., Schantz, P. and Pieniazek, N. (1995). Diagnosis of Parasitic Infections: Immunologic and Molecular Methods. In Murray / Barón / Pfaller / Tenover / Yolken. Manual of Clinical Microbiology. ASM PRESS. Sixth Edition. p. 1159-1170.

World Health Organization. (1985). Amoebiasis and its control. Bull WHO. 63 :417-26.

a

# APENDICE A

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

*Anticuerpos polivalentes anti-inmuno globulinas humanas, conjugados con peroxidasa y diluidos 1:7000:* Mezclar 2 pL de anticuerpos polivalentes con 14 mL de solución de lavado.

*Ácido clorhídrico al 1 %:* Colocar 10 mL de ácido clorhídrico en un matraz y aforar a 1000 mL con agua destilada.

*Cloro al 1 %:* Colocar 10 mL de cloro en un matraz y aforar a 1000 mL con agua destilada.

*Colorante Azul brillante de Coomassie R-250:* Pesar 0.1 g de colorante azul brillante de Coomassie R-250 y disolver en una solución de 45 mL de metanol - 45 mL de agua destilada - 10 mL de ácido acético.

*Etanol al 95 %:* Colocar 95 mL de etanol absoluto en un matraz y aforar a 100 mL con agua destilada.

*Formol al 5 %:* Colocar 5 mL de formol en un matraz y aforar a 100 mL con agua destilada.

*Hidróxido de sodio 1 N:* Pesar 39.996 g de hidróxido de sodio y aforar a 1 L con agua destilada.

*Hidróxido de sodio 0.1 N:* Pesar 3.9996 g de hidróxido de sodio y aforar a 1 L con agua destilada.

*Reactivo de Bradford:* Mezclar vigorosamente para disolver 100 mg de colorante azul brillante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol al 95 %. Mezclar la solución anterior con 100 mL de ácido fosfórico 85 % p/v. Posteriormente, aforar a 1 L con agua destilada y filtrar.

*Solución amortiguadora de acetatos 0.1 M pH 5.0:* Preparar las soluciones A: Colocar 0.5775 mL de ácido acético glacial en un matraz y aforar a 50 mL con agua destilada y B: Pesar 1.36 g de acetato de sodio, disolver y aforar a 50 mL con agua destilada. Posteriormente, mezclar 7.4 mL de la solución A y 17.6 mL de la solución B, aforar a 50 mL con agua destilada.

*Solución amortiguadora de Carbonatos 0.05 M pH 9.6:* Pesar 0.159 g de carbonato de sodio y 0.293 g de bicarbonato de sodio, disolver y aforar a 100 mL con agua destilada.

*Solución amortiguadora de citratos pH 5.0:* Pesar 0.73 g de ácido cítrico y 1.186 g de fosfato dibásico de sodio, disolver y aforar a 100 mL con agua destilada.

*Solución amortiguadora de fosfatos 0.15 M, pH 7.2 - 7.4 (PBS):* Pesar 8.0 g de cloruro de sodio, 1.2 g de fosfato dibásico de sodio, 0.2 g de fosfato monobásico de potasio y 0.2 g de cloruro de potasio, disolver y aforar a 1 L con agua destilada.

*Solución Bloqueadora (PBS 0.15 M, pH 7.2-7.4 - ASB al 3% - Tween 20 0.05%): Disolver* 3 g de albúmina sérica bovina en 100 mL de PBS y agregar 50 pL de Tween 20.

*Solución de Lavado (PBS 0.15 M, pH 7.2-7.4 - ASB al 0.01% - Tween 20 0.05%):* Disolver 10 mg de ASB en 100 mL de PBS y agregar 50 pL de Tween 20.

# RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Perla Canillo Duarte

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en
Microbiología Médica

Tesis: APLICACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA, DISEÑADA CON ANTÍGENOS AMIBIANOS PRESERVADOS SIN INHIBIDORES ENZIMÁTICOS

. Campo de Estudio: Microbiología Médica.

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Guamúchil, Sinaloa, el 15 de junio de 1971. hija de Juan Manuel Canillo Samaniego y Amelia Duarte Angulo.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Sinaloa, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo. Reconocimiento como Mejor Alumno de la Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología Médica por los períodos 1996-1997 y 1997-1998.