UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

TÍTULO

"NUEVOS MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA AMEBIASIS Y DE OTROS PROTOZOARIOS INTESTINALES"

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

Bioquímica Alicia Saura

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

CÓRDOBA, ARGENTINA
2012

DIRECTOR DE TESIS

DR. HUGO DANIEL LUJAN

COMISIÓN DE TESIS

DRA. NELIA GEREZ DE BURGOS

DR. ELIAS PEDRO CHALUB

EVALUADORES EXTERNOS

DR. JORGE PAVAN

DR. SIXTO RAUL COSTAMAGNA

Índice

		Pág.
Abreviaturas		3
Resumen		4
Abstract		6
1	Capítulo I: Introducción y Objetivos	8
1.1	Generalidades de las parasitosis causadas por protozoarios	9
1.2	*Entamoeba histolytica*	10
1.3	Biología Celular de *Entamoeba histolytica*	12
1.3.1	Ciclo de Vida	12
1.3.2	El trofozoíto	13
1.3.3	El quiste	14
1.4	Epidemiología de la Amebiosis	14
1.5	Manifestaciones Clínicas de la Amebiosis	15
1.5.1	Amebiosis intestinal	16
1.5.2	Amebiosis extraintestinal	16
1.6	Diagnóstico de la Amebiosis	17
1.7	Tratamiento de la Amebiosis	17
1.8	*Giardia lamblia*	18
1.9	Biología celular de *Giardia lamblia*	19
1.9.1	Ciclo de vida	19
1.9.2	El trofozoíto	20
1.9.3	El quiste	21
1.10	Epidemiología de la Giardiosis	21
1.11	Manifestaciones Clínicas de la Giardiosis	22
1.12	Diagnóstico de la Giardiosis	22
1.13	Tratamiento de la Giardiosis	22
1.14	*Cryptosporidium spp.*	23
1.15	Biología de *Cryptosporidium spp.*	23
1.15.1	Ciclo de Vida	23
1.15.2	Ooquistes	24
1.16	Epidemiología de la Cryptosporidiosis	25
1.17	Manifestaciones clínicas de la Cryptosporidiosis	25
1.18	Diagnóstico de la Cryptosporidiosis	26
1.19.	Tratamiento de la Cryptosporidiosis	26
1.20	Objetivos del Trabajo de Tesis	27
2	Capítulo II: Materiales y Métodos	28
2.1	Introducción	29
2.2	Obtención de antígenos (trofozoítos, quistes y proteínas recombinantes)	29
2.2.1	Cultivo *in vitro* de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*	29
2.2.2	Purificación de quistes de *Entamoeba histolytica*	29
2.2.3	Cultivo de trofozoítos y enquistamiento *in vitro* de *Giardia lamblia*	30
2.2.4	Obtención de ooquistes de *Cryptosporidium spp.*	30
2.2.5	Infección experimental en terneros con *Cryptosporidium parvum*	30
2.2.6	Purificación de ooquistes de *Cryptosporidium spp.*	31
2.2.7	Generación de proteínas de la pared del quiste de *Giardia* recombinantes	31
2.3	Producción de anticuerpos monoclonales	32
2.4	*Screening* de las colonias por microscopía de fluorescencia	33
2.5	Isotipificación de anticuerpos	33
2.6	Enzimo-inmuno ensayo (ELISA)	33

2.7 Electroforesis de proteínas en geles de SDS/poliacrilamida y Western blot 34
2.8 Determinación del contenido total de proteínas 35
2.9 Ensayos de caracterización del mAb 6C12 de *Entamoeba histolytica* 35
2.9.1 Tratamiento con Tripsina 35
2.9.2 Tratamiento con Proteinasa K 35
2.9.3 Tratamiento con DTT 35
2.9.4 Tratamiento con Quitinasa 36
2.9.5 Tratamiento con Periodato 36
2.9.6 Tratamiento con *Yeast lytic Enzyme* 36
2.9.7 Tratamiento con Neuraminidasa 36
2.9.8 Tratamiento con Calcofluor-White 36
2.10 Diseño y preparación de la tira reactiva 36
2.11 Procedimiento del test con las tiras reactivas 37
2.12 Detección de trofozoítos de *E. histolytica* en biopsias de tejidos 37
2.13 Análisis Estadístico 38
3 Capítulo III: Resultados 39
3.1 Desarrollo de anticuerpos monoclonales contra quistes de *E. histolytica* 40
3.2 Ensayos de caracterización del mAb 6C12 *de E. histolytica* 40
3.2.1 Tratamiento con Proteinasa K 41
3.2.3 Tratamiento con Tripsina 41
3.2.4 Tratamiento con Ditiotreitol (DTT) 42
3.2.5 Tinción con Calcofluor-White 43
3.2.6 Tratamiento con Quitinasa 43
3.2.7 Tratamiento con Neuraminidasa 43
3.2.8 Tratamiento con Periodato 44
3.2.9 Tratamiento con Enzima Lítica de Levaduras 45
3.3 Isotipificación del mAb 6C12 46
3.4 Análisis de Western Blot 46
3.5 Evaluación de la especificidad del anticuerpo con otras especies 48
3.6 Desarrollo de anticuerpos monoclonales contra trofozoítos de *E. histolytica* 52
3.6.1 Evaluación de los anticuerpos monoclonales en biopsias de tejido 54
3.7 Desarrollo de mAb contra ooquistes de *Cryptosporidium spp.* 56
3.7.1 Ensayos de especificidad de los mAbs contra ooquistes de *Cryptosporidium* 56
3.7.2 Isotipificación de los anticuerpos 57
3.7.3 Análisis de Western Blot 58
3.8 Desarrollo de anticuerpos monoclonales contra quistes de *Giardia lamblia* 59
3.8.1 Isotipificación del anticuerpo monoclonal 60
3.8.2 Análisis de Western blot 60
3.9 Procedimiento para la detección de los quistes con tiras reactivas 61
3.9.2 Valor diagnóstico de la tira reactiva en muestras de materia fecal 63
4 Discusión 65
4.1 Generalidades 66
4.2 Diagnóstico de la Amebiosis 67
4.3 Caracterización parcial del antígeno reconocido por el mAb 6C12 76
4.4. Diagnóstico de abscesos amebianos 77
4.5 Diagnóstico de la Giardiosis y la Cryptosporidiosis 79
4.6 Desarrollo de una tira reactiva para la detección de protozoarios intestinales 84
4.7 Conclusión 85
5 Capítulo IV: Bibliografía 86

Abreviaturas (en orden de aparición)

OMS: Organización Mundial de la Salud

NTD: Enfermedades tropicales desatendidas

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

mAbs: Anticuerpos monoclonales

CDC: Centro para el control y prevención de enfermedades de los Estados Unidos

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

IPTG: Isopropil-β-tiogalactósido

GST: Glutatión-S-Transferasa

CWP: Proteína de la pared del quiste

SPF: Libre de patógenos específicos

PEG: Polietilenglicol

BSA: Albúmina sérica bovina

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

BICP/NBT: 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato/cloruro de tetrazolio nitroazul

DTT: Ditiotreitol

PBS: Buffer fosfato salino

HRP: Peroxidasa de rabanito

GlcNAc: N-acetil glucosamina

SAF: Acetato de sodio/Formol

IFA: Ensayo de inmunofluorescencia

ATCC: American Type Culture Collection

IF: Inmunofluorescencia

HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana

IEF: Inmunoelectroforesis

HAI: Ensayo de inhibición de la aglutinación

AL: Aglutinación de partículas de látex

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

FC: Fijación del complemento

PDI: Proteína Disulfuro Isomerasa

DAB: Diaminobencidina

Resumen

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ubica a las enfermedades diarreicas en segundo lugar como causa de morbi-mortalidad de niños en países en vías de desarrollo, siendo las infecciones por protozoarios intestinales proporcionalmente una causa trascendente en dichas regiones. La mayoría de estos parásitos se transmiten por vía fecal-oral o por contacto interpersonal y exhiben ciclos de vida que, en general se desarrollan en dos estadios: el trofozoíto que coloniza el intestino y el quiste que es excretado con las heces y cuya rígida pared protectora, le confiere resistencia en el ambiente, permitiendo de este modo la propagación de la enfermedad.

Entamoeba histolytica es uno de los agentes infecciosos de mayor distribución mundial, y es aproximadamente la causa de 100.000 muertes por año, siendo responsable de uno de los problemas de salud más serios en países en vías de desarrollo. Se reconocen al menos ocho amebas que podrían colonizar el intestino del hombre: *E. histolytica, E. dispar, E. moshkovskii, E. coli, E. hartmanni, E. polecki, Iodamoeba butschlii* y *Endolimax nana.* Aunque sólo *E. histolytica* es considerada como el agente etiológico de la Amebiosis. Su presentación clínica va desde la colonización asintomática, la disentería amebiana, hasta la propagación extraintestinal, originando abscesos en diversos órganos y tejidos. Por este motivo, la correcta identificación de *E. histolytica* en heces y tejidos y diferenciándola de otras amebas comensales y de otros protozoarios representa un desafío en la práctica médica, ya que de ello dependerá el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad.

La problemática que ocasionan las enteroparasitosis es importante, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, por lo que es necesario el desarrollo de tests diagnósticos modernos, precisos y rápidos. La incorporación de nuevas tecnologías diagnósticas representa un reto importante. Por lo tanto, el objetivo de Trabajo de Tesis fue desarrollar nuevas estrategias diagnósticas basadas en la generación de anticuerpos monoclonales (mAbs, por sus siglas en Inglés), en especial contra trofozoítos y quistes de *E. histolytica*. Estas pruebas con mayor sensibilidad y especificidad que las actualmente disponibles, permitirán la identificación y el aislamiento del microorganismo en diversos especímenes biológicos. Para ello se desarrollaron anticuerpos monoclonales contra trofozoítos y quistes de *E. histolytica*. Los mismos fueron evaluados para comprobar su reactividad en diferentes tipos de muestras, con diferentes condiciones de fijación y almacenamiento, y se intentó la caracterización de los antígenos por ellos reconocidos.

Si bien los anticuerpos generados contra la pared del quiste no permitieron diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar*, es importante destacar que no presentaron reacción cruzada con otras especies de amebas, incluyendo *E. moshkovskii* cuyos quistes son morfológicamente indistinguibles del complejo *E. histolytica/dispar*, ni de otros parásitos comúnmente hallados en el intestino. Los anticuerpos generados contra la forma vegetativa del parásito mostraron una alta especificidad y sensibilidad sólo con trofozoítos de *E. histolytica*, tanto obtenidos en cultivo como en biopsias de tejidos, aún utilizando diferentes tipos de fijadores y conservantes.

Todos los anticuerpos generados para ambos estadios del ciclo de vida de este parásito demostraron excelente reactividad puesta en manifiesto mediante ensayos de microscopía de inmunofluorescencia, enzimo inmuno analisis y Western blotting.

Aunque existen kits comerciales efectivos contra otros protozoarios intestinales, tales como *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*, durante el desarrollo de este trabajo se obtuvieron además mAbs contra quistes y ooquistes de estos parásitos con la intención de generar un ensayo completo que involucre los tres protozoarios. Estos nuevos anticuerpos fueron combinados con los obtenidos anteriormente contra *Entamoeba* e incorporados en un kit en formato de tiras reactivas, de tal forma que sirviera para detectar simultáneamente estas tres especies de manera simple y económica. Estos se colocaron en un soporte de nitrocelulosa de manera tal que sirvan para la captura de las formas quísticas de estos parásitos, luego se exponen a un segundo anticuerpo marcado con una enzima y por último al sustrato específico para que desarrolle color. La cantidad mínima de parásitos detectados por estas tiras fue de 50 quistes por ml de materia fecal diluida 50/50 tanto para quistes de *E. histolytica/dispar* como para ooquistes de *Cryptosporidium spp*. y de 10 quistes de *G. lamblia*.

Con esto concluimos que estos anticuerpos combinados de forma eficiente en un formato de tiras reactivas representan una prueba diagnóstica simple, económica, de rápida realización, y al alcance de cualquier analista. Y si bien no es posible con ellos discriminar el complejo *E. histolytica/dispar* podrían ser aun así de inmensa utilidad en países en vías de desarrollo donde no existen recursos disponibles ni equipamiento adecuado para la realización de técnicas más sofisticadas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o PCR en tiempo real, y tener de esta forma una herramienta para un diagnóstico certero de los tres principales protozoarios intestinales en cualquier tipo de muestra de materia fecal.

Abstract

The World Health Organization (WHO) includes diarrhea as the second leading cause of morbidity and mortality of children in developing countries. Among these causes, infections by intestinal protozoan parasites represent an important percentage in any place of the world. Most of these parasites are transmitted by the fecal-oral route or by inter personal contact and exhibit simple life cycles, consisting in the disease-causing, proliferating trophozoites and the dormant, resistant cyst responsible for the transmission of the infection among susceptible hosts.

Entamoeba histolytica is one of the most frequent of those parasites, causing about 100.000 deaths per year in developing countries, being one of the major health problems in areas where basic sanitation practices are inefficient.

At least eight species of *Entamoeba* have been reported to infect the human large intestine: *E. histolytica, E. dispar, E. moshkovskii, E. coli, E. hartmanni, E. polecki, Iodamoeba butschlii* and *Endolimax nana,* although *E. histolytica* is the only one considered to cause pathology in humans. Clinical manifestation of this infection varies from asymptomatic infection to dysentery and extraintestinal invasion, producing abscesses in many tissues. Therefore, the correct identification of *E. histolytica* in stool and tissue samples and its differential diagnostic is an important challenge in parasitology because treatment and prognosis depend of the valid identification of this parasite.

The health issue of protozoan intestinal infections, both in developed and developing parts of the world, is of such importance that it is clearly necessary the development of novel, better, cheap, and faster diagnostic methods. The incorporation of new approaches and technology to the efficient and sensitive detection of these infections is significantly relevant.

The main goal of the present Doctoral Thesis was to develop new strategies for the diagnostic of intestinal protozoan parasites based on the development of specific monoclonal antibodies (mAbs), in particular against trophozoite and cyst forms of *E. histolytica,* which could detect the parasite in different biological samples with high sensibility and specificity, since no such technology is available commercially to determine amebic infection. We here developed mAbs against trophozoites and cyst of *E. histolytica*, which were then tested for their reactivity on different biological samples, including stool and biopsy materials, under variable storage and fixative conditions. The characterization of the antigens recognized by the mAbs was also attempted.

Although the mAb generated against the *Entamoeba* cyst wall could not allow the differentiation between *E. histolytica* from *E. dispar*, it did not demonstrate cross-reaction with either cysts of other intestinal parasitic protozoa or helminthes eggs neither to other type of amebas, including *E. moshkovskii*, which cysts are morphological undistinguished of the complex *E. histolytica/dispar*.

The mAbs generated to the vegetative stage of the parasite, the trophozoites, showed high sensitivity and specificity to *E. histolytica* obtained from culture as well as those obtained in tissue biopsies of infected patients, even using different fixatives to conserve the samples. All the mAbs were assayed by ELISA, immunofluorescence microscopy and Western blotting, showing excellent reactivity.

Although some kits to detect other common intestinal parasites such *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* are available, the mAbs against *Entamoeba* were combined with novel mAbs generated during this work against cysts of *G. lamblia* and oocysts of *Cryptosporidium spp*., and incorporated into a dipstick device. Specific mAbs were spotted into a nitrocellulose membrane placed on top of a plastic support to capture cysts/oocysts from stool samples. The dipstick was then exposed to another specific antibody for detection and later to a secondary antibody labeled with horse radish peroxidase and subsequently to a color-developing reagent. The minimal amount of cysts/oocysts that can be detected by this approach was 50 parasites per mililiter of stool samples diluted 50/50 for *Entamoeba* and *Cryptosporidium spp* and 10 cyst of *G. lamblia.*

We can conclude that the mAbs efficiently combined in a unique kit represent a cheap, simple, fast diagnostic approach that can be performed by untrained personnel or even the general public. Although the anti-*Entamoeba* mAb was not useful to discriminate the members of the complex *E. histolytica/dispar*, this mAb is of great value for the detection of the parasite, especially in areas where the instruments or resources are not available to perform more sophisticated techniques such as the polymerase chain reaction (PCR) or real time PCR, allowing the safe and sensitive detection of the major three protozoan parasites.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Generalidades de las parasitosis causadas por protozoarios

Se define como parásito a cualquier organismo que vive sobre o dentro de otro organismo vivo del que obtiene parte o todos sus nutrientes, al cual pueden causar daño o enfermedad y con el cual mantienen una dependencia obligada y unilateral (36). Una característica que poseen los organismos parásitos es su gran capacidad de adaptación. Estos, ya sean unicelulares como los protozoarios o multicelulares como los helmintos, ocupan diferentes nichos durante sus travesías por vectores y hospedadores por lo que han desarrollado extraordinarios mecanismos de adaptación que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales tan adversas que de otro modo los destruirían (36).

Las enfermedades parasitarias, desde hace muchos años, representan un grave problema en muchos países tanto de climas tropicales y subtropicales así como en climas más templados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las "Enfermedades Tropicales Desatendidas" (NTD: Neglected Tropical Diseases) como aquellas que han sufrido una falta de atención por parte de los organismos y autoridades de salud pública, a tal punto que más de mil millones de personas, una sexta parte de la población mundial, se ve afectada por una o más de ellas, y más de 500.000 personas mueren cada año en todo el mundo por estas causas (41, 62). Estas enfermedades tienen un alto costo en regiones endémicas, incluyendo pérdida de la capacidad para asistir al trabajo o la escuela, y retraso del crecimiento y desarrollo en niños pequeños, como también el deterioro de las habilidades cognitivas del individuo, representando un alto costo para algunos países (19).

Estas NTD involucran un amplio grupo de patologías entre las que se encuentras las llamadas enfermedades transmitidas por agua y alimentos. Dentro de este grupo encontramos patologías como la Giardiosis, Amebiosis y Cryptosporidiosis. Se estima que *Giardia* y *Cryptosporidium* causan 2.000.000 y 300.000 infecciones al año en Estados Unidos de Norteamérica, respectivamente (12, 34). La Cryptosporidiosis es la causa más frecuente de brotes de enfermedades relacionadas con el agua para uso recreativo, tales como piscinas, causando brotes múltiples cada año (12, 29, 64). Por otra parte se ha informado que *E. histolytica* causa 50 millones de casos y aproximadamente 100.000 muertes por año a nivel mundial, con un marcado predominio en países en vías de desarrollo (39, 88). Se considera además la posible transmisión zoonótica de estas enfermedades a través de animales domésticos como perros y gatos, así como cerdos y monos (50, 66, 85, 87, 92).

Tradicionalmente, la técnica utilizada para el diagnóstico de protozoos fue la

observación de las muestras al microscopio para visualizar las formas quísticas, huevos y/o trofozoítos; ésta metodología tiene la ventaja de tener bajo costo, pero su sensibilidad depende del grado de la infección, de frescura de la muestra que se analiza y del nivel de experiencia del microscopista (47, 82). Muchas veces se utilizan coloraciones para la detección de ciertos organismos específicos, por ejemplo para la identificación de coccidios (6). Muchos laboratorios han reemplazado estos métodos basados en la observación al microscopio de la muestra de materia fecal por otros con mayor sensibilidad y especificidad, como la técnica de ELISA o la de microscopía de inmunofluorescencia. El análisis por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) puede detectar estas infecciones con mayor sensibilidad que los métodos de detección por anticuerpos, pero no son utilizados rutinariamente para el diagnóstico en clínica debido a su alto costo, la necesidad de equipamiento adecuado, y la posibilidad de contaminaciones que generan falsos positivos (68, 70, 74, 82, 100).

Por todo lo expuesto, en este Trabajo de Tesis nos planteamos originariamente la generación de anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos contra la pared del quiste y de antígenos de membrana plasmática de trofozoítos de *E. histolytica* con el objetivo de iniciar estudios sobre su composición y estructura y, además, utilizarlos para generar nuevos métodos diagnósticos efectivos para la detección de la Amebiosis, dada la carencia de dichos reactivos para una rápida y eficiente individualización de este parásito en materia fecal o en biopsias de pacientes (4, 77). Dado los promisorios resultados obtenidos nos propusimos posteriormente generar nuevos anticuerpos contra formas resistentes de otros parásitos frecuentemente hallados en materia fecal de pacientes con diarrea, como *Giardia* y *Cryptosporidium*, con el objetivo de producir, por primera vez, un rápido y sencillo kit diagnóstico que incluya las formas quísticas de estos tres importantes patógenos humanos.

En las próximas secciones se describirán las características particulares de estos tres microorganismos y la importancia de su diagnóstico diferencial. Mayor énfasis es puesto en *Entamoeba* ya que fue el objeto inicial de este trabajo y cuyo diagnóstico es el de mayor relevancia para la comunidad médica.

1.2 ***ENTAMOEBA HISTOLYTICA***

La primera descripción de la Amebiosis fue realizada por Feder Lösch en 1875 en San Petersburgo, luego de aislar unos trofozoítos móviles en las heces de un campesino con disentería, a las que llamó *Amoeba coli* (69). Años después, en 1903,

Schaudinn introduce el término de *Entamoeba histolytica* para la ameba productora de disentería a diferencia de las no patógenas a las que denominó *Entamoeba coli* (69). Dobell, en 1925, describe el ciclo biológico de *E. histolytica* (26). En ese mismo año, basándose en consideraciones epidemiológicas, Brumpt propone la existencia de dos amebas morfológicamente idénticas, una no patógena y de distribución cosmopolita a la que llamaría *Entamoeba dispar*, mientras que a la causante de disentería e invasión y cuya distribución es más frecuente en países tropicales la llamó *Entamoeba dysenteriae* (69). Esta teoría descripta por Brumpt no fue tenida en cuenta durante muchos años.

En 1961 se logra el primer cultivo axénico de *E. histolytica* (24, 51). Más tarde en 1978, Sargeaunt logra establecer las primeras diferencias entre amebas patógenas y no patógenas observando diferentes patrones de isoenzimas (79, 80). En 1993, Diamond y Clark basándose en diferencias bioquímicas, genómicas, inmunológicas y clínicas, proponen la separación en dos especies, llamando a la ameba comensal *E. dispar* y a aquella patógena y productora de enfermedad *E. histolytica* (25).

