

1. INTRODUCCION

La amebiasis está catalogada a nivel mundial como la tercera parasitosis causante de muerte. Se presenta con más frecuencia en regiones tropicales con climas cálidos, templados y sobre todo en áreas marginadas e insalubres donde predomina el hacinamiento y el manejo inadecuado del agua y las excretas. La amebiasis intestinal afecta principalmente en los extremos de la vida de los individuos y los abscesos hepáticos ocurren con mayor frecuencia en varones entre 30 y 45 años. Puede afirmarse que la amebiasis se encuentra entre las primeras causas de morbimortalidad en el país (Martínez, 1989 y Walsh, 1986)

La amebiasis es una de las enfermedades relacionadas con parásitos más comunes y una de las que causan mayor impacto en la salud. En el Instituto Mexicano del Seguro Social se tratan por año aproximadamente un millón de casos. Con los procesos de transición epidemiológica que nuestro país lleva, se ha observado una reducción progresiva en la incidencia y mortalidad ocasionada por la amebiasis invasiva en todas sus formas clínicas. El desarrollo social, económico y la mejoría en las condiciones sanitarias observadas en México, particularmente en la segunda mitad de este siglo, pueden haber acondicionado este proceso. El mejoramiento en la disponibilidad, accesibilidad y utilización de servicios médicos pueden también explicar la reducción que ha sido observada en este padecimiento (Treviño y col. , 1994).

La amebiasis invasora se puede manifestar por síntomas localizados en el colon o bien en otros órganos como hígado, pulmón, cerebro o en piel, por

lo que la enfermedad puede ser estudiada por sus manifestaciones intestinales o extraintestinales. En la amebiasis intestinal la lesión llamada “botón de cuello” puede ser superficial o profunda, en zonas pequeñas o extensas del intestino; en ocasiones las lesiones están cerradas, no se eliminan trofozoítos o quistes, el laboratorio reporta negativo para amebas y la sintomatología persiste.

Son cinco las amebas que pueden parasitar el colon del hombre: *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903, *Entamoeba coli* (Grassi, 1879); Casagrande y Barbagallo, 1895, *Entamoeba hartmanni* Von Prowazek, 1912; *Endolimax nana* (Wenyon y O'Connor, 1917); Brug, 1918 y *Iodamoeba butschlii* (Von Prowazek, 1911); Dobell, 1911, de éstas, la primera es la única que está reconocida como patógena (González, 1994a).

Entamoeba histolytica, el primer protozoario intestinal, ha atravesado el tiempo en su implacable búsqueda para sobrevivir en el papel dicotómico de parásitos y patógenos. Enigmática en su transición de comensal intestinal humano a invasor de tejidos humanos, diverso en su patogenicidad en el hospedero humano y complicada en su interrelación bacteriana en el intestino, *E. histolytica* ha sido el punto central de la investigación intensiva en la biología básica subrayando patogenicidad humana (Reitano, Masci y Bottone, 1991)

Entamoeba histolytica es un protozoario entérico que infecta entre 10 y 20% de la población mundial, estableciéndose específicamente en los habitantes de los países en desarrollo (Conde y de la Mora, 1992). Las

estimaciones más aproximadas sugieren que cerca de 500 millones de personas están infectadas por el parásito y que pueden ser atribuidas más de 110,000 muertes por año a las complicaciones que causa (Organización Mundial de la Salud, 1985), de las cuales más de 2,500 corresponden a la especie que invade al hígado originando abscesos hepáticos amebianos. Esta especie parasita predominantemente al hombre y algunos primates. En México se han encontrado prevalencias de anticuerpos de 5.9% en promedio, pudiendo haber disminuído a la fecha a cifras menores Agencia de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos, 1992; Smith & Meerovitch, 1985).

La *E. histolytica*, única especie patógena del género *Entamoeba* es un protozooario que mide en promedio 25 μm , es esencialmente anaerobio. Al carecer de etapas sexuales o de huéspedes intermediarios permite que su ciclo vital sea sencillo. El trofozoíto se aloja en el contenido intestinal y se reproduce en forma binaria, posteriormente se forman los quistes que son conocidos como la única forma infectante, éstos pueden sobrevivir fuera del huésped durante semanas o meses si el medio es húmedo. Las amebas viven como comensales en el colon (amebiasis luminal) o bien adherirse al epitelio a través de un enlace con carácter de lectina e invadir la mucosa intestinal convirtiéndose en amebas invasoras intestinales. Cuando los trofozoítos entran en el torrente circulatorio pueden originar las formas invasoras extraintestinales, transportándose por la vena porta y formando el absceso hepático amebiano. La virulencia de las cepas de *E. histolytica* tal parece que depende de factores tanto del parásito como del huésped, sobre todo cuando en este último existe una pérdida transitoria de la integridad

funcional de la inmunidad celular o cuando hay una convivencia del parásito con bacterias tales como *Escherichia coli*. Los anticuerpos antiamebianos aparecen en sangre aproximadamente 7 días después del inicio de los síntomas y se encuentran con mayor frecuencia en los casos graves de amebiasis invasiva (Martínez, 1989).

Existen diversos métodos para detectar los anticuerpos séricos, todos emplean antígenos amebianos provenientes de cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica*. Entre los más sensibles y específicos se encuentran la contrainmunolectroforesis (CIE) y la hemaglutinación indirecta (HAI), esta última con mayor sensibilidad, pero la CIE es más simple, rápida y más fácilmente reproducible (Martínez, 1989). También la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) ha presentado resultados satisfactorios (Myung y col., 1992). Todos estos métodos requieren de equipo especial que difícilmente es accesible para pruebas de campo. Es importante señalar que los hallazgos serológicos deben ser evaluados cuidadosamente en base a la sintomatología e historia clínica del paciente, ya que los anticuerpos circulantes pueden detectarse por tiempos prolongados.

La detección de *Entamoeba histolytica* en heces generalmente se realiza mediante la búsqueda microscópica de los trofozoítos y/o quistes de la ameba, aún con las limitaciones que este método presenta.

2. ANTECEDENTES

La patogenicidad de *E. histolytica* en ocasiones es cuestionable, estudios realizados por Sargeanut y col. (1978), revelan que algunas cepas aisladas de portadores asintomáticos y que fueron identificadas como *E. histolytica*, pueden considerarse como no patógenas si el patrón electroforético de sus isoenzimas o zimodemos así lo establecen. Para explicar estos dos diferentes comportamientos clínicos en la amebiasis, se han propuesto dos hipótesis; la primera establece que *E. histolytica* es una especie distintiva en la cual la virulencia no es una propiedad estable, pero que bajo ciertos cambios en las condiciones de cultivo o flora bacteriana se vuelve un patógeno invasivo. La segunda hipótesis se basa en el concepto de que los humanos pueden infectarse con dos especies diferentes del parásito, uno de los cuales causa enfermedad (patógeno) y otro que no la causa (no patógeno). Los estudios mas recientes del patrón isoenzimático de la hexocinasa y de la fosfoglucomutasa de trofozoítos aislados de miles de casos sintomáticos y asintomáticos de amebiasis en diversas regiones del mundo, concluyen en la caracterización de dos categorías distintas: zimodemos patogénicos que se derivan de individuos con historial clínico y zimodemos no patogénicos que proceden de portadores asintomáticos. Estas evidencias sugieren que existen dos comportamientos clínicos diferentes causados por dos entidades biológicas *Entamoeba histolytica* patogénica y *Entamoeba dispar* no patogénica (Kelsall y col., 1994). Ambas poblaciones pueden ser diferenciadas en la actualidad debido al incremento de marcadores genéticos [análisis de secuencia del ácido ribonucleico (rRNA), sondas genéticas y análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción] y

antigénicos [anticuerpos monoclonales (AcM), dirigidos a antígenos superficiales y perfiles isoenzimáticos]. En el mercado norteamericano se comercializan reactivos que reconocen individualmente a las amebas mediante la detección del DNA (Acuña Soto y col., 1993).

El diagnóstico rutinario de la amebiasis se basa en la identificación morfológica de los parásitos detectados en las heces mediante microscopía de luz, lo que permite que exista una alta posibilidad de confusión, debido a la gran similitud que presentan diferentes especies en cuanto a su morfología. La aplicación de nuevas tecnologías para el diagnóstico de *E. histolytica*, que substituyan al método directo tradicional en los laboratorios clínicos de parasitología, es una necesidad. Pruebas inmunológicas, realizadas en suero de pacientes con amebiasis invasiva (Parija, Kasinathan & Rao, 1991; Myung y col., 1992; Lotter, Manweiler & Tanich, 1993), han mostrado éxito al eliminar la insertidumbre que otras pruebas presentan; sin embargo, ningún estudio, hasta el momento, ha planteado la aplicación de dichas pruebas para la obtención de un método, basado en el estudio de las heces de los pacientes, y obtener un diagnóstico rápido, mediante la reacción antígeno anticuerpo en una prueba sencilla de aglutinación.

Un estudio para determinar la confiabilidad de la detección de trofozoítos eritrofagocíticos amebianos, en muestras de heces de pacientes de México, Colombia y Bangladesh, en el diagnóstico de disentería asociado con *Entamoeba histolytica* invasiva utilizando microscopía de luz fue realizado por González y col. (1994b); la disentería amebiana se diagnosticó cuando fueron observados trofozoítos eritrofagocíticos en muestras diarreicas con

sangre. El aislamiento de *E. histolytica* fue caracterizado por electroforesis isoenzimática y se correlacionó con los resultados obtenidos en microscopía. Ellos concluyeron que la sensibilidad y especificidad del examen microscópico de una muestra de heces para el diagnóstico de disentería amebiana es muy alto. El vehículo intestinal de *E. histolytica* detectado por cultivo no indica necesariamente la enfermedad activa en pacientes sintomáticos con diarrea o asintomáticos con *E. histolytica* invasiva y no invasiva, ya que existe la posibilidad de que estén presentes dos poblaciones de la ameba con diferente potencial patogénico el cual podrá determinarse mediante análisis de zimodemos.

Nagano, Ohtomo & Masuda (1990), realizaron un estudio para determinar la sensibilidad y especificidad de diversas pruebas de diagnóstico serológico de amebiasis. Utilizaron la prueba de fijación de complemento (CF), contrainmunolectroforesis (CIE) y la técnica de ELISA. Estas se realizaron con sueros procedentes de pacientes con enfermedad aguda y convalecientes de colitis amebiana y absceso hepático amebiano, como control sueros de pacientes no infectados. La técnica de contrainmunolectroforesis fue menos sensible que la de fijación de complemento y la de ELISA.

Sathar y col.(1990), detectaron inmunoglobulinas IgG e IgM para antígenos de la membrana plasmática por medio del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Estudiaron 61 sueros de 22 pacientes con absceso hepático amebiano (AHA) clínicamente diagnosticado, 10 pacientes hospitalizados con enfermedades diferentes a la amebiasis, 12 controles sanos normales y 17 sujetos de una área endémica de amebiasis. Como

antígeno emplearon fracciones de la membrana plasmática obtenidas por centrifugación diferencial de cultivos axénicos de *E. histolytica* HK9 para detectar a IgG e IgM específicas. Emplearon diluciones de 1/100 y densidades ópticas a 492 nm de 0.200 y 0.250 como el valor de corte para los IgG e IgM respectivos en la técnica de ELISA. Obtuvieron una sensibilidad del 91% que corresponde a 20 de 22 y del 95% (21 de 22) pacientes con AHA. En la prueba, la especificidad de IgM e IgG fue del 95%. Todos los portadores sintomáticos fueron confirmados para la presencia de cepas patógenas, siendo positivas por ELISA-IgG y la prueba amebiana de difusión en gel (PADG). Se observó además, una correlación excelente ($r = 0.96$) entre la prueba de ELISA-IgG y la PADG. Estos ensayos con IgG e IgM mejoran el diagnóstico del AHA por la técnica de ELISA y además, el empleo de las fracciones de la membrana plasmática, acentúa el diagnóstico potencial de la presencia de IgM. Incluso, la presencia de anticuerpos también distingue infecciones actuales o pasadas, pues los anticuerpos persisten al menos por 3 años después de curarse de un AHA. Esta prueba es la primer herramienta inmunológica que distingue una invasión activa de las anteriores.

Tachibana *y col.* (1990), identificaron un antígeno aislado patógeno-específico de *E. histolytica* empleando anticuerpos monoclonales producidos contra trofozoítos de la cepa HM1:IMSS, los cuales reaccionan con las 42 cepas aisladas de 4 clonas que muestran patrones patógenos de zimodemos Z II, ZIIa- , Z II (glucosa fosfato isomerasa+), ZVII, ZVII (glucosa fosfato isomerasa a-, g+), ZXI, ZXIV y ZXIX, sin reconocer las condiciones del cultivo, origen geográfico o síntomas del hospedero en las pruebas de inmunofluorescencia indirecta. En contraste, el anticuerpo

monoclonal no reaccionó con 14 aislados que poseían zimodemos no patogénicos ZI y ZVIII, ni con otros protozoarios entéricos parásitos, tales como *E. histolytica-Laredo*, *E. hartmanni*, *E. coli*, *E. nana*, *Dientamoeba fragilis*, *Trichomonas hominis* y *Giardia lamblia*. El análisis por inmunoelectrotransferencia mostró que el peso molecular de los componentes antigénicos reconocidos por los anticuerpos monoclonales fue de exclusivamente 30,000 en aislados patogénicos de diferentes zimodemos. Estos resultados sugieren que este antígeno es un marcador de los aislados patógenos y que la prueba de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales es útil para asegurar el reconocimiento de las amibas patógenas.

Un estudio para serodiagnóstico de absceso hepático amebiano empleando una técnica modificada de hemaglutinación indirecta fue realizado por Parija, Kasinathan & Rao (1991). En dicha prueba se utilizaron células de *Staphylococcus aureus* (Cowan 1), conteniendo proteína A (SAPA) para mejorar la hemaglutinación de las células rojas sensibilizadas. El uso de células SAPA mejoraron marcadamente la sensibilidad de la prueba y se incrementaron en forma considerable los títulos obtenidos con la mayoría de los sueros. Para un diagnóstico de anticuerpos con título de 1:128 o más, la proteína A-IHA pudo detectar 72 (100%) de los casos de abscesos hepáticos amebianos. Uno (2%) de los sueros dieron reacciones falsas positivas para controles sanos. La proteína A-IHA fue altamente sensible cuando se comparó con la hemaglutinación indirecta (IHA) para serodiagnóstico de absceso hepático amebiano. El nuevo inmunoensayo es simple, económico y requiere de poca destreza.

Stanley *y col.* (1991), realizaron un estudio sobre serodiagnóstico de amebiasis invasiva usando proteína recombinante de *E. histolytica*. Se examinaron 108 muestras procedentes de 110 pacientes mediante análisis de inmunoelectrotransferencia para determinar la presencia de anticuerpos unidos a una proteína recombinante conteniendo la secuencia de la proteína de *E. histolytica* rica en serina (SREHP). Pacientes con amebiasis invasiva originarios de Durban, República de South Africa; San Diego, Cal.; Cd de México y St. Louis Missouri. 53 (82%) de 65 pacientes presentaron anticuerpos a SREHP. En contraste, sólo un paciente (2%) de 43 sin amebiasis invasiva aguda tuvo anticuerpos para SREHP. El valor predictivo de una prueba positiva para anticuerpos anti-SREHP, en la detección de amebiasis invasiva aguda, fue más marcada para los pacientes procedentes de Durban, donde 11 (92%) de 12 pacientes que fueron seropositivos para SREHP, contra 17 (65%) de 26 pacientes que presentaron un diagnóstico serológico positivo con la técnica de difusión en gel. Lo anterior concluye que el uso de pruebas serológicas basado en la fusión de la proteína recombinante SREHP, puede utilizarse como prueba adjunta al diagnóstico de amebiasis invasiva aguda en regiones endémicas.

Lotter *y col.* (1992), realizaron un estudio sobre serodiagnóstico de amebiasis invasiva utilizando una proteína de superficie recombinante de *Entamoeba histolytica* patogénica. La prueba fue realizada bajo el control del promotor de la RNA polimerasa T₇ usando un vector procariótico designado pHisT₇. Este vector permitió una expresión alta de la proteína recEh-P₁, fusionada a un extremo de la secuencia conteniendo ocho residuos de histidina, los cuales facilitaron la purificación por la afinidad cromatográfica en columnas de níquel bajo condiciones altamente

desnaturalizadas. La recEh-P₁ purificada, resultó ser soluble en agua después de una diálisis prolongada y fue usada como el antígeno para la detección de anticuerpos antiamebianos en suero por aglutinación y ELISA. En ambas pruebas, todos los sueros de los pacientes con amebiasis invasiva reaccionaron a recEh-P₁, mientras que ninguno de éstos fue altamente controlado, incluyendo individuos con amebiasis no invasiva o de pacientes que padecían infecciones de bacterias o protozoarios no relacionados con *E. histolytica*.

Myung y col. (1992), utilizaron como antígeno blanco, en la prueba de ELISA para el diagnóstico de amebiasis invasiva aguda, una proteína recombinante de *E. histolytica* rica en serina ligada a la proteína de unión a maltosa (SREHP/MBP). El estudio lo realizaron con 65 muestras de suero de pacientes con absceso hepático amebiano y 40 de pacientes asintomáticos, que sirvieron como control. La prueba SREHP/MBP/ELISA tuvo una sensibilidad de 74% y una especificidad de 55%. Cuando la prueba se corrió, utilizando un recombinante purificado, la sensibilidad subió a 79% y la especificidad a 87%, lo que permite considerar a este método como útil en serodiagnóstico de amebiasis invasiva.

