

avances en la técnica de contra-inmuno- electroforesis para el estudio serológico de la amibiasis

BERNARDO SEPÚLVEDA
MARTHA AUBANEL
LUIS LANDA
GUADALUPE VELÁZQUEZ

Se introdujeron diversas modificaciones a la técnica originalmente descrita, que consistieron esencialmente en: a) disminución de la fuerza iónica del amortiguador utilizado en la placa de agarosa, con el fin de establecer un sistema electroforético discontinuo; b) reducción del voltaje y del tiempo de aplicación de la corriente eléctrica; c) dilución o concentración del suero problema, de acuerdo con la distinta concentración de los anticuerpos, y d) uso de placas de mayor tamaño y de cámara electroforética de dimensión adecuada, para estudiar gran número de sueros.

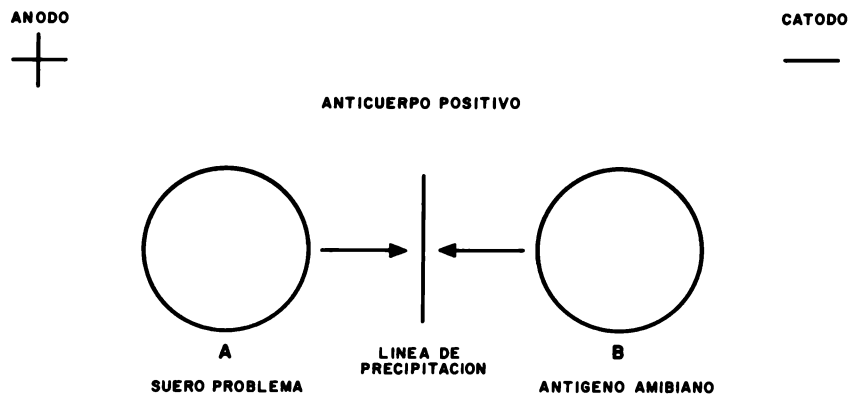
Con estas modificaciones, se ha logrado obtener mayor nitidez y precisión en la lectura de las reacciones; se ha hecho posible la expresión numérica de los títulos de los anticuerpos y se ha conseguido iniciar estudios seroepidemiológicos.

Por otra parte, se ha ensayado un equipo compacto, que utiliza un método simplificado de contra inmunolectroforesis. Los resultados preliminares han sido satisfactorios y en caso de confirmarse, el método puede tener aplicación útil a la práctica. [Arch. Inv. Méd. (Méx.) 3, Supl. 2: 363, 1972].

Servicio de Gastroenterología, Hospital General,
Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del
Seguro Social.

El año pasado, dimos a conocer la aplicación de la técnica de contra inmunolectroforesis, que entonces denominamos inmunolectroforesis cruzada, para el diagnóstico

FIG. 1. Esquema de la técnica de contra inmuno-electroforesis (Texto en la figura).



ESQUEMA DE LA TÉCNICA DE CONTRA INMUNOELECTROFORESIS PARA LA INVESTIGACION DEL ANTICUERPO ANTIAMIBIANO. LAS FLECHAS INDICAN EL DESPLAZAMIENTO DE LOS REACTIVOS POR LA CORRIENTE ELECTROFORÉTICA. EL SUERO PROBLEMA (EN ESTE EJEMPLO CON ANTICUERPO ANTIAMIBIANO), SE COLOCA EN EL ORIFICIO A. EL ANTIGENO OBTENIDO DEL CULTIVO AXENICO DE ENTAMOeba HISTOLYTICA SE COLOCA EN EL ORIFICIO B.

serológico de la amibiasis. La técnica se basa en dos principios: a) el desplazamiento del antígeno hacia el ánodo, por influencia de la corriente electroforética, y b) la movilización del anticuerpo hacia el cátodo, por el efecto electro endosmótico. Al encontrarse ambos reactivos en la zona intermedia, se produce la línea de precipitación (Fig. 1). Los resultados del estudio demostraron la rapidez y la sencillez del procedimiento; y en cuanto a la sensibilidad y especificidad, comprobaron que son iguales o superiores a las mismas propiedades del método de la hemaglutinación indirecta⁽¹⁾; este último método es el que habíamos venido utilizando con anterioridad.