La clasificación taxonómica de este parásito de acuerdo a Cavalier-Smith es la siguiente (14): Imperio o Superreino: Eukaryota; Reino: Protozoa; Subreino: Neozoa; Filo: Amoebozoa; Subfilo: Conozoa; Infrafilo: Archamoeba; Clase: Entamoebeae; Orden: Entamoebida; Familia: Entamoebidae; Género: Entamoeba; Especie: *Entamoeba histolytica*

Dentro del género *Entamoeba* existen al menos ocho especies que pueden habitar el intestino del hombre: *E. histolytica, E. dispar, E. moshkovskii, E. coli, E. hartmanni, E. polecki*, *Iodamoeba butschlii* y *Endolimax nana.* Las tres primeras son morfológicamente indistinguibles pero presentan diferencias bioquímicas y genéticas. Sólo *E. histolytica* es considerada patógena mientras que las dos restantes no (78).

Debe señalarse que trabajos publicados en los últimos años han indicado que *E. moshkovskii* podría causar infecciones. Esta especie era conocida anteriormente como *E. histolytica* variedad Laredo (16), considerada como una ameba de vida libre, no patógena que presentaba la particularidad de crecer a temperatura ambiente. Sin embargo algunos estudios realizados en Bangladesh, utilizando técnicas moleculares, determinaron una prevalencia d*e E. moshkovskii* del 21% en niños de 2 a 5 años (5), sugiriendo que quizás el hombre sea un hospedador habitual de este tipo de ameba.

En un trabajo reciente realizado en Australia (33), en el que se utilizó la técnica de PCR para la identificación de *E. histolytica, E. dispar* y *E. moshkovskii* en muestras de materia fecal de pacientes con diagnóstico microscópico positivo, encontraron que el

61,8% de los pacientes era portador de *E. moshkovskii*. Además todos los pacientes infectados con esta especie presentaban sintomatología, con los cual según los autores debería reevaluarse su papel patógeno (33).

Un importante punto a considerar es el hecho que aunque se han reportado diferencias moleculares entre *E. histolytica* y *E. dispar* luego de un intenso debate que duró décadas, el mayor sustento para su separación como especies diferentes es que *E. histolytic*a causa enfermedad mientras *E. dispar* no lo hace. Sin embargo, en los últimos años se han reportado innumerables casos de *E. dispar* causando patología y muchos otros de *E. histolytica* que son asintomáticos (15). Por ello, la discusión de que estas dos amebas morfológicamente indistinguibles corresponden a dos especies diferentes permanece irresuelta y las infecciones por este tipo de parásitos se designan como pertenecientes al complejo *E. histolytica/dispar* (15, 33, 37).

1.3 Biología Celular de *Entamoeba histolytica*

1.3.1 Ciclo de Vida

El ciclo biológico de *E. histolytica* es muy simple, ya que no necesita de hospedadores intermediarios ni posee reproducción sexual. Para poder sobrevivir en diferentes ambientes, éste parásito tiene dos estadios en su ciclo vital: la forma vegetativa del parásito, el trofozoíto, y la forma infectiva, el quiste (71, 81).

La infección se inicia por la ingestión de agua o alimentos contaminados con materia fecal conteniendo quistes de *E. histolytica* o por contacto interpersonal. La forma infectiva del parásito sobrevive al pasaje a través del estómago y del intestino delgado. En la primera porción del colon los quistes se desenquistan dando origen a los trofozoítos móviles (55, 81). En una primera instancia, éstos conservan el mismo número de núcleos que el quiste, pero luego cada núcleo se divide en dos y resulta un trofozoíto metacíclico de ocho núcleos (55, 81). En el colon cada núcleo se rodea de una porción de citoplasma formando ocho trofozoítos que crecen y se multiplican por división binaria (55, 81).

En la luz del intestino los trofozoítos eliminan vacuolas alimenticias y demás inclusiones intracitoplasmáticas, se inmovilizan y forman prequistes o pseudoquistes, los que adquieren una cubierta y dan origen a quistes inmaduros con un solo núcleo, los cuales siguen su desarrollo hasta formar el quiste maduro tetranucleado (81). La formación de quistes sucede exclusivamente en la luz del colon y nunca en el medio ambiente o en los tejidos. Los trofozoítos son rápidamente destruidos fuera del

hospedador mientras que los quistes pueden permanecer viables durante semanas o meses (Figura 1).

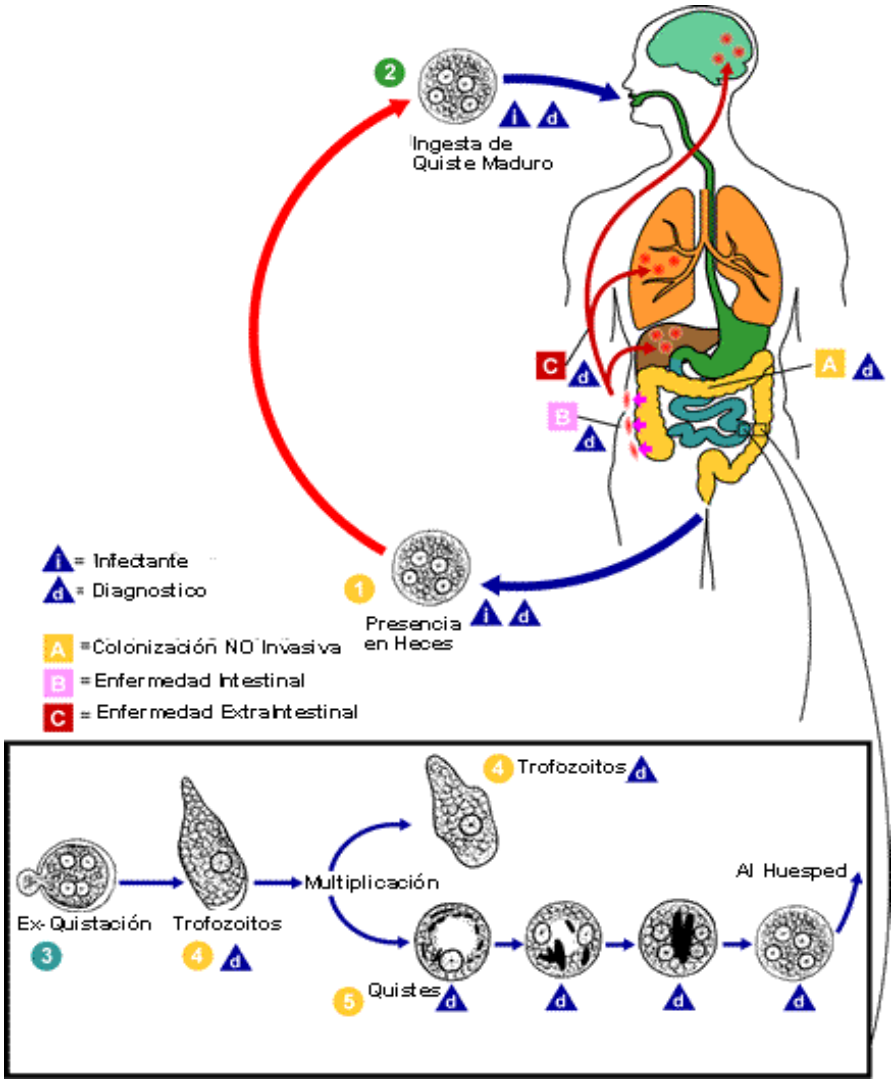


Figura 1: **Ciclo biológico de *Entamoeba***. La infección se inicia con la ingestión de los quistes, los cuales sobreviven al pasaje por el estómago y al llegar al intestino se desenquistan volviéndose móviles y potencialmente invasivos. En algunos casos estos trofozoítos que infectan el intestino forman nuevos quistes que se eliminan por las heces permitiendo la transmisión de la enfermedad a otro huésped. En otros casos se inicia la invasión del epitelio intestinal por los trofozoítos, pudiéndose propagar al peritoneo, hígado y otros órganos (71). Tomado del sitio web del Centro para la Prevención y control de Enfermedades de Estados Unidos de Norte América (CDC) (www.cdc.gov).

1.3.2 El trofozoíto

Esta es la forma vegetativa y dinámica del parásito y presenta un tamaño variable entre 10 y 60 µm de diámetro. El citoplasma está dividido en un ectoplasma hialino y en un endoplasma más granuloso, conteniendo abundantes vacuolas de tamaño variable. Carece de algunas de las organelas típicas que caracterizan a las células eucariotas, como mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, centríolos,

microtúbulos y un citoesqueleto organizado (71, 86). Se alimenta por fagocitosis y digestión intracelular de nutrientes. Muchas veces el citoplasma puede contener eritrocitos fagocitados, propiedad que le sirve para diferenciarla de otras amebas no patógenas (86).

El trofozoíto tiene un núcleo organizado que puede medir de 4 a 7 μm de diámetro, con cromatina periférica adherida a la membrana nuclear y cariosoma central. El trofozoíto es un organismo anaerobio o aerobio facultativo capaz de vivir en la luz del intestino grueso humano. Su movimiento es rápido y unidireccional a través de la emisión de seudópodos digitiformes (86)(Figura 2).

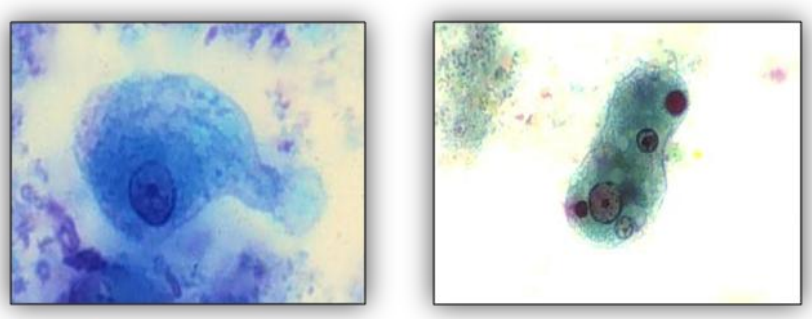


Figura 2. Trofozoítos de *E. histolytica*. A la derecha se observa en el citoplasma eritrocitos ingeridos. Tomado de CDC (www.cdc.gov).

1.3.3 El quiste

Los quistes son la forma de resistencia que presenta el parásito, ya que pueden sobrevivir fuera del hospedador por semanas o meses en un ambiente húmedo. Son formas redondeadas o ligeramente ovaladas con un diámetro que puede variar entre los 8 y los 20 μm. El quiste inmaduro posee un solo núcleo. A diferencia de éste, el quiste maduro posee cuatro núcleos esféricos con una distribución variable de cromatina periférica y un nucléolo puntiforme con ubicación central. En el citoplasma poseen una vacuola de glucógeno y cuerpos cromatoides en forma de bastones, constituidos por agregados de ribonucleoproteínas. Poseen una pared quística rígida constituida por quitina y proteínas fibrilares (Figura 3). El quiste es la forma responsable de la transmisión de la enfermedad (59).

1.4 Epidemiología de la Amebiosis

La Amebiosis fue considerada por mucho tiempo como una enfermedad tropical. Sin embargo hoy se sabe que esta enfermedad tiene una distribución mundial. La

Amebiosis es más frecuente en regiones tropicales de climas cálidos y templados, pero más aún en áreas pobres y mal saneadas donde priva el hacinamiento y el deficiente manejo de aguas y excretas (71, 97).

Figura 3. Quiste maduro de *E. histolytica*. La flecha indica el cuerpo cromatoideo**.** Tomado de CDC (www.cdc.gov).

Aproximadamente 500 millones de personas en el mundo están infectadas con *E. histolytica,* aunque solamente el 10% desarrolla la enfermedad. De ellos se calcula que entre 40.000 y 110.000 personas mueren como consecuencia de esta enfermedad (71).

La Amebiosis es transmitida por portadores asintomáticos o por pacientes con diarrea aguda (71). La forma de transmisión es diversa; en países en vías de desarrollo puede darse a través del consumo de aguas o alimentos contaminados, manipulación de alimentos y contactos sexuales. Por el contrario, en países desarrollados el contagio proviene por inmigración proveniente de zonas endémicas o por viajeros a países en vías de desarrollo (48). Las principales áreas de riesgo son México, norte de Sudamérica, oeste de África, Sudáfrica y Sudeste Asiático. La Amebiosis intestinal afecta y es más letal en los extremos de la vida, mientras que el absceso hepático que esta ameba produce es más frecuente en varones entre 30 a 45 años y se asocia con una alta mortalidad (49).

1.5 Manifestaciones Clínicas de la Amebiosis

De acuerdo a los síntomas presentados por los individuos infectados, la Amebiosis puede ser agrupada como: (a) asintomática, (b) sintomática sin evidencia de invasión tisular y (c) sintomática con evidencia de invasión tisular (49). Se considera que el estado de portador asintomático es la manifestación más frecuente de la Amebiosis. Los portadores asintomáticos de *E. histolytica* deben ser tratados ya que

pueden desarrollar una colitis o Amebiosis extraintestinal aunque lo más frecuente es que la enfermedad se resuelva espontáneamente (9, 49).

1.5.1 Amebiosis intestinal

Esta es la forma sintomática más frecuente de Amebiosis; sin embargo, los síntomas de la enfermedad son inespecíficos y de escaso valor en estudios epidemiológicos (94). Los síntomas comúnmente atribuidos a la colitis producida por *E. histolytica* incluyen dolor abdominal, pérdida de peso y diarrea (sanguinolenta y/o mucosa). La diarrea puede ocurrir con diez y más deposiciones por día. A diferencia de los pacientes con diarrea bacteriana, la fiebre no es una manifestación frecuente, observándose en menos del 40 % de los casos (9, 45).

El diagnóstico clínico de la Amebiosis resulta difícil por la naturaleza inespecífica de los síntomas. Se puede confundir con diarreas producidas por bacterias como *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* que son frecuentes en países tropicales y subtropicales. Además, es muy importante poder diferenciar la disentería de patologías no infecciosas como enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa isquémica y diverticulitis. Ocasionalmente pueden ocurrir complicaciones de la Amebiosis intestinal, como el desarrollo de colitis fulminante, ameboma, megacolon tóxico, Amebiosis cutánea y fístulas (45).

1.5.2 Amebiosis extraintestinal

E. histolytica debe su nombre a su capacidad de destruir los tejidos. Para ello es esencial que los trofozoítos se adhieran a las células epiteliales de la mucosa intestinal (57). La zona afectada inicialmente es la mucosa del intestino grueso. Estas lesiones intestinales pueden dividirse en varias fases: (a) alteración del moco y edema de la mucosa, (b) desaparición local del moco, (c) ulceración superficial y (d) lesión profunda de la mucosa. Posteriormente puede producirse diseminación de los trofozoítos a diferentes órganos y tejidos (28). Cuando los trofozoítos invaden los tejidos, lo hacen mediante movimientos activos, orientados en una misma dirección y ayudados por la gran cantidad de enzimas proteolíticas que el parásito posee, produciendo la necrosis de las células. Durante la fase inicial se puede observar que en la pared intestinal hay unas pequeñas lesiones con bordes redondeados, enrojecidos en su entorno y blanquecinos en el centro, lesión característica llamada “botón de camisa”. Estas lesiones crecen en extensión y profundidad. Las amebas pueden invadir todo el espesor de la mucosa y

gracias a su acción histolítica pueden atravesar todas las capas de la pared cólica, causando una perforación intestinal. En el curso de la colitis amebiana, algunas amebas pueden penetrar en la luz de los vasos sanguíneos que irrigan el intestino y de ahí pueden ser diseminadas hacia otros órganos (28).

El absceso hepático es la manifestación más frecuente de la Amebiosis extraintestinal. Existen dos patrones principales de presentación: el agudo, con fiebre elevada y dolor en el hipocondrio derecho; y el subagudo, en el que predomina la pérdida de peso, siendo menos frecuente el dolor abdominal y la fiebre. Es poco probable que coexistan las manifestaciones extraintestinales y la disentería amebiana (67). La diseminación de un absceso hepático hacia el pericardio es la complicación más peligrosa. La extensión del absceso a pleura y pulmón es relativamente frecuente. La peritonitis se produce por perforación de una úlcera del colon o por rotura de un absceso. El absceso cerebral es una manifestación muy poco frecuente (83).

1.6 Diagnóstico de la Amebiosis

Existen varios métodos para el diagnóstico de la Amebiosis basados fundamentalmente en la microscopía óptica e inmunoensayos de baja sensibilidad y especificidad. La forma de trofozoíto solo se puede encontrar en muestras de materia fecal acuosas, por lo que frecuentemente se encuentran rotos e indistinguibles de los detritos presentes en las muestras. Por otro lado, los test inmunológicos contra antígenos de la forma vegetativa (no de quistes que son los más comúnmente hallados en materia fecal de pacientes sintomáticos y asintomáticos) aunque son específicos de *E. histolytica* carecen de sensibilidad suficiente (33). Por tal motivo, y siendo la generación de un método diagnóstico para la Amebiosis el objetivo fundamental de este Trabajo de Tesis, la comparación de todas las técnicas diagnósticas contra este parásito será analizada en el Capítulo IV (Discusión).

1.7 Tratamiento de la Amebiosis

El tratamiento de la Amebiosis intestinal debe hacerse siempre, pues aún en personas asintomáticas es necesario eliminar a los parásitos del intestino con dos finalidades: (1) evitar que en algún momento haya invasión de los tejidos y (2) eliminar la fuente de infección y transmisión de la enfermedad. El número de drogas a las que se les ha demostrado actividad antiamebiana es amplio y los esquemas en que han sido utilizados son variados (38). Dependiendo de los sitios anatómicos donde ejercen su

acción pueden clasificarse en luminales y extraluminales. Las drogas incluidas en el grupo de las luminales tienen la característica de tener escasa absorción a nivel del intestino en consecuencia su acción es en el lumen de éste órgano. Esto medicamentos pueden utilizarse en portadores asintomáticos como droga única y en el caso de sintomáticos como complemento de los antiamebianos de acción tisular (38).

Todas las drogas de acción amebicida extraintestinales tienen como mecanismo farmacológico común su rápida absorción en el intestino delgado, razón por la cual están indicados en Amebiosis intestinal sintomática, donde los trofozoítos de *E. histolytica* han invadido la pared del colon y en los pacientes con Amebiosis extraintestinal. Los fármacos de este grupo se difunden ampliamente en los tejidos y alguno de ellos como el tinidazol y el secnidazol permanecen en ellos por mayor tiempo (38) (Tabla 1).

Tabla 1. Fármacos utilizados para el tratamiento de la Amebiosis.

Fármacos Luminales	Fármacos Extraluminales
Furoato de Diloxamida	Metronidazol
Teclozán	Tinidazol
Diyodohidroxiquinona	Ornidazol
Quinfamida	Secnidazol
Dihidroemetina	Dehidroemetina
Paramomicina	

1.8 ***GIARDIA LAMBLIA***

Giardia fue descubierta en 1681 por el científico holandés Antonie van Leeuwenhoek, quien observó a este parásito en su propia materia fecal mediante la utilización del microscopio compuesto por él desarrollado. Posteriormente, este organismo fue descripto en más detalle por Lambl en 1859, pero no fue sino hasta 1882 que el género *Giardia* fue reconocido como tal por Kunstlerm (30). Desde un punto de vista taxonómico, *Giardia lamblia* pertenece al reino Protista y se encuentra clasificado dentro de la clase Zoomastigofora, orden Diplomonadida, aunque recientemente se ha sugerido la formación de un nuevo reino denominado Archezoa ("fósiles biológicos"), abarcando a organismos originados antes de la aparición de la mitocondria, como *Giardia spp.* y *Trichomonas ssp.* (2). Sin embargo, el hallazgo de genes de origen mitocondrial en *Giardia* ha puesto en discusión esta denominación (90).

La clasificación de *Giardia* se ha modificado mucho durante los últimos años y esto ha generado confusión a la hora del estudio de la epidemiología de la infección. En 1952, Filice clasificó a este parásito teniendo en cuenta variables morfológicas y del hospedador en *G. lamblia* (*intestinalis o duodenalis*) de humanos, *G. muris* de roedores, y *G. agilis* de reptiles (2). Recientemente, mediante la utilización de marcadores moleculares se ha clasificado a *G. lamblia* en grupos nombrados con letras: los grupos A y B infectan humanos y se los suele denominar como descendientes de las cepas WB (utilizada en la presente tesis) y GS, respectivamente. Por último, se pueden distinguir los grupos: C y D, procedentes de perros; E, encontrados en animales ungulados; y F y G provenientes de gatos y ratas, respectivamente (63).

Una de las características más importantes de *G. lamblia* es que constituye una de las células eucariotas más primitivas que se conocen (46). Si bien es claramente un organismo eucariota debido a que posee una membrana nuclear rodeando el material genético, un sistema de endomembranas, vesículas lisosomales y citoesqueleto, carece de mitocondrias típicas y peroxisomas, asemejándose más, en muchos aspectos, a un organismo procariota que a cualquier otro eucariota conocido (1, 3). *Giardia* se puede catalogar en: Imperio o Superreino: Eukaryota; Reino: Protozoa; Filo: Sarcomastigota; Subfilo: Mastigospora; Clase: Zoomastigosporea; Orden: Diplomonadida; Especie: *Giardia lamblia*

1.9 Biología celular de *Giardia lamblia*

1.9.1 Ciclo de vida

Al igual que algunos protozoarios el ciclo de vida de *Giardia* es muy simple, atravesando dos fases, la forma vegetativa de trofozoíto y la forma infectiva de quiste. La infección comienza con la ingesta de quistes provenientes de aguas y comidas contaminadas. Cuando el quiste se encuentra expuesto al medio ácido del estómago se induce el proceso conocido como desenquistamiento. Este proceso culmina en la parte superior del intestino delgado con la liberación de los trofozoítos. Los trofozoítos emergente colonizan el intestino delgado, multiplicándose por fisión binaria adheridos al epitelio intestinal. Algunos de ellos descienden por el tracto intestinal y ante la carencia de lípidos de las porciones más bajas del yeyuno comienzan su diferenciación a quiste (3). Los quiste altamente resistentes a las condiciones del medio ambiente externo, son eliminados junto a las heces permitiendo al parásito completar el ciclo de transmisión al infectar a un nuevo hospedados (3) (Figura 4).

