

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



EVALUACION DE UNA TECNICA DE
AGLUTINACION SIMPLE PARA LA DETECCION
DE *Entamoeba histolytica* SCHAUDINN, 1903
(PROTOZOA: ENDAMOEBIDAE)

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN PARASITOLOGIA

POR

MARIA HILDA GARZA FERNANDEZ

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1996

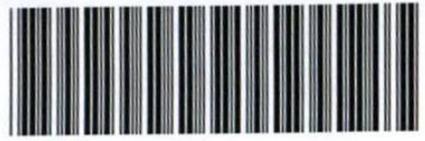
TM

RC121

.A5

G3

C.1



1080072414

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE
ANÁLISIS DE HUELOS PARA LA DETECCIÓN
DE *Endamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1908)
(PROTOZOA: ENDAMOEBIDAE)

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN PARASITOLOGÍA

POR

MARIA IBILDA GARCÍA FERNÁNDEZ



TM
RCIZI
F3AS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EVALUACION DE UNA TECNICA DE AGLUTINACION SIMPLE
PARA LA DETECCION DE *Entamoeba histolytica*
SCHAUDINN, 1903 (PROTOZOA:ENDAMOEBIDAE)

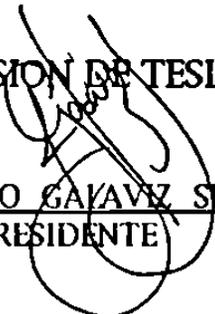
TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO
ACADEMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
PARASITOLOGIA

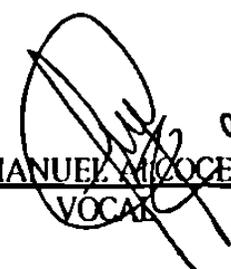
POR

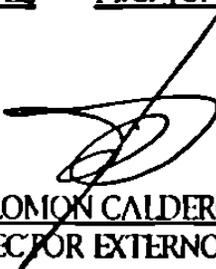
MARIA HILDA GARZA FERNANDEZ

COMISION DE TESIS


M.C. LUCIO GAYAVIZ SILVA
PRESIDENTE


M.C. ROBERTO MERCADO HERNANDEZ
SECRETARIO


M.C. JUAN MANUEL MICOZER MARTINEZ
VOCAL


DR. SALOMON CALDERON M.
DIRECTOR EXTERNO

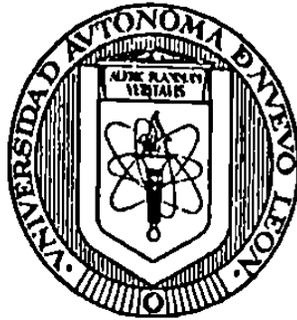
MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1996

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



EVALUACION DE UNA TECNICA DE AGLUTINACION SIMPLE PARA
LA DETECCION DE *Entamoeba histolytica* SCHAUDINN, 1903
(PROTOZOA:ENDAMOEBIDAE)

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO
ACADEMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
PARASITOLOGIA

POR

MARIA HILDA GARZA FERNANDEZ

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1996

Dedicatorias

A Dios Nuestro Señor

Por haberme permitido culminar esta etapa de mi vida profesional y por haberme concedido una segunda oportunidad de continuar en este camino que se llama vida.

A mis padres

Sr. Isaac Garza Villarreal y Sra. Ma. Luisa Fernández de Garza que desde el cielo guían mi camino.

Con un cariño muy especial a mi Madre, a quien debo la vida y lo que soy como profesionista.

A mi hijo

Por ser un hijo maravilloso.

Ricky, eres mi gran orgullo y la ilusión de mi vida, que Dios Nuestro Señor te bendiga siempre y te permita realizarte plenamente como hombre y como profesionista.

A mi esposo

Por ese apoyo incondicional que siempre me has brindado. Gracias.

Agradecimientos

Como no considero justo la posibilidad de omitir algún nombre, quiero plasmar en esta hoja, mi mas sincero agradecimiento a todas aquellas personas que desinteresadamente de una manera u otra me ayudaron a culminar esta etapa de mi vida profesional.

**Esta Tesis fue realizada en los Laboratorios de Parasitología e
Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad
Autónoma de Nuevo León.**

