

KASMER. Vol. 19 (1-4), 1991
Universidad del Zulia
Facultad de Medicina
Maracaibo - Venezuela

**PRUEBA INMUNO ENZIMATICA
PARA LA DETERMINACION DE COPROANTICUERPOS
DE LA CLASE IgA ANTI Entamoeba histolytica**

**IMMUNOENZYMATIC TEST FOR THE DETERMINATION
OF COPROANTIBODIES CLASS IgA AGAINST
Entamoeba histolytica**

*D. León de Bracho**
*G. Espinoza***
*A. Rangel***
*Ch. Ferrin***

RESUMEN

Se explora la respuesta inmunológica en la amibiasis intestinal mediante un método inmunoenzimático diseñado para determinar anticuerpos de la clase IgA específica contra *Entamoeba histolytica*, en 41 muestras de heces provenientes de pacientes con diagnóstico

* Profesora de la Cátedra de Pasantía de Inmunología. Escuela de Bioanálisis - Facultad de Medicina. Apdo. 526-C.P. 4011. Maracaibo, Venezuela.

** Unidad de Inmunología Clínica. Universidad de Los Andes, Facultad de Medicina. Mérida - Estado Mérida, Venezuela.

clínico de amibiasis intestinal. El análisis estadístico de los datos reveló que valores de absorbancia igual o mayor a 0.287 son significativos. Se demostró que la prueba es específica y de utilidad para el diagnóstico de amibiasis intestinal.

PALABRAS CLAVES:

Coproanticuerpos, anti *E. histolytica*, E.L.I.S.A.

ABSTRACT

The local response to intestinal amebiasis is explored using a enzyme-linked immunosorbent assay designed for specific IgA antibodies against *Entamoeba histolytica* from 41 samples of feces of patients with clinical diagnostic of intestinal amebiasis.

The stadistic analysis reveled that absorbance values equal or higher that 0.287 are significative. The test is specific in the diagnosis of intestinal amebiasis.

KEY WORDS:

Coproantibodies, anti *E. histolytica*, E.L.I.S.A.

INTRODUCCION

La amibiasis es una enfermedad de distribución mundial causada por *Entamoeba histolytica*, protozooario patógeno que habita en el intestino grueso del hospedero parasitado en el cual se producen lesiones de la pared intestinal y en algunos casos, puede causar amibiasis extraintestinal o invasiva caracterizada por abscesos en hígado, pulmón y otros órganos.¹

La invasión y destrucción del tejido, principalmente a nivel de la mucosa intestinal es una de las características más relevantes de la amibiasis intestinal. Esta invasión está condicionada por el balance

entre los mecanismos de respuesta del individuo frente a los antígenos de **Entamoeba histolytica**.

Los mecanismos de respuesta inmune local en la amibiasis intestinal no han sido bien caracterizados; es posible que la IgA secretora de los fluidos intestinales pueda contribuir a la defensa local contra **Entamoeba histolytica** al impedir la adherencia a las células epiteliales del intestino.^{2,5}

Los estudios realizados en pacientes con amibiasis intestinal han sugerido el aumento de la concentración de IgA en heces^{6,8} respuesta que también ha sido observada en animales de experimentación cuando se inoculan con antígenos crudos de **Entamoeba histolytica** o sus fracciones, con lo cual se induce la aparición de células productoras de anticuerpos y aumento en la concentración de inmunoglobulinas principalmente de la clase IgA.^{9,10}

La producción de coproanticuerpos de la clase IgA contra **Entamoeba histolytica** estaría inducida por la presencia de trofozoitos en la mucosa intestinal y su determinación sería un método de utilidad para el estudio de la respuesta inmunológica local y para el diagnóstico de amibiasis intestinal.

En este trabajo, se reportan los resultados de la determinación de IgA específica contra **Entamoeba histolytica** en heces de pacientes con amibiasis intestinal mediante el diseño de una prueba inmunoenzimática.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 41 muestras de heces provenientes de pacientes con diagnóstico clínico de amibiasis intestinal y/o disentería; consultantes de la emergencia pediátrica y de adultos del Hospital Universitario de Los Andes.