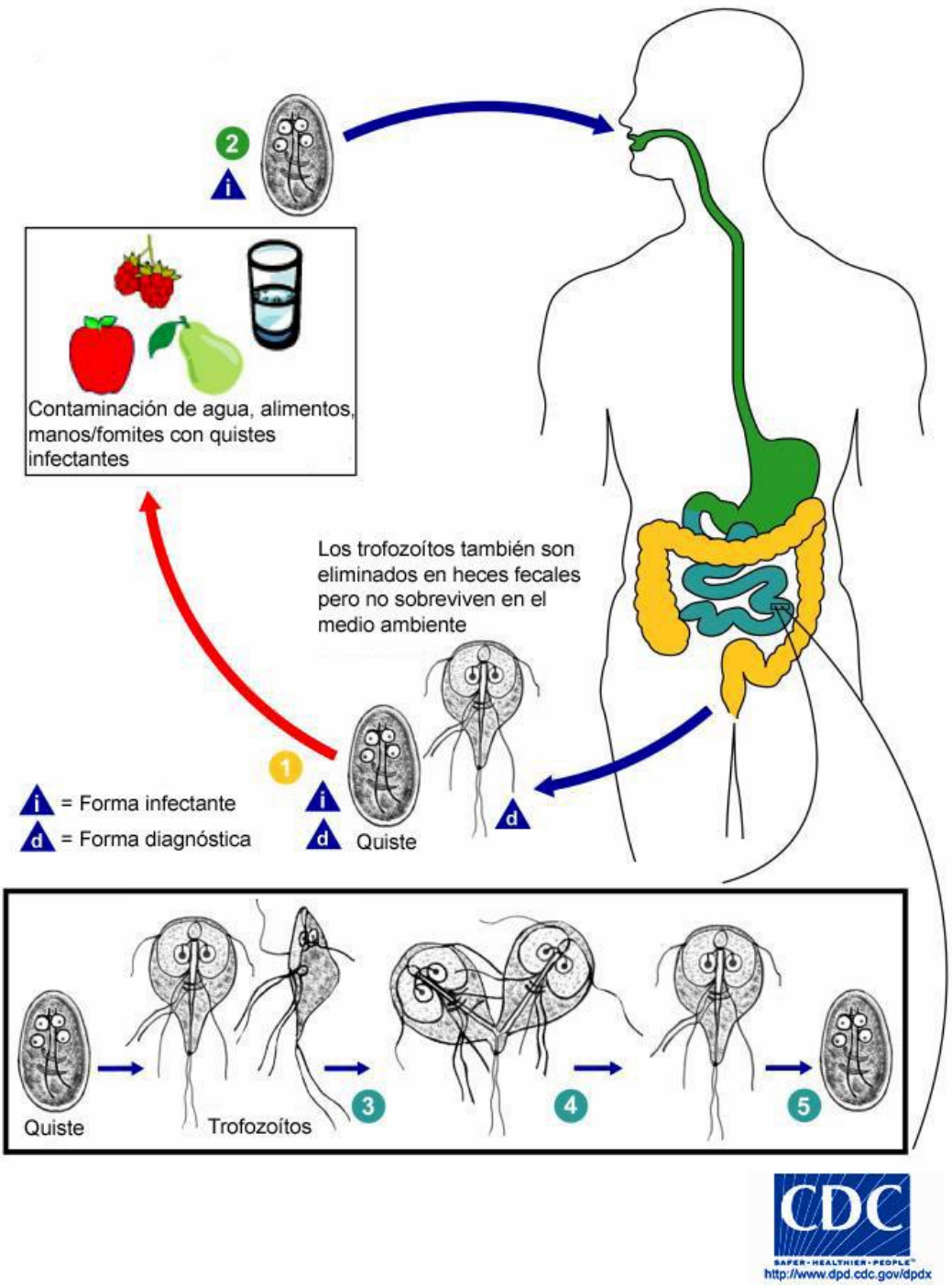


Figura 4. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. La infección del huésped comienza con la ingestión de los quistes, los cuales desenquistan en el duodeno luego de su activación por el pH ácido del estómago, liberando trofozoítos. Estos se adhieren a las microvellosidades intestinales y se replican colonizando el intestino. Cuando descienden por el tracto intestinal, la presencia de fluidos biliares y la ausencia de colesterol disparan su diferenciación a quistes. Los quistes, altamente resistentes, son eliminados con las heces permitiendo completar el ciclo de transmisión. Tomado de CDC (www.cdc.gov).

1.9.2 El trofozoíto

La forma vegetativa del parásito es piriforme y tiene un tamaño aproximado de 9 a 15 µm de largo y de 5 -9 µm de ancho. Tiene una cara posterior convexa y una cara

anterior cóncava, siendo el único protozoario que presenta simetría bilateral. Posee dos núcleos ovoides, sin nucléolos distinguibles morfológicamente. Tiene cuatro pares de flagelos que le confieren gran motilidad. Poseen un disco ventral formado por estructuras fibrosas y microtubulares complejas, que le permite mediante una unión mecánica adherirse a la pared intestinal y de esta manera captar los nutrientes necesarios para vivir. *Giardia* carece de algunas organelas típicas de las células eucariotas como mitocondrias, peroxisomas y aparato de Golgi (3, 13) (Figura 5).

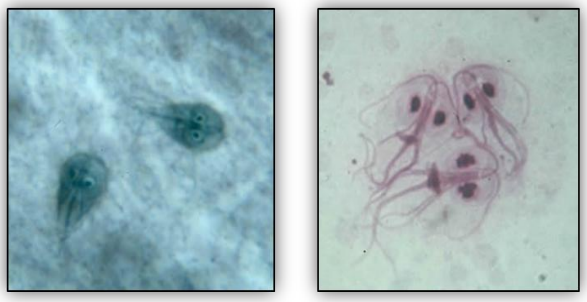


Figura 5.Trofozoítos de *Giardia lamblia.* A la izquierda con tinción de Kohn y a la derecha con coloreados con Giemsa. Tomado de CDC (www.cdc.gov).

1.9.3 El quiste

Los quistes son los encargados de diseminar el parásito en el medio ambiente y transmitir la infección entre los hospedadores susceptibles. Tienen forma oval y su tamaño varía de 6 a 10 μm, se encuentran recubiertos por una pared quística cuyo grosor es de 0,3 a 0,5 μm (3). Esta pared quística es selectivamente permeable, otorgándole resistencia a condiciones ambientales adversas y permitiéndole persistir en agua fresca, resistir a desinfectantes y atravesar el estómago de hospedadores (3) (Figura 6).

Figura 6. Quiste de *Giardia lamblia.* Morfología de un quiste teñido con solución de Lugol (Iodo). Tomado de CDC (www.cdc.gov).

1.10 Epidemiología de la Giardiosis

La Giardiosis es la enteroparasitosis más frecuente del mundo. Debido a las diferencias que existen en las condiciones sanitarias, su prevalencia varía entre el 2-5%

en países desarrollados llegando hasta más del 20-30 % en países subdesarrollados, siendo más común en niños (89). Según la OMS, existen alrededor de 200 millones de personas infectadas en Asia, África y América Latina, siendo reportados 500 mil nuevos casos cada año (89).

1.11 Manifestaciones Clínicas de la Giardiosis

El cuadro clínico de la Giardiosis varía desde la infección asintomática hasta la diarrea aguda o crónica de larga duración. Los síntomas predominantes son diarrea, náuseas, dolor abdominal y pérdida de peso. La enfermedad aguda suele resolverse en algunas semanas, pero un porcentaje importante de pacientes desarrolla una parasitosis crónica. Una característica importante de la Giardiosis en todas sus manifestaciones clínicas es que produce mala absorción a nivel intestinal, llevando a una insuficiencia nutricional que en el caso de los niños conduce a un retardo en el crecimiento (35).

1.12 Diagnóstico de la Giardiosis

En cuanto al diagnóstico de la infección, la mayoría de los casos de Giardiosis pueden confirmarse por análisis microscópico de la materia fecal. La forma quística es relativamente fácil de observar, sobre todo cuando el paciente no posee diarrea, mientras que el trofozoíto puede hallarse exclusivamente cuando el paciente presenta diarrea aguda (10).

A diferencia con lo que sucede en *E. histolytica*, para *Giardia* se han desarrollado numerosos tests basados en la generación de anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos de quistes (61), disponibles comercialmente incorporados tanto en ensayos de enzimo inmuno análisis como de inmunofluorescencia, los cuales han sido evaluados observándose excelentes resultados en sensibilidad y especificidad en comparación con la microscopía convencional (99).

1.13 Tratamiento de la Giardiosis

En la actualidad las infecciones de *Giardia* son controladas por medicamentos, especialmente los derivados de los 5-nitroimidazoles, tales como el metronidazol, mebendazol/inidazol y furasolidona, que generan radicales libres que resultan tóxicos para el parásito. Otras drogas como el benzimidazol y albendazol actúan sobre el parásito desestabilizando su citoesqueleto. Aunque estos medicamentos son efectivos y económicos, su utilización ha sido cuestionada ya que producen importantes efectos

colaterales en los pacientes. Por otro lado el abuso de su utilización ha generado cepas resistentes, esta problemática demuestra la importancia del desarrollo de herramientas que permitan hallar alternativas de cura y prevención de la enfermedad (95).

1.14 ***CRYPTOSPORIDIUM SPP.***

Los miembros del género *Cryptosporidium* pertenecientes al *Phylum Apicomplexa*, son pequeños coccidios que infectan la región de las microvellosidades de la células epiteliales del intestino. *Cryptosporidium spp.* fue descripto por Ernest Tyzzer en 1907 (52). Diferentes especies de *Cryptosporidium* han sido descriptas y parecen ser específicas para una clase de vertebrados *C. parvum, C. felis, C. muris* y *C. wrairi* infectan mamíferos, *C. meleagridis* y *C. baileyi* aves, *C. serpentis* reptiles y *C. nasorum* peces tropicales (52). Taxonómicamente se los clasifica de la siguiente manera: Imperio o Superreino: Eukaryota; Reino: Protozoa; Subreino: Neozoa; Filo: Apicomplexa; Clase: Sporozoea; Subclase: Coccidia; Orden: Eucoccidia; Familia: Cryptosporidiae; Género: *Cryptosporidium spp.*

1.15 Biología de *Cryptosporidium spp.*

1.15.1 Ciclo de Vida

Cuando los ooquistes son ingeridos por el hospedador, en contacto con los ácidos del estómago la membrana del ooquiste se abre liberando cuatro esporozoítos móviles, los cuales van a infectar las células epiteliales del intestino delgado. Los parásitos van a infectar la membrana apical de la célula epitelial residiendo por debajo de la membrana celular pero fuera del citoplasma. Los esporozoítos sufren diferentes transformaciones en un ciclo de reproducción asexual (merogonias) y uno sexual (gametogonias), siendo este último el ciclo que genera los ooquistes que son liberados con las heces posibilitando la transmisión de la enfermedad. Se producen dos tipos de quistes, unos cuya pared es más gruesa que son eliminados con la materia fecal y unos de pared más delgada los cuales son responsables de la autoinfección del huésped (91) (Figura 7)

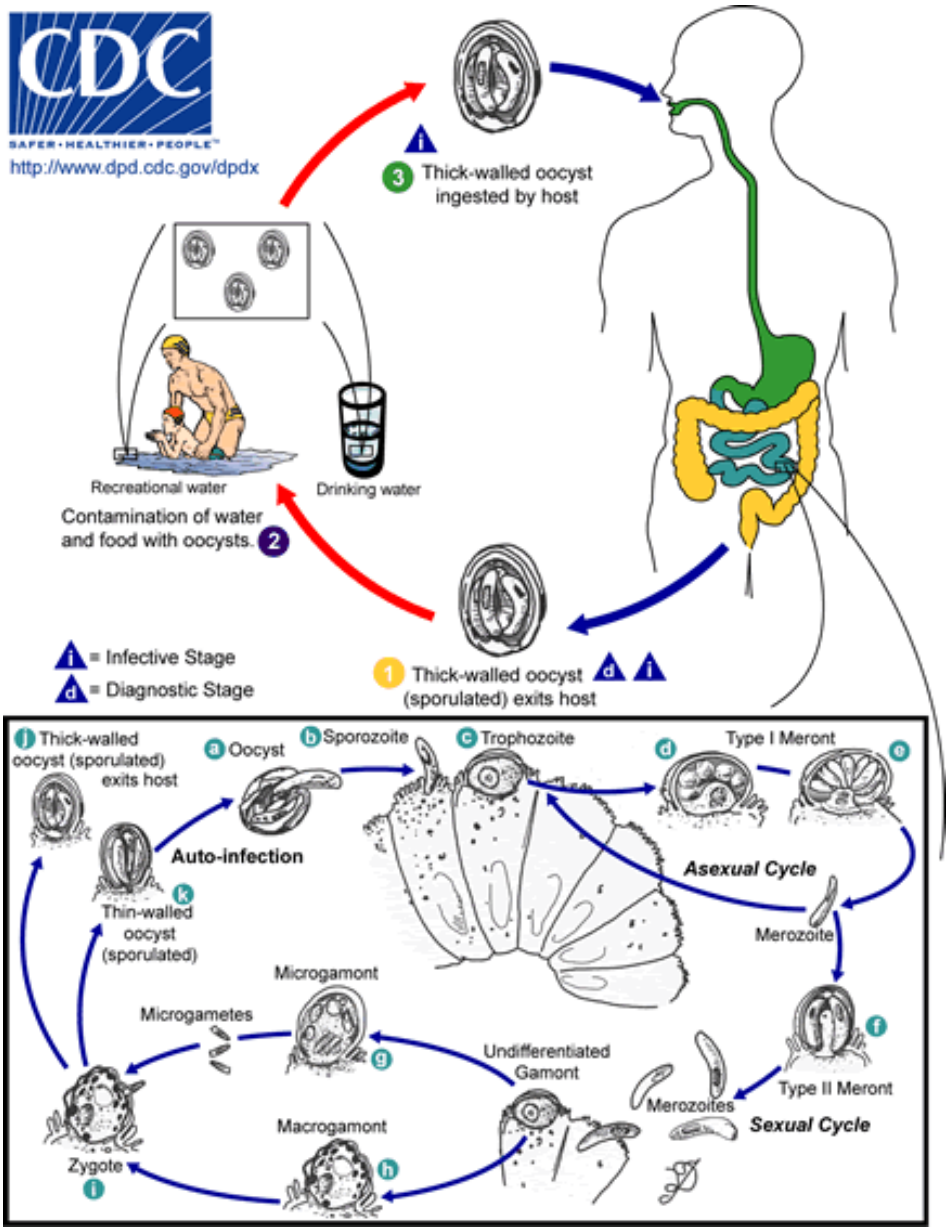


Figura 7. Ciclo de vida de *Cryptosporidium spp.* Luego de la ingestión de ooquistes, los esporozoítos son liberados adhiriéndose al borde de las microvellosidades del epitelio intestinal, invaden las células y forman trofozoítos. En la célula, los parásitos desarrollan una reproducción asexual (esquizogonia o merogonia) y luego una reproducción sexual (gametogonia) produciendo microgametos (masculinos) y macrogametos (femeninos). Luego que los macrogametos son fecundados por los microgametos, se desarrollan ooquistes que pueden esporular en el huésped, siendo la causa de autoinfección o ser excretados en las heces permitiendo la transmisión fecal-oral directa. Figura tomada del CDC (www.cdc.gov).

1.15.2 Ooquistes

Los ooquistes de *Cryptosporidium* poseen un tamaño de 4 a 6 µm con una delgada pared quística. Estos ooquistes mantienen su infectividad durante un tiempo relativamente largo y son muy resistentes a los desinfectantes (Figura 8).

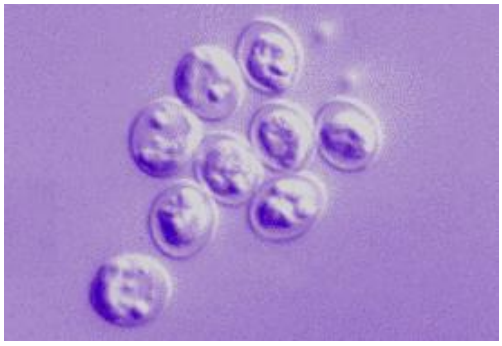


Figura 8. Ooquistes de *Cryptosporidium spp.* Ooquistes purificados y teñidos con la coloración de Ziehl-Neelsen. Magnificación 1000X.

1.16 Epidemiología de la Cryptosporidiosis

Desde el primer caso de infección informado en 1976, *Cryptosporidium* se ha convertido en uno de los enteropatógenos más comúnmente reportados tanto en personas inmunocompetentes como en inmunocomprometidas en cualquier parte del mundo (11). La Cryptosporidiosis cobra una significancia clínica importante en pacientes con una terapia antirretroviral activa, niños mal nutridos, personas que han recibido transplantes o están bajo tratamiento de quimioterapia (73). La infección con *Cryptosporidium* puede transmitirse vía fecal-oral, por contacto interpersonal, contacto con pacientes infectados, trabajadores de la salud, usuarios de piscinas comunitarias y personas que viajan a zonas endémicas, mientras que también es conocida su transmisión zoonótica (96). En 1993, un gran brote de esta parasitosis ocurrió en Milwaukee (EEUU) afectando aproximadamente a 403.000 personas cuyo contagio fue en una piscina pública (27). Por otra parte, se ha demostrado que los sistemas de potabilización convencionales de agua, no son lo suficientemente seguros frente a este parásito, además su resistencia a la cloración es mucho mayor que la de otros parásitos (7).

1.17 Manifestaciones clínicas de la Cryptosporidiosis

Si bien la infección puede ser asintomática, la mayoría de los pacientes presentan diarreas acuosas profusas conteniendo mucus y raramente sangre, que pueden poner en peligro la vida. Estas diarreas se acompañan de náuseas, vómitos, dolor abdominal, pérdida de peso y algunas veces fiebre. La duración y severidad de los síntomas clínicos dependerá del estado inmunológico de la persona afectada. Algunos casos de Cryptosporidiosis extraintestinal han sido reportados principalmente en pacientes con Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA) (22).

1.18 Diagnóstico de la Cryptosporidiosis

El diagnóstico clínico de la Cryptosporidiosis intestinal es complicado porque existen pocas características diferenciales con otras patologías diarreicas, por lo cual debe confrontarse con otras posibles etiologías de diarrea acuosa. El diagnóstico requiere la observación al microscopio de los pequeños ooquistes en materia fecal o de esquizontes o gametocitos en biopsias de tejidos o fluidos biológicos. Estas observaciones al microscopio pueden ser ayudadas por tinciones como la de Zielh Neelsen o de Kinyoun, pero la sensibilidad de las mismas es escasa (21).

Tal como con *Giardia*, pero de nuevo a diferencia de lo que sucede con *E. histolytica*, se han desarrollado técnicas de ELISA e inmunofluorescencia directa con utilidad diagnóstica, las que tienen alta sensibilidad y especificidad en el caso agudo de la enfermedad, pero tienen uso limitado en el caso de pacientes asintomáticos y estudios epidemiológicos (65). La técnica de PCR caracterizada por su gran sensibilidad y especificidad, es de gran utilidad para el diagnóstico, pero su uso está restringido sólo a algunos laboratorios de referencia (21). Lo laborioso del diagnóstico coprológico de *Cryptosporidium* ha propiciado el desarrollo de kits comerciales basados en la detección de antígenos. Estudios comparativos entre esta metodología y la microscopía convencional han demostrado una alta especificidad pero una menor sensibilidad. Esto podría explicarse por la diferencia observada en la frecuencia de aparición de ooquistes observada en materias fecales líquidas comparadas con las formes (21).

1.19. Tratamiento de la Cryptosporidiosis

No se dispone en la actualidad de un fármaco que sea realmente eficaz para el tratamiento de la Cryptosporidiosis. En las personas inmunocompetentes la infección es autolimitada, por lo que se requiere tratamiento de soporte y sintomático. La rehidratación oral o endovenosa, con o sin nutrición parenteral, generalmente es suficiente. Paromomicina, azitromicina y nitazoxanida son los fármacos más comúnmente usados aunque moderadamente efectivos (53).

1.20 OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS

Por todo lo expuesto, el objetivo principal del presente Trabajo de Tesis consiste en responder la hipótesis de que mediante el uso de anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos contra los tres principales protozoarios intestinales del ser humano, se puede generar un ensayo diagnóstico de bajo costo y de alta sensibilidad y reproducibilidad. Para su realización se plantearon las siguientes metas:

1- Generar anticuerpos monoclonales anti-antígenos de la pared del quiste y de la membrana plasmática de los trofozoítos de *E. histolytica* para caracterizarlos, valorar su sensibilidad y especificidad en muestras patrón y en ensayos de campo, e identificar los antígenos reconocidos por los anticuerpos. Éste constituye el principal objetivo, ya que no existen métodos diagnósticos confiables de esta parasitosis, ni reactivos para el estudio de la pared quística.
2- Generar anticuerpos monoclonales contra antígenos de la pared del quiste de *G. lamblia*, caracterizarlos, valorar su sensibilidad y especificidad en muestras patrón y en ensayos de campo.
3- Generar anticuerpos monoclonales contra antígenos de la pared del ooquiste de *Cryptosporidium parvum*, caracterizarlos, valorar su sensibilidad y especificidad en muestras patrón y en ensayos de campo, e identificar los antígenos reconocidos por los anticuerpos.
4- Utilizar los anticuerpos generados en los objetivos precedentes para el diseño, generación y puesta a punto de un método simple, barato y de alta sensibilidad y especificidad contra estos tres protozoarios comúnmente hallados en enfermedades intestinales humanas y de muchos animales domésticos o de granja.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Introducción

El diseño de un kit diagnóstico en formato de tiras reactivas requiere de numerosos pasos, entre los cuales el desarrollo de anticuerpos monoclonales es clave. Para esto es necesario, en primera instancia, contar con los antígenos purificados, quistes, trofozoítos y proteínas recombinantes que forman parte de la pared quística de los diferentes protozoos, los cuales sirven de inmunógeno para la elaboración de los anticuerpos. Para ello fue necesario obtenerlos de cultivos *in vitro* de los parásitos, de la inducción *in vitro* de la formación de quistes en el caso que fuere posible, de su recuperación a partir de muestras biológicas o de la obtención de las proteínas de la pared del quiste por medio de técnicas de ADN recombinante.

2.2 Obtención de antígenos (trofozoítos, quistes y proteínas recombinantes)

2.2.1 Cultivo *in vitro* de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*

Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* pertenecientes a la cepa HMI y HK9 fueron cultivados axénicamente a 37°C en medio TYI-S-33 suplementado con 10% suero adulto bovino y con una mezcla vitamínica al 2%, a 37°C (24). Los trofozoítos son luego recuperados por centrifugación a 500 *g* por 10 min.

2.2.2 Purificación de quistes de *Entamoeba histolytica*

Ya que no se ha logrado hasta el momento el enquistamiento *in vitro* de esta ameba, los quistes fueron purificados a partir de materia fecal de un paciente sintomático de Rio de Janeiro, Brasil, utilizando un doble gradiente de Sacarosa (Sacarosa 1 M y 0,5 M respectivamente). Para ello, las muestras de materia fecal se diluyeron 1/10 (V/V) con H_2O destilada, se mezclaron y filtraron con una gasa para eliminar la materia particulada. Luego, 5 mL del filtrado se colocaron suavemente sobre 10 mL de una solución de Sacarosa 1 M y se centrifugó a 450 *g* por 5 min. Se recuperó el sobrenadante, el cual se llevó a un volumen final de 50 mL con H_2O destilada, y se centrifugó nuevamente a 450 *g* durante 5 min. Una vez que fue descartado el sobrenadante, el sedimento fue resuspendido y agregado a 10 ml de una solución de Sacarosa 0,5 M, centrifugándose a 450 *g* 5 min. Se descartó el sobrenadante, obteniéndose los quistes en el fondo del tubo. Los mismos fueron lavados con agua destilada y conservados en PBS hasta su utilización para la inmunización de los animales (17).