En vista de tales ventajas, hemos adoptado en nuestro Servicio la técnica de contra inmuno-electroforesis para el estudio de las reac-

ciones serológicas de la amibiasis, tanto en humanos como en animales de experimentación. Durante el año transcurrido, se han introducido algunas modificaciones en la técnica original que han mejorado su rendimiento.

Por otra parte, recientemente se ha venido empleando un método de contra inmuno-electroforesis para la investigación del antígeno asociado a la hepatitis que utiliza un equipo sencillo.* En nuestro laboratorio, he-

* Hyland AUSTIGEN Counter Electrophoresis Supply Package. Hyland Div. Travenol Laboratories, Inc. Costa Mesa, Calif. 92626, U.S.A.



FIG. 2. Fotografía del equipo sencillo sometido a prueba, que consiste en una unidad compacta para electroforesis.

mos ensayado la aplicación de este sistema simplificado para el diagnóstico serológico de la amibiasis, comparándolo con la técnica adoptada por nosotros.

El presente trabajo tiene por objeto dar a conocer las modificaciones introducidas en la técnica de contra inmunoelectroforesis originalmente descrita; y, al mismo tiempo, presentar los resultados de nuestra experiencia con el equipo simplificado, para considerar las posibilidades de su aplicación más extensa a la práctica.

Material y métodos

Ensayo del método electroforético simplificado.—El equipo sencillo ya mencionado, fue sometido a la prueba, utilizando un grupo de sueros estudiados previamente con la técnica adoptada en nuestro laboratorio. En la figura 2, se presenta una fotografía del citado equipo, que es simplemente una unidad compacta para electroforesis.

Modificaciones a la técnica original.—Se ensayaron las variaciones a la técnica original que se presentan en la tabla I.

TABLA I. VARIACIONES A LA TECNICA ORIGINAL DE CONTRA INMUNOELECTROFORESIS QUE FUERON ENSAYADAS

<i>Factores ensayados</i>	<i>Técnica original</i>	<i>Variaciones</i>
Diámetro de los pozos.	5 mm	3 mm
Distancia entre los mismos.	3 mm	5 mm
pH del amortiguador.	8.2	8.6
Composición del amortiguador para la cámara.	Veronal	ninguna
Composición del amortiguador para la solución de agarosa.	Veronal	Tris EDTA
Fuerza iónica del amortiguador para la cámara.	0.05 M	ninguna
Fuerza iónica del amortiguador para la solución de agarosa.	0.05 M	0.01 M
Miliamperios por placa.	30	ninguna
Voltios por cm	12 - 13	3 - 4
Tiempo de aplicación de la corriente.	90 min.	45-60 min.

TABLA II. TECNICA DE CONTRA INMUNOELECTROFORESIS ADOPTADA EN LA ACTUALIDAD

F A C T O R E S	
Diámetro de los pozos.	5 mm
Distancia entre los mismos.	3 mm
pH del amortiguador, para la cámara y para la solución de agarosa.	8.6
Composición del amortiguador para la cámara.	Veronal
Composición del amortiguador para la solución de agarosa al 1%.	Veronal
Fuerza iónica para el amortiguador de la cámara.	0.05 M
Fuerza iónica para el amortiguador de la solución de agarosa.	0.01 M
Miliamperios por placa.	30
Voltios por cm	3 - 4
Tiempo de aplicación de la corriente.	45-60 min.

Los factores que resultaron más convenientes, tanto de la técnica original como de las variaciones introducidas, están subrayados.

De acuerdo con los resultados de estos diversos ensayos, hemos adoptado en la actualidad la técnica de contra inmunolectroforesis que se presenta en la tabla II.