Zhang y col. (1992), realizaron un estudio en el que usaron antígeno de superficie 170-kDa recombinante de *Entamoeba histolytica* para el serodiagnóstico de amebiasis e identificación de la molécula nativa inmunodominante. Expresan al gene que codifica para uno de los mayores antígenos de superficie de *E. histolytica*, la proteína 170-kDa (1,270 aminoácidos), una proteína de fusión al glutatión S-transferasa. Lisados de bacterias inducen a expresar una de estas proteínas, que fue usada como los

antígenos blanco en análisis inmunolectrotransferencia para determinar si un antígeno 170-kDa recombinante puede servir de base en una prueba serológica, usada para detectar amebiasis invasiva y si hay diferencia entre inmunogenicidad de tres dominantes mayores del antígeno 170-kDa. Esto lo hicieron en pacientes con amebiasis invasiva de tres áreas donde la enfermedad era endémica y dos sitios en los Estados Unidos; 54 (90%) de 60 presentaron anticuerpos contra la proteína 170-kDa recombinante. Entre 37 pacientes de regiones donde la enfermedad era endémica y 20 pacientes de los Estados Unidos sin enfermedad amebiana, uno (2%) de 57 presentó anticuerpos contra la proteína 170-kDa recombinante. Los estudios demostraron diferencia significativa en la seroreactividad de cada uno de los tres mayores dominantes de la molécula entre pacientes seropositivos, rangos de 100% de seroreactividad con las proteínas de fusión, conteniendo el dominante designado rico en cisteína, el 89% de seropositividad con la proteína de fusión incorporando una región de la porción designada pobre en cisteína y sólo el 9% de seropositividad para la proteína de fusión conteniendo la herencia pseudorepetida.

Abdo-Alla *y col.* (1993), determinaron si los anticuerpos IgM epitope específicos a proteína de adherencia galactosa-inhibible (GIAP) de *E. histolytica*, pueden ser empleados en los ensayos de ELISA para detectar antígenos en suero y heces y diferenciar entre zimodemos patógenos que requieren tratamiento y zimodemos no patógenos. La población de estudio consistió en 50 sueros control de personas sanas de los Estados Unidos de Norteamérica, 50 sueros control de egipcios sanos sin amebiasis, negativos al microscopio; 50 individuos de Egipto identificados como portadores asintomáticos de quistes y 100 egipcios con síntomas de colitis amebiana

que padecían de diarrea, trofozoítos hematófagos en heces y con un resultado negativo para las especies de *Shigella*. Determinaron la presencia de los antígenos GIAP en el suero del 57% de los individuos del Cairo con amebiasis intestinal sintomática y 42% con infección asintomática. El 4% de los controles no infectados o personas con otra infección parasítica presentaron GIAP. Tres de cuatro personas con amebiasis patógena asintomática y el 75% de las personas con diagnóstico de absceso hepático amebiano también fueron GIAP positivos. Los AcM epitope específicos se identificaron en 8 de 15 personas con antígeno fecal de cepas patogénicas y 7 de 8 presentaron proteínas de adherencia en suero. En resumen, fueron capaces de detectar proteínas GIAP en suero y heces por ELISA. La presencia del antígeno amebiano en suero mostró 94% de especificidad para las cepas patógenas de *E. histolytica*, aún durante infecciones asintomáticas.

Haque y col. (1993), prepararon AcM dirigidos contra epitopes patógenos específicos de la galactosa-adhesina de *E. histolytica*, empleándolos en ensayos de ELISA para detectar antígenos de cepas patógenas. Aplicaron su estudio en 74 muestras únicas de heces en pacientes de Bangladesh. La técnica de ELISA mostró reacción positiva en las 12 muestras de amebas patógenas subsecuentemente cultivadas y en 2 de 40 muestras que presentaban otros parásitos o cepas no patógenas de *E. histolytica*. La especificidad y sensibilidad del ensayo para las cepas patógenas fue del 97 y 100 % respectivamente. Los datos preliminares obtenidos manifiestan que, en un futuro cercano podrán ser usados en los ensayos diagnósticos de ELISA, empleando los AcM para la galactosa-adhesina y que ésta será

rápida y sensitiva para detectar la presencia de cepas patógenas y no patógenas de *E. histolytica* en muestras de heces.

Lotter, Mannweiler & Tannich (1993), desarrollaron tres pruebas de aglutinación para la detección de anticuerpos en suero contra *Entamoeba histolytica*. Estas pruebas se realizaron con perlitas de poliestireno carboxilado adheridas con proteína recombinante purificada de *E. histolytica* designada recEh-P₁, en una fracción soluble y en una fracción de membrana (M-LA), ambas preparadas a partir de trofozoitos de *E. histolytica*. Las tres pruebas de aglutinación fueron comparadas con un ensayo de enzima ligada inmunoabsorbente y una prueba de fijación de complemento, basada en antígenos crudos solubles de *E. histolytica*, así como con un ensayo con enzima ligada inmunoabsorbente usando recEh-P₁ como antígeno (P₁-EIA). Muestras de suero de pacientes con amebiasis invasiva (n=30) o con enfermedades infecciosas no relacionadas con *E. histolytica* (n=57), así como sueros de individuos aparentemente sanos (n=25), incluyendo algunos con amebiasis no invasiva (n=5), fueron examinados por los seis métodos. Dependiendo del ensayo empleado, los resultados obtenidos revelan rangos de sensibilidad de 83-100% y rangos de especificidad de 93-100%. P₁-EIA y M-LA dieron mejores resultados, ambos con una sensibilidad de 100% y especificidad de 98%.

La técnica de aglutinación con latex para investigar rápidamente la amebiasis invasiva fue comparada con tres técnicas serológicas estándares por Cummins y col. (1994), dichas pruebas fueron: anticuerpos inmuno fluorescentes (IFAT), hemaglutinación indirecta (IHA) y precipitina en acetato de celulosa (CAP). Cuarenta y seis sueros fueron examinados, 12

de controles negativos, 10 de otras infecciones diferentes a amebiasis y 24 de pacientes con infección luminal o extraluminal con *E. histolytica*. Se observaron reacciones fuertemente positivas con la prueba de aglutinación con latex en 12 de 12 sueros que dieron resultados positivos con CAP, IFAT e IHA. Estos resultados indican una amebiasis invasiva, y revelan que la prueba de aglutinación con latex fue indicadora útil, cuando se compararon los resultados con los obtenidos con técnicas serológicas estándares y que puede ser una herramienta de escrutinio útil en el campo.

Un estudio sobre el diagnóstico de disentería amebiana en pacientes originarios de Bangladesh, mediante la detección del antígeno fecal de *Entamoeba histolytica*, utilizando anticuerpos monoclonales de una cepa invasiva específica de la ameba y la técnica de ELISA, fue realizado por González y col. (1994a). El antígeno fecal captado por ELISA (FAC-ELISA) no presentó reacciones cruzadas con otras especies o con *E. histolytica* no invasiva presentes en heces frescas o inoculadas experimentalmente. El límite de detección en el ensayo para antígeno crudo de *E. histolytica* invasiva diluido en amortiguador salino y heces, fue de 0.58-3.9 mcg/ml respectivamente, el cual es equivalente aproximadamente a 72 y 487 trofozoitos de *E. histolytica* para cada uno respectivamente. La sensibilidad, especificidad y eficiencia de la FAC-ELISA fue de 87, 100 y 98% respectivamente para la detección de antígenos de *E. histolytica* invasiva y de 100% para el diagnóstico de disentería amebiana.

Haque y col. (1994), utilizaron la técnica de ELISA para la detección y diferenciación de antígenos de *Entamoeba histolytica* y *E. dispar* en heces.

Los resultados demostraron que 26 de 27 muestras de heces positivas para *E. histolytica* por observación microscópica directa, fueron también positivas por ELISA; tres de 25 muestras positivas para *E. dispar* y una de 30 con otros parásitos no intestinales dieron una especificidad y sensibilidad para la detección de *E. histolytica* de 93 y 96% respectivamente. Cuando la técnica se utilizó para detectar a ambas especies, fueron positivas 26 de 27 heces con *E. histolytica*, 19 de 25 heces positivas para *E. dispar* y una de 30 heces negativas por microscopía y cultivo para *Entamoeba*, dando una especificidad y sensibilidad de 97 y 87% respectivamente. Concluyen que esta técnica puede realizarse en aproximadamente dos horas y puede ser considerada como una técnica rápida y sensible para la detección de infecciones amebianas.

Kelsall y col. (1994), estudiaron los anticuerpos secretores IgA para la proteína de adherencia galactosa-inhibible en la saliva de pacientes con enfermedad de AHA. Dirigieron los AcM contra la proteína GIAP de 260 kDa de *E. histolytica* y observaron que se inhibe la unión de los trofozoítos con las mucinas del colon, estableciendo que las IgA secretorias anti-GIAP tienen una importante función en la defensa del hospedero contra la amebiasis invasora. Diseñaron una técnica de ELISA para observar si la respuesta de la IgA anti-GIAP de la saliva se presenta en pacientes de Sudáfrica con infección invasiva, concluyeron que 13 pacientes con AHA mostraron títulos de IgA anti-GIAP, mucho más elevados que los determinados para 7 personas sudafricanas hospitalizadas sin enfermedad amebiana, siete adultos sudafricanos sanos y otros siete individuos sanos de Virginia, EUA. De los pacientes con AHA, nueve tuvieron un curso agudo y cuatro habían sido curados de amebiasis hacía dos a ocho meses. No se

observó una correlación estadística directa entre los niveles de IgA anti-GIAP salivaria y anticuerpos séricos anti-GIAP ($r=0.187$). Concluyeron que la GIAP de *E. histolytica* ocurre naturalmente en infecciones invasivas.

Nicholls y col.(1994), utilizaron la técnica de ELISA para el diagnóstico serológico de absceso hepático amebiano (AHA), fue estandarizada y evaluada en sueros de tres grupos de pacientes: tres pacientes con diagnóstico confirmado por aislamiento del parásito, 37 pacientes con diagnóstico establecido por signos clínicos y estudios de ultrasonido, siete pacientes en los que se estableció el diagnóstico por signos clínicos y un doble positivo por prueba de inmunodifusión. 91 muestras de individuos sanos y 22 de pacientes con otras enfermedades del hígado o parasitarias también fueron incluidas en el estudio. La concentración óptima de antígeno de *E. histolytica* fue de 1.225 mcg/ml y las diluciones óptimas de suero y conjugado de IgG-fosfatasa alcalina fueron de 1:400 y 1:4000 respectivamente. El punto de corte en la prueba de ELISA en este estudio tuvo una absorbancia de 0.34. Los parámetros de la prueba fueron: sensibilidad=95.7%, especificidad=100%, valor predictivo positivo=100% y valor predictivo negativo=98.2%. La prueba de ELISA resultó ser una gran herramienta de diagnóstico para el establecimiento de la etiología amoebica de un paciente con sintomatología clínica de AHA. La prueba puede ser utilizada para estudios seroepidemiológicos de la prevalencia de amebiasis invasiva en una determinada población, que permite el proceso de gran número de muestras a un costo más bajo que otras pruebas serológicas.

Sharma y col. (1994), realizaron un estudio tendiente a detectar anticuerpos de *Entamoeba histolytica* utilizando la microtécnica "EIA", que requiere de

solo una gota de sangre obtenida mediante punción en un dedo y depositada en una tira de papel filtro, para posteriormente eluir el suero en un amortiguador durante 30 min a temperatura ambiente. La prueba se realizó en 24 pacientes con absceso hepático amebiano confirmado y 25 controles de pacientes aparentemente sanos. Se obtuvo una sensibilidad y especificidad de 96 y 92% respectivamente.

Attia, Rizk & Motawea (1995), realizaron un estudio en 200 individuos aparentemente sanos escogidos al azar de áreas rurales. Ellos fueron examinados clínica, sonográfica y parasitológicamente para quistes de *Entamoeba histolytica* y por ELISA para antígenos amebianos circulantes. Fueron negativos para antigemina 1/16, que fueron considerados para el título de diagnóstico de hepatitis amebiana. Para el estudio (basado en hospital) fueron llevados a cabo análisis en 27 pacientes que sufrían de absceso hepático amebiano. Los antígenos amebianos circulantes fueron detectados en 66.66% de ellos antes del tratamiento y descendió hasta 14.82% después de dos meses de administrar tratamiento. No hubo una asociación significativa entre el diámetro del absceso y el nivel de antígeno amebiano circulante. Se concluyó que el antígeno amebiano circulante puede ser útil para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con absceso hepático amebiano.

Garfinkel y col. (1989), desarrollaron varias sondas de DNA las cuales hibridan con secuencias de *E. histolytica*. Detectan las variaciones en el modelo de hibridación de diferentes cepas de la ameba y obtienen cuatro tipos de longitud de los fragmentos de restricción. De estos, la primera clase perteneció a *E. invadens* y *E. histolytica* cepa Laredo; las siguientes dos

clases consistieron de varias cepas de *E. histolytica* aisladas de pacientes asintomáticos y mostraron un patrón isoenzimático patogénico (zimodemos). El cuarto grupo consistió de *E. histolytica* con zimodemos no patogénicos obtenida de portadores asintomáticos. Obtienen la secuencia de DNA para las cepas con zimodemos patógenos y no patógenos denominándolas como sondas P145 y B133, las cuales hibridizan selectivamente con DNA aislados de las cepas patógenas y no patógenas. Consideran que estas nuevas sondas pueden emplearse con propósitos diagnósticos y podrían servir como herramienta para investigar las bases moleculares de patogenicidad y los mecanismos genéticos que regulan el comportamiento agresivo del parásito.

Por otro lado, Samuelson y col. (1989), diseñaron una sonda de DNA-especie específica y sensitiva para el diagnóstico rápido de *E. histolytica* aislada de heces, como una alternativa que substituya al diagnóstico microscópico. La sonda de hibridación se sintetizó por monitoreos a la librería genómica de la cepa virulenta HM1:IMSS para detectar plásmidos recombinantes que contienen secuencias de DNA altamente repetidas del parásito. La clona de diagnóstico contenía 145 pares de bases (pb) las cuales se presentan repetidas en el genoma. La sonda demostró una sensibilidad de 1.0 y una especificidad de 0.93 en un estudio de campo realizado con muestras de heces en una población de México, D.F. que contenían *E. histolytica*, *E. coli*, *Giardia lamblia*, *Endolimax nana*, *Trichuris trichiuria* y *Chilomastix mesnili*. Concluyen que la sonda puede emplearse para un diagnóstico rápido y seguro de *E. histolytica*.

Mirelman y col.(1990), describieron los elementos DNA repetitivos característicos de las amibas patógenas *E. histolytica* y diseñaron un procedimiento para detectarlos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Aislaron la cepa del parásito de pacientes sintomáticos y determinaron la presencia del modelo isoenzimático patógeno.

El desarrollo reciente de tecnologías en la amplificación del DNA y RNA han permitido el diseño de técnicas de diagnóstico ultra-sensibles para enfermedades infecciosas como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Ensayos de DNA basados en secuencias únicas encontradas en elementos repetitivos de *Entamoeba histolytica* han sido clonados, secuenciados y caracterizados. Algunas presentaciones de oligonucleótidos sintéticos han sido preparados hasta con 20 nucleótidos. Los sistemas de detección basados en esta tecnología presentan un alto grado de sensibilidad ya que detectan hasta una célula del parásito y son altamente específicos (Lizardi & Kramer, 1991).

El desarrollo de la inmunología molecular ha traído como consecuencia la caracterización de los antígenos superficiales de *E. histolytica*; entre estos se encuentra la proteína de adherencia galactosa-inhibible llamada GIAP (porque la muerte de las células blanco puede inhibirse completamente por los monómeros de galactosa o carbohidratos con grupo galactosa terminal en forma experimental), la cual media la adherencia de la ameba a las mucinas del colon, células epiteliales y células inflamatorias del hospedero cuya unión es necesaria para causar la lisis en las células blanco de los mamíferos (Abdo-Alla y col., 1993 & Chu-Jing y col., 1995).

Empleando la técnica de PCR, Acuña-Soto *y col.* (1993), estudiaron la epidemiología de *E. histolytica* patógena y no patógena en una comunidad rural de Chiapas, México. Conservaron las heces en formaldehído para extraer el DNA y realizan ampliaciones con dos juegos de iniciadores que discriminan entre las cepas patógenas y las no patógenas. Estudiaron 201 individuos seleccionados al azar, 25 de ellos (12%) fueron diagnosticados como positivos al examen microscópico. La PCR identificó a 24 de éstos como positivos con una sensibilidad del 0.96 y de los 176 individuos negativos sólo tres fueron identificados por la PCR como positivos, con una especificidad del 0.98. El análisis de la PCR define tres tipos de poblaciones, 14 casos positivos para cepas patógenas y no patógenas, 9 casos positivos para cepas patógenas y negativos para no patógenas y sólo un caso fue negativo para cepas patógenas y positivo para no patógenas. Las amebiasis estudiadas estuvieron fuertemente asociadas con *E. coli* y *E. nana*.