2.2.3 Cultivo de trofozoítos y enquistamiento *in vitro* de *Giardia lamblia*

Los trofozoítos de *Giardia lamblia* se cultivaron en medio TYI-S-33 (pH 7) suplementado con suero de bovino adulto al 10% y bilis bovina 0,5 mg/mL (medio completo) a 37°C en anaerobiosis (18). Para inducir el enquistamiento, los trofozoítos fueron cultivados hasta confluencia adheridos a las paredes del tubo de vidrio y luego el medio fue reemplazado por medio de pre-enquistamiento por 48 h. Este medio, similar al medio completo pero sin bilis, favorece la formación de quistes en la posterior etapa de enquistamiento. Finalmente el medio fue cambiado por medio de enquistamiento que posee bilis porcina 0,45%, ácido láctico 0,01% y pH 7,8 (54). Éste permite la diferenciación de trofozoítos a quistes, que son liberados al medio de cultivo. Los quistes son recuperados por centrifugación a 800 *g* por 10 min y utilizados para el *screening* de las colonias en el desarrollo de los anticuerpos.

2.2.4 Obtención ooquistes de *Cryptosporidium spp.*

Ooquistes de *Cryptosporidium parvum* de la cepa Iowa fueron provistos por el Dr. Vitaliano Cama (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC, Atlanta, Estados Unidos de Norte América) y utilizados para la infección de terneros en la Universidad Católica de Córdoba. Por otra parte se obtuvieron también muestras de heces de individuos infectados provistas por el Dr. Robert Gilman (Universidad Cayetano Heredia, Perú). De estas muestras se recuperaron ooquistes necesarios para la infección de los terneros.

2.2.5 Infección experimental en terneros con *Cryptosporidium parvum*

Se seleccionaron terneros de la raza Aberdinangus de menos de una semana de edad, los cuales fueron aislados en un recinto especialmente preparado para evitar la diseminación y facilitar la recolección de las muestras. Los animales fueron controlados y manipulados durante todo el procedimiento experimental. La infección se realizó por vía oral mediante sondas o administrando el inóculo junto con un sustituto lácteo (en ambos casos la carga parasitaria fue de 1×10^4 ooquistes por mL). A partir del momento de la infección se realizó la recolección de materia fecal hasta el día de la resolución de la patología. Dicho material fue examinado al microscopio por la técnica de Kinyou para confirmar la presencia de ooquistes. Estas muestras presentaron una alta carga parasitaria coincidente con las manifestaciones clínicas del animal y son las que

se utilizaron para la purificación de ooquistes que luego serían utilizados como antígenos.

2.2.6 Purificación de ooquistes de *Cryptosporidium spp.*

Para purificar grandes cantidades de ooquistes de las muestras de heces de estos animales, se diluyeron éstas en una proporción de 1:4 con agua destilada y se centrifugaron a 5.000 *g* por 10 min. La fase líquida fue descartada y el sedimento fue resuspendido en agua repitiendo nuevamente el procedimiento. Los materiales grasos fueron removidos resuspendiendo el sedimento en una solución fría de 1% (P/V) de $NaHCO_3$, adicionando luego una capa de éter frío y centrifugando la mezcla a 5.000 *g* por 10 min. Luego de la centrifugación, el sobrenadante conteniendo el tapón graso fue eliminado y el sedimento se resuspendió con la solución fría de 1% (P/V) de $NaHCO_3$ y se pasó a través de una capa de gasa pre-humedecida no absorbente para eliminar impurezas; luego el paso de extracción con éter fue repetido. Después de la centrifugación final, se descartó el sobrenadante y se agregó al sedimento 40 mL de una solución fría de Sacarosa 55% (P/V). Por último, se agregaron 10 mL de H_2O fría muy lentamente por las paredes del tubo para asegurarse que se formen dos capas y se centrifugó a 4000 x g por 20 min. Los ooquistes se purificaron de la interfase. La superficie de los ooquistes fue esterilizada con una solución de etanol 70% (V/V) durante 30 min, y luego se lavaron con un buffer salino y se conservaron en PBS a 4°C hasta su utilización.

2.2.7 Generación de proteínas de la pared del quiste de *Giardia* recombinantes

Los mARNs que codifican para las proteínas de la pared del quiste 1 y 2 (denominadas por sus siglas en inglés **C**yst **W**all **P**rotein; CWP1 y CWP2) fueron amplificados mediante sondas que extienden ambos genes sin su péptido señal. Inicialmente, se extrajo el ARN total de trofozoítos mantenidos en medio de enquistamiento por 24 h utilizando Trizol (Invitrogen) y posteriormente se generó el ADN copia utilizando una sonda de poli$(T)_{20}$ y la enzima Transcriptasa Reversa SuperScript III (Invitrogen). Luego, los genes se amplificaron por PCR utilizando las sondas específicas que incluyen sitios de restricción para su posterior clonado mediante una *Taq* polimerasa de alta fidelidad (*Pfx*; Invitrogen). Ambos genes fueron clonados en el vector pGEM-T4 que permite la expresión dirigida por el promotor LacZ de *E. coli* de proteínas de fusión con Glutatión-S-Transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*.

Dado que CWP2 es fácilmente procesada perdiendo su región C-terminal alcalina, se realizó una construcción conteniendo GST en su extremo N-terminal y seis histidinas (His_6) en su extremo C-terminal. Esto permitió la purificación de ambas proteínas recombinantes a partir de *E. coli* (cepa DH5α) transformadas con los vectores e inducidas con isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG), mediante una columna de glutatión reducido (que se une a GST) y otra de Níquel-agarosa (que se une a His_6). Las proteínas de fusión unidas a las columnas fueron tratadas con trombina (Sigma-Aldrich) para liberar las CWPs recombinantes de la GST que permanece unida a la columna. Las CWPs purificadas fueron luego utilizadas para inmunizar animales para la producción de anticuerpos monoclonales.

2.3 Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales fueron producidos por medio de procedimientos estándar utilizando para las inmunizaciones de los animales antígenos específicos para cada caso (para *Entamoeba histolytica* trofozoítos y quistes, para *Giardia lamblia* proteínas recombinantes CWP1 y CWP2, y ooquistes para *Cryptosporidium spp.*) (23). Ratones hembras BALB/c (libres de patógenos específicos; SPF por sus siglas en Inglés) de seis semanas de edad fueron inmunizados intraperitonealmente con 200 μL de la preparación de antígeno emulsionado con adyuvante (Sigma Adjuvant System, Sigma Aldrich) según la recomendación del fabricante. Para completar el esquema de inmunizaciones se realizaron tres inyecciones más a intervalos de siete días. Una semana antes de la fusión, se testeó por inmunofluorescencia indirecta la presencia de anticuerpos policlonales en el suero de los animales inmunizados por ELISA. Los animales que presentaron el mayor título de anticuerpos fueron seleccionados para la fusión. A éstos, tres días antes de la fusión, se les realizó el desafío por vía endovenosa con el antígeno puro resuspendido en solución salina (23).

Paralelamente fueron cultivadas las células mieloma NSO en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), adicionado con 20% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) y con una mezcla de antibióticos-antimicóticos (100 μg/mL penicilina, 100μg/mL estreptomicina y 0.25 μg/mL fungizona, Invitrogen).

El día de la fusión, los ratones fueron sacrificados, el bazo extraído y sus células fusionadas con células de mieloma NSO, utilizando polietilenglicol (PEG) como agente fusionante (Sigma-Aldrich) para producir hibridomas o células híbridas secretoras de anticuerpos monoclonales. Para la selección se utilizó hipoxantina, aminopterina y

timidina (HAT; Sigma-Aldrich), el cual se adicionó al medio de cultivo. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos a 37°C en atmósfera controlada con 5% de CO_2 durante un período 7 a 10 días a partir del cual se comenzó a evaluar microscópicamente la aparición de colonias en las placas. Se recolectó el sobrenadante de cultivo de aquellos pocillos donde se observó crecimiento de hibridomas para analizar su reactividad con trofozoítos o quistes por inmunofluorescencia indirecta. Las colonias que resultaron positivas fueron expandidas y clonadas por dilución límite (23).

2.4 *Screening* de colonias por microscopía de fluorescencia

Los trofozoítos de *E. histolytica* obtenidos del cultivo, ooquistes de *Cryptosporidium spp* y los quistes de *Giardia lamblia* y *E. histolytica* se fijaron con paraformaldehido al 4% durante 10 min, posteriormente se incubaron durante 30 min con solución bloqueante (PBS 1X/Tritón X100 0,05%, albúmina sérica bovina (BSA) 3%). Después de la incubación por 1 h a temperatura ambiente con el correspondiente sobrenadante, los tubos de reacción fueron lavados con PBS 1X/Tritón X-100 0,005%, y posteriormente incubados con el anticuerpo secundario (suero de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con fluoresceína, Sigma-Aldrich) que fue utilizado a una dilución 1/2.000 en solución de bloqueo por 1 h. Los núcleos fueron visualizados mediante la tinción con 4´, 6 diamidino-2-fenilindol (DAPI por sus siglas en inglés) diluido 1/1.000, ya que esta sustancia forma complejos fluorescentes con la doble cadena de ADN. La aplicación de esta técnica nos permitió determinar qué colonias producían anticuerpos y, en el caso de que se observara reactividad, determinar la localización celular de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales.

2.5 Isotipificación de anticuerpos

El isotipo y la composición de la cadena liviana de esos anticuerpos fue determinada usando un kit comercial (mouse monoclonal antibody isotyping kit, dipstick format - Hycult Biotechnology).

2.6 Enzimo-inmuno ensayo (o ELISA por sus siglas en inglés)

Los quistes, ooquistes y los trofozoítos de cultivo fueron unidos a placas de ELISA de alta capacidad (Millipore), en solución de 2 µg/mL de antígeno en buffer fosfato 10 mM pH 7,0. Posteriormente incubados en una solución de bloqueo (PBS, BSA3%) durante 2 h a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS, se

agregaron los sobrenadantes de los hibridomas durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de dos lavados con PBS, se incubó con un anticuerpo secundario de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con Fosfatasa Alcalina en una dilución 1/2.000, durante 1 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo y luego de dos lavados con PBS, la reacción fue revelada mediante el agregado del sustrato de Fosfatasa Alcalina, p-nitrofenilfosfato 1 mg/mL (Sigma-Aldrich), pudiéndose observar la formación de color o midiendo la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA marca Multiscan X de Thermo Scientific.

2.7 Electroforesis de proteínas en geles de SDS/poliacrilamida y Western blotting

Los quistes y ooquistes de los protozoos fueron lisados y determinada su concentración de proteínas. Utilizando iguales concentraciones de proteínas totales se realizaron las corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de acetato de celulosa, la cual fue incubada con los anticuerpos específicos que fueron desarrollados, para la detección de las proteínas.

Las proteínas fueron hervidas 10 min en buffer de siembra (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS 10%, Glicerol 10%, azul de Bromofenol 0,5%) en presencia o ausencia de β-mercaptoetanol 5 mM y sembradas en geles de poliacrilamida al 10-20%/SDS 0,1%. La electroforesis fue realizada utilizando el sistema Mini-PROTEAN II (Bio-Rad), a un voltaje constante de 200 V.

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Optitran BA-S 85, Schleicher & Schuell o Hybond-C, Amersham) en buffer conteniendo Tris 20 mM, glicina 150 mM y metanol 20% a 100 V por 1,30-5 h a 4ºC (PS 1200 PC Power Supply, Hoefer Scientific Instruments). Las membranas fueron bloqueadas con PBS/Tween 20 0,5%/ BSA 3% e incubadas por 1 h con los anticuerpos correspondientes diluidos 1/1.000 en solución bloqueante.

Luego de ser lavadas con PBS/Tween 20 0,5%, las membranas fueron incubadas con suero de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a Fosfatasa Alcalina (Southern Biotechnology) y reveladas con sustrato para Fosfatasa Alcalina (BCIP/NBT, Color Development Solution, Bio-Rad).

Los anticuerpos utilizados fueron: mAb 6C12 para *E. histolytica*, mAb 8F12 para CWP1, mAb 7D6 para CWP2 ambos de *Giardia lamblia* y mAb 15B12, mAbs 16H7 para ooquistes de *Cryptosporidium spp*. Para revelar se utilizó suero de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a Fosfatasa Alcalina (Southern Biotechnology) y posteriormente el sustrato BCIP/NBT (Color Development Solution de Bio-Rad).

2.8 Determinación del contenido total de proteínas

La determinación fue realizada utilizando un kit comercial BCA™ Protein Assay kit (Pierce) que utiliza BCA (ácido binconínico) según especificaciones del fabricante.

2.9 Ensayos de caracterización del mAb 6C12 de *Entamoeba histolytica*

Con el fin de poder determinar la naturaleza química del epitope al cual está dirigido este anticuerpo monoclonal, se realizaron diferentes ensayos en los cuales se sometieron a los quistes a tratamientos con diferentes enzimas que digieren proteínas o glúcidos y luego se analizó si se observaba algún tipo de cambio en la intensidad o de la marca por inmunofluorescencia con el mAb. Para determinar si se trataba de una proteína utilizamos Tripsina, Proteinasa K y Ditiotreitol (DTT). Por otra parte para saber si el epitope que reconoce el mAb es un glúcido usamos Calcofluor, quitinasa, *yeast lytic enzyme*, periodato y neuraminidasa (todos de Sigma-Aldrich).

2.9.1 Tratamiento con tripsina

Los quistes purificados fueron lavados con buffer fosfato salino (PBS), centrifugados y al sedimento se le agregó Tripsina (0,5% y 0,25%, Sigma-Aldrich) y se incubó la mezcla a 37°C durante 30 min. Luego se lavó dos veces con PBS y los quistes se utilizaron para efectuar el análisis de inmunofluorescencia.

2.9.2 Tratamiento con Proteinasa K

Los quistes previamente purificados fueron incubados con Proteinasa K (60 mUA/mL y 120 mUA/mL, Sigma-Aldrich) durante 3 h a 56°C, luego fueron lavados tres veces con PBS y utilizados para efectuar el análisis de inmunofluorescencia.

2.9.3 Tratamiento con DTT

Los quistes purificados y lavados se incubaron a 37°C durante 30 min con DTT (6 mmol/L y 12 mmol/L), luego fueron lavados 3 veces con PBS y utilizados para realizar el análisis de inmunofluorescencia.

2.9.4 Tratamiento con Quitinasa

Los quistes purificados y lavados con PBS, fueron incubados con Quitinasa (0,5 U/mL, 1,2 U/mL y 2,5 U/mL) (Sigma-Aldrich) a 37°C durante 3 h. Posteriormente se lavaron nuevamente con PBS y se utilizaron para efectuar los análisis de inmunofluorescencia.

2.9.5 Tratamiento con Periodato

Los quistes purificados y lavados con PBS, se incubaron con una solución de periodato 20 mM a 56°C durante 30 min y 3 h a 37°C y a temperatura ambiente toda la noche. Luego se lavaron nuevamente con PBS y se utilizaron para realizar las pruebas de inmunofluorescencia.

2.9.6 Tratamiento con *Yeast lytic Enzyme*

Los quistes purificados y lavados con PBS fueron incubados con *yeast lytic enzyme* en concentraciones de 2, 4 y 8 U/mL (Zymolase, MP Biomedicals) a 37°C por 30 min. Luego de varios lavados con PBS fueron utilizados para realizar análisis de inmunofluorescencia.

2.9.7 Tratamiento con Neuraminidasa

Los quistes purificados y lavados con PBS fueron incubados con Neuraminidasa (Sigma-Aldrich) 2 U/mL a 37° C por 30 min. Luego de varios lavados con PBS fueron utilizados para realizar análisis de inmunofluorescencia.

2.9.8 Tratamiento con Calcofluor-White

Los quistes purificados y lavados con PBS fueron incubados con Calcofluor White (Sigma-Aldrich) a 37°C por 30 min. Luego de varios lavados con PBS fueron utilizados para realizar análisis de inmunofluorescencia.

2.10 Diseño y preparación de la tira reactiva

Membranas de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,45 µm, Schleicher & Schuell o Hybond-C, Amersham) fueron adheridas a papel de filtro y ambas capas pegadas a un soporte plástico flexible (películas radiográficas usadas). Las muestras se aplicaron en puntos separados entre ellos con una distancia de 4 mm. Los siguientes elementos fueron utilizados: controles positivos y anticuerpos específicos para la captura de antígenos en la muestra de materia fecal. Como controles positivos se usaron quistes de *Giardia lamblia* generados *in vitro*, ooquistes de *Cryptosporidium parvum* obtenidos y purificados de terneros infectados experimentalmente y extractos proteicos de *Entamoeba histolytica*. Para la captura de antígenos utilizamos los anticuerpos monoclonales generados contra cada una de las especies, mAb 7D6 anti-quistes de *G. lamblia*, mAb 15B12 anti-ooquistes de *Cryptosporidium spp.* y mAb 6C12 anti-quistes de *Entamoeba histolytica* y en un último lugar un anticuerpo monoclonal inespecífico que sirva de control negativo. Luego las tiras fueron bloqueadas con una solución de PBS/Tween 20 0,5%/ BSA 3% (Sigma-Aldrich).

2.11 Procedimiento del test con las tiras reactivas (Inmunoblot por doble captura de antígenos)

Las tiras se incubaron con diluciones 1/10 de las muestras de materia fecal por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavadas con PBS, incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con una mezcla de anticuerpos monoclonales (mAb 7D6 anti-quistes de *G. lamblia*, mAb 15B12 anti-ooquistes de *Cryptosporidium spp.* y mAb 6C12 anti-quistes de *E. histolytica*) marcados con Peroxidasa (HRP). Por último, luego de un lavado se colocó la tira en la solución reveladora (peróxido/diaminobencidina) hasta observar la presencia o ausencia de color.

El análisis de la especificidad y sensibilidad del test se realizó mediante la utilización de materias fecales de individuos sanos con el agregado de números crecientes de quistes de los diferentes protozoarios. La reproducibilidad del test se probó con más de 800 muestras de materia fecal obtenidas de pacientes provenientes de México, Perú, Brasil y diversas zonas de la Argentina.

2.12 Detección de trofozoítos de *E. histolytica* en biopsias de tejidos

Con el fin de evaluar la reactividad de los anticuerpos generados contra los trofozoítos de *E. histolytica* se utilizaron biopsias de tejido de un paciente con

diagnóstico de Amebiosis que presentaba abscesos amebianos en hígado y pulmón. Estas muestras fueron obtenidas gracias a la colaboración del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Clínica Reina Fabiola de la Universidad Católica de Córdoba, Argentina. Los materiales obtenidos de ambos órganos, fueron fijados con formaldehido al 4% e incluidos en parafina y los cortes realizados con micrótomo. Además de la clásica coloración de hematoxilina-eosina, también se realizó otra con biotina-avidina-Peroxidasa, utilizando como anticuerpo primario en mAb 1G4 contra trofozoítos de *E. histolytica*.

2.13 Análisis Estadístico

Los porcentajes de pruebas positivas detectadas por microscopía y tiras reactivas fueron calculados estadísticamente. Además, la sensibilidad, especificidad y valor predictivo negativo (NPV) y positivo de las tiras reactivas (PPV) fue calculado de acuerdo con Knapp and Miller (56).

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Desarrollo de anticuerpos monoclonales contra quistes de *E. histolytica*

Tal como se describe en Materiales y Métodos, los animales inmunizados con quistes de *E. histolytica* fueron sacrificados y su bazo fusionado con células NSO, según el protocolo establecido previamente. Las colonias en crecimiento fueron chequeadas por inmunofluorescencia, utilizando como anticuerpo primario el sobrenadante de cultivo de la colonia y como anticuerpo secundario suero de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con fluoresceína, posteriormente la colonia que resultó positiva fue expandida. De esta forma se obtuvo el anticuerpo monoclonal 6C12, que mostró por inmunofluorescencia una fuerte marca sobre la pared quística, tal como se observa en la Figura 9.

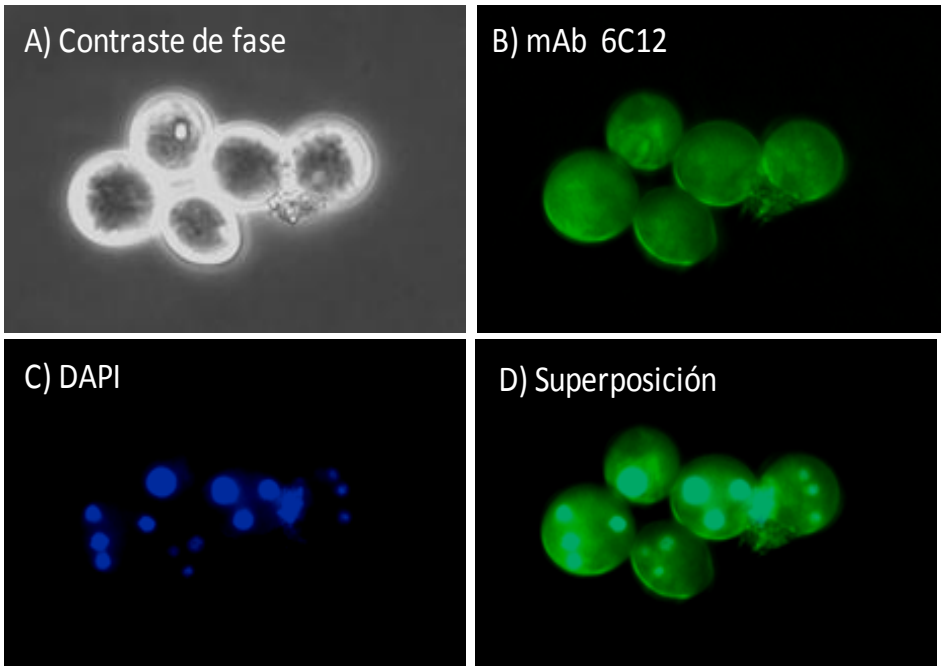


Figura 9: Inmunofluorescencia de quistes de *E. histolytica* utilizando el mAb 6C12. A) Grupo de quistes de *E. histolytica* obtenidos de un paciente con Amebiosis activa proveniente de Brasil observados por microscopía de contraste de fase. B) Inmunofluorescencia de los quistes usando el mAb 6C12 como anticuerpo primario y un anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína. C) Núcleos de los quistes teñidos con DAPI donde se puede visualizar los cuatro núcleos característicos del parásito. D) Superposición de la tinción de DAPI y fluoresceína.

