

CONTRIBUCIONES ORIGINALES

INVESTIGACION DE ANTICUERPOS AMIBIANOS POR FIJACION EN SUPERFICIE

MAXIMILIANO RUIZ-CASTAÑEDA *

El método de fijación en superficie ya bien probado para revelar reacciones antígeno-anticuerpo en brucelosis, tifoidea y tifo exantemático, así como en la tipificación de grupos sanguíneos y de la mononucleosis infecciosa ha sido aplicado con resultados prometedores en la demostración de reacciones inmunológicas en la amibiasis invasora. La reacción es instantánea y tiene la ventaja de ser la más rápida de cuantas se han ideado hasta la fecha.

En vista de los resultados de pruebas comparativas con métodos de reconocida eficiencia tales como la contraelectroforesis, se considera justificado continuar y tal vez perfeccionar la prueba de "fijación en superficie".

En la compacta relación bibliográfica sobre inmunología de la amibiasis que Kagan reunió sobre esta infección,¹ hace resaltar la complicada reacción inmunológica que estimula el parásito, y considera la posibilidad de producción de cuando menos cuatro tipos de inmunoglobulinas.

* Académico honorario. Hospital Infantil de México.

Parece ser que en el tracto intestinal se produce IgA durante la fase aguda; en tanto que la ulterior invasión de los tejidos puede estimular la formación no sólo de IgG e IgM, sino al parecer también de IgE, así como fenómenos de inmunidad celular.

Sobre la posible presencia de IgA y su función, el autor citado refiere interesantes antecedentes de otras infecciones tales como el cólera y la poliomielitis, en que tales anticuerpos parecen desempeñar algún papel protector por lo que no es aventurado suponer que algo semejante pueda ocurrir en la amibiasis.

Lo referente a la posible presencia de IgE se basa en la producción de reacciones intradérmicas inmediatas de tipo reagínico, que aparecen minutos después de la inyección del antígeno, alcanzan su máximo en 15 a 30 minutos y desaparecen en una o dos horas, tal como ocurre en las conocidas reacciones provocadas por liberación de histamina. Por otra parte la inyección por vía intradérmica de antígenos amibianos ha dado lugar a reacciones de aparición retardada de tipo tuberculínico, lo que revela la existencia de inmunidad celular.

Para fines prácticos de diagnóstico serológico en la amibiasis invasora se aprovecha la existencia de fenómenos de inmunidad humoral, en la que intervienen como factores principales los linfocitos tipo "B". Se asegura que este leucocito, bajo el impacto antigénico se transforma para formar células plasmáticas, que sintetizan y secretan inmunoglobulinas "G" y "M", sustancias que pueden reconocerse mediante diversos procedimientos serológicos entre los que figuran las pruebas de difusión según el método de Ouchterlony,² la hemaglutinación indirecta y fija-

ción del complemento³ y el más reciente procedimiento, aplicado por Sepúlveda y col.^{4, 5} en el que mediante un ingenioso recurso se hace pasar corriente eléctrica sobre el antígeno y el anticuerpo dispuestos en placas de agar y se aprovecha la tendencia del antígeno para emigar hacia el ánodo, en tanto que la inmunoglobulina se dirige hacia el cátodo. El encuentro de ambos factores se hace aparente por la formación de bandas de precipitación que facilitan la identificación de reacciones específicas. Para esta prueba se ha utilizado una solución de antígeno amibiano⁽¹⁾ Parke Davis.

La técnica de contra-inmuno-electroforesis, además de suministrar datos sobre reacciones con suero sin diluir, lo que facilita exploraciones de tipo epidemiológico, puede revelar títulos con diluciones superiores al 1:16.

El objeto de la presente comunicación es presentar una prueba adicional de que el fenómeno de "fijación en superficie", que por primera vez dimos a conocer en 1950,⁶ puede revelar no sólo reacciones con suero antibrucela, sino que ha dado resultados aplicables a la clínica en casos de fiebre tifoidea, tifo exantemático, así como en la determinación de grupos sanguíneos, mononucleosis infecciosa y otras pendientes de dar a conocer.⁷

Conviene recordar que el principio del método está basado en el hecho de que la inmunoglobulina correspondiente, al conjugarse con los receptores antigénicos, pierde su equilibrio dentro del suero; y al convertirse en sustancia liófila se adhiere al papel sobre el que se verifica la reacción a la vez que sujeta al antígeno correspondiente. Tal adherencia es tan firme que resiste el paso de una corriente líquida que por absorción actúa sobre la mezcla

suelo-antígeno y arrastra las albúminas y globulinas no específicas, siendo la intensidad de la fijación proporcional al contenido del suero en anticuerpos.

Material

El antígeno empleado fue obtenido de cultivos axénicos suministrados por cortesía de Sepúlveda y de la Torre, del Hospital General del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social. El sedimento de esos cultivos, con un contenido aproximadamente de 37 millones de parásitos, se lava dos a tres veces con solución salina isotónica formalinizada al 0.2 por ciento y el sedimento final se resuspende en poco menos de un mililitro de la misma solución. El antígeno se conserva en refrigeración a una temperatura de 4 a 8°C.