Purdy *y col.* (1993), analizaron la familia de genes que codifica para la subunidad de adhesina 170 kDa galactosa-específica. Definieron a la subunidad pesada de la adhesina de unión a galactosa de 170 kDa de *E. histolytica* como un elemento determinante para que la amiba se ligue a las células blanco y efectúe la lisis. Para determinar la presencia y complejidad de la familia de genes hg/1 de la subunidad 170 kDa, hibridizaron con fragmentos de DNA la librería genómica de la amiba desde el 5' al 3' de hg/1. Identificaron los distintos extremos de los genes de la subunidad pesada incluyéndose a hg/1, hg/2 y un tercero, no reportado aún, denominado como hg/3. Secuenciaron el marco de lectura abierta de hg/3, determinando además la secuencia de codones para los aminoácidos que codifican. El

valor intrínseco de sus hallazgos, van dirigidos a explicar los mecanismos que usa la ameba para adherirse a las mucinas glicoprotéicas del colon y a células efectoras de la respuesta inmune como neutrófilos y linfocitos, vía una adhesina galactosa-específica de la superficie celular. La adhesina purificada está constituida por un heterodímero que consta de una subunidad ligera de 35 kDa y una pesada de 170 kDa. La inhibición de la adhesina por Ac anti 170-kDa o galactosa libres bloquea la capacidad de la ameba para ligarse y lisar las células del hospedero. Su propuesta fue establecida en la hipótesis de que la subunidad pesada está codificada por una familia de genes.

Chu-Jing *y col.* (1995), estudiaron a la subunidad de 170 kDa de la lectina de adherencia galactosa-inhibible, la cual media la unión de la ameba a mucinas del colon y células del hospedero y determinan el fragmento de DNA que la codifica. Diseñaron un método mediante la PCR en base a sus observaciones recabadas en los ensayos con endonucleasas de restricción. Denominaron a la tercer sección del fragmento como LC3, caracterizándola como una región que codifica una proteína de fusión rica en cisteína. Elaboraron AcM antilectina e inmunizaron animales de laboratorio con la proteína LC3-codificada recombinante, obteniendo elevados títulos de anticuerpos en suero y una inmunidad protectora contra trofozoítos virulentos axénicos. Esta noble vacuna mostró una eficiencia del 71% bajo una $r < 0.01$. Concluyeron que la porción recombinante rica en cisteína de la subunidad 170 kDa de la lectina fue altamente antigénica, inmunogénica y efectiva como una vacuna contra el AHA en un modelo de experimentación.

Estrada y col. (1995), realizaron un método llamado Reacción en Cadena de la Polimerasa-Hibridación, Ensayo Enzimático Liberado (PCR-HERA) para detectar amplificaciones de PCR que contienen un corte con una enzima de restricción. El producto PCR es hibridizado a un oligonucleótido sintético que es inmovilizado en una placa de microtitulación. El desdoblamiento específico del híbrido resultante, por una restricción de la endonucleasa, libera un brazo del DNA inmovilizado marcado con fluorescencia. Este método detecta secuencias específicas de especie del DNA ribosomal extra-cromosomal de *Entamoeba histolytica* y es considerado como una técnica de alta especificidad que no requiere de pasos de lavado y que puede ser fácilmente automatizado.

3. OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es establecer un método de diagnóstico rápido, sencillo y económico, con elevados niveles de sensibilidad y especificidad para la identificación de *Entamoeba histolytica* en heces, basado en el principio de aglutinación simple “Reacción Calderón”. Asimismo, evaluar un reactivo constituido por antígenos de *E. histolytica* para detectar los anticuerpos correspondientes en suero.

4. IMPORTANCIA

El diagnóstico de la amebiasis tradicionalmente se hace mediante la búsqueda de los trofozoítos y/o quistes del parásito en muestras de materia fecal. Hasta la fecha, la mayoría de los laboratorios de diagnóstico utilizan al microscopio óptico para lograr tal fin mediante examen parasitológico seriado, aún con las limitaciones que éste implica. Sin embargo, debido a la frágil naturaleza de la ameba, el examen microscópico en ocasiones se complica observándose sólo el 50-60% de los quistes excretados, lo que trae por consecuencia que el diagnóstico se dificulte, no descartando además, que aún cuando el laboratorista esté debidamente capacitado, éste llegue a confundir a las amebas con macrófagos o leucocitos que contienen eritrocitos fagocitados o bien con otros organismos morfológicamente similares o por reacciones antigénicas cruzadas con otras amebas entéricas no patógenas. Por otro lado, la detección de anticuerpos antiamebícos en el suero de pacientes no es un indicador relevante, ya que su presencia puede

mas bién ser el resultado de una infección pasada que el de una patología activa actual (Conde y de La Mora, 1992).

En el diagnóstico microscópico, dado que morfológicamente *E. histolytica* y *E. hartmanni* son iguales, su diferenciación debe hacerse en base a su tamaño, lo que implica que los microscopios utilizados para este análisis deben estar provistos de micrómetros oculares calibrados, esto hace que a nivel operativo los laboratorios clínicos no hagan tal diferencia y por consecuencia que los informes de resultados no sean correctos. Además, no debe dejarse al margen el error que puede presentarse en cuanto al tamaño de la ameba cuando después de la división celular éstas permanecen pequeñas hasta que se enquistan.

Con excepción del método microscópico, cuyo costo resulta relativamente bajo, la mayoría de los métodos que utilizan nuevas tecnologías para el diagnóstico de amebas presentan un costo elevado y el requerimiento de equipo especial, por lo que resulta de gran interés para los laboratorios de diagnóstico tener a su alcance un método simple, rápido, de bajo costo y que presente sensibilidad y especificidad para la especie de ameba deseada.

5. HIPOTESIS

La técnica de aglutinación simple (“Reacción Calderón”) para la detección de *Entamoeba histolytica* es rápida, sencilla, confiable y de bajo costo.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Plan General de Trabajo

Se evaluó una técnica de aglutinación simple “Reacción Calderón” para el diagnóstico de *Entamoeba histolytica* en heces y en suero, para detectar antígenos y anticuerpos de la ameba respectivamente.

Las muestras de heces se examinaron, además de la técnica de aglutinación, por microscopía, utilizando la técnica de Flotación de Faust. Las muestras de suero sólo se examinaron por la técnica de aglutinación. La técnica de PCR se realizó solamente a partir de cultivos axénicos de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

Se examinaron 253 muestras de heces (196 fijadas con formol y 57 sin fijador) y 79 de suero procedentes de pacientes que acuden a diversos centros hospitalarios y a laboratorios clínicos. De las muestras de heces no se obtuvo información sobre antecedentes de amebiasis y de las de suero, sólo una presentaba este antecedente.

Asimismo, se obtuvieron antígenos totales a partir de cultivos axénicos de *E. histolytica* HM1:IMSS y HM38:IMSS (donados por el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, la primera considerada como de mayor virulencia que la segunda), con éstos se prepararon diferentes diluciones que sirvieron para realizar la prueba de aglutinación simple y determinar la sensibilidad de la misma. En los antígenos se cuantificaron y caracterizaron las proteínas y se identificó la fracción

antigénica de éstas. Asimismo, se realizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Por otro lado, para descartar la posibilidad de falsos negativos, muestras negativas microscópicamente para *E. histolytica*, se mezclaron con los antígenos completos obtenidos de los cultivos axénicos de la ameba y sus diluciones correspondientes para realizar la prueba de aglutinación.

Para evaluar el reactivo que identifica anticuerpos en suero, además de los sueros de los pacientes, se prepararon diluciones de un suero positivo conteniendo anticuerpos de *E. histolytica* y con éstas se realizó la prueba de aglutinación.

Todas las pruebas que se realizaron para la evaluación de las técnicas se hicieron por triplicado.

Los resultados obtenidos se sometieron a análisis estadístico y se determinó la sensibilidad y especificidad de la técnica de aglutinación como parte de los objetivos de este estudio.

6.2 Detección de *E. histolytica* en heces por microscopía (Beaver, Jung & Cupp, 1986; Smith, 1979)

En un tubo de 13x100 mm se depositó aproximadamente 1 g de la muestra de heces, se agregó agua destilada hasta la mitad del tubo, se homogenizó y se completó con agua destilada hasta 2/3 del volumen total del tubo, se homogenizó y se centrifugó a 2,500 rpm durante 1 min. El sedimento se

lavó dos veces con agua destilada y posteriormente se agregó una solución de sulfato de zinc ($d=1.18$ para muestras frescas y $d=1.20$ para muestras fijadas con formol) hasta la mitad del tubo, se homogenizó y se agregó un poco más de la solución hasta aproximadamente 1 cm abajo de la boca del tubo, Se centrifugó a 2,500 rpm durante 1 min. Se elevó el nivel del líquido, agregando un poco de éste hasta formar en la parte superior un menisco, se colocó encima un cubreobjetos de 22x22 cm, se dejó reposar 10 min y posteriormente se levantó éste en forma vertical para luego dejarlo caer lentamente sobre una gota de lugol (Iodo resublimado 5g, KI 10 g, agua destilada 100 ml). Se observó al microscopio con objetivos 10X y 40X.

6.3 Detección de *E. histolytica* por el método de aglutinación simple (REACCION CALDERON)

6.3.1. Prueba en heces.

Se utilizó un reactivo elaborado con latex-poliestireno sensibilizado con anticuerpos provenientes de una cabra inmunizada con antígeno total de *Entamoeba histolytica*, que al mezclarlo con el sobrenadante de una suspensión de heces o con antígeno proveniente de cultivos axénicos de la ameba, por aglutinación simple, se puso en evidencia la presencia del antígeno correspondiente (Reacción Calderón).

Se homogenizaron aproximadamente 0.5 g de heces con 2 ml de solución salina (NaCl al 0.85%) en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm. Se centrifugó la mezcla a 2,500 rpm/5 min y del sobrenadante se depositó una gota sobre una placa de vidrio, se agregó una gota del reactivo de latex, se mezcló con

un palillo y con movimientos oscilatorios de la placa se obtuvo la aglutinación en un período no mayor de 3 min (grumos blancos, grandes, que se observan a simple vista sobre superficie oscura)

6.3.2. Prueba en suero.

Se utilizó un reactivo elaborado con liposomas-carbón activado sensibilizado con antígeno total de *Entamoeba histolytica*. Se depositó en una placa de vidrio una gota del suero obtenido de la retracción al coágulo de una muestra de sangre, se mezcló con una gota del reactivo y con movimientos oscilatorios de la placa se puso de manifiesto la presencia de aglutinación en un período no mayor a 3 min (grumos grises que se aprecian a simple vista sobre superficie blanca).

6.3.3. Prueba de aglutinación simple con antígenos totales obtenidos de cultivos axénicos de las cepas de *E. histolytica* HM1:IMSS y HM38:IMSS

6.3.3.1. Obtención del antígeno total.

6.3.3.1.a. Cultivo masivo de *E. histolytica*

Se utilizaron frascos para cultivo en suspensión (Spinners, Bellco Glass, Inc, Vineland, N.J., U.S.A.) de 500 ml de capacidad. El inóculo fue de 30×10^3 amebas/ml en 350 ml de medio PEHPS (peptona de caseína 20.0 g, glucosa 12.0 g, L-cisteína 2.0 g, ácido ascórbico 0.4 g, KH_2PO_4 1.2 g, K_2HPO_4 2.0 g, extracto de hígado y páncreas 500 ml. Los ingredientes se disolvieron en 800 ml de agua desionizada, se adicionó el extracto de hígado

y páncreas y se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 1.0 N, se aforó a 1000 ml y se esterilizó en autoclave a 15 lb/15 min , posteriormente se adicionaron 35 ml de suero descomplementado de bovino, estéril). Se incubaron a 36⁰ C/ 2 días, manteniendo los cultivos estáticos para después pasar a incubarlos en baño María a 36⁰ C/72 h, agitándolos con ayuda de barras magnéticas para mantener los cultivos en suspensión (Said *et al.*, 1988).

6.3.3.1.b. Cosecha de los trofozoítos.

Concluido el tiempo de incubación se cosecharon los trofozoítos de las amebas mediante inmersión del frasco de cultivo en agua-hielo durante 10 min. El medio de cultivo con las amebas se centrifugó en botellas de polipropileno de 500 ml con tapón de rosca (Damon IEC Div MA, U.S.A.) a 1,200 x g/ 10 min a 4⁰C y se lavaron dos veces con amortiguador salino PBS (NaCl 6.5 g, K₂HPO₄ 2.6 g, KH₂PO₄ 0.4 g; se disolvieron los componentes en 700 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 7.4 y se aforó a 1000 ml; la solución se fraccionó en alícuotas de 100 ml y se esterilizó en autoclave a 15 lb/15 min). Las amebas se resuspendieron en medio PEHP (PEHPS desprovisto de suero de bovino) y se contaron las células utilizando una cámara de Neubauer (Said y col,1988).

6.3.3.1.c. Determinación de la densidad celular.

Los cultivos enfriados en agua-hielo se homogenizaron cuidadosamente y se contaron las células en la cámara de Neubauer mediante el siguiente procedimiento: Se colocó muestra en ambos compartimientos de la cámara y se contaron las células presentes en los cuatro cuadrantes mayores de cada compartimiento (ocho cuadrantes en total) el promedio de éstos se multiplicó por 10^4 y se tomó como el número de amebas/ml de medio. Todas las manipulaciones se realizaron bajo condiciones de esterilidad. El inóculo se ajustó para tener suspensiones de 1, 5, 10 y 15 x 10^6 amebas/tubo y con éstas se obtuvo el antígeno total individualmente

6.3.3.1.d. Preparación del antígeno.

Los tubos, conteniendo los paquetes celulares, se colocaron en un baño con agua-hielo para lograr el desprendimiento de las células adheridas a las paredes de los tubos y se centrifugaron a 2,000 rpm/5 min (Centrifuga Beckman, Modelo TJ-6). A cada uno de los paquetes celulares se les adicionó 3 ml de agua bidestilada estéril y posteriormente se sumergieron en una mezcla de hielo seco y alcohol hasta lograr la congelación, luego se transfirieron a un recipiente con agua a temperatura ambiente para descongelar la suspensión. Este procedimiento se repitió 10 veces. Se adicionó a cada tubo 1 ml de solución amortiguadora de glicina a pH 2.5 (10g de glicina en 500 ml de agua destilada estéril), se ajustó el pH de la solución a 2.5 con HCl 0.1N. Los tubos se calentaron en baño María a $55^{\circ}\text{C}/30$ min, cuando alcanzaron la temperatura ambiente, se ajustó el pH a

7.0 con NaOH 0.1N (Com. Pers. Dr. Librado Ortiz) y se agregó a cada tubo 10 mg de timerozal (Sigma Chem. Co.). Se cuantificaron y caracterizaron las proteínas de los antígenos mediante el micrométodo de Lowry (Stoscheck, 1995) y por electroforesis en gel de poliacrilamida (Weber y Osborn, 1969) respectivamente, asimismo se realizó la identificación antigénica por la técnica inmunoelectrotransferencia (Aldovini y Walker, 1989).

6.3.3.2. Cuantificación de proteínas en los antígenos (Micrométodo de Lowry)

Se trazó una curva de referencia con concentraciones conocidas de proteína y posteriormente bajo las mismas condiciones se realizó la cuantificación de la proteína en los antígenos totales.

6.3.3.2.a. Curva de referencia.

Se prepararon diluciones a partir de una solución de albúmina de huevo (Fisher Scientific Co.) conteniendo 1 mg/ml, posteriormente se hicieron diluciones para obtener desde 0.01 a 0.07 mg/ml de proteína respectivamente. Se transfirieron 100 µl de cada dilución a las cavidades de una placa de policarbonato de 96 pozos (Nunc-immuno plate, Maxi Sorp, Inter Med), posteriormente se adicionaron en cada pozo 25 µl de tartrato de cobre 5X (A+B+C, 1:1:100; A= sulfato de cobre 5 %, B= tartrato de sodio y potasio 10 % y C= NaOH 0.5N). La placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se adicionó en cada pozo 10 µl del reactivo de Folin (Folin Ciocalteu Fenol, diluído con NaOH 1N; 1:1), se incubó a

temperatura ambiente durante 20 min y se leyó al espectrofotómetro (Microplate-Bio-Tek Instruments EL 311) a 630 nm. Se trazó una curva de concentración de proteína contra Absorbancia.

6.3.3.2.b. Cuantificación de proteínas.

Se procedió igual que para la curva de referencia, realizando diluciones del antígeno (1:5, 1:10 y 1:15), substituyendo la albúmina de huevo por el antígeno a evaluar. Se interpoló el valor de la absorbancia en la curva de referencia para determinar la concentración de proteína en cada muestra de antígeno.

6.3.3.3. Caracterización de proteínas.

Se utilizó un gel de poliacrilamida al 12% con dodecil sulfato de sodio. Agua 3.3 ml, mezcla de poliacrilamida al 30% (poliacrilamida 29.2%, N,N' methylene-bis-acrylamide 0.8%) 2.1 ml; TRIS 1.5M pH 8.8 2.5 ml; dodecil sulfato de sodio al 10% 0.1 ml; persulfato de amonio 0.1 ml; TEMED (N, N, N', N'-tetramethyldiamine) 0.004 ml.

6.3.3.3.a. Preparación de las placas de gel de poliacrilamina.

Se colocaron dos placas de vidrio con un separador de plástico para dejar un espacio entre ambas de aproximadamente 3 mm y se sujetaron con una pinza por cada lado. Se selló la parte inferior con una capa de agarosa al 2%

y se dejó solidificar. Se agregó la solución de poliacrilamida al 12% hasta cubrir aproximadamente 4/5 partes del espacio entre placas, se dejó solidificar y se agregó una solución de poliacrilamida al 3% hasta cubrir por completo el espacio entre placas, se colocó inmediatamente un peine de plástico para que al solidificar quedaran formados carriles en la placa de gel, en donde posteriormente se depositaron las muestras de antígeno a evaluar y los marcadores correspondientes.