Una de las modificaciones más importantes, es el sistema electroforético discontinuo que se establece al reducir cinco veces la fuerza iónica del amortiguador utilizado en preparar el medio de soporte (solución de agarosa al 1% en Veronal pH 8.6), en relación con la del amortiguador empleado en la cámara. Esta diferencia en la fuerza iónica determina mayor rapidez en el desplazamiento del antígeno hacia el ánodo y del anticuerpo hacia el cátodo, lo que favorece las condiciones de la reacción^(2, 3).

Otras modificaciones a la técnica original que fueron adoptadas, consistieron en someter a los sueros que inicialmente dieron reacciones dudosas, a concentración por medio del gel de acrilamida,* con objeto de incrementar la concentración de los anticuerpos y en hacer diluciones progresivas de los sueros que dieran reacciones positivas, con el fin de obtener estimaciones cuantitativas de los títulos de anticuerpos.

Asimismo, antes de revestir las placas de vidrio con el medio de soporte,** consistente como antes se dijo, en solución de agarosa al 1% en amortiguador de Veronal (pH 8.6 y fuerza iónica 0.01 M), las mencionadas placas fueron precubiertas con una película de

solución de agarosa en agua destilada al 1.5%* y secadas posteriormente a 37°C. El objeto de este paso previo, fue aumentar la adhesión del medio de soporte a la placa y evitar la infiltración de los reactivos por capilaridad entre el propio medio de soporte y la superficie desnuda del vidrio.

Por último, hemos utilizado para los estudios seroepidemiológicos placas de vidrio de 20 cm de longitud y 8.3 cm de anchura, unidas a lo largo de dos en dos, de tal manera que la longitud era de 40 cm; un par de placas se colocó en la parte superior y el otro par en la inferior de una cámara electroforética grande** (Fig. 3).

En cada placa (Fig. 4), se hicieron ocho columnas, en sentido vertical, con siete pares de pozos en cada columna; en el pozo del lado del cátodo, se colocó el antígeno y en el lado del ánodo, el suero problema. Con este dispositivo, se estudiaron 56 sueros por placa; como se utilizaron cuatro placas, en cada electroforesis se hicieron 224 pruebas. En caso necesario, se hizo otra electroforesis el mismo día, para completar 448 pruebas por jornada.

En cuanto a la lectura de las placas, hemos preferido seguir haciéndola después de baño en solución salina durante 18 horas, con luz fluorescente indirecta y con el auxilio de una lupa; en la placa de la figura 5, son claramente visibles doce reacciones positivas. Para conservación de las mismas placas, las teñimos sistemáticamente con rojo de Ponceau.

* Lyphogel, Gelman Instruments, Ann Arbor, Mich., E.U.A.

** 10 ml de la solución de agarosa para medio de soporte en las placas de 10.2 cm x 8.3 cm y 20 ml en las placas de 20 cm x 8.3 cm.

* 2 ml de esta solución en las placas de 10.2 cm x 8.3 cm y 4 ml en las placas de 20 cm x 8.3 cm.