A cada muestra de heces le fue practicado un examen parasitológico con solución salina y coloración temporal de azul de metileno a pH de 3.8; luego fueron homogeneizadas en solución salina fisiológica en proporción 1/1 Peso/Volumen y filtradas a través de una gasa estéril; el filtrado fue centrifugado a 1200g para luego precipitar las

inmunoglobulinas del sobrenadante con Sulfato de Amonio al 45% pH 7.9; los precipitados de inmunoglobulinas fueron liofilizados y conservados a - 20°C hasta el momento de determinar la concentración proteica por el método de Bradford; la concentración de IgA por el método de inmunodifusión radial y la determinación de IgA específica para *Entamoeba histolytica* por ELISA.

PRUEBA INMUNOENZIMATICA:

Muestras: Los liofilizados de las muestras de heces fueron resuspendidos en PBS pH 7.2 para ajustarlas a una concentración de 100 ug/ml de proteína.

Procedimiento: Se utilizó el método de "Sandwich" indirecto para detectar IgM³⁵ modificado según se describe: en los pozos de una microplaca (Dynatech, Alexandria) se adsorbieron 200ul de anti-IgA humana, cadena alfa específica preparada en cabra (Kallestad, Austin, Texas) a una concentración de 4 ug/ml en buffer carbonato de pH 9.6, las placas se incubaron durante 18 horas a 4°C en cámara húmeda, luego de lavarlas seis veces con buffer fosfato salino Tween 20 al 0.05% (PBS - T), fueron cubiertas con 200ul de una solución de albúmina bovina (Sigma) al 0.5% en PBS - T (PBS - T - BSA) y se incubaron a 37°C durante 1 hora.

Después de lavar, se adicionaron 200 ul del precipitado de las heces ajustadas a 100 ug/ml de proteínas y se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después de un nuevo lavado, se agregaron 200 ul de antígeno de membrana de la cepa HMI de *Entamoeba histolytica* (cedida por el Lic. Antonio Ramírez del Hospital Infantil de México) cultivada en medio axénico según la técnica de Diamond¹¹ y diluida en PBS-T a una concentración de 4 ug/ml, la placa se incubó durante 1 hora a 37°C y después de lavar se agregaron a cada pozo 200 ul de IgG humana anti *Entamoeba histolytica*, diluida en PBS-T a una concentración de 10 ug/ml; las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C luego de lavar, se adicionaron 200 ul de anti IgG humana, preparada en cabra y conjugada con peroxidasa (ATAB), diluida a dosis óptima de 1:2500 ul de substrato, (Ortofe-

nilendiamina H_2O_2 30%), se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en obscuridad y se detuvo la reacción con 50 ul de H_2SO_4 2,5N, luego fue leída en un espectrofotómetro (GILFORD, Mod. IEA) a 450 nm.

RESULTADOS

El análisis parasitológico directo realizado en las muestras de heces, reveló la presencia de quistes y/o trofozoítos de *Entamoeba histolytica* en 28 de las 41 muestras analizadas, lo cual representa el 68.3% del total. En una muestra, 2.4% se observaron trofozoítos de *G. lamblia* y en 12 muestras, que representan el 29.3% no se observó ningún elemento parasitario. (Tabla 1).