El papel empleado para observar la fijación del complejo antígeno-anticuerpo fue Papel Beckman No. 320046 para electroforesis.

El colorante que se seleccionó para revelar la reacción fue azul de bromofenol, el mismo empleado como indicador de pH y se prepara en solución acuosa al 0.2 gm. por ciento. El fijador es una solución de alcohol etílico al 50 por ciento adicionada de 10 por ciento de ácido acético glacial.

Se emplearon finalmente sueros control positivos, probados por el método de contra-inmuno-electroforesis, así como sueros humanos negativos y sueros de conejo.

Métodos

La prueba de fijación en superficie con fines de diagnóstico rápido se puede practicar de la manera siguiente: en una lá-

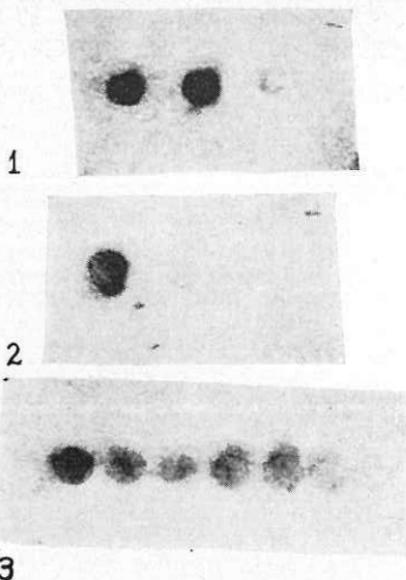
mina de vidrio se disponen gotas de un suero positivo sin diluir, de uno negativo y del suero problema. Las gotas se aplican con ayuda de asas de alambre de 3 mm. de diámetro sobre las que, mediante asas de 2 mm. se agrega el antígeno procurando mezclar los reactivos. A la brevedad posible se aplica sobre las gotas una tira de tamaño adecuado de papel absorbente. Para el procedimiento de tinción puede procederse de dos maneras, según la urgencia del caso; desde luego se sumerge el papel durante 15 a 20 segundos en la solución de bromofenol y se transfiere al fijador donde puede permanecer unos 2 minutos; después se pasa el papel a una lámina de vidrio y se somete a un chorro fuerte de agua de la llave y este brusco tratamiento durante el tiempo necesario borra el color del control negativo, pero no lo afecta en el positivo; se aplica una hoja de papel filtro para eliminar el exceso de agua y se deja secar a temperatura ambiente o en la estufa a 37°C. Estas maniobras requieren un máximo de 10 a 15 minutos. La segunda manera de diferenciar la reacción puede ser de utilidad cuando hay que investigar varios sueros. Para esto, una vez teñido y fijado el papel se deposita en un tanque de agua corriente y se deja tanto tiempo como se requiera hasta observar decoloración en el control negativo.

En ocasiones, cuando se prolonga excesivamente el lavado, puede decolorar el control positivo por lo que, para evitar lecturas falsamente negativas conviene repetir con el papel decolorado la misma maniobra de tinción, fijación y lavado a chorro. Es de interés observar que, a medida que el lavado progresa, van apareciendo las manchas, las cuales ulteriormente desaparecen del control negativo.

Segundo procedimiento con sueros no diluidos: una vez absorbidas las mezclas, el papel se deposita en un tanque que contiene solución salina isotónica y se mantiene allí unos 5 minutos, con lo que se favorece la eliminación de un exceso de proteínas no específicas. Se pasa el papel a un tanque de agua destilada para eliminar restos de NaCl, maniobra que debe ser rápida y se sumerge después en el colorante durante 10 a 15 segundos antes de pasarlo al fijador. La diferenciación puede hacerse sea por el método rápido o por lavado lento. Los resultados se ilustran en las figuras 1 y 2.

Titulación de sueros positivos

La dilución del suero se practica en placas de plástico de las utilizadas para microaglutinación con pozos de fondo cónico. El suero se diluye en suero normal previamente diluido al 1/5 con solución salina isotónica. Con pipetas calibradas para depositar 0.02 ml. se aplica esa cantidad de suero normal en cada uno de 8 pozos. Al primero se agrega 0.02 ml. del suero problema y con la misma pipeta se mezcla y pasa al segundo pozo 0.02 ml. y así sucesivamente hasta el 7o. pozo. A continuación se agrega a los pozos, excepto al primero, 0.02 ml. de una dilución del antígeno al 1:10. En seguida, con ayuda de un aplicador de madera, de los empleados usualmente en nuestros laboratorios, se procura mezclar los reactivos, primero en el pozo 8 y con el líquido adherido al aplicador se imprime un círculo líquido en el extremo de una tira de papel, según se ilustra (fig. 3). Este disco será el control negativo. Con el mismo aplicador se mezcla el contenido del pozo 7 imprimiendo una segunda huella, y así