6.3.3.3.b. Marcadores.

Se utilizaron los siguientes marcadores: β galactosidasa (116 kDa), albúmina bovina (66 kDa) e inhibidor de tripsina (20.1 kDa).

6.3.3.3.c. Preparación de la muestra de antígeno.

Se suspendieron 100 ml de cada antígeno en amortiguador mercapto (TRIS base 0.45 g; dodecil sulfato de sodio 1.20 g; glicerol 6.0 g; azul de bromofenol 0.06 g; β -mercapto etanol 3.0 ml y agua bidestilada 21.0 ml), dilución 1:1, se calentaron a 100 °C/ 3 min.

6.3.3.3.d. Corrimiento de la muestra.

Se colocaron 20 ml de cada muestra de antígeno en los diferentes carriles formados en la placa de gel de poliacrilamida y en los carriles del extremo derecho los marcadores correspondientes. La placa se sumergió en un

amortiguador de corrimiento 1X (glicina 14.41 g; TRIS 3.02 g y dodecil sulfato de sodio 1.0 g , se disolvieron en 600 ml de agua bidestilada y se aforó a 1000 ml) . El corrimiento se llevó a cabo bajo condiciones de 200 V, 30 mA en corriente constante, durante 5 h.

6.3.3.3.e. Tinción del gel de poliacrilamida.

La placa de gel se sumergió en una solución de Commassie (Sigma, Co.)/ 1 h y se decoloró, primero, con una solución de metanol-ácido acético-agua (150:70:280)/ 1 h y posteriormente con la misma solución pero con la proporción 70:30:400 / 5 h.

6.3.3.3.f. Interpretación.

Las bandas resultantes en los antígenos se compararon con las desarrolladas por los marcadores utilizados y la molaridad de las proteínas se determinó por su desplazamiento de acuerdo al método de Weber y Osborn (1969). Se hizo una curva de calibración de acuerdo a la movilidad de los marcadores con pesos moleculares de 66, 36, 29 y 20.1 kDa, utilizando la fórmula de $R_f = \text{distancia recorrida por el marcador de peso molecular conocido} / \text{diatancia recorrida hasta el frente de corrimiento}$. De igual forma se procedió para las proteínas correspondientes a los antígenos de las cepas HM1 y HM38.

6.3.3.4. Identificación de las fracciones antigénicas de *E. histolytica* por la técnica de “Western Blot” (Aldovini & Walker, 1989; Burnette, 1981; Stowbim, Staehelin & Gordon, 1979).

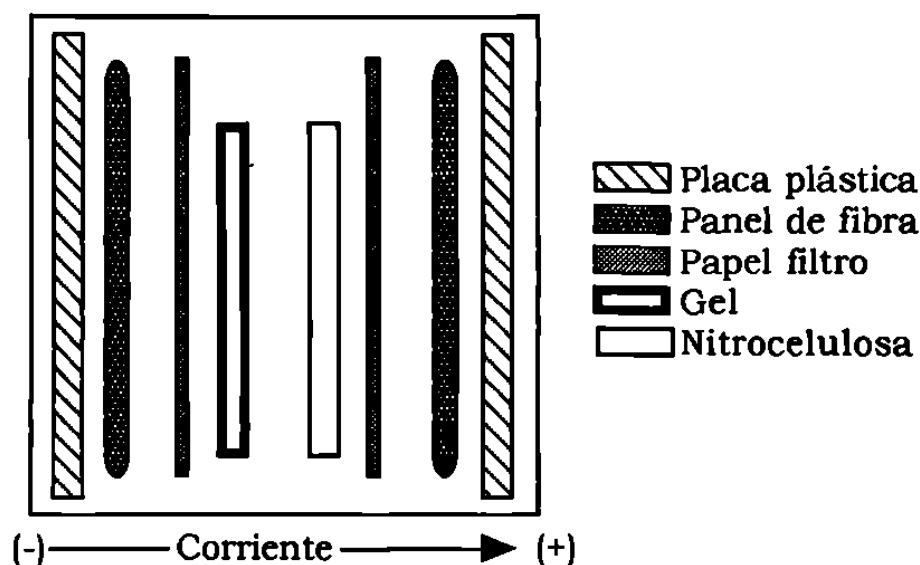
La técnica se realizó de acuerdo a los autores, con algunas modificaciones en el laboratorio.

6.3.3.4.a. Electroforesis.

Se utilizó un gel concentrador de poliacrilamida al 5% y uno resolvente al 12% para la separación de los polipéptidos utilizando un amortiguador de glicina, se colocaron 20 ml de cada una de las muestras en los carriles correspondientes y se pasó a una cámara con una corriente constante de 200 V/3 h. Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Gibco).

6.3.3.4.b. Transferencia.

El gel se colocó en un bastidor formando un “sandwich” con la siguiente distribución: en la parte externa, un panel de fibra; en la interna, una hoja de papel filtro; en el centro, el gel y la hoja de nitrocelulosa como se observa en la figura.



Distribución del "sandwich" para realizar la electroinmunotransferencia

Posteriormente el bastidor se colocó en una cámara con un amortiguador de transferencia glicina-metanol (TRIS 0.09 g, glicina 43.2 g y metanol 600 ml, todo se aforó a 3000 ml) y se hizo el corrimiento durante 12 h a 200 mA constantes. Una vez terminada la transferencia, la nitrocelulosa fue teñida con rojo Ponceau (Sigma Chem. Co.) durante 5 min para visualizar la transferencia de las proteínas, posteriormente se eliminó el colorante lavando la membrana dos veces con agua destilada durante 5 min. La membrana de nitrocelulosa, conteniendo las proteínas, fue bloqueada con un amortiguador salino de fosfatos (PBS) conteniendo tween 20 al 2% /10 min. En seguida se adicionó el primer anticuerpo contenido en un suero problema (reactivo control positivo para detectar anticuerpos de *E. histolytica* en suero "Reacción Calderón") a una dilución 1:100 y se incubó a temperatura ambiente (aprox. 28°C)/2 h. Posteriormente se lavó la membrana en tres ocasiones durante 5 min utilizando una solución de fosfatos (PBS-tween al 0.05%). Se adicionó el segundo anticuerpo, el conjugado comercial anti-IgG-fosfatasa alcalina (Sigma, Chem. Co.) dilución 1:10,000 en PBS-Tween 0.05%, se incubó durante 1 h y se lavó nuevamente la membrana.

Finalmente se agregó el sustrato (5 mg/ml de BCIP y 10 mg/ml de NBT (Sustrato Kit Pierce). Cuando aparecieron las bandas (aprox 10 min), la reacción se detuvo con agua bidestilada y la membrana se secó entre papel absorbente.

6.4. Detección de secuencias genómicas de *E. histolytica* por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Esta técnica se realizó a partir de cultivos axénicos de las cepas de *E. histolytica* HM1:IMSS y HM38:IMSS.

Las cepas de *E. histolytica* se cultivaron en medio de PEHPS (Said y col., 1988) y se obtuvieron paquetes celulares de 1×10^6 trofozoitos /ml; éstos se depositaron directamente en tubos Eppendorff y se suspendieron en amortiguador de fosfatos-formalina al 10 % hasta el momento de realizar la prueba.

6.4.1. Obtención del DNA de *E. histolytica*.

El DNA de *E. histolytica* de las cepas fue obtenido a partir de 100 ml de cada una de las suspensiones, las cuales fueron lavadas tres veces con agua tridestilada, centrifugadas (Microcentrífuga Eppendorff 5415C) y resuspendidas en 100 ml de una solución conteniendo TRIS 100 mM pH 8.0 y EDTA 25 mM. Los tubos fueron sumergidos en una mezcla de hielo seco y etanol durante 3 min y después colocados en agua a temperatura ambiente por 2 min. Este proceso fue repetido tres veces para lograr el rompimiento

de las células. Posteriormente, los tubos fueron sometidos a sonicación (Branson, modelo B-32) durante 10 seg y después se mezclaron con 200 ml de una solución conteniendo TRIS 100 mM pH 8.0; EDTA 25 mM, dodecil sulfato de sodio SDS 1 % y proteínasa K 200 mg (Gibco). La mezcla fue incubada a 50°C / 24 h, posteriormente en agua en ebullición durante 10 min y finalmente se mantuvo congelada hasta la realización de la prueba. La presencia del DNA se corroboró en geles de agarosa al 1%. La concentración del DNA se determinó en una dilución 1:1000 del ácido nucleico extraído leyendo en un espectrofotómetro (Beckman) a 260 nm, registrándose en mg/ml. Posteriormente se hizo otra lectura a 280 nm para determinar la calidad del DNA en base a la relación de las lecturas.

6.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias genómicas de *Entamoeba histolytica*.

La detección molecular de la presencia de secuencias genómicas de *E. histolytica* se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa. Cada reacción se realizó ensamblando los siguientes componentes de la mezcla de reacción en un área separada del equipo termociclador (DNA Thermal Cycler 480. Perkin Elmer Cetus, Norwalk, C.T.). de uno a tres µg del DNA extraído se mezclaron con: TRIS pH 8.0 70 mM; MgCl₂ 4mM; (NH₄)₂SO₄ 20mM, Tritón X-100 0.1%; ditioteitol 1 mM; seroalbúmina bovina 50 µg , iniciadores (Bio-Synthesis) 300 nM de cada uno; deóxido nucleótido trifosfato (dATP, dGTP,dCTP y dTTP) 200 mM de cada uno, TFL DNA Polimerasa termostable (PROMEGA) 2.0

unidades. Las mezclas se cubrieron con 50 ml de aceite mineral estéril. El programa de amplificación usado fue el siguiente:

Paso de la reacción	Temperatura/Tiempo
Inicio caliente	94 ^o C/2 min
Desnaturalización	94 ^o C/30 seg
Alineamiento	55 ^o C/1 min
Extensión	72 ^o C/2 min
35 ciclos	

Para el análisis de los productos de amplificación de PCR, se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2% (Cámara de electroforesis Horizon-58, Life Technologies, Gibco BRL, Horizontal Electrophoresis con fuente de poder Ephortec 1000 volts), colocando en cada carril 8 µg del producto amplificado + 2 ml de líquido de Hall. La detección de los fragmentos amplificados se llevó a cabo mediante una tinción del gel con bromuro de etidio (0.5 mg/ml de agua) para verificar la amplificación de segmentos de 145 pares de bases.

Mezcla de Reacción para cepas de *Entamoeba histolytica*

Reactivo	Volumen				
	l	l'	38	38'	C
Muestra de DNA	1 µl (1µg)	3 µl (3µg)	2.5µl (1µg)	7.5µl (3µg)	-
Amortiguador de PCR 10X	2.5µl	2.5µl	2.5µl	2.5µl	2.5µl
MgSO ₄ 25 mM	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
Mezcla de dNTP's 0.2 mM	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl
Iniciador 1 <i>E. histolytica</i>	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Iniciador 2 <i>E. histolytica</i>	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
TFL Polimerasa (IV)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Agua ultrapura	32 µl	29.5 µl	30.5 µl	25 µl	32.5µl
Aceite mineral	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Iniciador 1 5' TCA AAA TGG TCG TCG TCT AGG C 3'

Iniciador 2 5' CAG TTA GAA ATT ATT GTA CTT TGT A 3'

6.5. Interpretación de resultados y evaluación estadística.

6.5.1. Método microscópico.

Se realizó mediante la morfología de los trofozoítos y/o quistes de la ameba detectada en las muestras de heces.

6.5.2. Método de aglutinación simple.

6.5.2.a. En heces (reactivo a base de latex).

Negativa o cero cuando la aglutinación no era perceptible; 1+ para aglutinación muy débil (muy escasos grumos blancos, fondo turbio); 2+ para aglutinación débil (escasos grumos blancos, fondo turbio); 3+ para aglutinación moderada (moderados grumos blancos, fondo turbio) y 4+ para aglutinación fuerte (abundantes grumos blancos, fondo claro)

6.5.2.b. En suero (reactivo a base de liposomas-carbón activado).

Igual que para las muestras de heces, sólo que los grumos son de color gris

6.5.2.c. En antígenos totales de *E. histolytica*.

Se procedió igual que para las muestras de heces, sólo que en este caso la interpretación se hizo primero a partir del antígeno total, obtenido a partir de 1, 5, 10 y 15 x 10⁶ trofozoítos de cada una de las dos cepas de *E. histolytica* y posteriormente con diluciones 1:10, 1:20, 1:40; 1:80; 1:160 y

1:320 de los mismos, de igual forma, a partir de heces negativas microscópicamente para *E. histolytica* a las que se les adicionaron los antígenos en todas sus diluciones. Cada una de las pruebas se hizo por triplicado.

6.5.2.d. Sensibilidad y especificidad; valor predictivo positivo y negativo de la técnica.

La sensibilidad y especificidad de la técnica de aglutinación se determinó en base a los resultados positivos y negativos para *E. histolytica* obtenidos tanto por la técnica de aglutinación, como por la de microscopía en las 253 muestras de heces examinadas utilizando los siguientes datos:

		Microscopia		Totales
		+	-	
Aglutinación	+	V(+)	F(+)	
	-	F(-)	V(-)	
Totales				

Simbología:

V(+) = Verdaderos positivos

F(+) = Falsos positivos

V(-) = Verdaderos negativos

F(-) = Falsos negativos.

Aloxon, Inc. 1993

La determinación de los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, dependen de relaciones de los valores positivos y negativos verdaderos y de los valores positivos y negativos falsos, mostradas a continuación.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{V(+)}{V(+)+F(-)}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{V(-)}{V(-)+F(+)}$$

$$\text{Valor_predictivo_positivo} = \frac{V(+)}{V(+)+F(+)}$$

$$\text{Valor_predictivo_negativo} = \frac{V(-)}{V(-)+F(-)}$$

El significado de cada uno de los términos obtenidos de las relaciones anteriores se explica de la siguiente forma.

- **Sensibilidad**, es la capacidad de la prueba para identificar correctamente a quienes tienen la característica de *E. histolytica*.
- **Especificidad**, es la capacidad de la prueba para identificar correctamente a quienes no tienen la característica de *E. histolytica*.
- **Valor predictivo positivo**, es la proporción de verdaderos positivos de todos aquellos que tienen resultados positivos en la prueba (es la más alta prevalencia)
- **Valor predictivo negativo**, es la proporción de verdaderos negativos de todos aquellos que tienen resultados negativos en la prueba

6.5.2.e. Evaluación estadística de la prueba de aglutinación en antígenos totales.

Para determinar la prueba estadística a usar, en la evaluación del comportamiento de la técnica al comparar las diluciones y poblaciones de trofozoítos con los que se prepararon los antígenos en las dos cepas de *E. histolytica* en estudio, se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Si la variable resultara normal se utilizaría un análisis de varianza o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Zar, 1974).

7. RESULTADOS

7.1. Detección de *E. histolytica* en heces por microscopía

Los resultados obtenidos en el examen parasitológico de 253 muestras de heces de pacientes que acuden a centros hospitalarios y laboratorios clínicos se presentan en la Tabla 1, se observa que *E. histolytica* se detectó solamente en 5 (2%) de las muestras examinadas microscópicamente utilizando el método de flotación de Faust. De éstas, dos estaban fijadas con formol y tres fueron registradas como exentas del fijador.

Tabla 1. Protozoarios detectados en 253 muestras de heces utilizando el método microscópico por flotación de Faust.

Protozoarios	Número de muestras			
	Fijadas con formol	Sin fijar	Total	%
<i>Blastocystis hominis</i>	19	16	35	13.8
<i>Endolimax nana</i>	11	9	20	7.9
<i>Entamoeba coli</i>	5	6	11	4.3
<i>Giardia lamblia</i>	3	8	11	4.3
<i>Entamoeba histolytica</i>	3	2	5	2.0
<i>Entamoeba hartmanni</i>	0	1	1	0.4
<i>Iodamoeba butschlii</i>	0	1	1	0.4

Al examinar por el método microscópico las muestras de heces, se detectaron seis especies de protozoarios, *Entamoeba histolytica*, *E. coli*, *E. hartmanni*, *Iodamoeba butschlii*, *Giardia lamblia* y *Blastocystis hominis*. En todas las muestras se detectaron tanto trofozoítos como quistes de las protozoarios. La Tabla 2 muestra la distribución de éstos, observándose que hubo muestras que presentaron un solo protozoario, dos, o tres a la vez, en muestras con y sin fijador. *E. histolytica* estuvo presente en forma

individual en tres muestras y mezclada con *E. coli*, *Blastocystis hominis* y/o *Iodamoeba butschlii* en tres muestras.

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).

