

OBTENCION Y PURIFICACION DE ANTIGENOS PARA DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE AMEBIASIS

LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR, LICDA. MARIA EUGENIA PAREDES SANCHEZ,
LIC. RAFAEL ARMANDO ELGUETA SPINOLA, LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA,
Br. MARITZA MARTINEZ GARZARO.

ESCUELA DE QUIMICA BIOLÓGICA, DEPARTAMENTO DE CITO HISTOLOGIA

1. SUMARIO

El documento resume los ensayos realizados para la estandarización de un método serológico (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima, ELISA), para el diagnóstico de amebiasis, utilizando antígeno obtenido a partir de cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*. El estudio se realizó en dos fases, la primera consistió en la obtención de antígeno; para esto se cosecharon las amebas en frascos de cultivo en fase logarítmica de crecimiento, obteniéndose así una solución que contenía 5 µg/ul de antígeno amebiano. En la segunda fase se probó la sensibilidad y especificidad del antígeno obtenido enfrentándolo a anticuerpos monoclonales y policlonales por medio de la técnica de ELISA. Se encontró que bajo estas condiciones el antígeno era capaz de detectar títulos de anticuerpos hasta 1:6400, utilizando los conjugados comerciales al doble de la dilución recomendada. El antígeno se enfrentó además a sueros de pacientes y controles comerciales, comparándolo simultáneamente a un método comercial de ELISA, donde se obtuvieron iguales resultados por ambos métodos. Se concluye que el antígeno preparado en el laboratorio da buenos resultados. Se recomienda seguir realizando más ensayos, a fin de estandarizar el método para propósitos de diagnóstico y estudios seroepidemiológicos que proporcionen un marco real de la prevalencia de la amebiasis en Guatemala.

2. INTRODUCCION

La infección conocida como AMEBIASIS, es provocada en el humano, por el parásito *Entamoeba histolytica*, y aunque algunos otros primates también pueden infectarse. Se sabe que la infección se originó en el hombre, y que éste es el mayor reservorio de la misma. Se conocen dos formas de amebiasis: a) Luminal, donde los síntomas clínicos no son aparentes b) Invasiva donde hay invasión de la mucosa intestinal y se produce disentería y/o ameboma [1].

La demostración de consistentes diferencias bioquímicas entre las cepas patógenas y no patógenas, ha dado un avance en el entendimiento de la amebiasis, y han confirmado la hipótesis de Brumpt, quien en 1925 formuló que la amebiasis luminal era producida por una cepa de ameba, mientras que la invasiva la producía otra morfológicamente similar, pero de diferente especie. Actualmente, se han caracterizado más de 20 diferentes patrones de zimodemos, que han sido encontrados en varias áreas del mundo, con amebas cultivadas de muestras de pacientes con amebiasis invasiva [2].

En el diagnóstico de amebiasis, se ha demostrado a menudo que los métodos serológicos son de gran ayuda, debido a que en el 95% de los pacientes con absceso hepático amebiano, ocurre una producción de anticuerpos específicos anti-ameba, los cuales pueden ser identificados enfrentándolos al antígeno amebiano (proteína amebiana) por diferentes técnicas, como: Inmunolectroforesis (IEP), Centrifugación diferencial y más recientemente por ELISA e Inmunoblotting [3].

La elucidación de las reacciones inmunes antiamebicas es complicada por el gran número de componentes antigénicos que pueden provocar igualmente, gran número de diferentes respuestas inmunes. El cultivo masivo de *E. histolytica* en medio axénico, ha proporcionado las bases para separar estos antígenos y estudiar sus características inmunológicas [4].

Este estudio permitió grandes avances en el conocimiento de técnicas de cultivo *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, obtención de antígenos y diagnóstico inmunológico de enfermedades parasitarias; todas estas técnicas fueron aprendidas y experimentadas en el Instituto Politécnico Nacional de México, D.F., lo que permitió traer suficiente cantidad de antígeno amebiano para realizar los ensayos necesarios para el desarrollo del trabajo.