- 1 Prueba positiva controlada con sueros negativo y positivo.
- 2 Prueba negativa controlada.
- 3 Ejemplo de titulación de un suero positivo.

sucesivamente hasta el pozo No. 2, procurando actuar con rapidez para evitar el inconveniente de la desecación de las huellas. Conviene practicar la prueba en dispositivos que permitan actuar en presencia de una atmósfera húmeda. Una vez preparados los 7 pequeños círculos, que representan diluciones finales equivalentes a 8-16-32-64-128-256-512, se transfiere el papel al tanque de solución salina de donde al cabo de unos minutos se pasa al agua destilada y se procede a teñir y fijar en la forma usual. La diferenciación puede hacerse rápidamente bajo el chorro de agua. Se notará que después del tratamiento con bromofenol y fijador puede aparecer poco marcada la coloración; pero,

como en casos anteriores, el color se va acentuando a medida que avanza el tratamiento, teniendo cuidado de suspenderlo al decolorarse el control y posiblemente en dos o más diluciones cercanas al negativo.

La figura 3 muestra el resultado de la titulación de un suero positivo. En caso de que el tratamiento con solución salina haya sido un tanto exagerado y se de lugar a reacciones dudosas, conviene repetir con el mismo papel el tratamiento con colorante y fijador y se logra así hacer aparente el delicado depósito del complejo antígeno-anticuerpo.

Si se protege con tiras de cinta adhesiva la hilera de pozos que contienen las diluciones del suero, se evita su evaporación y se permite repetir la prueba varias veces cuando el operador lo juzgue necesario.

Discusión

La ventaja que puede ofrecer el método de fijación en superficie en la revelación de anticuerpos humorales en la amebiasis, se debe a que la unión de IgG o IgM con los correspondientes receptores es un fenómeno que tiene lugar en forma instantánea por lo que la prueba resulta la más rápida de cuantas se han ideado para el diagnóstico serológico de la amebiasis invasora. Sin embargo, salvo casos individuales o poco numerosos, y solamente con experiencia para manejar e interpretar el método, éste no puede ser comparable, por ejemplo, con la prueba de contra-inmuno-electroforesis aplicada por Sepúlveda, particularmente cuando se pretenda el diagnóstico con fines epidemiológicos.

Por lo que se refiere a la manera de practicar esta prueba, se ha preferido uti-

lizar como antígeno suspensiones del parásito cultivado en medios libres de asociados bacterianos, de preferencia a los antígenos comerciales de uso tan generalizado en los laboratorios clínicos. En cuanto a la forma de revelar la reacción, suponemos que la acción del colorante sobre el material proteínico adherido al antígeno es al parecer lo que hace visible dicha respuesta. Sin embargo, la acción del colorante no parece ser suficientemente firme pues el excesivo lavado puede hacerla desaparecer.

Es de interés hacer notar que el azul de bromofenol al teñir los anticuerpos amebianos libres de suero protector confiere el color con tal firmeza que tanto la fijación sobre el papel como la coloración resisten todo intento de decoloración por los lavados usuales.

Se han practicado más de 50 pruebas con material obtenido tanto de los laboratorios de Sepúlveda como de otras instituciones así como, de material clínico bien confirmado y los resultados son comparables con los de otros métodos. Por lo que se refiere a sueros negativos se han realizado buen número de pruebas con material obtenido de los laboratorios de rutina del Hospital Infantil.

Se considera este trabajo como el inicio de estudios tendientes a perfeccionar métodos que faciliten el diagnóstico rápido de la amebiasis invasora.

REFERENCIAS

1. Kagan, I. G.: *The immunology of amebiasis*. Arch. de Invest. Med. (Méx.). Suplemento 1, p. 169, 1973.
2. Ouchterlony, O.: *Immunodiffusion and electrophoresis*. Ann. Arbor. Science Pub. Inc. Ann. Arbor. Michigan, 1968.
3. Kessel, J. F.; Lewis, W. P.; Molina-Pasquel, C. y Turner, J. A.: *Indirect hemagglutination*

and complement fixation tests in amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 14:540, 1965.

4. Sepúlveda, B.; Lee, E.; de la Torre, M. y Landa, L.: *El diagnóstico serológico de la amebiasis invasora con la técnica de inmunoelectroforesis cruzada*. Arch. de Invest. Med. (México), Vol. 2, suplemento 1, p. 269, 1971.
5. Sepúlveda, B.; Aubanel, M.; Landa, L. y Velázquez, G.: *Avances en la técnica de contra-inmuno-electroforesis para el diagnóstico sero-*

lógico de la amebiasis. Arch. de Invest. Med. (México), suplemento 2, p. 363, 1972.

6. Ruiz Castañeda, M.: *Surface Fixation. A new method of detecting certain immunological reactions*. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 73:46, 1950.
7. Ruiz Castañeda, M.: *Reacciones inmunológicas sobre papel filtro. Fijación en superficie*. Academia Nacional de Medicina. 1er. Centenario, Tomo 2, p. 199, 1964.