Protozoarios	Muestras positivas			
	Microscopía		Aglutinación simple	
	Fijadas	No fijadas	Fijadas	No fijadas
<i>Blastocystis hominis</i>	10	15	0	0
<i>Entamoeba histolytica</i>	2	1	0	1
<i>Entamoeba coli</i>	1	3	0	0
<i>Giardia lamblia</i>	2	6	0	0
<i>Endolimax nana</i>	7	7	0	0
<i>Blastocystis hominis</i> <i>Entamoeba coli</i>	3	0	0	0
<i>Blastocystis hominis</i> <i>Giardia lamblia</i>	1	1	0	0
<i>Blastocystis hominis</i> <i>Endolimax nana</i>	4	0	0	0
<i>Entamoeba coli</i> <i>Giardia lamblia</i>	0	1	0	0
<i>Entamoeba coli</i> <i>Endolimax nana</i>	0	1	0	0
<i>Entamoeba hartmanni</i> <i>Endolimax nana</i>	0	1	0	0
<i>Blastocystis hominis</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Entamoeba coli</i>	1	0	0	0
<i>Entamoeba histolytica</i> <i>Entamoeba coli</i> <i>Iodamoeba butschlii</i>	0	1	0	1

7.2. Detección de *E. histolytica* en heces por el método de aglutinación simple (Reactivo Calderón a base de latex)

El reactivo “Calderón” preparado a base de latex presenta diferentes grados de aglutinación dependiendo de la concentración de antígeno presente en la

muestra, éstos se presentan en la figura 1 cuando se tomaron con una lente de acercamiento y en la figura 2 se muestran pruebas de aglutinación positiva y negativa tomadas en un fotomicroscopio con 120 aumentos.

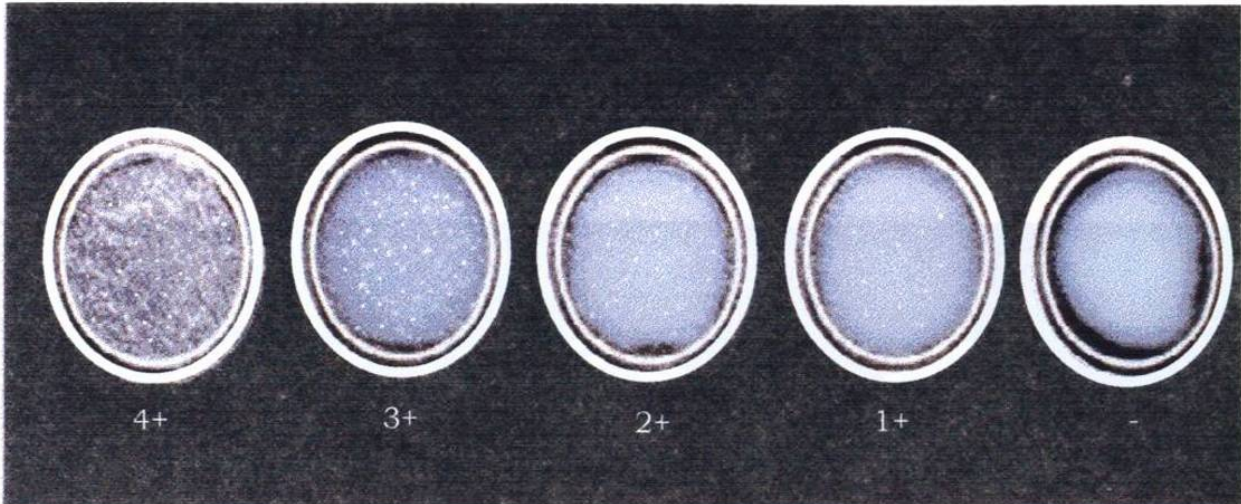


Figura 1. Grados de aglutinación al utilizar el reactivo de latex para la detección de antígenos de *E. histolytica* (foto tomada con lente de acercamiento).

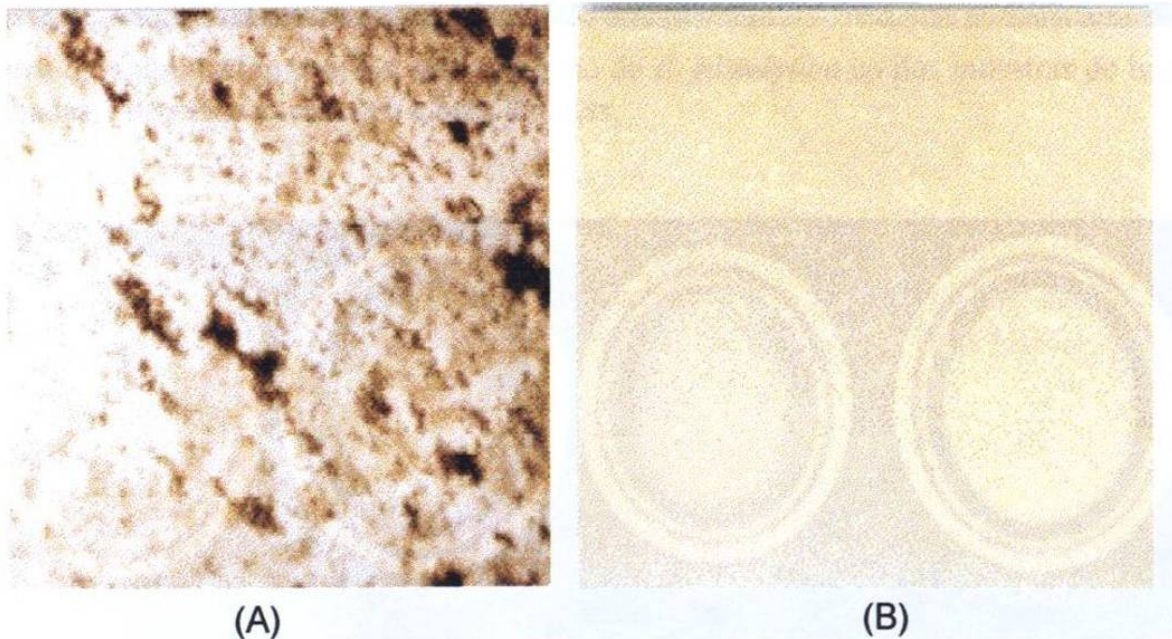


Figura 2. Aglutinación positiva (A) y negativa (B) para antígenos de *E. histolytica* utilizando el reactivo “Calderón” (foto tomada al microscopio con 120X).

De 253 muestras de heces examinadas, cuando se utilizó el método de aglutinación, *E. histolytica* se detectó en dos de las muestras exentas de fijador, esto se presenta en la figura 3 y tabla 2, en donde también se observa que que tres muestras fijadas, positivas para *E. histolytica* por el método microscópico, no lo fueron cuando se examinaron por el método de aglutinación con latex (figura 4).

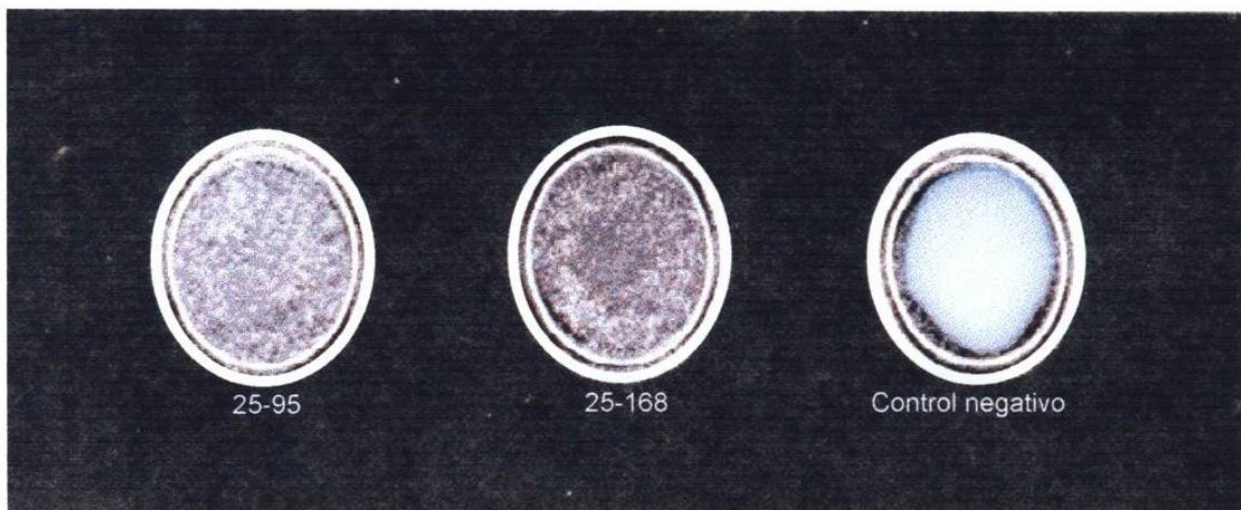


Figura 3. Aglutinación positiva para antígeno de *E. histolytica* en dos muestras de heces no fijadas, utilizando el reactivo a base de latex.

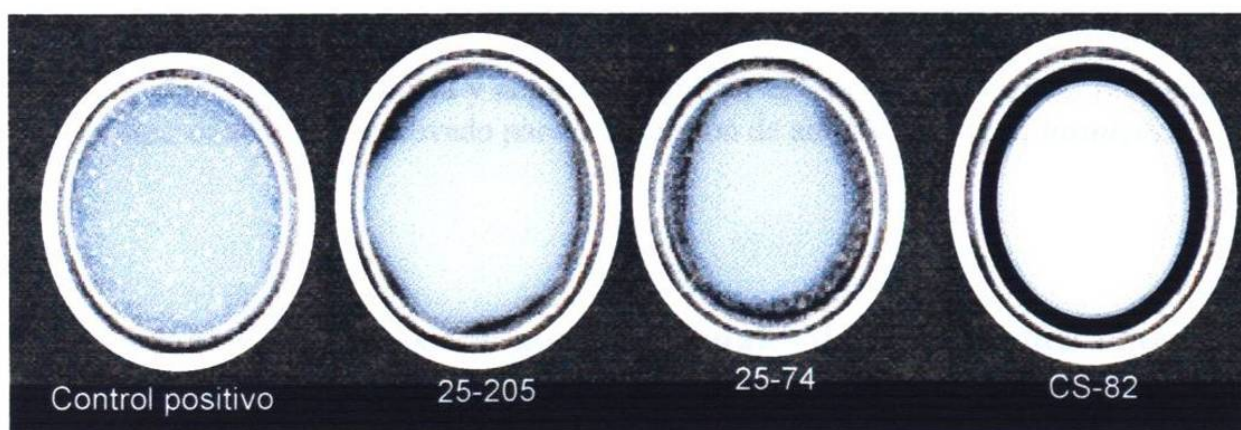


Figura 4. Aglutinación negativa para antígenos de *E. histolytica* en tres muestras de heces fijadas, utilizando el reactivo a base de latex.

7.3. Detección de *E. histolytica* en suero por el método de aglutinación simple (Reactivo “Calderón” a base de liposomas-carbón activado)

La aglutinación que se observa al utilizar este reactivo se presenta en la figura 5. De las 79 muestras de suero examinadas, ninguna presentó aglutinación con el reactivo de carbón. De las muestras examinadas, sólo en una de ellas se tenían antecedentes de amibiasis, pero sin confirmar la antigüedad del padecimiento. La sensibilidad del reactivo se evaluó utilizando el control positivo, el cual fue obtenido a partir de una cabra inmunizada con antígeno total de *E. histolytica* y con diluciones del mismo en solución salina. El reactivo fue sensible frente al suero positivo hasta una dilución 1:40.

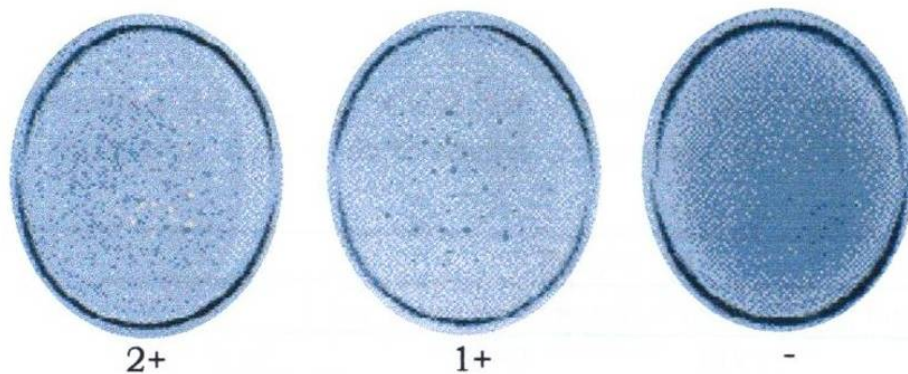


Figura 5. Aglutinación positiva y negativa al utilizar el reactivo “Calderón” preparado a base de liposomas-carbón activado para la detección de anticuerpos de *E. histolytica*.

7.4. Pruebas realizadas con antígenos totales de *E. histolytica* obtenidos de cultivos axénicos de las cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS de *E. histolytica*.

Al detectarse sólo 5 muestras de heces positivas para *E. histolytica*, se procedió a evaluar el reactivo a partir de antígenos obtenidos de cultivos axénicos de dos cepas de *E. histolytica*, una considerada de mayor virulencia

axénicos de dos cepas de *E. histolytica*, una considerada de mayor virulencia que la otra. Las tablas 3 y 4 muestran, mediante diferentes grados de aglutinación, la positividad del reactivo de latex para detectar antígenos totales de *E. histolytica* obtenidos de cultivos axénicos de diferentes poblaciones de trofozoítos ($1, 5, 10$ y 15×10^6) de las cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS respectivamente. Se observa que el reactivo identifica al antígeno de la ameba, la positividad va disminuyendo a medida de que decrece la población de trofozoítos con los que fue preparado el antígeno correspondiente. Lo mismo sucedió cuando la prueba se realizó con diferentes diluciones del antígeno (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320) ya que entre más diluido se encontraba éste, la positividad fue menor.

Tabla 3. Positividad del reactivo “Calderón” a base de latex para antígenos de *E. histolytica* preparados a partir de diferentes poblaciones de trofozoítos de la cepa HM1:IMSS.

Dilución	Positividad			
	Poblaciones de trofozoítos (en antígeno total)			
	1×10^6	5×10^6	10×10^6	15×10^6
Directa	4+	4+	4+	4+
1:10	3+	3+	3+	4+
1:20	2+	3+	3+	3+
1:40	2+	2+	3+	3+
1:80	1+	2+	2+	2+
1:160	-	1+	2+	2+
1:320	-	-	1+	1+

Simbología:

- 4+ Aglutinación fuerte (abundantes grumos blancos, fondo claro).
- 3+ Aglutinación moderada (moderados grumos blancos, fondo ligeramente turbio).
- 2+ Aglutinación débil (escasos grumos blancos, fondo turbio).
- 1+ Aglutinación muy débil (muy escasos grumos blancos, fondo turbio).
- Aglutinación no percibida.

Cuando las diferentes diluciones de los antígenos totales se mezclaron con heces negativas para *E. histolytica* por el método microscópico, la prueba de aglutinación presentó la misma positividad que cuando se hizo con el antígeno obtenido de los cultivos axénicos de la ameba.

Tabla 4. Positividad del reactivo “Calderón” a base de latex para antígenos de *E. histolytica* preparados a partir de diferentes poblaciones de trofozoitos de la cepa HM38:IMSS.

Dilución	Positividad			
	Poblaciones de trofozoitos (en antígeno total)			
	1×10^6	5×10^6	10×10^6	15×10^6
Directa	4+	4+	4+	4+
1:10	3+	4+	4+	4+
1:20	3+	3+	3+	3+
1:40	2+	2+	3+	3+
1:80	2+	2+	2+	2+
1:160	1+	1+	2+	2+
1:320	-	-	1+	1+

Simbología:

- 4+ Aglutinación fuerte (abundantes grumos blancos, fondo claro).
- 3+ Aglutinación moderada (moderados grumos blancos, fondo ligeramente turbio).
- 2+ Aglutinación débil (escasos grumos blancos, fondo turbio).
- 1+ Aglutinación muy débil (muy escasos grumos blancos, fondo turbio).
- Aglutinación no percibida.

7.5. Evaluación de los antígenos totales de *E. histolytica*.

7.5.1. Cuantificación de las proteínas.

Los valores de absorbancia obtenidos por el micrométodo de Lowry, con diferentes concentraciones de proteína de albúmina de huevo para obtener la curva de referencia, se presentan en la tabla 5, con estos valores se trazó la curva, aplicando una regresión lineal (figura 6).

Tabla 5. Valores de absorbancia para diferentes concentraciones de proteína, utilizando el micrométodo de Lowry (curva de referencia).

Concentración de proteína (mg/100ml)	Absorbancia a 630 nm
0.01	0.162
0.02	0.235
0.03	0.285
0.04	0.356
0.05	0.436
0.06	0.484
0.07	0.502

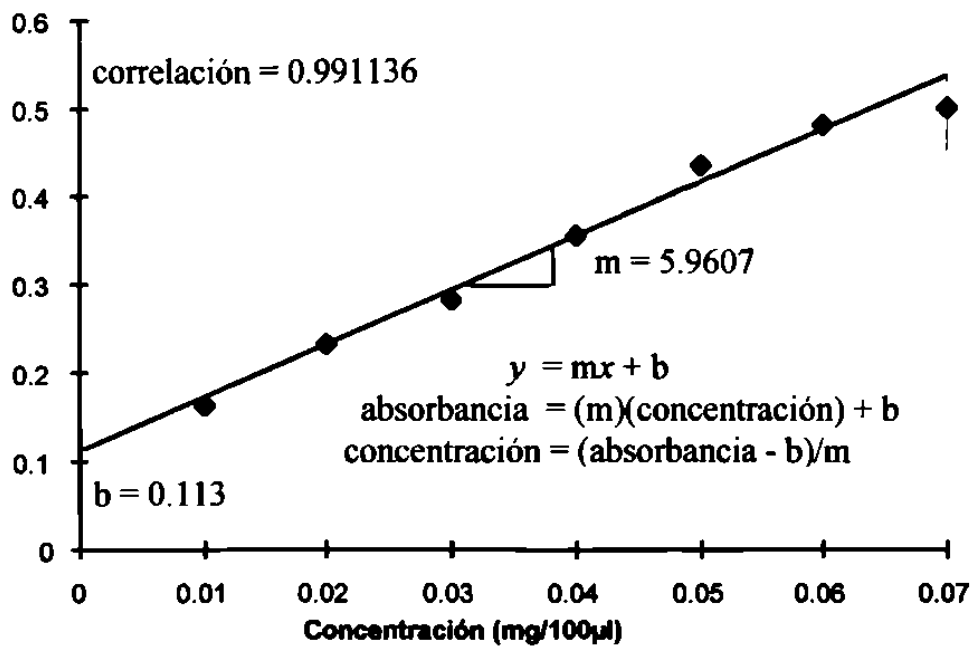


Figura 6. Curva de referencia para cuantificación de proteínas, utilizando albúmina de huevo (micrométodo de Lowry).