3. MATERIALES Y METODOS

Con la colaboración del IPN de México D.F., se inició en nuestro laboratorio el montaje de la técnica de cultivo polixénico, monoxénico y axénico, a partir de muestras de pacientes, así como de cepas mexicanas; sin embargo por problemas en la estandarización de los métodos, y premura de tiempo, realizamos esta parte del proyecto en México con la supervisión de nuestros asesores la obtención de antígeno. Para esto se utilizaron 3 botellas de cultivo axénico de *E. histolytica* en fase logarítmica [5,6] inoculadas 3 días antes a partir de otras botellas de cultivo axénico de la cepa HM1 (Humano, México, #1); las botellas se colocaron en baño de hielo por 5 minutos con el objeto de que las amebas se despegaran de las paredes de las botellas, se vació el contenido de las botellas en tubos centrífuga estériles; se centrifugó a 4° C por 5 minutos a 1000/rpm, se descartó el sobrenadante y se hicieron tres lavados con un volumen conocido de PBS frío pH 7.2, con centrifugación a 1000 rpm por 5 minutos. Se realizó un conteo en un hemocitómetro para conocer el número de amebas por mililitro.

Se agregó 15 ul de PHMB y 1.5 ml de PBSA a la suspensión celular y esta se sometió a homogenización en baño de etanol congelado con hielo seco, dejándose congelar para luego descongelarla con un baño de agua a 37° C. Este procedimiento se repitió 3 veces para lograr una homogenización completa. El lisado celular se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 12,000 rpm por 30 minutos a 4° C. Se retiró el sobrenadante, y se le cuantificaron las proteínas por el método de Lowry almacenándose a -70° C hasta su posterior utilización.

Ya en nuestro laboratorio se repitió la determinación de proteínas para asegurar que no hubiera sufrido cambios el antígeno durante el transporte, comprobándose que la concentración era de 5ug/ul. La prueba del antígeno consistió en sensibilizar placas de microtitulación con 10ug/pozo del antígeno obtenido y comprobar que este antígeno es capaz de detectar diferentes cantidades de anticuerpos por medio de la técnica semicuantitativa de ELISA.

El antígeno se enfrentó a anticuerpos monoclonales IgG de ratón específicos para la cepa HM1, ensayándose 8 diferentes diluciones, utilizando el conjugado a una dilución de 1:1000 y como sustrato ABTS peroxidasa. El antígeno se enfrentó además a un anticuerpo policlonal de la cepa B-4 de *E. histolytica*, ensayándose también 8 diluciones. Simultáneamente se ensayaron diferentes diluciones para el conjugado, que era una anti-IgG de ratón marcada con peroxidasa, desde 1:500 hasta 1:8000. Se realizaron además unas pruebas con sueros humanos (previamente analizados por IHA) comparándose los resultados con los obtenidos utilizando un método comercial de ELISA para diagnóstico serológico de amebiasis.

4. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Se obtuvo una buena concentración de antígeno, sin embargo el volumen (1.5) fue poco debido al bajo crecimiento de las amebas en el cultivo axénico, lo que incidió directamente en el rendimiento del método [6].

Los resultados obtenidos al enfrentar el antígeno a diferentes concentraciones de anticuerpos monoclonales y policlonales, (Ver anexos 1 y 2) fueron positivos en todas las diluciones ensayadas cuando se utilizó el conjugado a la dilución recomendada al igual que el rango comprendido desde 1:500 hasta 1:2000, lo que da un indicio de la alta sensibilidad que puede tener el método para detectar concentraciones muy bajas de anticuerpos [7]. Esto además demuestra que los costos pueden reducirse, ya que se obtuvieron iguales resultados utilizando el conjugado al doble de la dilución recomendada, lo que constituye una gran ventaja, puesto que los conjugados son lo más costoso del método [2,8].