** CAMAG 4132 Muttentz/Suiza.

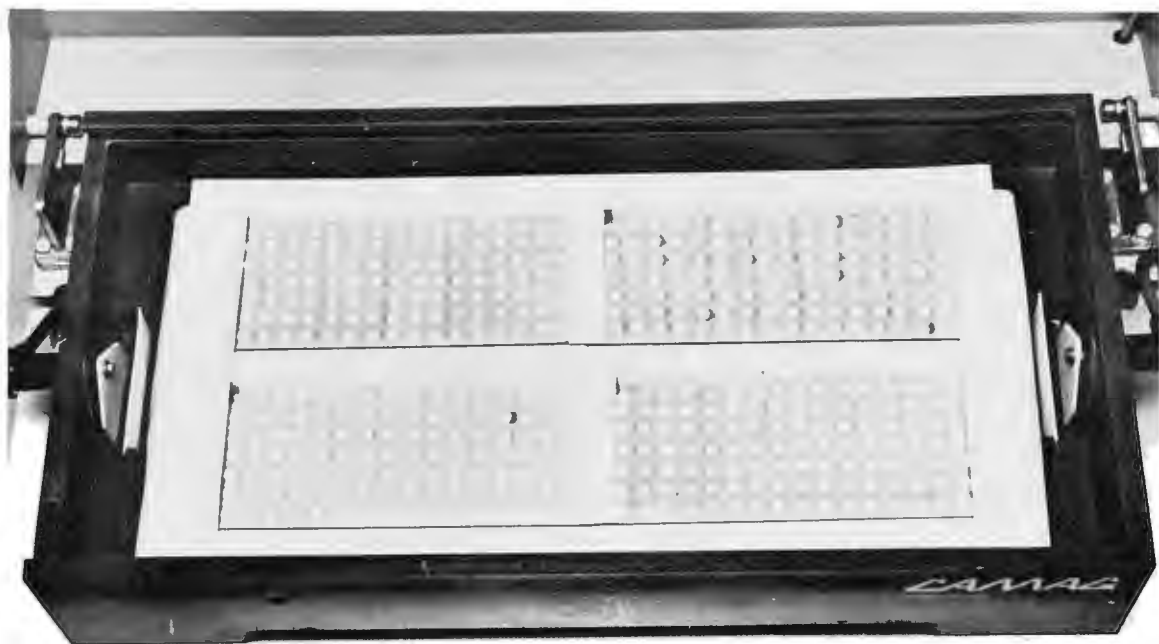


FIG. 3. Cámara electroforética, con las cuatro placas de 20 cm de longitud y 8.3 cm de anchura cada una, colocadas en su sitio.

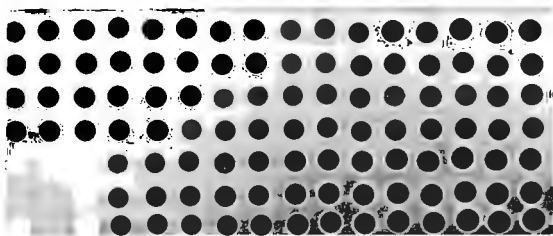
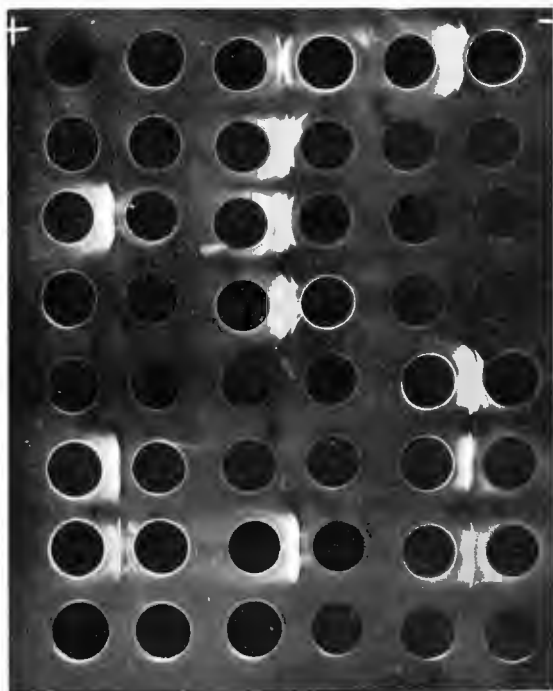


FIG. 4. Acercamiento de la fotografía anterior, que muestra una placa, con ocho columnas de pozos en sentido vertical y siete pares de pozos en cada columna.

FIG. 5. Fotografía de una placa después de la electroforesis, que muestra claramente visibles doce líneas de precipitación (reacciones positivas).



Resultados y discusión

En lo que respecta al método simplificado, los resultados de las reacciones serológicas fueron satisfactorios. En la figura 6, se muestra la fotografía de una placa utilizada en este método, en que pueden observarse claramente varias reacciones positivas.

Tenemos la impresión, derivada de un ensayo preliminar, que los resultados son semejantes a los de nuestra técnica, si bien el método simplificado parece tener menor sensibilidad. En todo caso, conviene ensayarlo en mayor escala, ya que si llega a confirmarse su eficacia, la sencillez en su ejecución significa importante ventaja desde el punto de vista práctico.