3.2 Caracterización del mAb 6C12 de *Entamoeba histolytica*

Se realizaron diferentes ensayos cuyo fin fue tratar de determinar si el epitope reconocido en la pared del quiste de *E. histolytica* por el mAb 6C12 es un glúcido o una proteína. Para ello se sometieron a los quistes a diferentes tratamientos que degradan ciertos glúcidos o proteínas y luego se les realizó una inmunofluorescencia utilizando como anticuerpo primario el mAb 6C12. De esta forma se analizó si existía algún tipo

de cambio en los quistes, ya sea morfológico, en la intensidad de fluorescencia o si se mantenían o no las agrupaciones típicas de los quistes que se observan durante su purificación a partir de la materia fecal, comparado con los quistes control sin tratamiento teñidos con blanco de calcofluor (Figura 10).

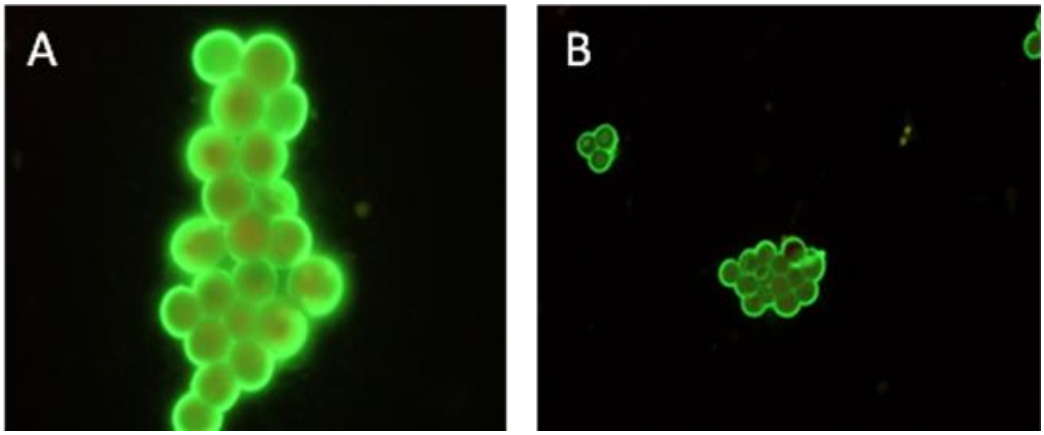


Figura 10: Inmunofluorescencia de quistes de *E. histolytica* utilizando el mAb 6C12. Tanto en la figura A (400X) como en la B (200X) se observa una fuerte marca en toda la superficie de los quistes, como así también la típica formación de *clusters* o agrupaciones.

3.2.1 Tratamiento con Proteinasa K

La Proteinasa K es una enzima involucrada en la digestión de proteínas y cuyo sitio predominante de clivaje es el enlace peptídico adyacente al grupo carboxilo de aminoácidos alifáticos y aromáticos con grupos α-amino bloqueados. Luego del tratamiento con esta enzima se observó una notable diminución en la intensidad de la marca por inmunofluorescencia, como así también la liberación en algunos quistes de material hacia el medio y la desaparición de las agrupaciones (Figura 11).

3.2.3 Tratamiento con Tripsina

Tripsina es una enzima que escinde selectivamente los enlaces peptídicos donde se encuentran aminoácidos diaminados (lisina y arginina). A través de la inmunofluorescencia posterior al tratamiento con esta enzima, puede observarse que no hay una disminución tan marcada de la tinción como se observaba luego del tratamiento con proteinasa K, y tampoco se observa desaparición de las agrupaciones, aunque sí hay una notoria liberación de material al exterior y se observan algunos cambios morfológicos: los quistes se encogen tal como puede observarse en la Figura 12.

3.2.4 Tratamiento con Ditiotreitol (DTT)

El DTT es un fuerte agente reductor utilizado con frecuencia para reducir enlaces disulfuro intra- e inter-moleculares de proteínas. La inmunofluorescencia posterior al tratamiento con DTT no presentó cambios en la intensidad de fluorescencia, ni en la morfología, ni tampoco en la formación de agrupaciones, tal como se observa en la Figura 13.

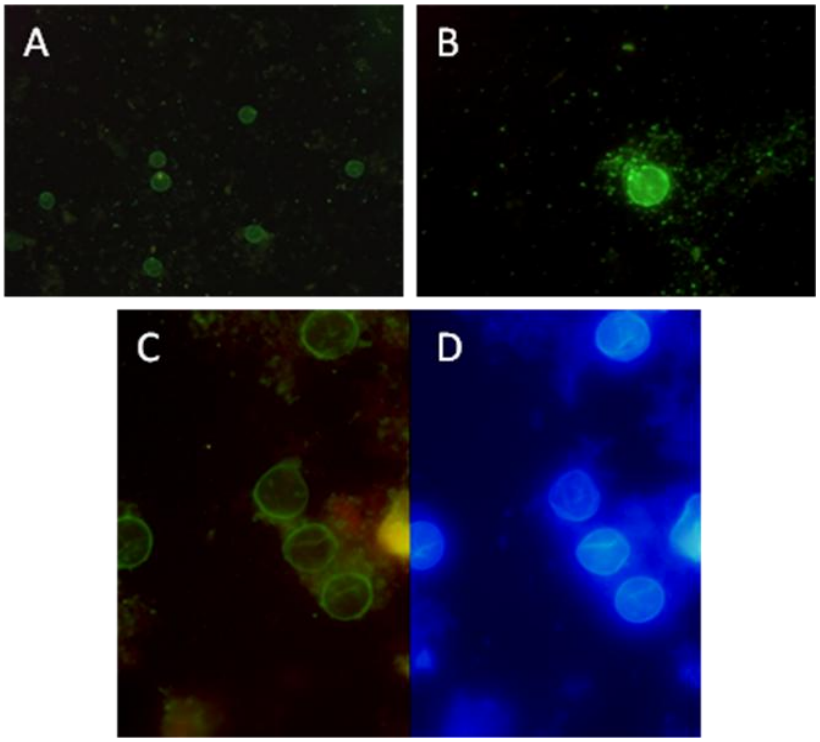


Figura 11: Inmunofluorescencia de quistes de *E. histolytica* utilizando el mAb 6C12 posterior al tratamiento con proteinasa K. A) Aquí se muestra un grupo de quistes que presentan una notable disminución en la fluorescencia. B) Quiste liberando material al exterior. C) Quistes con disminución en la marca fluorescente, y D) los mismos quistes que en C pero con marca positiva con Calcofluor.

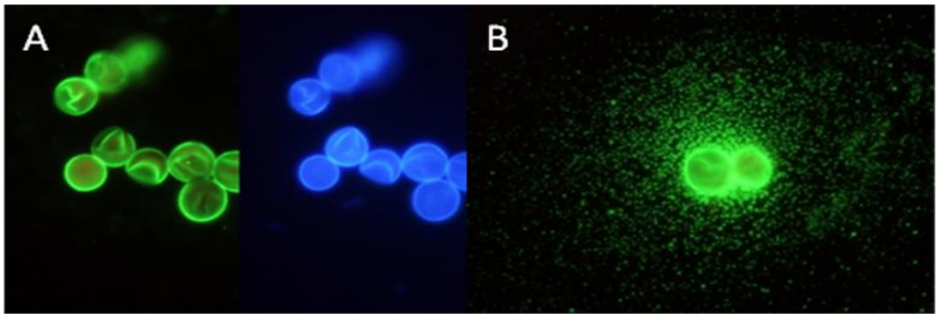


Figura 12: Inmunofluorescencia de quistes de *E. histolytica* utilizando el mAb 6C12 posterior al tratamiento con Tripsina. A) Típica agrupación de quistes a la izquierda con fuerte marca fluorescente y donde se observa ese encogimiento en la pared quística, a la derecha la misma muestra control positivo de Calcofluor. B) Quistes con gran liberación de material al medio.

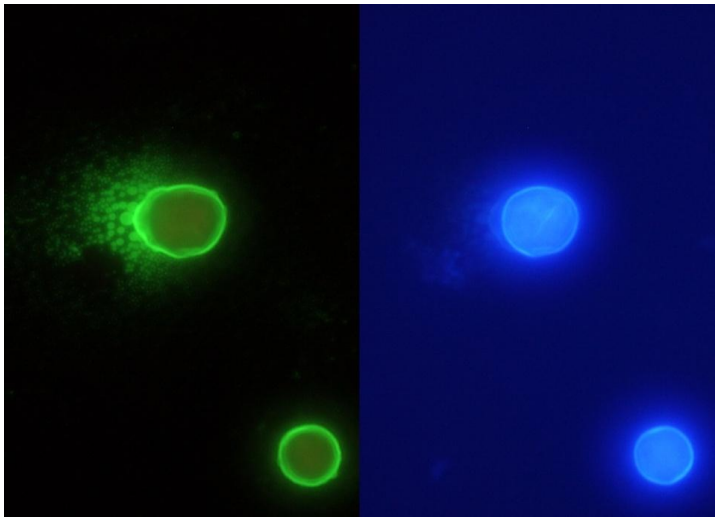


Figura 13: Inmunofluorescencia de quistes de *E. histolytica* utilizando como anticuerpo primario el mAb 6C12 posterior al tratamiento con Ditiotreitol. A la izquierda se observan los quistes con fuerte marca y sin cambios morfológicos, a la derecha los mismos quistes con tinción de Calcofluor como control.

3.2.5 Tinción con Calcofluor-White

La técnica de blanco de Calcofluor se basa en la propiedad que tiene esta sustancia de emitir fluorescencia cuando se la irradia con luz ultravioleta y de la afinidad que tiene con estructuras que posean celulosa y quitina. No es específico ya que puede colorear diferentes especies como hongos y quistes de diversos parásitos. En estos experimentos esta tinción se uso como control de la presencia de quistes.

3.2.6 Tratamiento con Quitinasa

La Quitinasa es una enzima que actúa sobre glúcidos capaz de degradar polímeros de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) que poseen enlaces β (1-4), principalmente la quitina. Luego de un tratamiento con este compuesto, la inmunofluorescencia presenta una marca intensa similar a la del Calcofluor en los quistes íntegros y una marca más débil en los rotos, desaparece la formación de agregados y no presenta fuga de material al medio (Figura 14).

3.2.7 Tratamiento con Neuraminidasa

Esta enzima es capaz de romper los enlaces de ácido siálico de oligosacáridos, glicolípidos y glicoproteínas. Luego del tratamiento con la enzima no se observaron cambios en la formación de agrupaciones, ni en la intensidad de la fluorescencia, ni la fuga de material al medio (Figura 15).

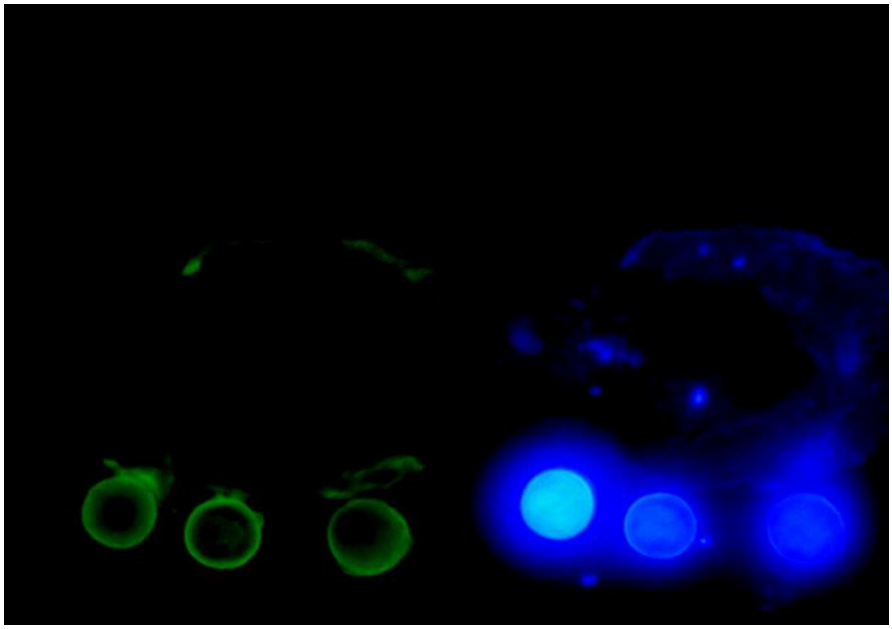


Figura 14: Inmunofluorescencia de quistes de *E. histolytica* utilizando como anticuerpo primario el mAb 6C12 posterior al tratamiento con Quitinasa. A la derecha se observa el control de quistes con la tinción de Calcofluor. A la izquierda se observan los quistes con igual intensidad en la marca, no se observan agrupaciones, ni fuga de material.

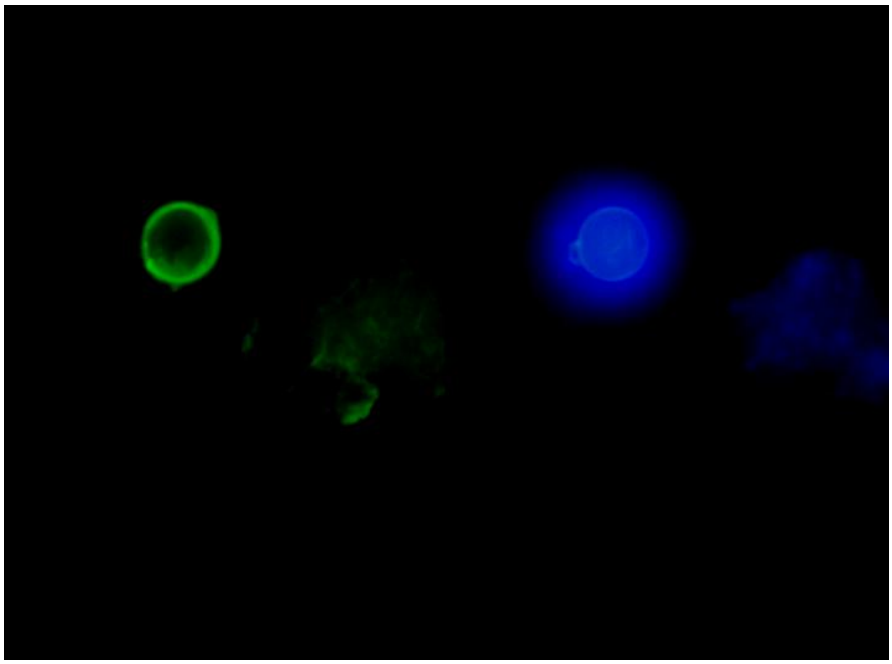


Figura 15: Inmunofluorescencia de quistes de *E. histolytica* utilizando el mAb 6C12 posterior al tratamiento con Neuraminidasa. A la derecha control con tinción de Calcofluor, a la izquierda quiste donde se observa que no hay liberación de material y marca fluorescente intensa.

3.2.8 Tratamiento con Periodato

El tratamiento con periodato es muy usado para producir la oxidación de azúcares. Este compuesto rompe enlaces entre dos carbonos en los que ambos tienen involucrado un átomo de oxígeno (grupo hidroxilo, cetona o aldehído). Si bien luego del

tratamiento se siguen observando las agrupaciones y no hay fuga de material, hay una pequeña disminución de la intensidad de la marca con respecto a su control con Calcofluor, los quistes aparecen como más frágiles y se observa una separación entre la pared quística y la membrana celular (Figura 16).

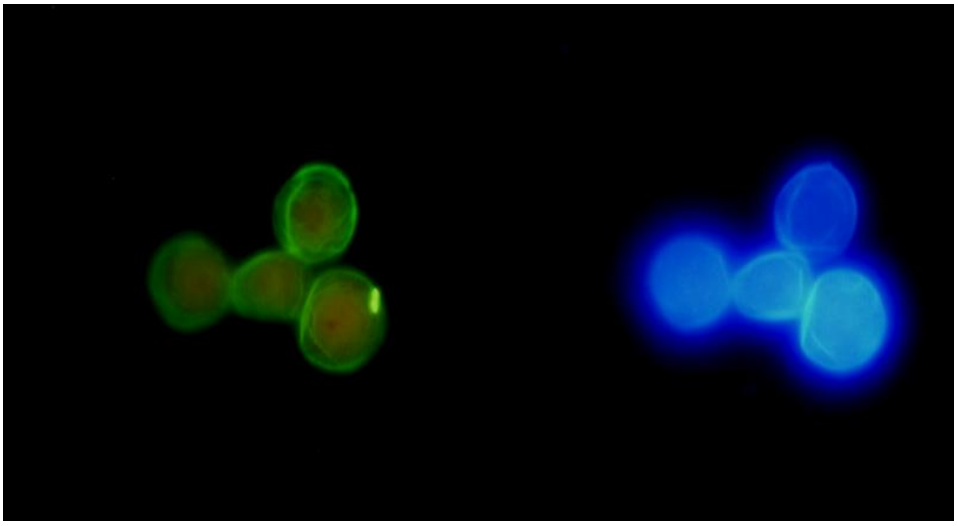


Figura 16: Inmunofluorescencia de quistes de *E. histolytica* utilizando el mAb 6C12 posterior al tratamiento con Periodato. En la imagen de la izquierda se observa una leve disminución en la intensidad de la fluorescencia, una separación entre la membrana celular y la pared quística, se conservan las agrupaciones y sin pérdida de material al exterior. A la derecha imagen control con Calcofluor.

3.2.9 Tratamiento con Enzima Lítica de Levaduras

Esta enzima produce la lisis de las células levaduriformes ya que hidroliza polímeros de glucosa que posean enlaces β (1-3). Luego del tratamiento con esta enzima no se observó ningún cambio en los parámetros analizados (Figura 17).

Como se puede observar, la mayoría de los cambios observados con los tratamientos realizados se obtuvieron cuando se utilizaron enzimas que producen modificaciones sobre proteínas, con lo cual se podría concluir que este anticuerpo monoclonal reconocería a una molécula proteica que forme la pared quística. Por otra parte se observó que sólo con el tratamiento con quitinasa desaparecía la formación de agrupaciones típicas, lo que hace sospechar que quizás la quitina pueda ser la molécula involucrada en la formación de agrupamientos.

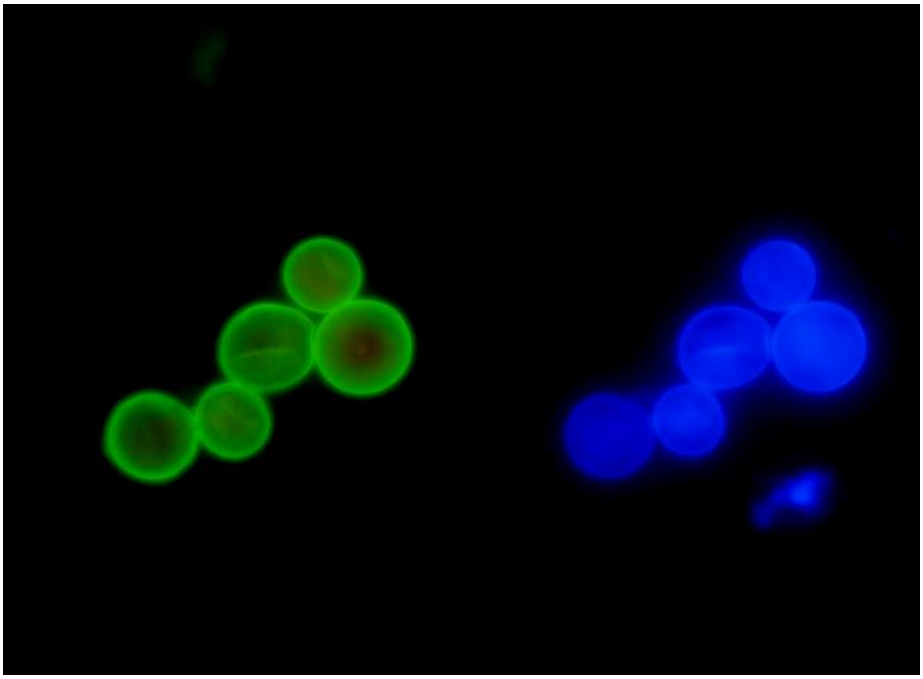


Figura 17: Inmunofluorescencia de quistes de *E. histolytica* utilizando como anticuerpo primario el mAb 6C12 posterior al tratamiento con enzima lítica de levaduras. Se observa una marca intensa en todos los quistes, sin fuga de material y manteniéndose las agrupaciones, a la derecha control de Calcofluor.

3.3 Isotipificación del mAbs 6C12

Se determinó el isotipo de este anticuerpo según fue descripto en Materiales y Métodos, resultando del isotipo IgM con cadena Kappa como se observa en Figura 18.

Figura18. Isotipificación del mAb 6C12. Los resultados indican que corresponde a una IgM.

3.4 Análisis de Western Blot

Para realizar el análisis de western blot y ante la dificultad de contar con muestras de quistes de *E. histolytica*, recurrimos a la obtención *in vitro* de pseudoquistes, utilizando dos tipos de medio de cultivo, uno envejecido y otro

conteniendo suero humano bajo en lipoproteínas. A su vez se realizó el estudio en tres condiciones de las muestras: con PBS y sin lisis, lisis con buffer RIPA (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM Na_2EDTA; 1 mM EGTA; 1% NP-40; 1% Deoxicolato de sodio; 2,5 mM pirofosfato de sodio; 1 mM β-glicerofosfato; 1 mM Na_2VO_4); 1 µg/mL leupeptina) y lisis por sonicación. Utilizando concentraciones iguales de proteínas en cada una de las condiciones mencionadas anteriormente, se realizó una corrida electroforética en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras. Posteriormente se realizó la trasferencia de proteínas a una membrana de acetato de celulosa, luego la membrana fue incubada con el anticuerpo 6C12 y posteriormente con un anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón marcada con fosfatasa alcalina para su posterior revelado.

Como resultado se obtuvo una banda de aproximadamente 20 kDa cuando utilizamos suero humano bajo en lipoproteínas tanto para la lisis en RIPA como para la lisis por sonicación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 19.