Los resultados similares que se obtuvieron con el método comercial, indican que si se estandariza el método puede ser muy útil para propósitos e diagnóstico, especialmente para estudios seroepidemiológicos [9]. En los dos sueros control negativo que dieron positivo 1:20 por ambos métodos no pudo establecerse con claridad la causa; sin embargo esto podría significar dos cosas, falsos positivos a diluciones muy bajas, lo que implicaría correr un número mayor de muestras, para establecer la Media Geométrica del título menor, o bien que se trata de casos de portadores asintomáticos. Esta posibilidad de establecer diferencias entre los títulos de pacientes con amebiasis invasiva, intestinal y portadores asintomáticos, constituye una de las mejores ventajas de los métodos serológicos, sobre los coproparasitológicos [9,10,11].

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 La obtención de antígeno es un método muy sencillo, pero depende directamente del cultivo amebiano; cuanto mejor crecimiento se obtenga en las botellas, mejor será el rendimiento del método, por esto es importante continuar el montaje de la técnica de cultivo *in vitro* con cepas nativas de *E. histolytica*, que ayudarían a bajar enormemente los costos de la obtención de antígeno.

5.2 El antígeno que se obtiene a partir de cultivo axénico de *E. histolytica*, puede ser utilizado sin inconvenientes en el método de ELISA; sin embargo, es necesario continuar ensayando diferentes concentraciones de antígeno y establecer si es posible obtener un mejor rendimiento del antígeno.

5.3 Es importante realizar estudios epidemiológicos para tener una imagen real sobre la situación de la amebiasis en la población guatemalteca, para ello se necesita establecer los títulos de anticuerpos positivos y negativos de la población que permitan diferenciar entre portadores asintomáticos, enfermos y no enfermos. Para apoyar estos estudios sería importante el montaje de la técnica de detección de antígenos en heces, lo cual permitirá identificar a los pacientes con amebiasis intestinal.

6. AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB), por proporcionar gran parte del financiamiento para el desarrollo de la investigación.

Al Instituto Politécnico Nacional de México, D.F. (IPN), por permitirnos realizar el aprendizaje y la ejecución de buena parte del proyecto en sus instalaciones, así como la asesoría de las Doctoras: María Guadalupe Ortega, María de Lourdes Muñoz y Margarita de la Torre, ya que sin su valiosa ayuda no se hubiera realizado el estudio.

Al departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por proporcionarnos el equipo y demás recursos que se utilizaron.

7. REFERENCIAS

- 7.1 Martínez Palomo A. The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitol. Tod.* 1987;4:111-118.
- 7.2 Trissi D. Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal hosts. *Rev. Inf. Dis.* 1982;6:1154-1183.
- 7.3 Joyce P, Ravdin J. Antigens of *Entamoeba histolytica* recognized by immune sera from liver abscess patients. *Am J Trop Med & Hyg.* 1988;38:74-80.
- 7.4 England PT, Sher A. The biology of parasitism: a molecular and immunological approach. New York: Alan R. Liss Inc, Doc. tec. 1988. 554 p.
- 7.5 Diamond LS. *Entamoeba histolytica* shudinn;1903: from xenic to axenic cultivation. *J Protozool* 1986;33:1-5.
- 7.6 De la Torre M. et al. Cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica*. *Arch of Inv Med (Mex)* 1971;2:165-172.
- 7.7 Collins WP. Alternative and complementary immunoassays. Folleto informativo. 1984.
- 7.8 Voller A, Bidwell DE. Heterogeneous enzyme immunoassays (ELISA) difficulties encountered and their resolution; *Biology Prospective 5a. coloque international. Doc Tec.* 1983; pp 217-222.

- 7.9 Strachan WD *et al.* Immunological differentiation of pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. Lancet 1988;12:561-562.
- 7.10 Robinson GL. The laboratory diagnosis of human parasitic amoeba, Trans. of Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 1982, 76:465-472.
- 7.11 Grundy M. Preliminary observations using a multy layer ELISA method for detection of *Entamoeba histolytica* trophozoite antigens in stool samples. Trans. Soc. Trop. Med. & Hyg., 1982; 76:396-400.