En la tabla 6 se presentan las concentraciones de proteína correspondientes a las absorbancias obtenidas en la dilución 1:10 de los antígenos correspondientes a las cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS, mismas que fueron obtenidas de la curva de referencia. Es notorio que aún cuando se partió de

la misma población celular para ambas cepas, la HM38:IMSS presenta un valor mayor de proteínas en su antígeno correspondiente.

Tabla 6. Cuantificación de proteínas en antígenos totales obtenidos de diferentes poblaciones de trofozoítos de dos cepas de *Entamoeba histolytica* utilizando el micrométodo de Lowry.

Cepa	Antígeno total (población de trofozoítos)	Absorbancia a 630 nm.	Concentración de proteína (mg/ml)
HM1:IMSS	1X10 ⁶	0.148	0.587
	5X10 ⁶	0.235	2.047
	10X10 ⁶	0.304	3.204
	15X10 ⁶	0.350	3.976
HM38:IMSS	1X10 ⁶	0.297	3.087
	5X10 ⁶	0.330	3.641
	10X10 ⁶	0.362	4.177
	15X10 ⁶	0.338	4.614

7.5.2. Caracterización de las proteínas.

Al realizar un corrimiento electroforético con marcadores de peso molecular conocido en un gel de poliacrilamida y posteriormente tñirlo con solución de Comassie, se logró obtener sus Rf correspondientes (Tabla 7) y trazar con ellos una curva de calibración, utilizando una regresión lineal (figura 7).

Tabla 7. Rf obtenidos con marcadores de pesos moleculares conocidos en un corrimiento electroforético.

Marcador	Peso molecular (kDa)	Distancia recorrida por el marcador (cm)	Frente de corrimiento (cm)	Rf
Albúmina bovina	66.0	1.65	4.80	0.3437
Gluteraldeído deshidrogenasa	36.0	2.85	4.65	0.6129
Anhidrasa carbónica	29.0	3.35	4.65	0.7204
Inhibidor de tripsina	20.1	4.40	4.65	0.9462

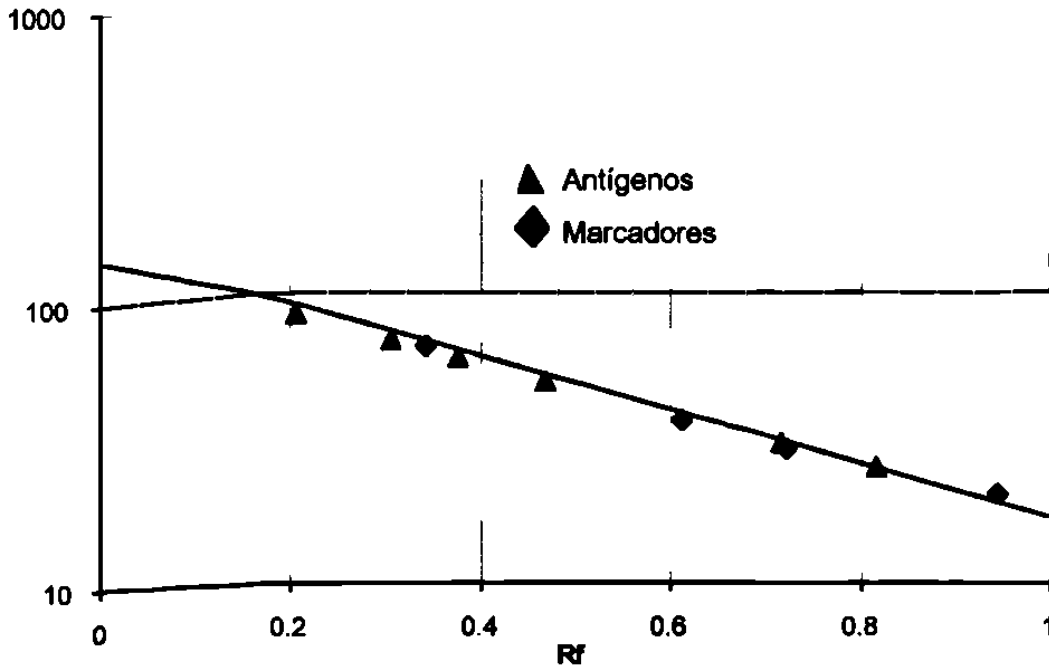


Figura 7. Curva de calibración con marcadores de pesos moleculares conocidos en un corrimiento electroforético.

Posteriormente se caracterizaron las proteínas de los antígenos de las cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS de *E. histolytica* corridos electroforéticamente bajo las mismas condiciones y cuyos resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Pesos moleculares de las proteínas principales de los antígenos de las cepas de *E. histolytica* HM1:IMSS y HM38:IMSS obtenidas en un corrimiento electroforético e interpoladas en la curva de calibración.

Distancia recorrida por la proteína del antígeno (cm)	Frente de corrimiento (cm)	Rf	Peso molecular (kDa) de la proteína del antígeno
1.00	4.9	0.2040	84.68
1.50	4.9	0.3061	69.03
1.85	4.9	0.3775	59.85
2.30	4.9	0.4693	49.80
3.50	4.9	0.7142	30.51
4.00	4.9	0.8163	24.88

En la figura 8 se presenta el corrimiento electroforético de las proteínas de los antígenos y de los marcadores correspondientes. En ambos antígenos se detectaron proteínas con pesos moleculares aproximados de 84.68, 69.03, 59.85, 49.80, 30.51 y 24.88 kDa respectivamente.

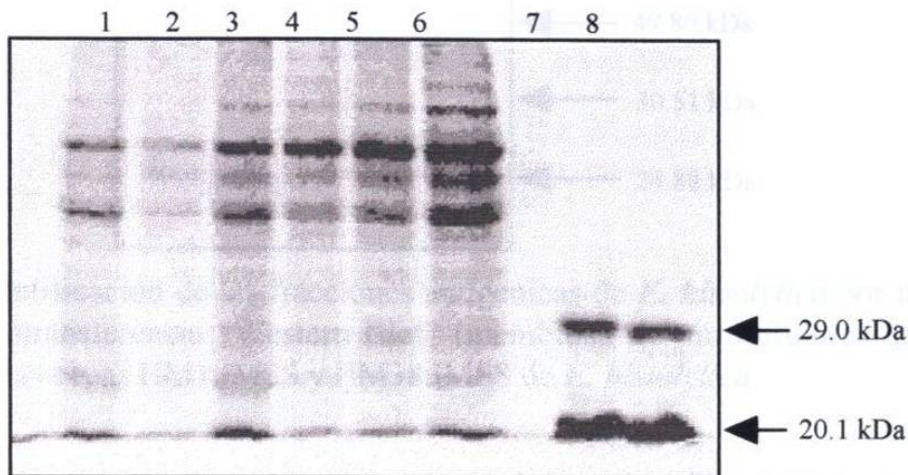


Figura 8. Corrimiento electroforético de las proteínas de los antígenos totales de las cepas HM1:IMSS(carriles 1 al 3) y HM38:IMSS (carriles 4 al 6) de *E. histolytica* y de los marcadores correspondientes (carriles 7 y 8).

7.5.3. Identificación antigénica de *E. histolytica* por la técnica de Inmunolectrotransferencia.

La identificación de las fracciones antigénicas de *E. histolytica* por la técnica inmunolectrotransferencia se muestra en la figura 9, donde se observa la membrana de nitrocelulosa en que se transfirieron las proteínas, que constituyen los antígenos totales de las cepas de *E. histolytica* HM1:IMSS y HM38:IMSS respectivamente (después de la fijación de los anticuerpos provenientes del suero de una cabra inmunizada con el antígeno total de *E. histolytica*). Los carriles 1 y 2 corresponden a la cepa HM38:IMSS y los 3 y 4 a la HM1:IMSS. En ambas cepas sobresalen tres proteínas reactivas con pesos moleculares aproximados de 24.88, 30.51 y 49.8 kDa respectivamente, con alta capacidad inmunogénica.

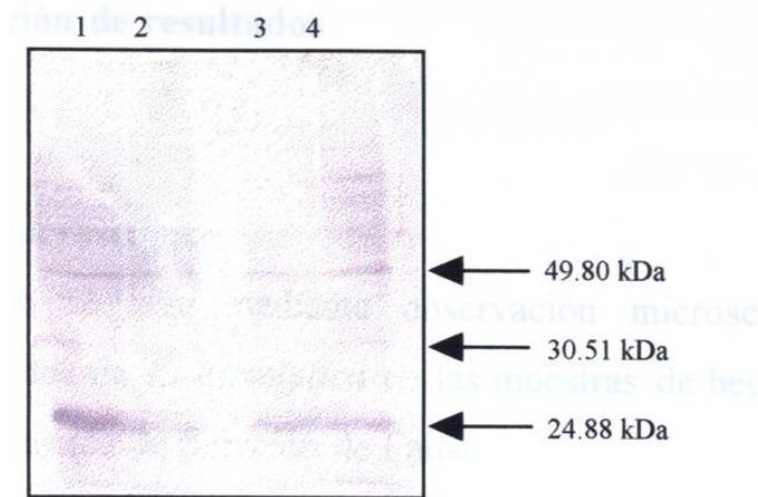


Figura 9. Identificación de las fracciones antigénicas de *E. histolytica* por la técnica de electroinmunotransferencia “Western Blot” (membrana de nitrocelulosa) utilizando los antígenos de las cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS de *E. histolytica*.

7.6. Detección de secuencias genómicas de *E. histolytica* por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En la figura 10 se muestra la amplificación de secuencias genómicas de las cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se obtuvo un producto amplificado de 145 pares de bases (pb) en ambas cepas, aunque se observa que el producto amplificado en la cepa HM38:IMSS es de menor cantidad con respecto al producto amplificado obtenido con la cepa HM1:IMSS.

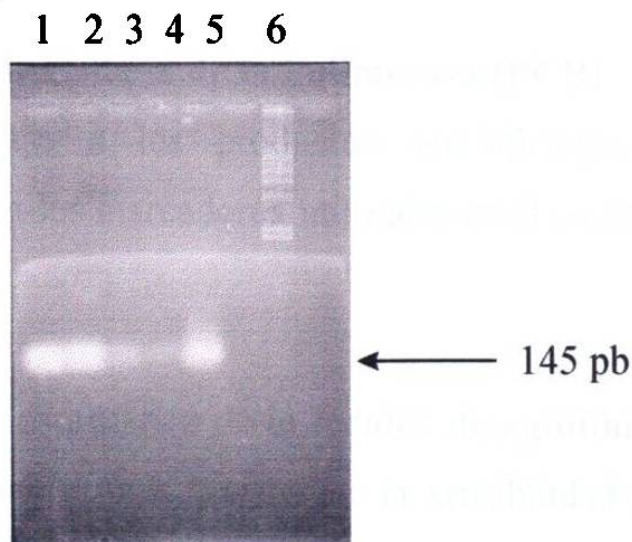


Figura 10. Amplificación de secuencias genómicas de las cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS en gel de agarosa al 1%. Cepa HM1:IMSS (carriles 1 y 2), cepa HM38:IMSS (carriles 3 y 4), control positivo (carril 5) y marcadores de peso molecular I/Hind III (carril 6).

7.7. Interpretación de resultados

7.7.1. Método microscópico

La interpretación se hizo mediante observación microscópica de los trofozoítos o quistes de *E. histolytica* en las muestras de heces procesadas de acuerdo a la técnica de flotación de Faust.

7.7.2. Método de aglutinación simple

En las muestras de heces y suero, la aglutinación sólo se tomó como positivo o negativo, y cuando se trató de los antígenos totales de diferentes poblaciones de trofozoítos de *E. histolytica* y sus diluciones correspondientes, se tomó en cuenta el grado de positividad (1+, 2+, 3+ y 4+) según la dilución evaluada.

7.7.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó en base a los productos amplificados en ambas cepas, comparándolas con los marcadores utilizados en el corrimiento.

7.7.4. Evaluación estadística de la técnica de aglutinación simple.

Los valores obtenidos para determinar la sensibilidad y especificidad, así como los valores predictivos positivo y negativo de la prueba de aglutinación simple (Reacción Calderón) al compararla con el método microscópico se presenta en la tabla 9.

Tabla 9. Sensibilidad y especificidad de la técnica de aglutinación al compararla con la microscópica.

	Microscopía			
		+	-	Totales
Aglutinación simple	+	2	0	2
	-	0	251	251
Totales		2	251	253

$$\text{Sensibilidad} = \frac{V(+)}{V(+)+F(-)} = 100\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{V(-)}{V(-)+F(+)} = 100\%$$

$$\text{Valor_predictivo_positivo} = \frac{V(+)}{V(+)+F(+)} = 100\%$$

$$\text{Valor_predictivo_negativo} = \frac{V(-)}{V(-)+F(-)} = 100\%$$

Se observa que al tomar en cuenta solamente las muestras de heces exentas de fijador, la sensibilidad y especificidad de la prueba de aglutinación simple fue de 100%. Asimismo, al calcular el valor predictivo positivo y negativo, ambas resultaron con el 100%. El reactivo a base de liposomas-carbón activado que detecta anticuerpos no fue posible evaluarlo de esta forma, dado que ninguna de las muestras de suero examinadas presentaron resultados positivos para la aglutinación.

La validación estadística para evaluar el comportamiento del antígeno total y sus diluciones obtenido a partir de diferentes poblaciones de trofozoítos de las cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS de *E. histolytica* arrojó lo siguiente: La variable a cuantificar fue clasificada con cero cuando no había aglutinación perceptible, 1+ para aglutinación muy ligera (fondo turbio), 2+ para aglutinación ligera (fondo turbio), 3+ para aglutinación moderada (fondo turbio) y 4+ para aglutinación fuerte (fondo claro). Al realizar la prueba de

Kolmogorov-Smirnov, se encontró que dicha variable se distribuye normalmente ($Z_{K-S} = 2.3168$ $p < 0.05$). Se realizó un análisis de varianza para probar si había diferencia significativa del efecto de las diluciones (1= directa, 2= 1:10, 3= 1:20, 4= 1:40, 5= 1:80, 6= 1:160 y 7= 1:320) sobre la variable, se encontró para la cepa HM1:IMSS una $F=57.56$ $p < 0.01$ y para la cepa HM38:IMSS, la $F=127.36$ $p < 0.01$. Al analizar la población (concentración de: 1, 5, 10 y 15 x 10⁶) se encontró que para la cepa HM1:IMSS, la $F=3.08$ $p < 0.05$ (diferencia significativa), mientras que para la cepa HM38:IMSS, la $F= 1.24$ $p > 0.20$ (no hay diferencia significativa).

8. DISCUSION Y CONCLUSIONES

En el presente estudio se examinaron 253 muestras de heces de pacientes procedentes de diversos centros hospitalarios y laboratorios clínicos; de éstas, cinco (2%) fueron positivas para *Entamoeba histolytica* cuando se examinaron microscópicamente mediante el método de flotación de Faust, solamente dos fueron positivas para la ameba por el método de aglutinación simple (Reacción Calderón), utilizando un reactivo elaborado a base de latex y anticuerpos de *E. histolytica*. El hallazgo de un número tan bajo de muestras de heces positivas para *E. histolytica*, pone en evidencia que en nuestro país en los últimos años se ha incrementado la vigilancia epidemiológica de este padecimiento, coincidiendo con lo publicado por Treviño y col (1994) al respecto.

La diferencia de muestras positivas para *E. histolytica*, al utilizar los métodos microscópico y de aglutinación simple, permite relacionar dichos resultados con la presencia o ausencia del formol utilizado como preservador en las heces, ya que precisamente las tres muestras que fueron positivas por microscopía y negativas por aglutinación simple, habían sido previamente fijadas con formol y las dos positivas por aglutinación estaban exentas del fijador, lo que indica que esta substancia juega un papel muy importante en dichos resultados. Esto coincide con lo publicado por Tijssen (1985), quien menciona que el formol está directamente relacionado con resultados falsos negativos cuando se utilizan métodos de aglutinación en el diagnóstico de *E. histolytica* en heces.

El reconocimiento de *E. histolytica* por microscopía, utilizando la técnica de flotación de Faust es fácil de realizar, económica y rápida, pero en ocasiones es necesario examinar hasta cinco muestras del mismo paciente, debido a que los trofozoítos de la ameba fácilmente se destruyen y existe dificultad para poner de manifiesto al parásito, lo que implica un incremento en tiempo y en el costo del análisis. Además, coincidiendo con lo mencionado por Conde y De la Mora (1992), el método microscópico presenta grandes limitaciones debido a las confusiones que suelen presentarse con macrófagos u otras amebas, cuando no se cuenta en el laboratorio con personal especializado; todo esto, pone en ventaja al método de aglutinación simple, el que además de económico y rápido, es fácil de realizar ya que no requiere de mucha destreza, ni de personal altamente capacitado y con la ventaja de que su reacción es indiferente a la presencia de quistes o trofozoítos de la ameba en las heces.