En lo que se refiere a la técnica que hemos adoptado en la actualidad en nuestro laboratorio, las modificaciones introducidas al procedimiento original se resumen en la tabla III.

Las ventajas principales obtenidas con las citadas modificaciones, consisten en la mayor nitidez de las líneas de precipitación, lo que facilita la lectura de las reacciones positivas (Fig. 7); y además, en la aparición más frecuente de dos o más líneas de precipitación,

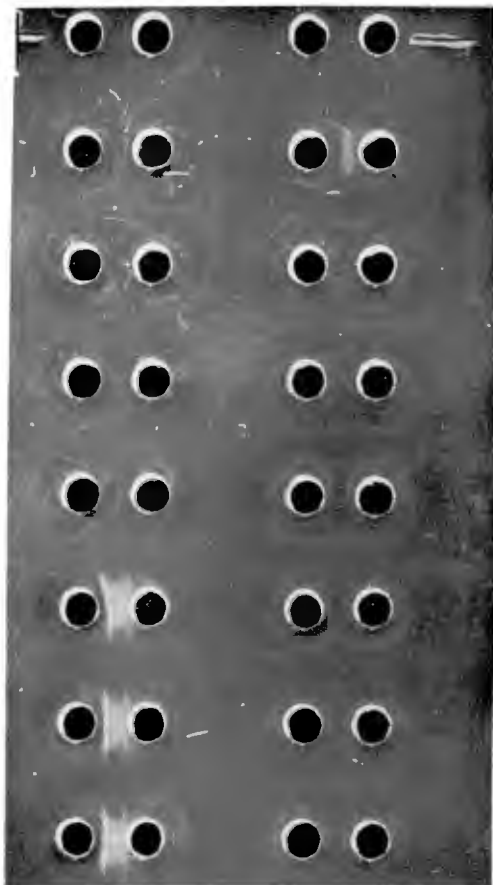


FIG. 6. Fotografía de una placa utilizada en el equipo compacto después de electroforesis, que muestra reacciones positivas en los tres últimos pozos de la columna a la izquierda y una reacción dudosa en el segundo pozo de la columna a la derecha. Posteriormente, se comprobó que este último suero daba reacción positiva.

lo cual indica la mayor intensidad de la reacción y demuestra la diferente cuantía de los anticuerpos circulantes en los distintos sueros (Fig. 8).

TABLA III

Modificaciones esenciales a la técnica de contra inmunoelectroforesis

- a) uso de un sistema electrofrético discontinuo, con amortiguador de fuerza iónica inferior en la placa de agarosa.
 - b) disminución del voltaje y del tiempo de aplicación de la corriente.
 - c) dilución o concentración del suero problema, según el caso.
 - d) empleo de placas de mayor tamaño para estudios sero epidemiológicos.
-

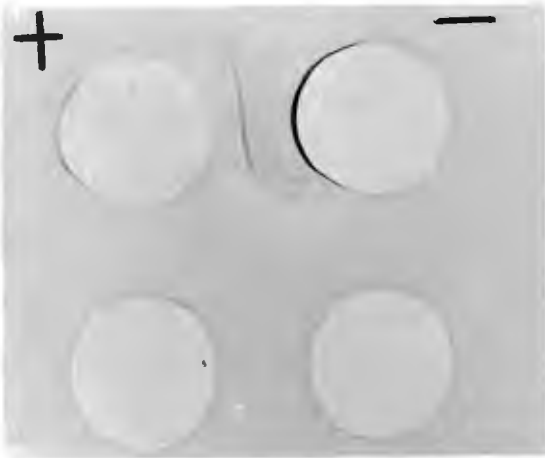


FIG. 7. Acercamiento de una placa, que muestra con nitidez la línea de precipitación entre los dos pozos superiores. La reacción fue negativa en los pozos inferiores.