TABLA Nº 1

ANALISIS PARASITOLÓGICO DIRECTO EN MUESTRAS DE HECES
MERIDA, 1988

AGENTE	Nº DE MUESTRAS	%
<i>E. histolytica</i>	28	68.3
<i>G. lamblia</i>	1	2.4
Ningún elemento parasitario	12	29.3
TOTAL	41	100.0

F. de I.: Unidad de Inmunología Clínica. Hospital Universitario de Los Andes.

La Tabla Nº 2 describe los resultados de la determinación de IgA por inmunodifusión radial; de los 28 precipitados de las muestras con *Entamoeba histolytica*, en 16 (57%) se detectó IgA y de los 13 precipitados de muestras negativas, 7 (53%) mostraron la presencia de IgA. La distribución individual de los valores se expresa en la Tabla Nº 3. En las muestras negativas, se detectaron valores entre 0.5

TABLA Nº 2

NIVELES DE IgA EN PRECIPITADOS DE HECES
MERIDA, 1988

PRECIPITADOS ANALIZADOS		PRECIPITADOS CON IgA DETECTABLE	%
Muestra positivas para <i>E. histolytica</i>	28	16	57 %
Muestras negativas para <i>E. histolytica</i>	13	7	53 %

F. de I.: Unidad de Inmunología Clínica. Hospital Universitario de Los Andes.

TABLA Nº 3

VALORES INDIVIDUALES DE IgA EN PRECIPITADOS DE HECES
MERIDA, 1988

MUESTRAS POSITIVAS	AMIBA SP mg/dl	MUESTRAS NEGATIVAS	AMIBA SP mg/dl
1 J. D.	4.6	1. C. G.	4.6
2 J. A.	19.8	2. N. Ch.	0.5
3 D. V.	4.6	3. I. F.	4.6
4. A. M.	18.0	4. H. G	5.2
5. S. D.	5.2	5. L.O.	16.0
6. A. L.	0.5	6. L. P.	8.4
7. C. V.	2.5	7. M. T.	5.2
8. R. P.	20.2		
9. C. D.	37.0		
10. B. C.	11.6		
11. M. B.	0.5		
12. I. P.	11.6		
13. J. M.	11.0		
14. I. R.	0.8		
15. M. S.	0.8		
16. N. M.	1.0		

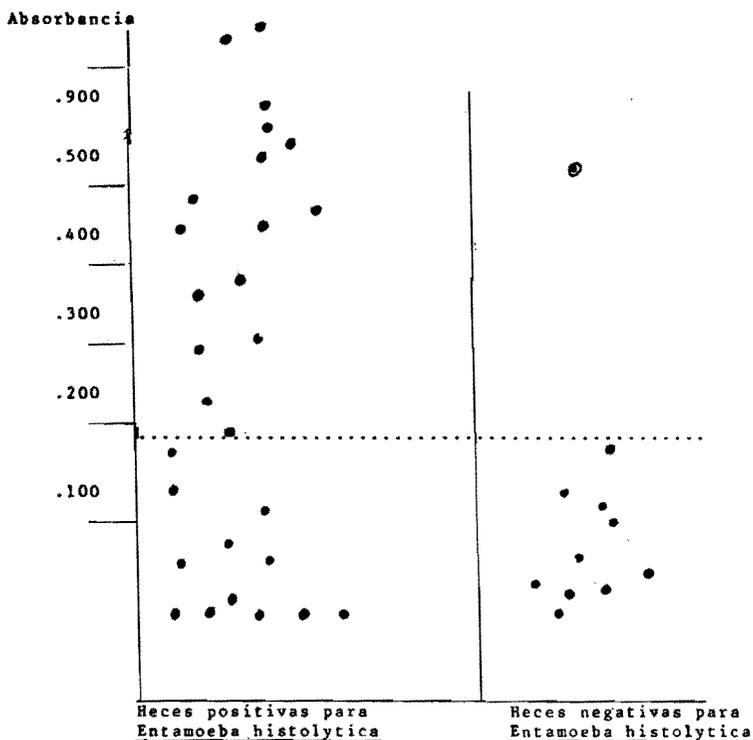
F. de I.: Unidad de Inmunología Clínica . Hospital Universitario de Los Andes.