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
INDICE DE TABLAS	i
INDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
1. INTRODUCCION	4
2. ANTECEDENTES	8
3. OBJETIVO	27
4. IMPORTANCIA	27
5. HIPOTESIS	28
6. MATERIAL Y METODOS	29
6.1 Plan General de trabajo	29
6.2 Detección de <i>E. histolytica</i> por microscopía	30
6.3 Detección de <i>E. histolytica</i> por el método de aglutinación simple	31
6.3.1 Prueba en heces	31
6.3.2 Prueba en suero	32
6.3.3 Prueba de aglutinación simple con antígenos totales obtenidos de cultivos axénicos de las cepas de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS y HM38:IMSS	32
6.3.3.1 Obtención del antígeno total	32
6.3.3.1.a Cultivo masivo de <i>E. histolytica</i>	32
6.3.3.1.b Cosecha de los trofozoitos	33
6.3.3.1.c Determinación de la densidad celular	34
6.3.3.1.d Preparación del antígeno	34
6.3.3.2 Cuantificación de proteínas en los antígenos (micrométodo de Lowry)	35
6.3.3.2.a Curva de referencia	35
6.3.3.2.b Cuantificación de proteínas	36
6.3.3.3 Caracterización de proteínas	36
6.3.3.3.a Preparación de las placas de gel de poliacrilamida	36
6.3.3.3.b Marcadores	37
6.3.3.3.c Preparación de la muestra de antígeno	37
6.3.3.3.d Corrimiento de la muestra	37
6.3.3.3.e Tinción del gel de poliacrilamida	38
6.3.3.3.f Interpretación	38

6.3.3.4	Identificación de las fracciones antigénicas de <i>E. histolytica</i> por la técnica de “Western Blot”	39
6.3.3.4.a	Electroforesis	39
6.3.3.4.b	Transferencia	39
6.4	Detección de secuencias genómicas de <i>E. histolytica</i> por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	41
6.4.1	Obtención del DNA de <i>E. histolytica</i>	41
6.4.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias genómicas de <i>Entamoeba histolytica</i>	42
6.5	Interpretación de resultados y evaluación estadística	44
6.5.1	Método microscópico	44
6.5.2	Método de aglutinación simple	44
6.5.2.a	En heces (Reactivo a a base de latex)	44
6.5.2.b	En suero (Reactivo a base de liposomas-carbón activado)	44
6.5.2.c	En antígenos totales de <i>E. histolytica</i>	44
6.5.2.d	Sensibilidad y especificidad; valor predictivo positivo y negativo de la técnica	45
7.	RESULTADOS	48
7.1	Detección de <i>E. histolytica</i> en heces por microscopía	48
7.2	Detección de <i>E. histolytica</i> en heces por el método de aglutinación simple (Reactivo Calderón a base de latex)	49
7.3	Detección de <i>E. histolytica</i> en suero por el método de aglutinación simple (Reactivo Calderón a base de liposomas-carbón activado)	52
7.4	Pruebas realizadas con antígenos totales de <i>E. histolytica</i> obtenidos de cultivos axénicos de las cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS	52
7.5	Evaluación de los antígenos totales de <i>E. histolytica</i>	54
7.5.1	Cuantificación de las proteínas	54
7.5.2	Caracterización de las proteínas	56
7.5.3	Identificación antigénica de <i>E. histolytica</i> por la técnica de inmunoelectrotransferencia “Western Blot” (WB)	58
7.6	Detección de secuencias genómicas de <i>E. histolytica</i> por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	59
7.7	Interpretación de resultados	60
7.7.1	Método microscópico	60
7.7.2	Método de aglutinación simple	60
7.7.3	Reacción en Cadena de la Polimerasa	60
7.7.4	Evaluación estadística de la técnica de aglutinación simple	60
8.	DISCUSION Y CONCLUSIONES	63
	LITERATURA CITADA	69

ANEXOS

Examen microscópico (Faust) (Diagrama)	75
“Reacción Calderón” Detección de antígenos de <i>E. histolytica</i> (Diagrama)	76
“Reacción Calderón” Detección de anticuerpos de <i>E. histolytica</i> (Diagrama)	77
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Diagrama)	78
Abreviaturas	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Protozoarios detectados en 253 muestras de heces utilizando el método microscópico por flotación de Faust.	48
Tabla 2.	Muestras de heces con y sin fijador positivas para 1, 2 ó 3 protozoarios utilizando los métodos microscópico y de aglutinación simple (reactivo Calderón a base de latex).	49
Tabla 3.	Positividad del reactivo "Calderón" a base de latex para antígenos de <i>E. histolytica</i> preparados a partir de diferentes poblaciones de trofozoítos de la cepa HM1:IMSS.	53
Tabla 4.	Positividad del reactivo "Calderón" a base de latex para antígenos de <i>E. histolytica</i> preparados a partir de diferentes poblaciones de trofozoítos de la cepa HM38:IMSS.	54
Tabla 5.	Valores de absorbancia para diferentes concentraciones de proteína, utilizando el micrométodo de Lowry (curva de referencia).	55
Tabla 6.	Cuantificación de proteínas en antígenos totales obtenidos de diferentes poblaciones de trofozoítos de dos cepas de <i>Entamoeba histolytica</i> utilizando el micrométodo de Lowry.	56
Tabla 7.	Rf obtenidos con marcadores de pesos moleculares conocidos en un corrimiento electroforético.	56
Tabla 8.	Pesos moleculares de las proteínas principales de los antígenos de las cepas de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS y HM38:IMSS obtenidas en un corrimiento electroforético e interpoladas en la curva de calibración.	57
Tabla 9.	Sensibilidad y especificidad de la técnica de aglutinación al compararla con la microscópica.	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Grados de aglutinación al utilizar el reactivo de latex para la detección de antígenos de *E. histolytica* (foto tomada con lente de acercamiento). _____ 50