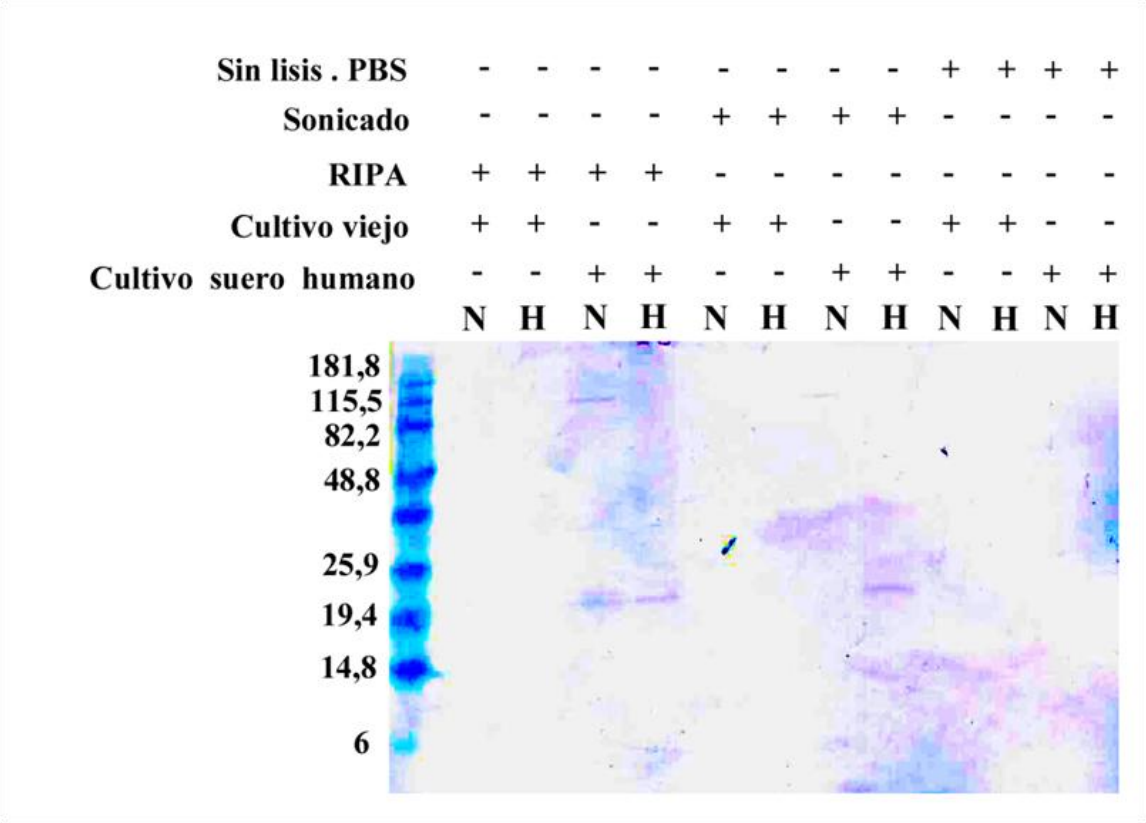


Figura 19. Ensayo de Western blot en pseudoquistes de *E. histolytica.* Fotografía de las membranas de nitrocelulosa luego de realizar una SDS-PAGE de las proteínas de pseudoquistes. En la parte superior de la fotografía se especifican las diferentes condiciones de cultivo y lisis de los pseudoquistes. H corresponde a muestra hervida y N a muestra no hervida. En las condiciones de cultivo con suero y lisis con RIPA y sonicación se observan las bandas de aproximadamente 20 kDa.

3.5 Evaluación de la especificidad del anticuerpo con otras especies

Para que este anticuerpo pudiera ser considerado para su utilización en pruebas diagnósticas era esencial en primera instancia evaluar su especificidad enfrentándolo a quistes y trofozoítos de otras especies que microscópicamente resultan similares y se prestan a confusión, para asegurarnos de que no presentaran reacción cruzada con ninguno de ellos. También era necesario evaluar su reactividad frente a muestras de materia fecal en fresco y recolectadas con diferentes conservantes utilizados habitualmente en los laboratorios clínicos (Formalina, SAF, Etanol, Polivinil Alcohol).

Se realizó entonces un primer estudio con un grupo de muestras cedidas por la Dra. Marianne Lebbad del Instituto de Control de Enfermedades Infecciosas, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia. Estas muestras se encontraban conservadas en diferentes soluciones y presentaban diversas especies parasitarias, que habían sido determinadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A todas estas muestras se les realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal 6C12. Independientemente de la solución conservante en la que se encontraban las muestras se observó una fuerte marca en todas aquellas que poseían quistes de *E. histolytica* o *Entamoeba dispar,* y resultaron negativas todas aquellas que presentaban quistes de otras especies. Sorpresivamente una de las muestras obtenidas de materia fecal de cabra también mostró una reacción positiva sobre unas amebas uninucleadas, lamentablemente no se conoce mucho sobre estas amebas ya que son consideradas comensales y por este motivo no se les ha prestado mucha atención. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2.

Por otra parte este anticuerpo fue testeado con más de 900 muestras cedidas por diferentes patólogos y analistas de varias regiones del mundo, positivas para algún tipo de parásito, algunas incluso para el complejo *Entamoeba histolytica/dispar* (cuyo diagnóstico había sido realizado por observación microscópica) y más de 100 muestras negativas (Gran número de muestras aportadas por el Dr. Robert Gilman, Universidad Cayetano Heredia, Perú). De esta manera se evaluó la reactividad del anticuerpo frente a *Blastocystis hominis*, *Chilomastix mesnili*, ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*, *Dientamoeba fragilis*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki-like*, quistes y trofozoítos de *Giardia lamblia*, *Iodamoeba Bustschlii*, ooquistes de *Cryptosporidium*, *Microsporidium*, *Enterobius vermiculares*, diferentes huevos de *Taenias* y trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. El anticuerpo presentó una reactividad del 100% en todas aquellas muestras que poseían lo que se conoce como

complejo *E. histolytica/dispar*, y no presentó reacción cruzada con ningún quiste, huevo o trofozoíto de ningún otro parásito, incluso resultó negativa aún cuando se los enfrentó con trofozoítos de su propia especie. Cabe destacar que si bien este anticuerpo carece de la habilidad de discernir entre ambas especies, siempre la reacción resulta positiva cuando alguna de las dos especies, o ambas se encuentran presente.

Demostró además tener una intensidad de marca igualmente buena en la pared de todos los quistes tanto en muestras conservadas en distintas soluciones fijadoras como también en muestras frescas, tal como se observa en la Figura 20.

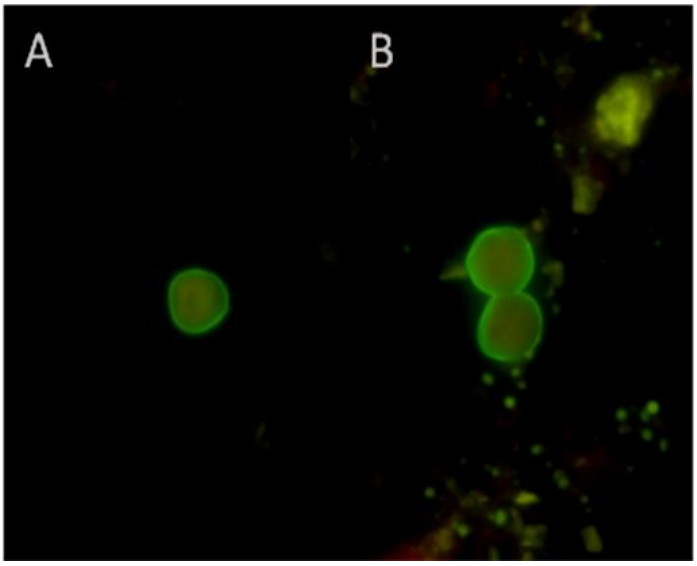


Figura 20. Inmunofluorescencia sobre muestras de materia fecal utilizando el mAb 6C12 como anticuerpo primario. Tanto en la muestra A (muestra fresca) como en la B (muestra conservada en SAF) se observa una marca fuerte sobre toda la superficie de los quistes.

Un total de 96 muestras a las que se les realizó un diagnóstico inicial por microscopía óptica fueron enviadas desde Institutet Karolinska, Suecia, para evaluar la reactividad del anticuerpo. De este total de muestras, 47 fueron determinadas como positivas para el complejo *E. histolytica/dispar*, 39 negativas y 10 de ellas negativas pero con la presencia de algunos quistes sospechosos y cuya etiología era imposible de determinar a través de una simple observación microscópica. A todas ellas se les realizó una inmunofluorescencia utilizando como anticuerpo primario el mAb 6C12. Las 47 muestras positivas por microscopia convencional, también resultaron positivas por inmunofluorescencia usando el anticuerpo, las 39 negativas también lo fueron por inmunofluorescencia. Además a todas ellas se les realizaron ensayos de PCR confirmando los resultados anteriores por ambas técnicas. Con respecto a las diez

muestras que presentaban sospecha los diagnósticos efectuados por las 3 técnicas se detallan seguidamente.

Tabla 2. Determinación de la reactividad del mAb 6C12 en diferentes muestras.

PARÁSITO	mAb 6C12	Aislados	Observaciones
Quistes de *Entamoeba histolytica* fijados en formalina	Positivo	3	Fuerte marca por IFA, todos los quistes presentan marca. Especie verificada por PCR
Quistes de *Entamoeba histolytica* fijados con etanol	Positivo	1	Fuerte marca por IFA, todos los quistes presentan marca. Especie verificada por PCR
Quistes de *Entamoeba dispar* fijados con SAF	Positivo	6	Fuerte marca por IFA, todos los quistes presentan marca. Cuatro de estas muestras fueron aisladas de pacientes, una de mono y otra provista por ATTC. Todas verificadas por PCR
Quistes de *Entamoeba dispar* fijados con etanol	Positivo	1	Fuerte marca por IFA, todos los quistes presentan marca. Especie verificada por PCR
Quistes de *Entamoeba coli* fijadas con formalina y SAF	Negativo	4	No se observó marca por IFA Especie verificada por PCR
Quistes de *Entamoeba hartmanni* fijadas con formalina	Negativo	2	No se observó marca por IFA Especie verificada por PCR
Quistes de *Entamoeba polecki-like* fijados con formalina	Negativo	5	No se observó marca por IFA Especie verificada por PCR
Quistes uninucleados provenientes de cabra fijados en formalina	Positivo	1	Varios quistes presentaron marca
Quistes de *Iodamoeba butschili* fijados con formalina	Negativo	2	No se observó marca por IFA Especie verificada por PCR
Quistes de *Endolimax nana* fijados con formalina	Negativo	2	No se observó marca por IFA Especie verificada por PCR
Quistes de *Giardia lamblia* fijados con formalina	Negativo	5	No se observó marca por IFA Especie verificada por PCR
Blastocytis hominis fijados con formalina	Negativo	1	No se observó marca por IFA Especie verificada por PCR
Quistes de *Entamoeba moshkovskii* fijados con formalina	Negativo	1	No se observó marca por IFA Especie verificada por PCR

Como se puede observar en la Tabla 3, del total de las muestras dudosas, tres de ellas resultaron positivas por PCR, técnica altamente sensible y que hasta el momento se considera como confirmatoria, y de esas tres positivas, una de ellas también lo fue por

inmunofluorescencia usando el mAb 6C12. Las otras dos muestras restantes presentaban 1 y 3 quistes sospechosos respectivamente, lo que nos indicaría que quizás ésta escasa cantidad de quistes escape a los límites de detección del anticuerpo, contrariamente a lo que ocurre con el ensayo de PCR (el ADN extraído solamente de un quiste es suficiente para realizar la prueba).

Tabla 3. Comparación de microscopía óptica, PCR e inmunofluorescencia.

	Diagnóstico por Microscopía óptica	**IF mAb 6C12**	**PCR**
1	*Entamoeba coli* y algunos quistes sospechosos de *E. histolytica/dispar*	Negativo	Negativo
2	*Entamoeba coli* y algunos quistes sospechosos de *E. histolytica/dispar*	Negativo	Negativo
3	*Entamoeba coli* y algunos quistes sospechosos de *E. histolytica/dispar*	Negativo	Negativo
4	*Entamoeba coli* y algunos quistes sospechosos de *E. histolytica/dispar*	Positivo	Positivo
5	*Entamoeba coli* y algunos quistes sospechosos de *E. histolytica/dispar*	Negativo	Negativo
6	*Entamoeba coli* y algunos quistes sospechosos de *E. histolytica/dispar*	Negativo	Negativo
7	*Entamoeba coli* y algunos quistes sospechosos de *E. histolytica/dispar*	Negativo	Negativo
8	*Entamoeba hartmanni* y algunos quistes sospechosos de *E. histolytica/dispar*	Negativo	Negativo
9	Sólo tres quistes sospechosos de *E. histolytica/dispar*	Negativo	Positivo
10	Sólo un quiste sospechoso de *E. histolytica/dispar*	Negativo	Positivo

A diferencia de otros parásitos como por ejemplo *G. lamblia*, en *E. histolytica* se desconoce un medio de cultivo adecuado que permita reproducir su enquistamiento *in vitro*. Aunque se han obtenido algunos avances en este aspecto, aún se desconoce el mecanismo exacto que desencadena su transformación a quiste. Se ha observado que en cultivos de trofozoítos de *E. histolytica* mantenidos durante varios días sin recambio de medio, en el cual los nutrientes comienzan a agotarse, el parásito sufre algunos cambios en su morfología que algunos llegan a denominar pseudoquistes. Se probó la reactividad del anticuerpo sobre los pseudoquistes de esos cultivos agotados y se observó una marca sobre algunos segmentos de su membrana indicando quizás el inicio de la formación de la pared quística (Figura 21).

Otra de las hipótesis que se manejan con respecto al enquistamiento de *Entamoeba histolytica* sostiene que posiblemente sea un shock osmótico el responsable de la formación de quistes (Luján, HD, resultados no publicados). Sometimos entonces

este protozoo a medios de cultivo más concentrados y a un pH menor. Observamos que cuando el medio estaba 2,5 veces más concentrado que el original y a un pH de 5 se visualizaban estructuras compatibles con pseudoquistes. A estos se les realizó una inmunofluorescencia utilizando como anticuerpo primario el mAb 6C12, observándose una fuerte y nítida marca en toda la superficie mostrando nuevamente el principio de formación de la pared quística (Figura 22).

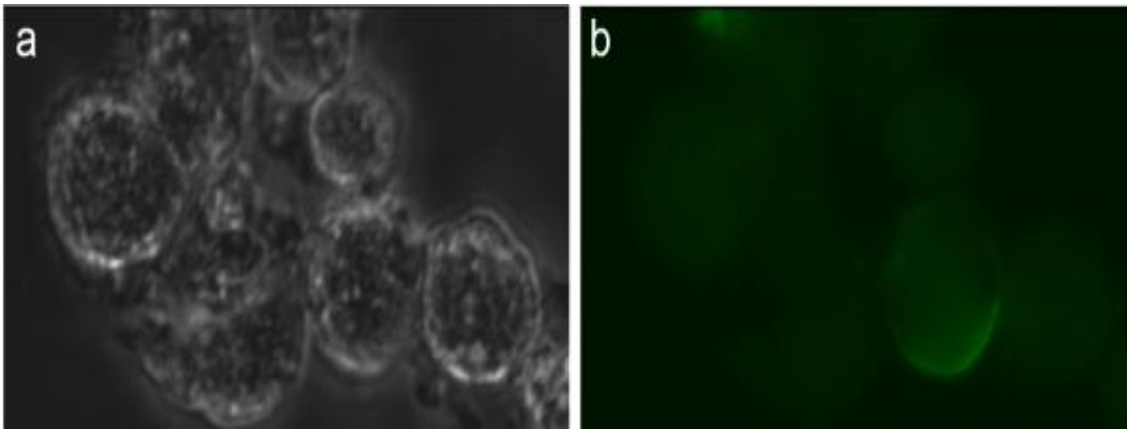


Figura 21. Expresión del antígeno reconocido por el mAb 6C12 en pseudoquistes de cultivo. (a) Pseudoquistes de *Entamoeba histolytica* en campo claro. (b) Inmunofluorescencia realizada sobre los pseudoquistes utilizando mAb 6C12 donde se observa en uno de ellos la marca sobre la pared quística en formación.

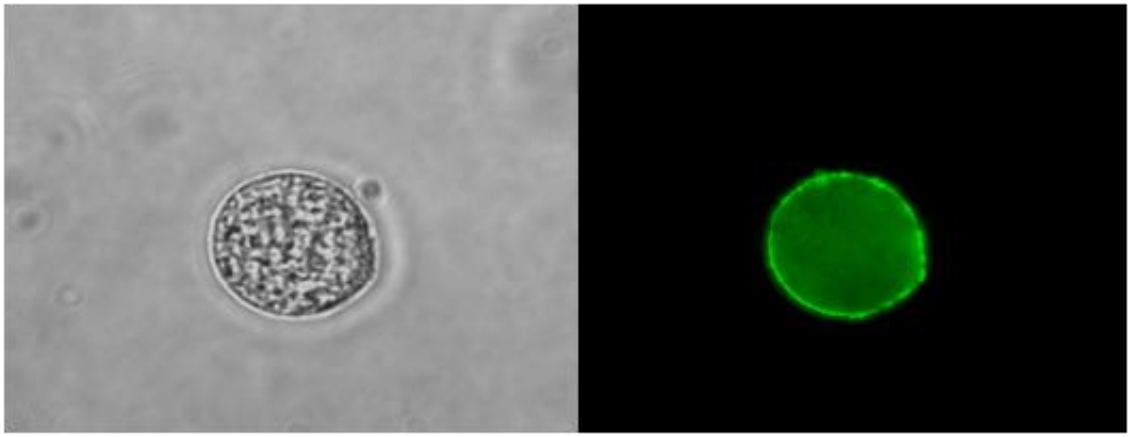


Figura 22. Inmunofluorescencia de pseudoquistes de *E. histolytica* utilizando mAb 6C12 como anticuerpo primario. A la derecha se observa un pseudoquiste en campo claro y a la izquierda la marca clara de la pared quística en formación con fluoresceína.

3.6 Desarrollo de anticuerpos monoclonales contra trofozoítos de *E. histolytica*

Por la misma metodología descripta en Materiales y Métodos se desarrollaron anticuerpos monoclonales contra la forma vegetativa de *E. histolytica*. Se obtuvieron

varios anticuerpos que marcaban diferentes estructuras celulares. Algunos mostraron marca en algunas estructuras internas, otros sobre la membrana celular y otros marcaron sólo la membrana de algunas amebas, indicando que tal vez este parásito pueda presentar el mecanismo de variación antigénica conocido que ocurre en otros protozoarios como *Giardia lamblia, Plasmodium sp.* y *Trypanosoma brucei.* Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia sobre trofozoítos de *E. histolytica* obtenidos de cultivos *in vitro*, utilizando como anticuerpos primarios a cada uno de los mAbs obtenidos. Algunas de las marcas obtenidas pueden observarse en la Figura 23.

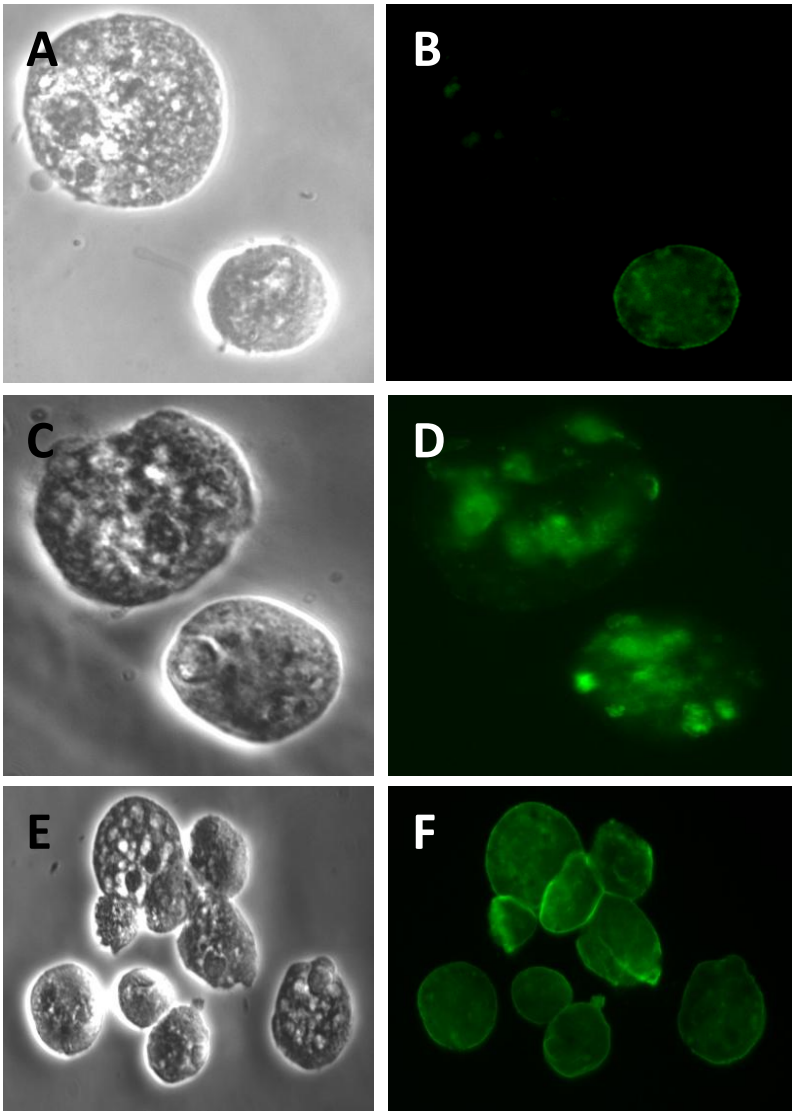


Figura 23. Inmunofluorescencia de trofozoítos de *E. histolytica*, utilizando como anticuerpo primario alguno de los anticuerpos obtenidos. A y B fotografías en campo claro e IFA de amebas donde se observa la marca diferencial sobre unas amebas con el mAb 17C7. C y D campo claro e IF donde se muestran marcas en vacuolas internas del parásito con el mAb 9C5; por último, en E y F se observa marca sobre la superficie de todas las amebas utilizando el mAb 1G4.

3.6.1 Evaluación de los anticuerpos monoclonales contra trofozoítos de *Entamoeba histolytica* en biopsias de tejido hepático y pulmonar

Pudimos contar con cortes histológicos de tejido hepático y pulmonar de un paciente con amebomas en esos órganos, gracias al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Clínica Reina Fabiola de la Universidad Católica de Córdoba, Argentina, en los cuales evaluamos la reactividad del anticuerpo monoclonal 1G4, que marca la superficie completa de todas las amebas. A estos cortes se les realizó en primera instancia una coloración de hematoxilina-eosina convencional para determinar la presencia de los trofozoítos en los tejidos, tal como se puede observar en la Figura 24.