Al considerar la sensibilidad y especificidad de la técnica de aglutinación simple, comparándola con el método microscópico, se encontró que ambas presentan 100%; no obstante, es entendible que el número de muestras positivas, respecto a las negativas fue muy bajo y que por consiguiente resultó difícil aplicar algún modelo estadístico para evaluar este parámetro. Sin embargo, se descartó la posibilidad de resultados falsos negativos al mezclar antígenos de *E. histolytica* con materia fecal, y al realizar la prueba responder positivamente con el reactivo a base de latex. Lo anterior dió lugar a que el reactivo "Calderón", para el diagnóstico de antígenos de *E. histolytica* en heces, se sometiera a pruebas de evaluación con antígenos preparados a partir de cultivos axénicos de *E. histolytica* utilizando las

cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS, la primera considerada como de mayor virulencia que la segunda.

El reactivo “Calderón” preparado a base de latex para la detección de *Entamoeba histolytica* en heces, resultó satisfactorio. Si se comparan estos resultados con los obtenidos por Cummings y col. (1994) se deduce que los reactivos preparados con latex son adecuados para el diagnóstico de *E. histolytica*, tanto en heces como en suero.

Por otro lado, la especificidad del reactivo “Calderón” en el diagnóstico de *E. histolytica* en heces, se puso en evidencia al no reconocer éste a protozoarios diferentes a dicha ameba, tales como *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba butschlii*, *Giardia lamblia* y *Blastocystis hominis*. Estos resultados coinciden con lo reportado por González y col. (1994a) cuando utilizaron la técnica de ELISA para el diagnóstico de disentería amebiana, donde el antígeno fecal captado por la técnica no presentó reacciones cruzadas con otras especies de amebas.

Con respecto a la evaluación de la técnica de aglutinación simple para el reactivo “Calderón”, elaborado a base de liposomas-carbón activado que detecta anticuerpos en suero sanguíneo, ninguna de las 79 muestras examinadas presentaron reacción positiva, pero tampoco se contaba con antecedentes de amebiasis en los pacientes, con excepción de una muestra que fue negativa para anticuerpos de *E. histolytica* por la técnica de aglutinación, que aún con antecedentes del padecimiento, se desconocía el tiempo en que se presentó éste. El reactivo se evaluó solamente con un

suero positivo para anticuerpos de *E. histolytica* y fue sensible hasta una dilución 1:40.

Al cuantificar las proteínas de los antígenos de las cepas HM1 y HM38 de *E. histolytica*, se encontró que el correspondiente a esta última presenta una concentración mayor de proteínas. Por otro lado, en el corrimiento electroforético, al comparar las bandas desarrolladas con las del marcador utilizado en la prueba, se encontró un patrón similar en ambas cepas; asimismo, es importante mencionar que las proteínas, que en el corrimiento electroforético presentaron bandas poco percibibles (24.88 y 30.51KD), en la inmunoelectrotransferencia se aprecian fuertemente coloreadas, es decir, con elevada capacidad inmunogénica para la producción de anticuerpos, las que por electroforesis presentaron bandas de color intenso, por WB apenas fueron percibibles, lo que indica escasa capacidad inmunogénica para la producción de anticuerpos contra la misma proteína. Lo anterior permite considerar que al realizar la prueba de aglutinación simple, utilizando el antígeno total de las cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS de *E. histolytica*, este último presenta positividad fuerte a una dilución mayor del antígeno por el solo hecho de contener mayor concentración de proteínas, ya que inmunogénicamente se comportan igual, lo importante es que el reactivo “Calderón” las reconoce a ambas por igual.

Usando un par de iniciadores específicos para amplificar secuencias genómicas de *E. histolytica* patogénica, se encontró que se amplifica un producto de 145 pares de bases (pb) tanto en la cepa HM1:IMSS como en la HM38:IMSS, indicando que no parece existir una diferencia entre ambas cepas en relación a su patogenicidad. Estos datos se correlacionan con los

resultados obtenidos en la prueba de aglutinación simple, dado que se había encontrado previamente que no se pueden diferenciar una cepa de otra, pero sí es posible establecer diferencias con respecto a otros protozoarios. Existe una correlación entre la prueba de PCR y la prueba de aglutinación en detectar específicamente cepas de *E. histolytica*. La técnica de PCR es muy sensible y bastaría una sola célula de la ameba para detectar su presencia; sin embargo, es una técnica que requiere de personal con destreza y equipo especializado, además de que su costo es elevado, por lo que su uso sería recomendable solo para estudios muy específicos.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo mencionado por Sargeanut *y col* (1978), quienes consideran que la patogenicidad de *E. histolytica* en ocasiones es cuestionable, ya que su virulencia no es una propiedad estable y que bajo ciertos cambios en la flora bacteriana por ejemplo, se vuelve un patógeno invasivo. Lo anterior se confirma al considerar que las cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS son consideradas por la Institución que las facilitó como cepas de diferente virulencia; sin embargo; al hacer el corrimiento electroforético y la identificación de las fracciones antigénicas, así como la reacción en cadena de la polimerasa su comportamiento fue el mismo.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio difieren de lo reportado por Acuña-Soto *y col.* (1993), quienes pudieron diferenciar cepas patógenas y no patógenas de *E. histolytica* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mientras que el comportamiento de las cepas de *E. histolytica* HM1:IMSS y HM38:IMSS involucradas en este estudio y

presuntamente con diferente virulencia, presentaron un comportamiento similar cuando se analizaron por PCR.

Si se toma en cuenta el criterio utilizado por González *y col* (1994a), al detectar antígeno de *E. histolytica* en heces por el método de ELISA, el límite de detección para antígeno total de *E. histolytica* por la prueba de aglutinación simple utilizando las cepas HM1:IMSS y HM38:IMSS fue de 1.25 mg/ml para la primera y de 0.62 mg/ml para la segunda. Estos datos confirman lo mencionado anteriormente respecto a que la cepa HM38:IMSS produce mayor cantidad de antígeno que la HM1:IMSS y por consiguiente la reacción positiva la presenta a diluciones mayores de éste.

Por análisis de varianza se encontró diferencia significativa del efecto de las diluciones del antígeno sobre la variable cualificada (HM1:IMSS, $F=57.56$ $p<0.01$ y para HM38:IMSS, $F=127.36$ $p<0.01$); sin embargo, para la población sólo se encontró diferencia significativa para la cepa HM1:IMSS ($F=3.08$ $p<0.05$), concluyéndose que la cepa HM38:IMSS produce mayor cantidad de antígeno que la HM1:IMSS, aunque electroforéticamente se demostró que el perfil de las proteínas de ambos antígenos es similar y por inmunolectrotransferencia que inmunogénicamente también presentan similitud.

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten confirmar la hipótesis de que la técnica de aglutinación simple (“Reacción Calderón”) es confiable para el diagnóstico de *E. histolytica*, además, es sencilla, rápida y de bajo costo comparada con otras técnicas de diagnóstico. La técnica puede ser de gran ayuda en estudios epidemiológicos y de campo.

LITERATURA CITADA

Abdo Alla, M.D; T.F.H.G. Jackson, V. Gathiram, A.M. El-Hawell and J. I. Ravdin. 1993. Differentiation of Pathogenic *Entamoeba histolytica* Infections from Nonpathogenic Infections by Detection of Galactose-Inhibitable Adherence Protein Antigen in Sera and Feces. J.Clin. Microbiol. 31(11): 2845-2850.

Acuña-Soto, R.; J. Samuelson, P. de Girolami, L. Zárate, F. Milán-Velazco, G. Schoolnick and D. Wirth. 1993. Application of the Polimerase Chain Reaction to the Epidemiology of Pathogenic and Nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Am. J.Trop. Med. Hyg. 48(1):58-70.

Aldovini, A. & B. D. Walker. 1989. Techniques in HTV Research. Stockton Press.

Attia, R. A., H. Rizk, S. Motawea. 1995. Importance of *Entamoeba histolytica* antigen in serodiagnosis and follow up of patients with amoebic abscess. J. Egypt-Soc. Parasitol. 25(2): 485-490.

Beaver, P. Ch, R. C. Jung & E.W. Cupp. 1986. Parasitología Clínica, 2a. Ed, Salvat Editores, México.

Burnette, W. N. 1981. Western Blotting. Electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulfate acrylamide gels unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio yodinated protein A. Anal. Biochem. 112:195.

Chu-Jing, G. S.; K.C. Kain, M. Abd-Alla, T.F.H.G., Jackson and J. I. Raudin 1995. A Recombinant Cysteine-Rich Section of the *Entamoeba histolytica* Galactose-Inhibitable Lectin Is Efficacious as a Subunit Vaccine in the Gerbil Model of Amebic Liver Abscess. J. Infect. Dis. 171:645-651.

Comunicación Personal. Dr. Librado Ortiz, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F.

Conde B, M,C,. De la Mora, Z.C. 1992. *Entamoeba histolytica* : Un Desafío Vigente. Salud Pública de México. 32: 589-596.

Cummins, A. J., A. H. Moody, K. Laloo & P. L. Chiodini. 1994. Rapid latex agglutination test for extraluminal amoebiasis. *J.Clin.Pathol.* **47(7)**: 647-648.

Estrada, G., L. Colin, P. Gaytán, A. Alagón & P. M. Lizardi. 1996. Sequence-specific detection of PCR-amplified DNA by restriction enzyme release of hybrids. *Mol. Cel. Prob.* **10**: 179-185.

Garfinkel, L.L., M. Galadi, M. Huber, C. Gitter, D. Mirelman, M. Revel and S. Rozenblatt, 1989. DNA Probes Specific for *Entamoeba histolytica*, Prossersing Pathogenic and Nonpathogenic Zymogemes. *Infect. Immun.* **57(3)**: 926-931.

González, R. A., R. Haque, T. Rehman, A. Aguirre, A. Hall, F. Guhl, D. C. Warhust & M. A. Miles. 1994a. Diagnosis of amebic dysentery by detection of *Entamoeba histolytica* fecal antigen by an invasive strain-specific, monoclonal antibody-based enzyme-linked immuno-absorbent assay. *J. of Clin. Microbiol.* **32(4)**: 964-970.

González, R. A., R. Haque, A. Aguirre, G. Castanón, A. Hall, F. Guhl, P. G. Ruiz, M. A. Miles & D. C. Warhust. 1994b. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Pathol.* **47 (3)**: 236-239.

Haque, R., K. Kress, S. Wood, T.F.H.G, Jackson, D. Lyberly, T. Wilkins and W.L. Petri.1993. Diagnosis of Pathogenic *Entamoeba histolytica* Infection Using a Stool ELISA Based on Monoclonal Antibodies to the Galactose-Specific Adhesin. *J. Infect. Dis.* **167**: 247-249.

Haque, R., L. M. Neville, S. Wood & W. A. Petri.1994. Short report: Detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* en heces. *Am.J. Trop. Med. Hyg.* **50(5)**: 595-596.

Kelsall, B., T.G.F.H., Jackson, V. Gathiram, S. B. Salig, M. Vaithilingum, R. D. Pearson and J. I. Ravdin. 1994. Secretory Immunoglobulin A Antibodies to The Galactose-Inhibitable Adherence Protein in the Saliva of Patients with Amebic liver Disease.*Am. J. Trop. Med. Hygi.* **51(4)**: 454-459.

- Lizardi, P. M. & F. R. Kramer. 1991. Exponential amplification of nucleic acids: new diagnostics using DNA polymerases and RNA replicases. *Tibtech*, 9: 53-58.
- Lotter, H., E. Mannweiler, M. Schreber & E. Tannich. 1992. Sensitive and specific serodiagnostic of invasive amebiasis by using a recombinant surface protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 30(12): 3163-3167.
- Lotter, H., E. Mannweiler & E. Tannich. 1993. Crude or recombinant proteins applied to latex agglutination, complement fixation and enzyme-linked immunoabsorbent assays for the serodiagnosis of invasive amebiasis. *Trop. Med. Parasitol.* 44(4): 277-280.
- Martínez, P. A. 1989. Amibiasis. Editorial Médica Panamericana.
- Mirelman, D., R. Bracha, S. Rozenblatt and L. J. Garfinkel. 1990. Repetitive DNA Elements Characteristic of Pathogenic *Entamoeba histolytica* Strains Can Also Be Detected after Polymerase Chain Reaction in a Cloned Nonpathogenic Strain. *Infect. Immun.* 58(6): 1660-1663.
- Myung, K., D. Burch, T. F. Jackson & S. L. Stanley. 1992. Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen-based ELISA. *Arch. Med. Res.* 23(2): 285-288.
- Nagano, I., H. Othomo & G. Masuda. 1990. Fundamental studies on serological diagnosis of amoebiasis: 2 Application of antigen of *Entamoeba histolytica* for complement fixation test to contraimmuno-electrophoresis and clinical relevance of serological tests. *Kansenshogaku-Zasshi*. 64(11): 1379-1384.
- Nicholls, R. S., M. I. Restrepo, S. Duque, M. C. López & A. Corredor. 1994. Standardization and evaluation of ELISA for the serodiagnosis of amoebic liver abscess. *Mem-Inst-Oswaldo Cruz.* 89(1): 53-58.
- Nie, N., H. Hull, J., Jenkins, K., Steinbrenner and D., Bent. 1975. *Statistical Package for the Social Sciences*, Mc Graw Hill, 2th Edition.
- Ortiz, O. L. y M. L. Avella. 1984. Respuesta inmune en infecciones por *Entamoeba histolytica*. *Inmunología.* 3: 5-11.

- Smith, J. W. 1979. Identification of fecal parasites in the special parasitology survey of the College of Clinical Pathologists. *Am. J. Clin. Pathol.* **72**:371-373.
- Smith, J. M., Meerovitch, E. 1985. Primates as a source of *Entamoeba histolytica* : their Zymodeme Status and Zoonotic Potential. *J. Parasitol.* **71**: 751-756.
- Stanley, S. L., T. F. Jackson, S. L. Reed, J. Calderon, J. C. Kunz, V. Gathiram & E. Li. 1991. Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein. *JAMA.* **266**(14): 1984-1986.
- Stoscheck, C. M. 1995. Quantiation of protein. Section II. General Method for handling protein and enzyme. In. Wide to protein purification. Ed. M.V. Deutsher. 1995. *Method in enzymology.* **182**:50-67.
- Stowbim, H., T. Staehelin & J. Gordon. 1979. Electrophoretic Transfer of protein from polyacrilamide gel to nitrocellulose sheep: Procedures and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.* **76**:4350.
- Tachibana. H., S. Kobayashi, Y. Kato, K. Nagakura, Y. Kaneda and T. Takeuchi. 1990. Identification of a Pathogenic Isolate-Specific 30,000-M Antigen of *Entamoeba histolytica* by Using a Monoclonal Antibody. *Infect. Immun.* **58**(4): 955-960.
- Tijssen, P. 1985. Practice and Theory of enzyme Immunoassays. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, R.H. Burdon and P. H. van Knippenberg, Ed. Elsevier, N. Y.
- Treviño, G. M. N., R. C. Escandón, De la P. J. Escobedo, R. JM. Hernández & H. H. Fierro. 1994. Amebiasis in the epidemiologic transition in Mexico: its morbidity and mortality trends in the Mexican Institute of Social Security. *Arch. Med. Res.* **25**(4): 393-399.
- U.S.Food & Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. 1992. (Bad Bug Book)

Walsh, J. A. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infec. Dis.* **8**: 228-238.

Weber, K. O. & M. Osborns. 1969. The reliability of Molecular Weight Determination by dodecyl sulfate poliacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **224**: 4406-4412.