FIG. 8. Acercamiento de una placa, que muestra tres reacciones intensamente positivas. En los pozos que aparecen en medio, se observan cinco líneas de precipitación, y cuatro en los otros dos pares de pozos.

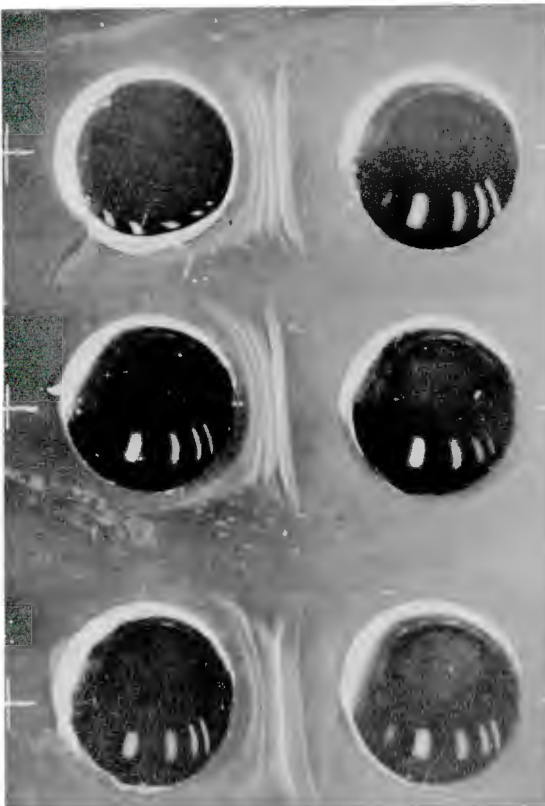


FIG. 9. Fotografía de una placa que muestra la titulación de un suero con reacción positiva. En este caso, las reacciones fueron positivas con diluciones 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16.

Por otra parte, en casos de sueros con títulos bajos de anticuerpos, que dieron inicialmente reacciones dudosas, la concentración con gel de acrilamida permitió obtener reacciones positivas bien definidas.

En cuanto a la dilución progresiva de los sueros que dieron reacciones positivas, sirvió para expresar numéricamente los títulos de los anticuerpos. En la placa de la figura 9, el suero dio reacción positiva con diluciones 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16; estos resultados de acuerdo con la técnica nuestra, indican una concentración elevada de anticuerpos.

Finalmente, el empleo de placas grandes y de cámara electroforética de mayor capacidad, ha permitido realizar los estudios en la escala necesaria para iniciar la investigación seroepidemiológica de la amebiasis.

Abstract

ADVANCES IN COUNTER IMMUNOELECTROPHORETIC TECHNIC IN THE SEROLOGIC STUDY OF AMEBIASIS. Several modifications were made to an immunoelectrophoretic technic described previously. They were mainly: a) to decrease ionic concentration in the buffer used in the agar plate, so that a non-continuous electro-

phoretic system could be obtained, b) to reduce voltage and time of electric current application, c) to dilute or concentrate antibodies, and d) to use larger plates and electrophoretic chambers of an adequate size for allowing the study of larger number of sera.

With these modifications, a neat and accurate lecture of the reactions as well as the numerical expression of antibody titers were obtained. Seroepidemiologic studies have been initiated already.

On the other hand, a kit based upon a simplified counter immunoelectrophoretic method has been assayed; so far, satisfactory preliminary results have been obtained. However, further studies are needed for determining its usefulness in general practice

Referencias

1. 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. Inv. Méd. (Méx.) 2, Supl. 1: 263, 1971.
2. WALLIS, C. y MELNICK, J.: Enhanced detection of Australia antigen in serum hepatitis patients by discontinuous counter-immuno electrophoresis. Appl. Microbiol. 21: 867, 1971.
3. ALTER, H. J.; HOLLAND, P. V. y PURCELL, R. H.: Counterelectrophoresis for detection of hepatitis-associated antigen: methodology and comparison with gel diffusion and complement fixation. J. Lab. Clin. Med. 77: 1000, 1971.