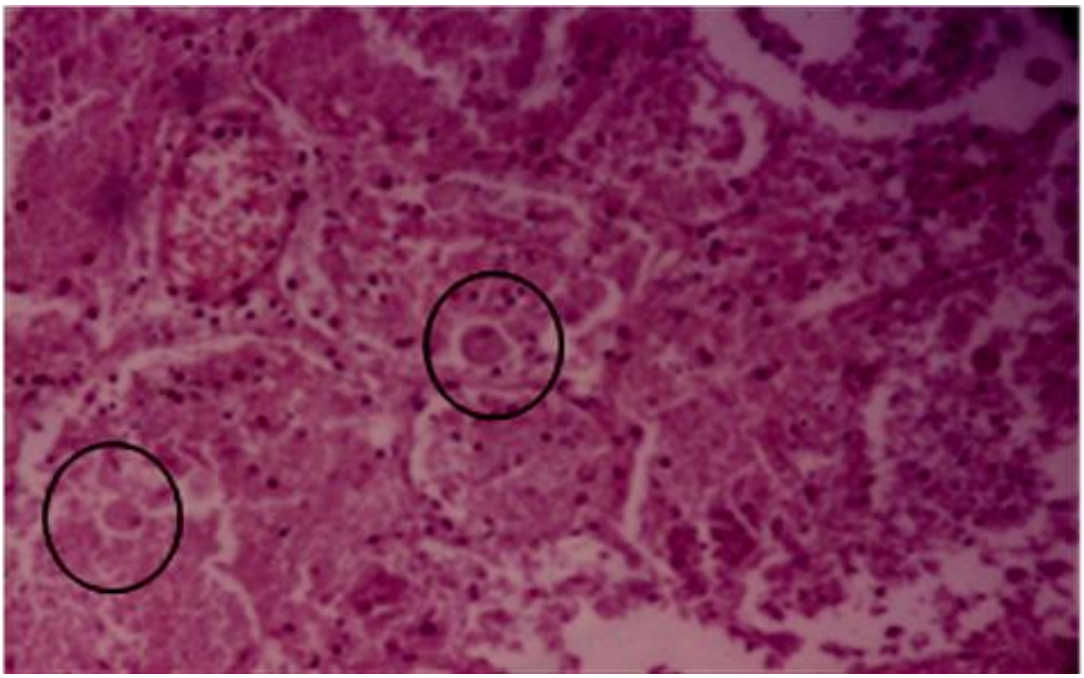


Figura 24. Corte histológico de tejido hepático teñido con hematoxilina-eosina. Los círculos indican la ubicación de trofozoítos de *E.histolytica*, muy difíciles de identificar mediante esta coloración.

Posteriormente se probó la reactividad del mAb 1G4 en los cortes de ameboma hepático y pulmonar mediante técnicas de inmunohistoquímica, tal como se describe en Materiales y Métodos, observándose una excelente marca en la superficie de todos los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* presentes en estos tejidos (Figuras 25 y 26).

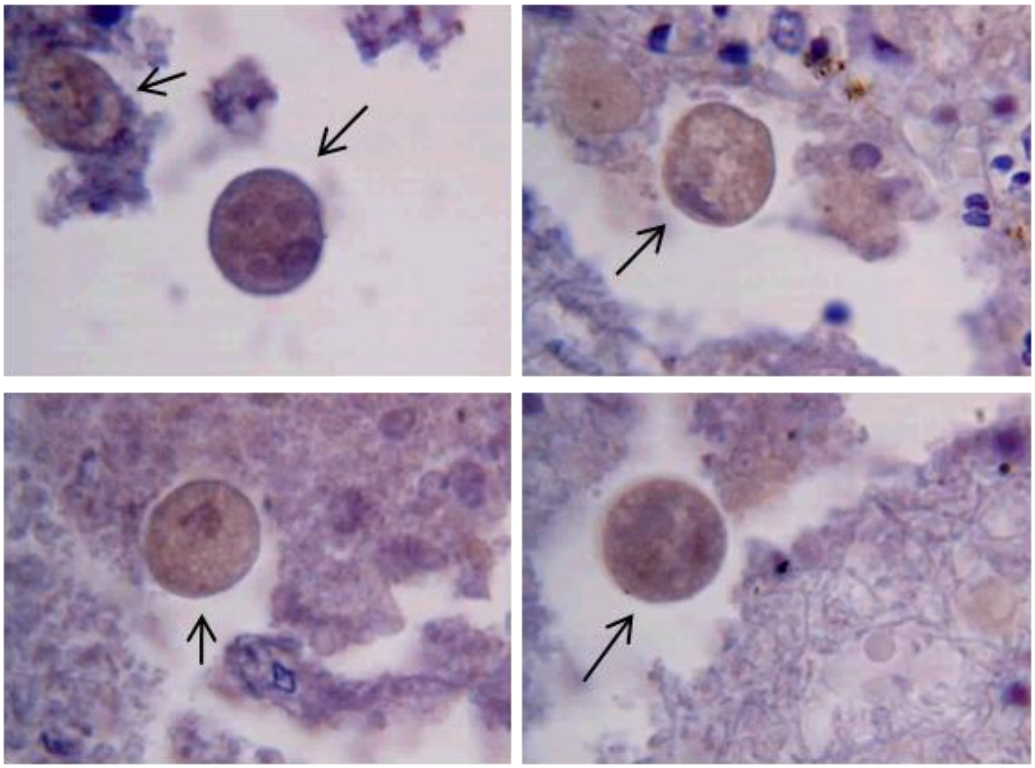


Figura 25. Inmunohistoquímica de cortes de tejido pulmonar usando el mAb 1G4 y revelado con biotina-avidina-peroxidasa. Las flechas indican los trofozoítos de *E. histolytica* marcados en marrón por esta técnica.

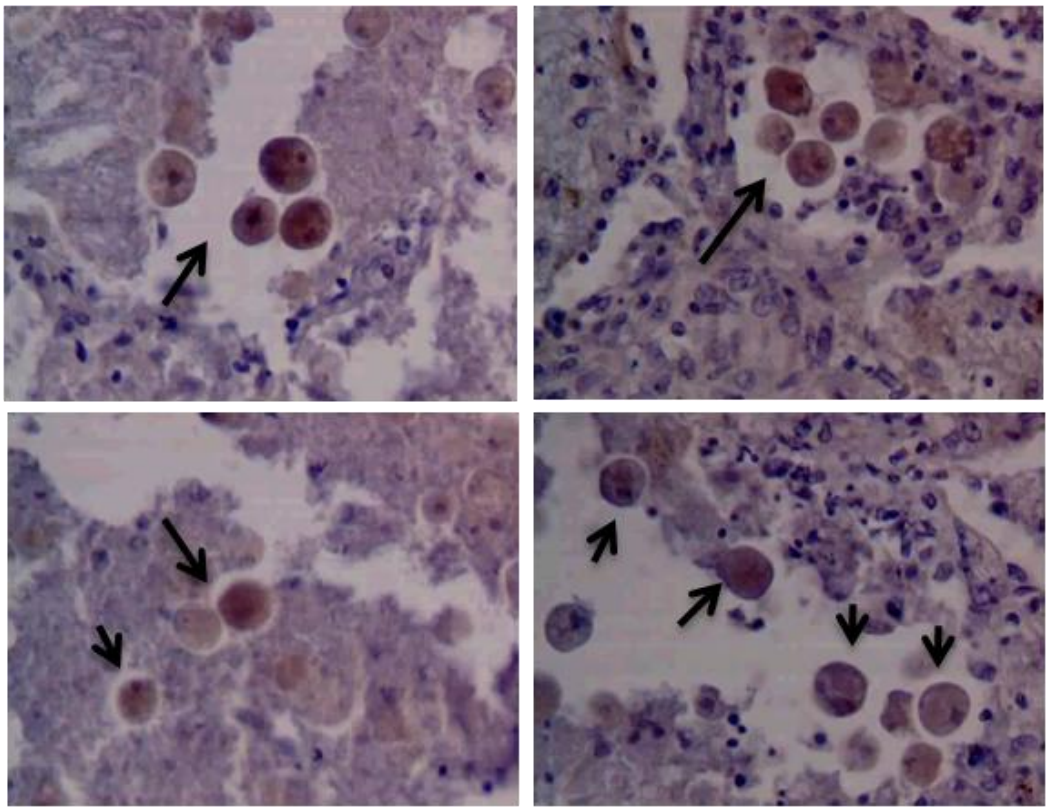


Figura 26. Inmunohistoquímica de cortes de tejido hepático usando el mAb 1G4 y revelado con biotina-avidina-peroxidasa. Las flechas indican los trofozoítos de *E. histolytica* marcados en marrón por esta técnica.

3.7 Desarrollo de mAb contra ooquistes de *Cryptosporidium spp.*

Por la misma metodología utilizada para el desarrollo de los anticuerpos monoclonales contra *E. histolytica* y que fue descripta en el capítulo anterior, se realizó la técnica para la obtención de anticuerpos monoclonales contra ooquistes de *Cryptosporidium*. Las colonias en crecimiento fueron chequeadas obteniéndose más de 18 anticuerpos contra ooquistes de *Cryptosporidium*, cinco de los cuales mostraron una excelente reactividad tanto por ensayos de ELISA, Western blot e inmunofluorescencia utilizando cada uno de estos anticuerpos monoclonales como anticuerpo primario tal como puede observarse en la Figura 27.

3.7.1 Ensayos de especificidad de los mAbs contra ooquistes de *Cryptosporidium spp* con otras especies y con diferentes conservantes

La especificidad de los anticuerpos fue evaluada mediante ensayos de inmunofluorescencia frente a quistes y trofozoítos de diversos parásitos como *E. histolytica, Giardia lamblia, Enterobius vermicularis, Blastocystis hominis, Dientamoeba fragilis, Endolimax nana, Entamoeba coli, Microsporidium, Ascaris lumbricoides*. Estos anticuerpos fueron altamente específicos reconociendo únicamente ooquistes de *Cryptosporidium* y siendo negativos para el resto de los parásitos a los cuales fue enfrentado.

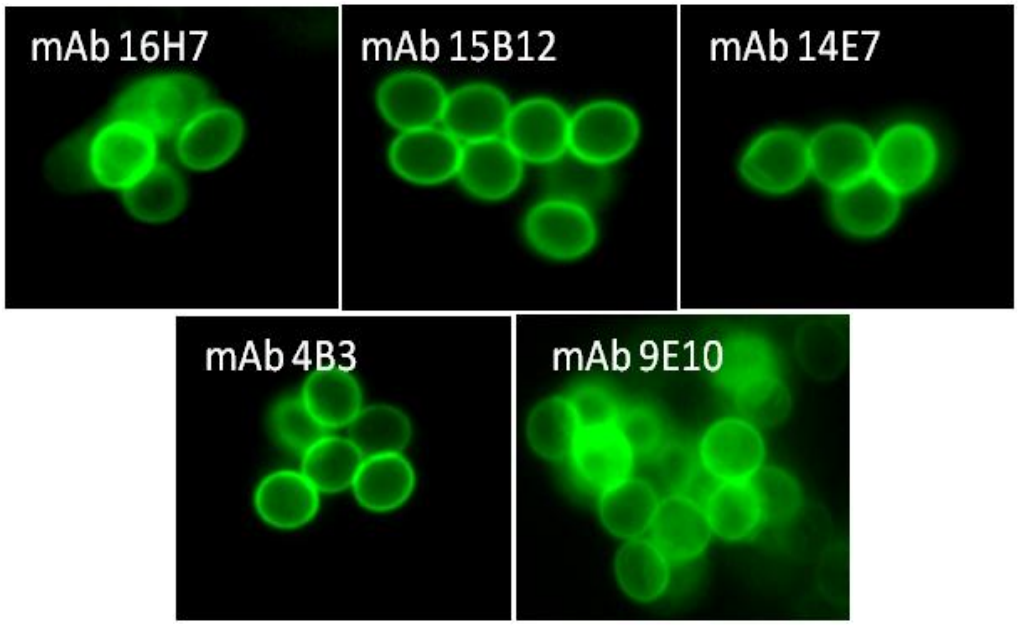


Figura 27. Inmunofluorescencia de ooquistes de *Cryptosporidium spp*. Se utilizaron cada uno de los mAb como anticuerpo primario y luego un anticuerpo conjugado con fluoresceína. En el ángulo superior izquierdo de las imágenes figura el nombre del anticuerpo utilizado (Magnificación 1000X).

Gracias a la colaboración de la Unidad de Referencia de *Cryptosporidium* del Reino Unido, pudimos contar con una serie de muestras de distintas especies de *Cryptosporidium*, todas ellas productoras de infección en humanos y cuya especie fue determinada por técnica de PCR. Estas muestras fueron procesadas en ciego con el fin de evaluar la reactividad de estos cinco anticuerpos. Todos los anticuerpos mostraron reacción positiva al ser enfrentados a los ooquistes presentes en las diferentes muestras pero no todos lo hicieron con la misma intensidad en la marca fluorescente, tal como lo muestra la Tabla 4.

Tabla 4. Estudio comparativo de diferentes mAbs anti-*Cryptosporidium spp.*

Especie	Referencia	mAb: Detección de ooquistes por IFA				
		16H7	15B12	9E10	4B3	14E7
C .hominis	17076	+++	+++	++	++	+
	17064	+++	+++	++	++	+
	16954	+++	+++	++	++	+
	16953	+++	+++	++	++	+
	16896	+++	+++	++	++	+
C. parvum	17100	+++	+++	++	++	+
	17185	+++	+++	++	++	+
	17181	+++	+++	++	++	+
	17108	+++	+++	++	++	+
	17193	+++	+++	++	++	+
C. felis	16570	+++	+++	++	++	+
C. cervine	16788	+++	+++	++	++	+
C. meleagridis	16888	+++	+++	++	++	+

Para poder seleccionar los anticuerpos más adecuados para el diseño del kit diagnóstico era necesario asegurarse que además de presentar una fuerte reactividad tanto por ELISA como por IFA, esta reacción se mantuviera positiva tanto en muestras frescas como cuando se usan diferentes soluciones conservantes. Los cinco anticuerpos presentaron igual reacción tanto en las muestras frescas como en aquellas que poseían soluciones conservantes (Figura 28).

3.7.2 Isotipificación de los anticuerpos

Tal como se describió en el capítulo anterior, se estudiaron los isotipos de los cinco anticuerpos monoclonales resultando todos IgM cadena Kappa. En la Figura 29 se muestra el isotipo del anticuerpo 15B12 fue el seleccionado para el diseño de la tira reactiva.

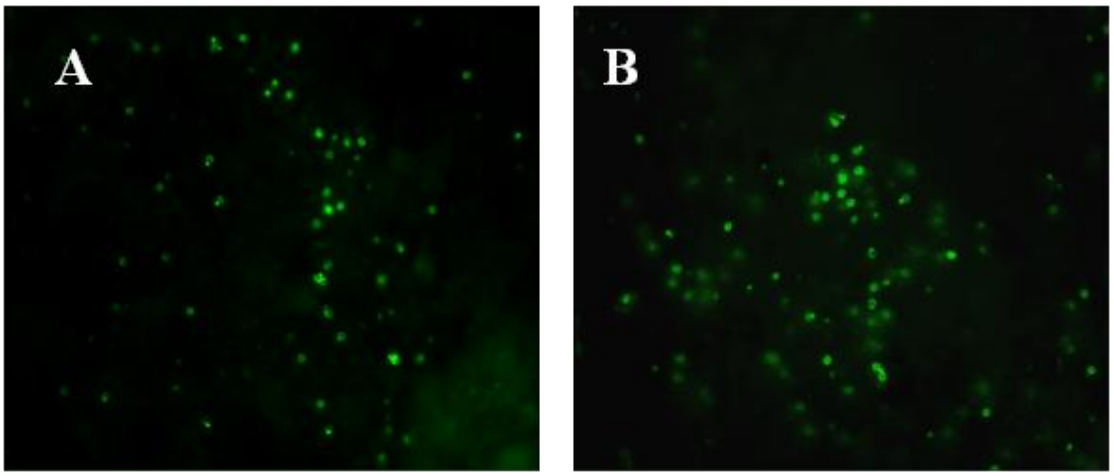


Figura 28. Inmunofluorescencia sobre ooquistes de *Cryptosporidium spp.* usando el mAb 16H7. (A) Muestra de materia fecal fresca. (B) Muestra de materia fecal conservada en solución SAF.

Figura 29. Isotipificación del mAb 15B12. Se muestra un isotipo IgM.

3.7.3 Análisis de Western Blot

Utilizando concentraciones iguales de proteínas de *Cryptosporidium* se realizó una corrida electroforética en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, posteriormente se realizó la trasferencia de proteínas a una membrana de acetato de celulosa. Cada calle fue incubada por separado con uno de los cinco anticuerpos seleccionados, para identificar las proteínas que reconocen los anticuerpos. Como resultado se observó que todos mostraban una banda correspondiente a un peso de 37 kDa (Figura 30).

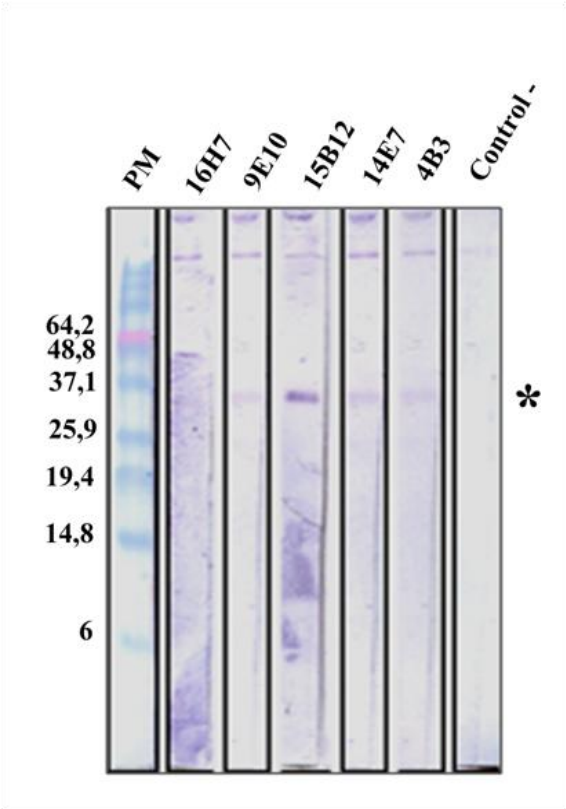


Figura 30. Ensayo de Western blot sobre proteínas de ooquistes de *Cryptosporidium spp.*. El asterisco indica las bandas correspondientes a la proteína de 37 kDa reconocida por los diferentes mAbs.

3.8 Desarrollo de anticuerpos monoclonales contra quistes de *Giardia lamblia*

Luego de varias inmunizaciones con las proteínas recombinantes CWP1 y CWP2 (ambas componentes de la pared del quiste de *Giardia*), se realizó la fusión de las células de bazo con las de mieloma para la producción de los anticuerpos tal como se describe en Materiales y Métodos. Posteriormente, las colonias en crecimiento fueron testeadas para evaluar su positividad por microscopía de inmunofluorescencia utilizando quistes obtenidos *in vitro*, como fue descripto en el capítulo anterior. Como resultado de esta fusión se obtuvieron cinco anticuerpos: cuatro dirigidos contra CWP2 y uno dirigido contra CWP1. Todos los anticuerpos presentaron muy buena marca cuando se los evaluó por inmunofluorescencia, como también un título elevado cuando se los evaluó por la técnica de ELISA (Figura 31).

Los anticuerpos además fueron evaluados tanto en quistes obtenidos a partir de cultivos *in vitro* como así también en muestras frescas, refrigeradas y conservadas con diferentes soluciones, observándose la misma reactividad en todas las condiciones. Por otra parte también se evaluó si presentaban reacción cruzada con quistes y trofozoítos de otros parásitos, observándose una especificidad del 100%.

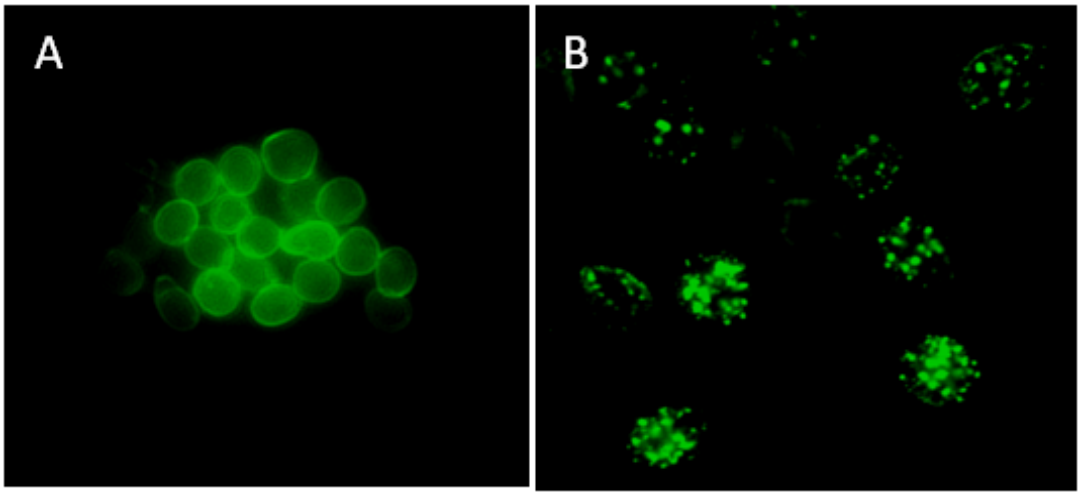
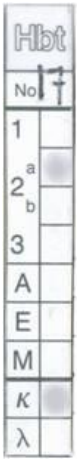


Figura 31. Inmunofluorescencia de quistes y trofozoítos de *Giardia lamblia*, usando mAb 7D6 anti-CWP2 como anticuerpo primario. (A) marca en la superficie de todos los quistes. (B) Trofozoítos de *Giardia* mostrando las vesículas donde son transportadas las proteínas que formarán la pared quística.

3.8.1 Isotipificación del anticuerpo monoclonal

Se realizó la isotipificación del anticuerpo monoclonal 7D6 anti-CWP2 seleccionado para la tira reactiva, resultando un isotipo IgG2a, cadena Kappa, tal como se observa en la Figura 32.



. **Figura 32. Isotipificación del anticuerpo 7D6.** El anticuerpo muestra un isotipo IgG2a.