- 8.4 mg/dl, a excepción de la muestra L.O., cuyo valor fue de 16 mg/dl; es de hacer notar que era un niño de 30 días de nacido y este valor puede ser consecuencia de la lactancia materna. En las muestras positivas, los valores se distribuyen entre 0.5 - 37 mg/dl de IgA y 7 pacientes (43%) mostraron valores por encima de 8.4 mg/dl.

En el Gráfico N° 1 se representa la distribución de los valores de absorbancia obtenidos en la prueba de ELISA al realizar la determi-

GRAFICO N° 1

IgA ESPECIFICA A *E. histolytica* EN PRECIPITADOS DE HECES (ELISA)



nación de IgA específica contra **Entamoeba histolytica** en los precipitados de las heces de todos los pacientes. En los pacientes con síndrome diarréico de etiología diferente a la amibiana, los valores de absorbancia se distribuyeron entre 0.014 - 0.195, con excepción de la muestra R.G., cuya lectura fue de 0.526. Las muestras que al examen microscópico fueron consideradas positivas para **Entamoeba histolytica**, mostraron una amplia distribución de los valores de absorbancia entre 0.015 - 0.926.

En 16 de estas muestras (57.12%) se obtuvieron valores mayores al valor máximo obtenido para las muestras donde no se observaron formas de **E. histolytica**.

Para el análisis estadístico se realizó la prueba F de análisis de varianza, para lo cual las muestras se dividieron en tres grupos:

Grupo A: Pacientes con diagnóstico clínico de amibiasis intestinal y/o disentería amibiana con valores de absorbancia superiores al valor máximo del grupo C (0.195).

Grupo B: Pacientes con diagnóstico clínico de amibiasis y/o disentería amibiana con valores de absorbancia inferiores a 0.220 (valor mínimo de absorbancia para el grupo A).

Grupo C: Pacientes con diagnóstico clínico de síndrome diarréico agudo de etiología diferente a la amibiasis intestinal.

Todo valor de absorbancia superior a 0.273 fue significativamente distinto con un valor de P 0.05 entre los grupos A y B y los grupos A y C.

El pool de sueros usados como control positivo dio una lectura promedio de 0.380 y en la muestra de saliva se obtuvo un valor de absorbancia de 0.135.

DISCUSION

El balance entre los mecanismos de patogenicidad de **Entamoeba histolytica** y los mecanismos de defensa del hospedero son factores que condicionan la instalación de la amibiasis intestinal.^{2,5}

Los mecanismos de protección contra microorganismos entéricos, incluyendo **Entamoeba histolytica** han sido relacionados con el

predominio en la mucosa intestinal de IgA secretora, la cual inhibe su adherencia a las células blancas.^{6, 8, 12, 13} Por lo tanto, el estudio de la respuesta inmunológica local puede ser útil como método de diagnóstico en amibiasis intestinal.

En esta investigación se expresan los resultados del estudio preliminar sobre un método inmunoenzimático indirecto diseñado para cuantificar IgA específica contra **Entamoeba histolytica** en muestras de heces. El empleo del antígeno de membrana de la cepa HMI de **Entamoeba histolytica** garantizó la especificidad de la prueba y ésta se demostró por la diferencia en los valores de absorbancia obtenidos en las muestras controles que se usaron.

El análisis de la concentración protéica reveló que no hay diferencia entre los grupos analizados. Para los niveles de IgA, la concentración fue menor en el grupo de pacientes con síndrome diarreico de etiología diferente a la amibiana como se demuestra en el Cuadro N^o 2.

El análisis estadístico de los valores de absorbancia reveló que existen diferencias significativas entre los pacientes del grupo A, que tienen diagnóstico clínico de amibiasis intestinal con valores de absorbancia igual o mayor a 0.273 y los pacientes del grupo C, al cual pertenecen aquellos con síndrome diarreico agudo de etiología diferente a **Entamoeba histolytica**.