Figura 2. Aglutinación positiva (A) y negativa (B) para antígenos de *E. histolytica* utilizando el reactivo “Calderón” (foto tomada al microscopio con 120X)._____ 50

Figura 3. Aglutinación positiva para antígeno de *E. histolytica* en dos muestras de heces no fijadas, utilizando el reactivo a base de latex. _____ 51

Figura 4. Aglutinación negativa para antígenos de *E. histolytica* en tres muestras de heces fijadas, utilizando el reactivo a base de latex. _____ 51

Figura 5. Aglutinación positiva y negativa al utilizar el reactivo “Calderón” preparado a base de liposomas-carbón activado para la detección de anticuerpos de *E. histolytica*._____ 52

Figura 6. Curva de referencia para cuantificación de proteínas, utilizando albúmina de huevo (micrométodo de Lowry)._____ 55

Figura 7. Curva de calibración con marcadores de pesos moleculares conocidos en un corrimiento electroforético. _____ 57

Figura 8. Corrimiento electroforético de las proteínas de los antígenos totales de las cepas HM1:IMSS(carriles 1 al 3) y HM38:IMSS (carriles 4 al 6) de *E. histolytica* y de los marcadores correspondientes (carriles 7 y 8). _____ 58

Figura 9. Identificación de las fracciones antigénicas de *E. histolytica* por la técnica de electroinmunotransferencia “Western Blot” (membrana de nitrocelulosa) utilizando los antígenos de las cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS de *E. histolytica*. _____ 59

Figura 10. Amplificación de secuencias genómicas de las cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS en gel de agarosa al 1%. Cepa HM1:IMSS (carriles 1 y 2), cepa HM38:IMSS (carriles 3 y 4), control positivo (carril 5) y marcadores de pares de bases λ /Hind III (carril 6)._____ 59

RESUMEN

Se evaluó una técnica de aglutinación simple "Reacción Calderón" para el diagnóstico de *Entamoeba histolytica* en heces y en suero, utilizando reactivos a base de latex y de liposomas-carbón activado respectivamente. Se examinaron 253 muestras de heces y 79 de sueros de pacientes procedentes de diversos centros hospitalarios y laboratorios clínicos. La sensibilidad del reactivo de latex se evaluó con el antígeno en forma individual y mezclado con heces, empleándose cultivos axénicos de *E. histolytica*, cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS con $1,5, 10$ y 15×10^6 trofozoítos en ambas determinaciones. En la primera evaluación, el reactivo identificó plenamente al antígeno y el grado de aglutinación fue proporcional a la dilución del mismo. En los coproparasitoscópicos se identificaron 5 muestras positivas al microscopio, 3 con preservador y 2 exentas de éste; las últimas presentaron aglutinación con el reactivo de latex, observándose que el fijador interfiere con la reacción de aglutinación, arrojando resultados falsos negativos. La sensibilidad y especificidad de la técnica de aglutinación simple, al compararla con la microscópica, fueron de 100%. Ninguna de las muestras de suero fue positiva para *E. histolytica*. Por análisis de varianza se encontró diferencia significativa del efecto de las diluciones del antígeno sobre la variable cualificada (cepa HM1:IMSS, $F=57.56$ $r<0.01$ y para la cepa HM38:IMSS, $F=127.36$ $r<0.01$); sin embargo, para la población sólo se encontró diferencia significativa para la cepa HM1:IMSS ($F=3.08$ $r<0.05$). Al cuantificar las proteínas, la cepa HM1 presentó valores menores que la HM38, pero ambas se comportaron igual cuando las proteínas fueron corridas electroforéticamente y cuando se identificaron las fracciones antigénicas de las mismas. Los polipéptidos menos percibibles por electroforesis presentaron mayor capacidad inmunogénica para la producción de anticuerpos en ambas cepas. Al amplificar las secuencias genómicas de las dos cepas, se obtuvo un producto amplificado de 145 pb en ambas, por lo que existe una correlación entre la técnica de PCR y la de aglutinación al detectar específicamente cepas de *E. histolytica*. El reactivo "Calderón" reconoció a los antígenos de las dos cepas. El límite de detección para antígeno total de *E. histolytica* fue de 1.25mg/ml para la HM1 y de 0.62 mg/ml para la HM38. La evaluación del reactivo para detectar anticuerpos en suero fue sensible frente al testigo positivo en una dilución de hasta 1:40. Se concluye que la técnica de aglutinación simple "Reacción Calderón" es confiable para el diagnóstico de *E. histolytica*, además de ser rápida y sencilla, no requiere de gran destreza. La técnica microscópica presenta algunas limitantes y la de PCR aunque es la más sensible su costo está muy por encima de las otras técnicas.