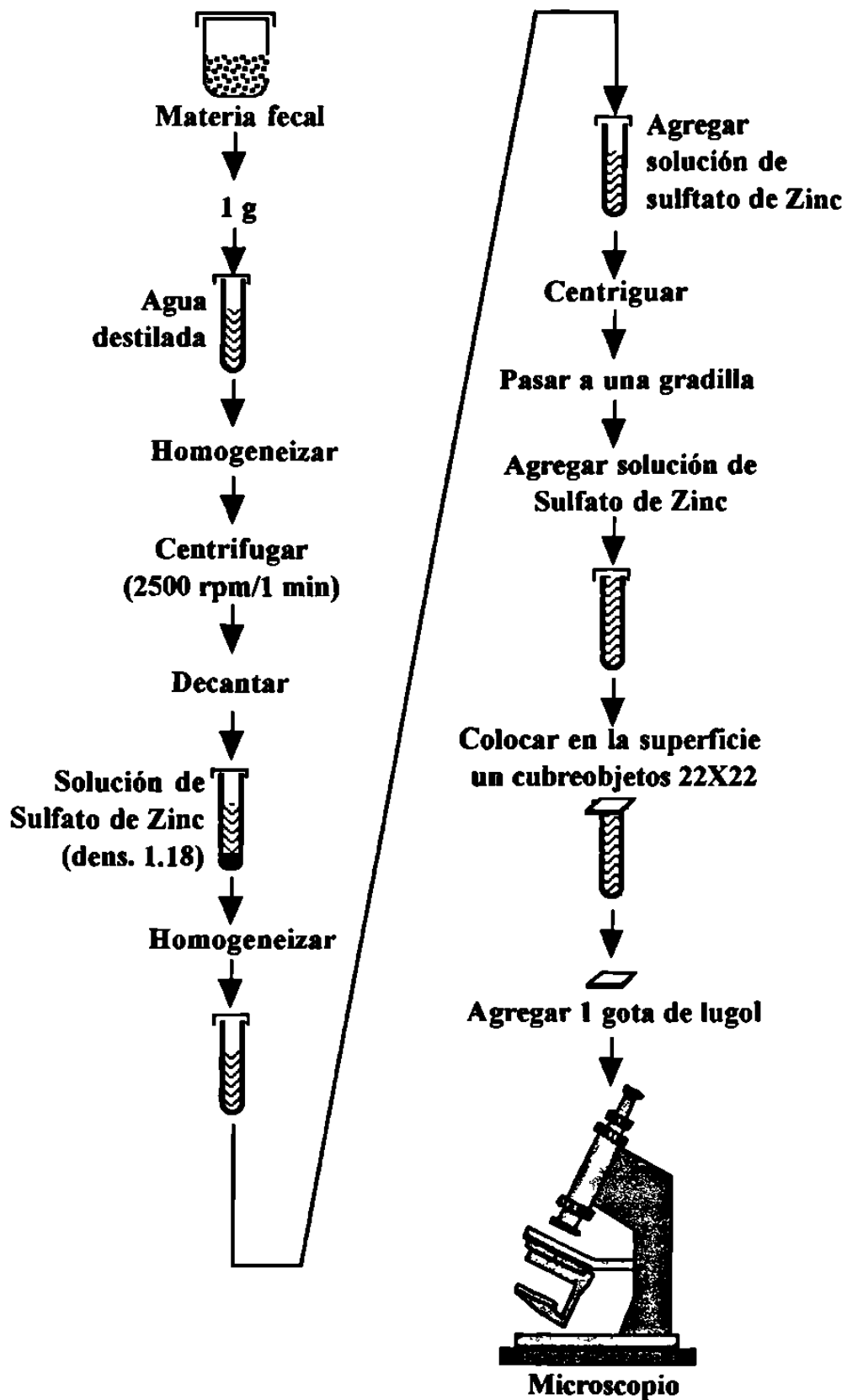
WHO Meeting, 1985, Amoebiasis and its control. *Bull, World Health Organ.* **63**: 417-426.

Zar, J. H. 1974. *Bioestatistical Analysis*. Prentice-Hall Inc. Engleword Cliff, N. Y.

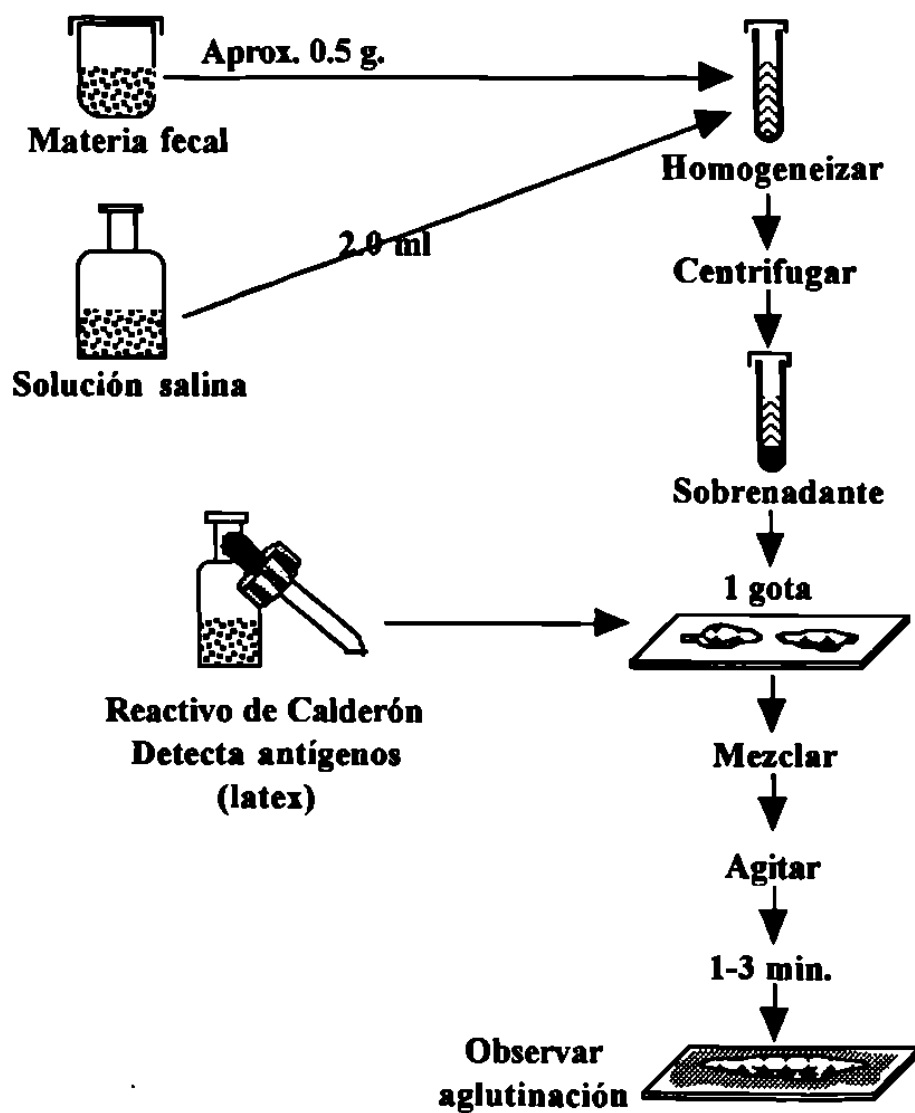
Zhang, Y., E. Li, T. F. Jackson, T. Zhang, V. Gathiram & S. L. Stanley. 1992. Use of a recombinant 170-kilodalton surface antigen of *Entamoeba histolytica* for serodiagnosis of amebiasis and identification of immunodominant domains of the native molecule. *J. Clin. Microbiol.* **30**(11): 2788-2792.

ANEXOS

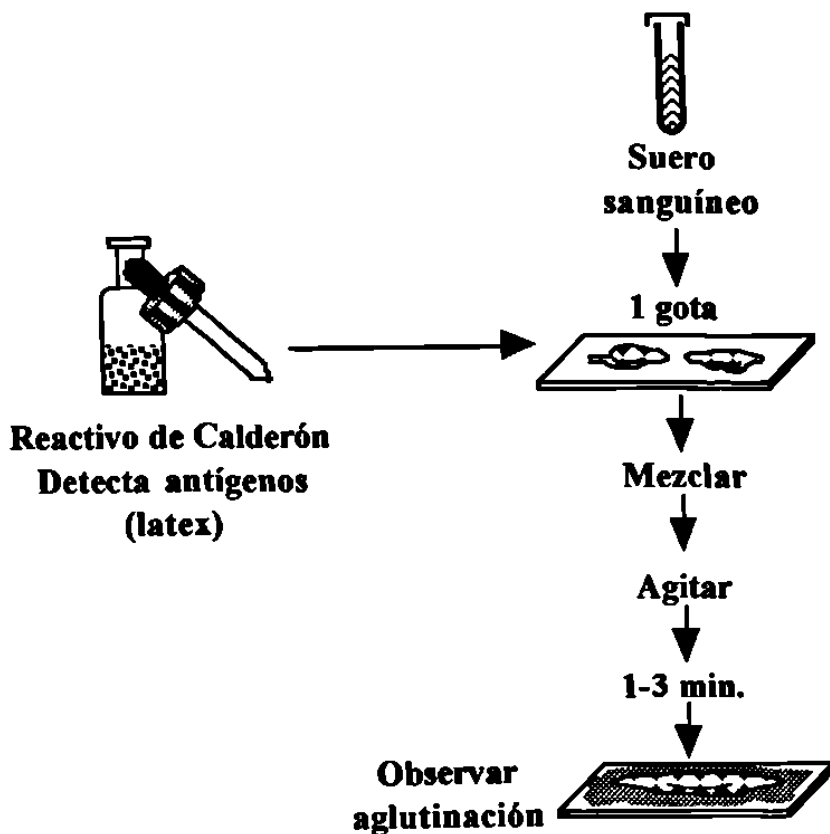
Examen Microscópico (Faust)



Reacción de Calderón
Detección de antígenos de *E. histolytica*.

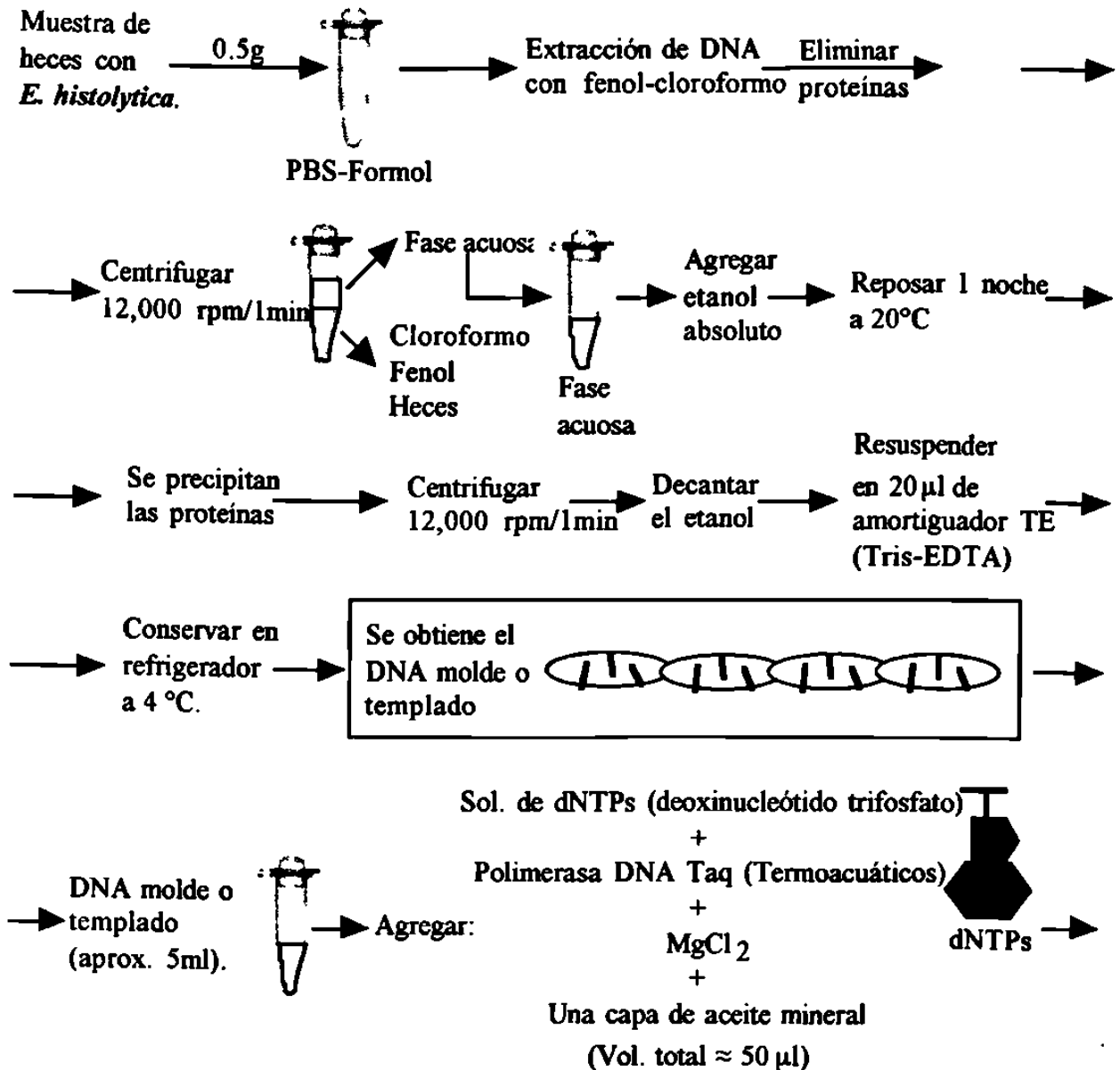


Reacción de Calderón Detección de anticuerpos de *E. histolytica*.



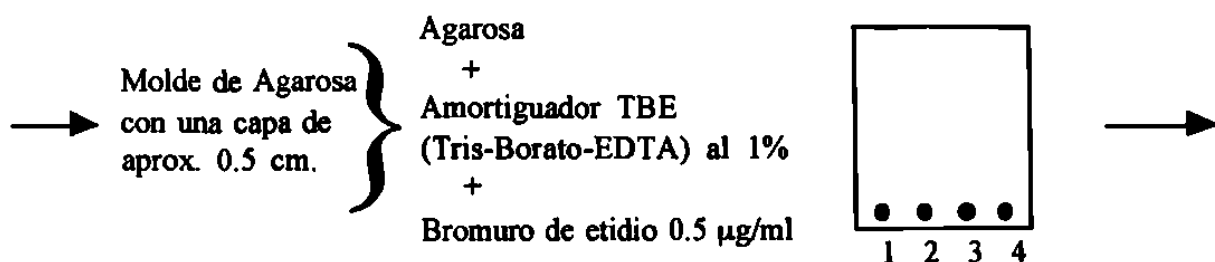
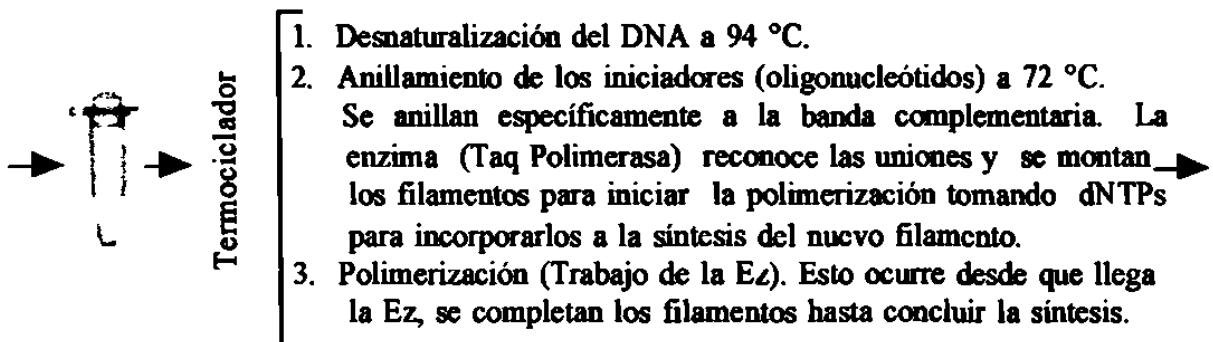
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Amplificación del DNA de *E. histolytica*.



Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

(... continuación)



Colocar en la parte inferior un peine para marcar los carriles y depositar en ellos:

- Carril 1 - Marcador de pares de bases.
- Carril 2 - Control positivo de *E. histolytica*
- Carril 3 - Control negativo.
- Carril 4 - Muestra problema.

[8 µl de muestra + 2 µl de líquido de Hall (Xilencianol + azul de bromofenol)]

- Correr a 100 Volts/1hr.
- Comparar el desplazamiento entre muestra y controles + y -.
- Verificar con el marcador de pares de bases.
- Tomar fotografías.

Abreviaturas

Ac.	Anticuerpo.
AcM	Anticuerpos monoclonales
AHA	Absceso Hepático Amebiano
A-IHA	Proteína A-Hemaglutinación Indirecta
ALA	Amebic Liver Abscess (Absceso Hepático Amebiano)
CAP	Precipitina en Acetato de Celulosa
CF	Fijación de Complemento
CIE	Contra Inmuno Electroforesis
DNA	Acido Desoxiribonucleico
EDTA	Acido Etilen Diamino Tetra Acético
EIA	Anticuerpos de <i>Entamoeba histolytica</i>
ELISA	Ensayo de Enzima Ligada Inmuno Absorbente
FAC-ELISA	Antígeno Fecal Capturado-Ensayo de Enzima Ligada Inmuno Absorbente
GIAP	Proteína de Adherencia Galactosa Inhibible
HM1:IMSS	<i>Entamoeba histolytica</i> México 1:Instituto Mexicano del Seguro Social
HM38:IMSS	<i>Entamoeba histolytica</i> México 38:Instituto Mexicano del Seguro Social
IFAT	Anticuerpos Inmunofluorescentes
IgA	Inmuno globulina A
IgG	Inmuno globulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IHA	Hemaglutinación Indirecta

kDa	Kilodaltios
MBP	Proteína de unión a Maltosa
M-LA	Fracción de Membrana
NBT	Substrato Kit Pierce
PADG	Prueba Amebiana de Difusión en Gel
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCR-HERA	Reacción en Cadena de la Polimerasa-Hibridación-Ensayo Enzimático liberado
PEHP	Peptona Extracto de Hígado Páncreas
PEHPS	Peptona Extracto de Hígado Páncreas-Suero
rec-Eh-P ₁	Proteína recombinante de <i>Entamoeba histolytica</i>
Rf	Distancia recorrida por el marcador/Distancia recorrida por el solvente hasta el frente de corrimiento
rRNA	Acido Robonucleico ribosomal
SAPA	<i>Staphylococcus aureus</i> -Proteína A
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SREHP	Proteína Recombinante rica en Serina
T ₇ -RNA	Acido Ribonucleico Polimerasa T ₇
WB	“Western Blot” (Inmunoelectrotransferencia)