También se observaron diferencias significativas entre el grupo A antes descrito y el grupo B al cual pertenecen los pacientes con diagnóstico clínico parasitológico de amibiasis, pero con valores de absorbancia comparable con los pacientes del grupo C. Este hallazgo hace pensar que la certeza del diagnóstico parasitológico no fue de un 100% y es probable que los quistes o trofozoítos observados correspondían a especies de amibas no patógenas y el síndrome diarreico era causado por otros agentes involucrados en esta entidad clínica.

Los resultados obtenidos en esta investigación preliminar permiten afirmar que la técnica diseñada es útil para la determinación de anticuerpos específicos contra **Entamoeba histolytica** en heces y

podría ser de utilidad en el diagnóstico de amibiasis intestinal y en el estudio de la respuesta inmunológica local de la infección intestinal causada por **Entamoeba histolytica**.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. SOTO, R. Amibiasis Intestinal, agente etiológico, clínica, diagnóstico y tratamiento. *KASMER*. 8: 63-78, 1980.
2. RAVDIN, J.; Croft, B. and Guerrant, R. Cytopathogenic mechanisms of **Entamoeba histolytica**. *J. EXP. MED.* 152: 377-390, 1980.
3. AUST, K. and Sundquist, R. Dynamics of the interaction between **Entamoeba histolytica** and components of the immune response. *SCAND. J. IMMUNOL.* 7: 35-44, 1978.
4. RAVDIN, J.; John, J.; Johnston, L.; Innes, D. and Guerrant, R. Adherence of **Entamoeba histolytica** trophozoites to rat and human colonic mucosa. *INFECTION AND IMMUNITY.* 48: 292-296, 1985.
5. RAVDIN, J.; Petri, W.; Murphi, Ch. and Smith, R. Production of mouse monoclonal antibodies with inhibit in vitro adherence of **Entamoeba histolytica** trophozoites. *INFECTION AND IMMUNITY.* 53: 1-5, 1986.
6. CAMPOS, R.; Díaz, O.; Barranco, Cl.; Isibasi, A.; Kumate, J. Papel de la IgA en la eliminación de antígeno amibiano. *ARCH. INVEST. MED. (Méx.)* 17: 353-358, 1986.
7. MAHAJAN, R. C.; Agarwal, S. C.; Chuttani, P. N. and Chitkarn, W. L.; Coproantibodies in intestinal amoebiasis. *INDIAN J. MED. RES.* 60, 547-550, 1972.
8. KESSEL, J.; Lewis, W.; Molina, P. and Turner, J. Indirect haemagglutination and complement fixation test in amebiasis. *AMER. J. TROP. MED. HYG.* 14: 540-550, 1965.
9. CAMPOS, R. y cols. Respuesta immune local contra antígenos de **Entamoeba histolytica**. *ARCH. INV. MED. (Méx.)*, 17: 273-276, 1986.
10. ACOSTA, G.; Barranco, C.; Isibasi, A.; Campos, R.; Kumate, J. Excreción de anticuerpos de clase IgA específica anti-amiba en bilis de ratas inmunizadas con trofozoitos de **Entamoeba histolytica** cultivadas en medio axénico. *ARCH. INV. MED. (Méx.)* 13 (Suppl.) 3: 255-259, 1982.
11. DIAMOND, L.; Harlon, D. and Commick, C. A new medium for the axenic cultivation of **Entamoeba histolytica**. *TRANS. ROY. SOC. TROP. MED. HYG.* 72: 431-432, 1978.
12. DAVIS, C.; Houston, C.; Fader, R.; Goldblum, R.; Weaver, E. and Goldman, A. Immunoglobulin A and Secretory immunoglobulin A antibodies to puri-

fied type 1 *Klebsiella pneumoniae* pili in human calusdtrum. INFECTION AND IMMUNITY, 38: 496-501, 1982.

13. BARRANCO, Cl.; Acosta, G.; Campos, R.; Isibasi, A. y Kumate, J. Inhibición por anticuerpos de la adherencia de los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. ARCH. INVEST. MED. (Méx) 17, (Supl. 1): 237-239, 1986.