3.8.2 Análisis de Western blot

Utilizando concentraciones iguales de proteínas obtenidas de trofozoítos de *G. lamblia* que se encuentran a distintos tiempos en el proceso de enquistamiento, se realizó una corrida electroforética en geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras. Posteriormente se realizó la trasferencia de proteínas a una membrana de acetato de celulosa, la cual fue incubada con los anticuerpos anti-CWP1 y con anti-CWP2 para confirmar que las proteínas que reconocen estos anticuerpos se corresponden a las proteínas recombinantes. Se encontró que el mAb 8F12 reconoce

una banda simple de 26 kDa correspondiente a la proteína de la pared del quiste CWP1. Por otra parte, el anticuerpo 7D6 reconoce una banda de 39 kDa correspondiente a la proteína CWP2 (Figura 33).

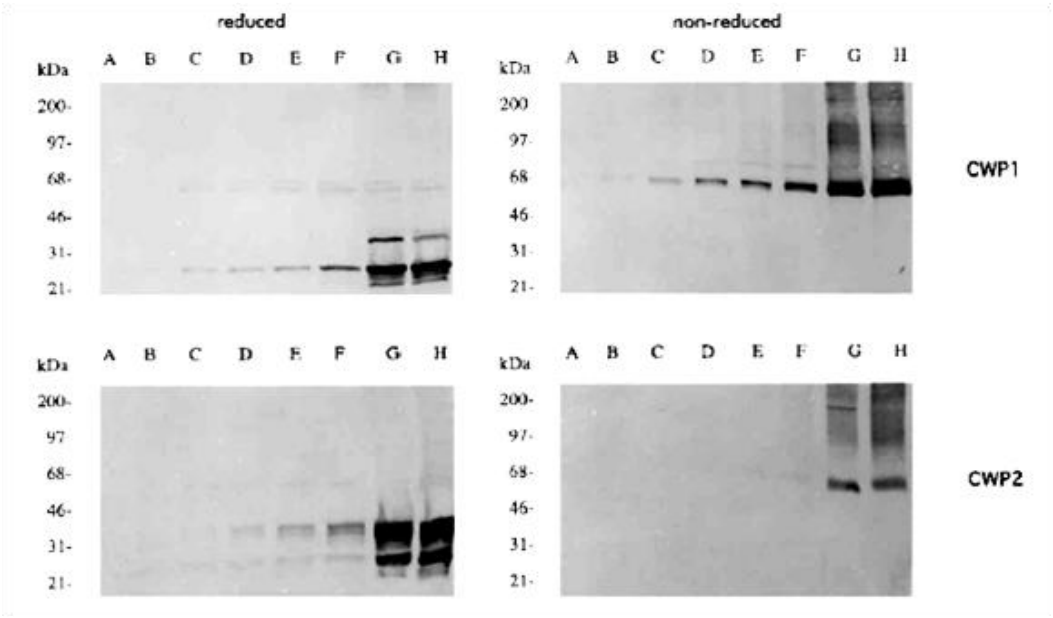
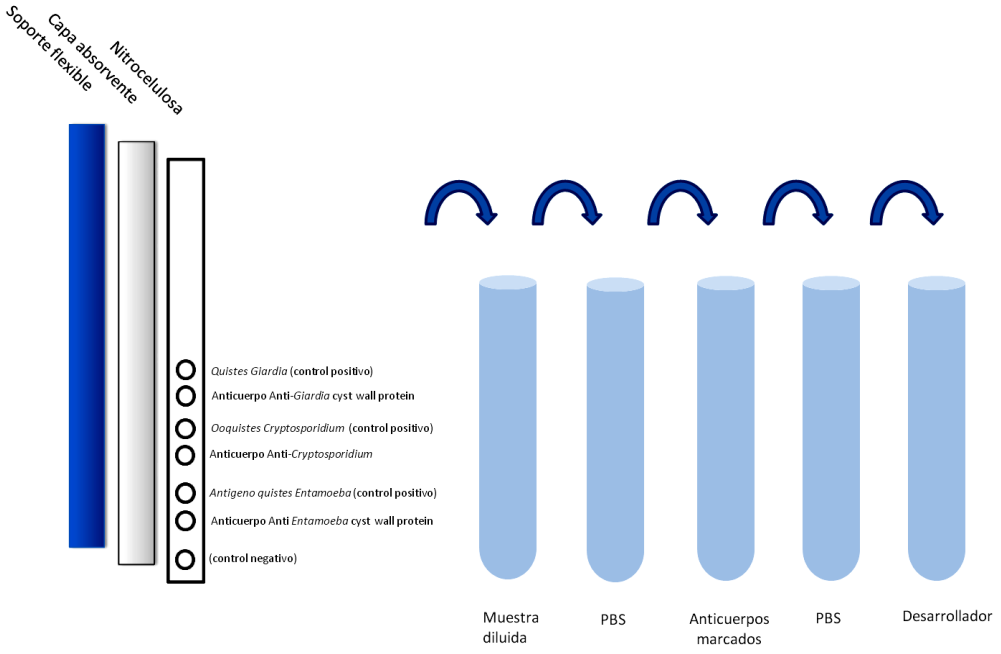


Figura 33. Ensayo de Western Blot en trofozoítos en enquistamiento de *Giardia lamblia*. Fotografía de las membranas de nitrocelulosa luego de realizar un SDS-PAGE de las proteínas de los trofozoítos durante el proceso de enquistamiento. Para todos los casos A son trofozoítos que no están enquistando y no expresan las proteínas de la pared del quiste. De B a H son trofozoítos con diferentes tiempos de enquistamiento, 2, 4, 8, 10, 12, 24 y 48 h, respectivamente. Las dos fotografías superiores corresponden a CWP1 usando como anticuerpo primario el mAb 8F12 y las dos inferiores a CWP2, usando mAb 7D6. En todos los casos se observa la expresión de las proteínas que formarán la pared quística a medida que transcurre el proceso de enquistamiento.

3.9 Procedimiento para la detección de los quistes con las tiras reactivas

El diagnóstico de las enteroparasitosis y en especial de *E. histolytica* ha sido un gran desafío en la práctica médica, ya que resulta esencial poder distinguir correctamente entre las especies que son patógenas y las que no, además que muchos de los quistes de parásitos suelen ser confundidos entre sí o con artefactos y detritos que se encuentran en la materia fecal, estos aspectos son cruciales para el pronóstico y tratamiento de estas enfermedades. Es por eso que nos planteamos el diseño de este kit de fácil utilización, que no requiera equipamiento ni personal entrenado y que pueda estar al alcance de toda la población. Para su realización los anticuerpos desarrollados anteriormente contra *Giardia lamblia, Entamoeba histolytica y Cryptosporidium spp.* fueron incorporados en un kit diagnóstico con formato de tiras reactivas, que utilizando la técnica de inmunoblotting por doble captura de antígenos, represente un ensayo rápido, simple, que no requiera el uso de complejo equipamiento y que de ésta manera

pueda ser realizado por cualquier analista o inclusive por los propios pacientes. Las tiras reactivas fueron diseñadas tal como se describió en Materiales y Métodos, previamente bloqueadas y luego incubadas con diferentes muestras de materia fecal que tenían presentes los quistes y ooquistes de los parásitos. Luego de ser lavadas se incubaron con la solución que contiene la mezcla de anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa, y finalmente incubadas con la solución reveladora, tal como lo muestra el siguiente esquema.



Una vez realizadas las tiras, se las sometió a muestras de materia fecal que contenían quistes y ooquistes de una sola de las especies y también mezclas de ellos para poder evaluar la efectividad de la tira. Los resultados se muestran en la Figura 34, donde se pueden observar las manchas coloreadas oscuras tanto en los controles positivos como en las muestras de pacientes infectados. Como control negativo no se utilizó ningún anticuerpo de captura y como controles positivos se usaron (a) para *Giardia*, quistes obtenidos *in vitro*, (b) para *Entamoeba*, pseudoquistes purificados de cultivos envejecidos y (c) para *Cryptosporidium*, ooquistes obtenidos de materia fecal de terneros neonatos infectados ya que no se cuenta con métodos de cultivo y diferenciación de este parásito *in vitro*.

Posteriormente se realizaron estudios para determinar la mínima cantidad de quistes y ooquistes que esta tira era capaz de detectar, para ello se realizaron diferentes diluciones de quistes y ooquistes previamente purificados, cada dilución fue evaluada con 10 tiras. Se utilizó una materia fecal humana negativa para los tres parásitos a la

cual se le fueron agregando quistes u ooquistes en cantidad conocida. La cantidad mínima detectable fue de 10 quistes para *Giardia lamblia*, y de 50 quistes u ooquistes para los casos de *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium spp*. Estos resultados se resumen en la Tabla 5.

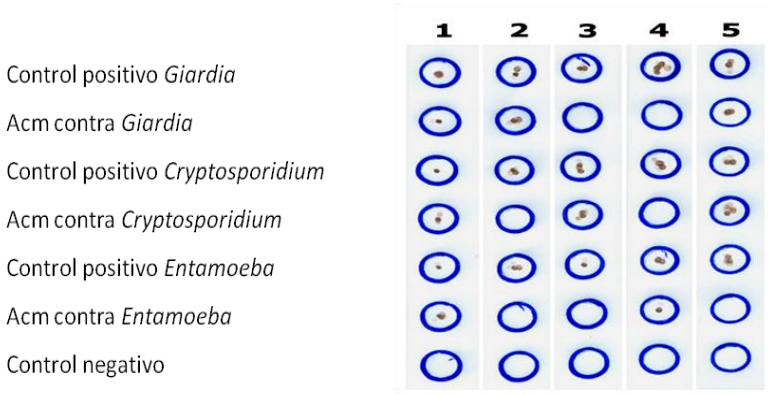


Figura 34. Inmunoblotting doble captura de antígenos. 1) Muestra de materia fecal que contiene quistes y ooquistes de los 3 parásitos (*Entamoeba histolytica, Giardia lamblia y Cryptosporidium spp*), 2) muestra que contiene sólo quistes de *G. lamblia*. 3) Muestra conteniendo ooquistes de *Cryptosporidium spp.* 4) Muestra que contiene sólo quistes de *E. histolytica*. 5) Muestra con quistes de *Giardia lamblia* y ooquistes de *Cryptosporidium spp.*

De esta manera se propone una nueva estrategia diagnóstica económica, de fácil utilización y al alcance de todos los profesionales de la salud, que si bien no se compara con técnicas confirmatorias como la PCR puede proporcionar un diagnóstico mucho más certero que los utilizados habitualmente y que pueda ser utilizada para *screening* de poblaciones y que no requiera de equipamiento complejo el cual no está al alcance de los laboratorios de rutina.

Tabla 5. Sensibilidad del kit de tiras reactivas ante diferentes protozoarios parásitos.

Parásito	Cantidad mínima detectable	Efectividad
Giardia lamblia	10 ± 1 quistes/ml	100%
E. histolytica/dispar	50 ± 1 quistes/ml	100%
Cryptosporidium spp	50 ± 1 ooquistes/ml	100%

3.9.1 Valor diagnóstico de la tira reactiva en muestras de materia fecal

Tal como se describe en Materiales y Métodos, materia fecal de pacientes que habitan diferentes partes del mundo donde reportes de parasitosis son frecuentes como Perú, Argentina, México y Brasil. La gran mayoría de las muestras fueron obtenidas

dentro de un programa subvencionado por la Unión Europea llamado CONTENT ("*Control and prevention of enteric infections in childhood in Latin America*") cumpliendo con todas las normas éticas y de bioseguridad. En todos los casos, los sitios para estudios de campo comparten similares características socio-culturales y pobres condiciones sanitarias, lo que se supone aumentaría la probabilidad de parasitosis, principalmente en niños. En total se analizaron 945 muestras por microscopía directa y utilizando las tiras reactivas. Los resultados de estos estudios se indican en la Tabla 6.

Tabla 6. Detección de protozoarios parásitos en muestras de materia fecal.

País de procedencia de las muestras	Ciudad de procedencia de las muestras	Cantidad de muestras analizadas	Cantidad de muestras positivas por microscopía	Cantidad de muestras positivas por la tira reactiva
Perú	Lima	212	0	0
Brasil	Rio de Janeiro	32	14	22
	Fortaleza	286	54	86
Colombia	Bogotá	10	0	0
México	Distrito Federal	245	102	132
	Morelia	75	8	28
Argentina	Córdoba	50	0	0
	Buenos Aires	15	0	0
	Santa Fe	20	0	0
totales		**945 (100%)**	**178 (19%)**	**268 (28%)**

Dado que los ensayos de inmunodetección parecieron ser más sensibles que los ensayos de microscopía óptica normal (28% contra 19%) y que los rangos de prevalencia reportados en algunos países alcanzan al 30% de la población, se realizaron experimentos adicionales para verificar la sensibilidad del método. Así, los falsos positivos y falsos negativos de ambas técnicas se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Especificidad del kit diagnóstico de protozoarios intestinales.

Microscopía	Falsos positivos	Falsos negativos
Óptica	5.3 %	14,3 %
Inmunodetección	0.5 %	0.0 %

Estos resultados indican que el test diagnóstico basado en tiras reactivas es altamente confiable cuando se lo compara con la microscopía. Los resultados estadísticos indicaron que el valor predictivo negativo es de 98,3 % y el valor predictivo positivo del 99,98 %.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

4.1 Generalidades

Las parasitosis intestinales son unas de las causas más frecuentes de infecciones en niños, inmunocomprometidos y adultos que conviven con condiciones sanitarias deficientes (40). Entre ellas, las causadas por protozoarios tales como *Giardia*, *Entamoeba* y *Cryptosporidium* son por lejos las parasitosis intestinales más comunes en cualquier lugar del mundo (72). *Giardia lamblia* es muy frecuente en niños, mochileros, ancianos que habitan asilos y en adultos que viajan a países donde la infecciones son endémicas (12). Este parásito causa primariamente infecciones crónicas y recurrentes que se manifiestan en general con diarreas agudas o crónicas que conllevan a deficiencias en la absorción de nutrientes (3). *Cryptosporidium*, por otro lado, es un microorganismo cosmopolita que no presenta síntomas en individuos con el sistema inmune activo, pero es causal de diarreas acuosas prolongadas en pacientes inmunodeprimidos, como infección con el HIV (SIDA) y en individuos trasplantados, poniendo en riesgo la vida ya que no existe actualmente ningún tratamiento eficaz. En el caso de *Entamoeba histolytica*, la infección que sólo se limita al intestino grueso produciendo diarreas sanguinolentas, con intenso dolor abdominal y, de no tratarse a tiempo, puede dar manifestaciones extraintestinales graves tales como abscesos en el hígado y de pulmón (86).

Para algunos de estos parásitos, como *Giardia* y *Cryptosporidium*, existen métodos diagnósticos eficientes basados en técnicas de inmunofluorescencia con la utilización de anticuerpos monoclonales (10). Aunque sensibles y bastante específicas, estas metodologías requieren de personal especializado, microscopios de fluorescencia de alto costo y no se pueden aplicar de forma rutinaria en países con bajos recursos o condiciones sanitarias son deficientes, generando un círculo vicioso en dónde los más pobres se mantienen infectados permanentemente, generando defectos en el desarrollo físico e intelectual de los niños afectados, lo cual dificulta el acceso a la educación y con ello a condiciones de vida más dignas (19).

El caso de *E. histolytica* es aún más grave, ya que siendo unos de los parásitos intestinales más importantes, no existen métodos diagnósticos específicos, sensibles y baratos (86).

Por estos motivos, los comienzos de este Trabajo de Tesis estuvieron centrados en el diseño de nuevas tecnologías para el diagnóstico específico de la Amebiosis mediante la detección de quistes del parásito en muestras de materia fecal (ver siguiente

sección). Luego, basados en los promisorios resultados obtenidos, decidimos realizar nuestro aporte para el diagnóstico certero de trofozoítos de *E. histolytica* en muestras de biopsias de hígado y pulmón de pacientes con amebomas, debido a las dificultades expresadas por anátomo-patólogos en el diagnóstico diferencial de esos abscesos, los cuales son fácilmente confundibles con tumores de diferente etiología mediante el diagnóstico por imágenes. Por ello desarrollamos anticuerpos monoclonales contra trofozoítos del parásito que permiten el diagnóstico certero de la Amebiosis en cortes de tejidos por técnicas de inmunohistoquímica.

Luego, dada la imperiosa necesidad de llegar a la comunidad médica y de allí a la población en general para el diagnóstico especifico y seguro contra los protozoarios más frecuentes, decidimos producir nuevos anticuerpos contra proteínas de la pared de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* para combinarlos con los anticuerpos anti-ameba en un test simple y barato en formato de tiras reactivas. Este nuevo método, diseñado durante el trascurso de este Trabajo de Tesis demostró una alta especificidad y sensibilidad en más de 900 muestras de pacientes, similar a los test de inmunofluorescencia que se encuentran en el mercado contra *Giardia* y *Cryptosporidium*, con el agregado que posee el único anticuerpo monoclonal existente contra quistes de *E. histolytica*.

Por ello, en las próximas secciones se discutirán los resultados obtenidos, particularmente en el contexto de la literatura relacionada en el tema

4.2 Diagnóstico de la Amebiosis

Históricamente el diagnóstico tradicional de la Amebiosis se ha realizado por microscopía, observando en las muestras de heces la morfología de quistes y trofozoítos. Estas técnicas de microscopía incluyen preparaciones en fresco como también métodos de concentración de muestras y tinciones. El examen microscópico directo de heces en fresco es un método muy poco sensible, ya que se debe examinar en las primeras horas luego de la recolección, sin refrigerarla ya que los trofozoítos pueden perder su motilidad.

Tanto los quistes como los trofozoítos de *E histolytica, E. dispar y E. moshkovskii* son morfológicamente indistinguibles y sólo pueden diferenciarse al microscopio si se visualizan trofozoítos hematófagos. Se considera que el hallazgo de eritrocitos en el citoplasma del trofozoíto sería diagnóstico de *E. histolytica* (68),

aunque existe controversia al respecto. Este hallazgo requiere de una gran experiencia del observador ya que es muy fácil confundirlos con macrófagos y con trofozoítos de otras especies (68). La presencia de estos trofozoítos hematófagos es un hecho muy poco frecuente, los portadores asintomáticos generalmente sólo eliminan formas quísticas en materia fecal y en pacientes que no presentan un cuadro agudo los trofozoítos suelen aparecer sin eritrocitos en su citoplasma (68).

Los métodos de concentración de heces se utilizan rutinariamente para mejorar la fiabilidad del examen microscópico y lograr así porcentajes de detección mayores, pero estos métodos tienen el inconveniente de que pueden destruir los trofozoítos (17).

Con respecto a los quistes, es necesario diferenciar los quistes de *E. histolytica* con los de otras amebas y para ello es importante valorar el número y morfología de los núcleos, como así también su tamaño. También pueden realizarse tinciones que coloreen el núcleo y algunas estructuras celulares, lo que ayuda a la diferenciación de las especies. La sensibilidad de este método es baja ya que puede conducir a resultados engañosos, si no se cuenta con personal adiestrado se pueden cometer errores en la identificación confundiendo quistes y trofozoítos con leucocitos polimorfonucleares o con quistes de otras especies de amebas. Como se puede observar, el diagnóstico microscópico es dificultoso, poco específico, laborioso en algunos casos y, por ende, poco confiable (68).

Por otro lado, el cultivo de protozoarios es poco eficiente, laborioso y complicado de mantener en un laboratorio de diagnóstico. Se dispone de técnicas de cultivo de *Entamoeba* desde hace muchos años, estos medios de cultivo incluyen sistemas xénicos (el parásito crece en presencia de bacterias u otras células para aprovechar la actividad metabólica de éstas y utilizar eficazmente los nutrientes) y axénicos, que pueden ser bifásicos o monofásicos (18). En 1961, Louis Diamond logra cultivar al parasito en un medio axénico por primera vez (24) y en 1978 implementa la utilización del medio TYI-S-33 que es el que se emplea actualmente en los laboratorios de referencia (18, 24) y en el que nosotros cultivamos los trofozoítos de cepas derivadas de distintas partes del mundo.

El cultivo de *E. histolytica* puede realizarse desde muestras de heces, biopsias intestinales y aspirado de absceso hepático. Actualmente el cultivo no suele utilizarse para el diagnóstico clínico, no sólo por su baja sensibilidad, sino también por su costo, su complejidad y porque este protozoo requiere de períodos largos para su crecimiento. Además posee el inconveniente de sobrecrecimiento bacteriano, fúngico y de otros

parásitos si analizamos el material de donde proviene la muestra. Por otro lado, sólo se pueden cultivar muestras que contienen trofozoítos viables, ya que no se dispone de métodos que permitan eficientemente el desenquistamiento de los quistes, que es la forma predominante del parásito que aparece en materia fecal en etapas crónicas de la infección (71). Es importante destacar que gracias a la generación de un anticuerpo monoclonal específico contra la pared del quiste de *E. histolytica*, hemos comenzado estudios que nos han permitido, mediante envejecimiento o concentración del medio de cultivo, producir pre o pseudoquistes de este parásito por primera vez. Aunque la eficiencia del enquistamiento *in vitro* se encuentra en etapas de evaluación y mejora, el anticuerpo monoclonal 6C12 permitirá en el futuro contar con una valiosa herramienta que facilite la determinación del estímulo del enquistamiento del parásito, del transporte de los componentes de su pared, y el ensamblado de la misma del mismo modo que se logró en *Giardia* (54).

Para el diagnóstico de la Amebiosis también se ha utilizado el perfil isoenzimático de cepas aisladas de pacientes. Mediante su trabajo, Sargeaunt en 1978 demostró que mediante el análisis del perfil de isoenzimas de un cultivo de amebas era posible diferenciar las especies patógenas de las que no lo son (79). Un zimodema se define como una población genéticamente diferenciable que comparte un patrón electroforético para varias enzimas. Las enzimas evaluadas son principalmente cuatro: enzima málica, fosfoglucomutasa, glucosa fosfatoisomerasa y hexoquinasa. Un total de 20 zimodemas fueron descriptos, de los cuales 9 correspondían *E .histolytica* y el resto a *E. dispar* (79). Estudios más recientes de Diamond y colaboradores utilizando cultivos axénicos establecieron que sólo existen 4 zimodemas, de los cuales II, XIV y XIX corresponden a *E. histolytica* y I a *E. dispar* (25). El resto de los patrones enzimáticos descriptos anteriormente en cultivos xénicos podrían ser el resultado de artefactos originados por la presencia de bacterias en el medio (25).

Aunque este método ha sido capaz de diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar* posee muchas desventajas, entre las que se encuentran: su gran complejidad, necesidad de un laboratorio con personal calificado, el tiempo de realización que la técnica requiere es muy largo, se necesita establecer un cultivo de amebas y una gran cantidad de células para llevar a cabo el estudio (25). Como se mencionó previamente, no es fácil establecer un cultivo continuo de amebas, sumado al inconveniente del crecimiento no deseado de bacterias y otros parásitos. Por lo tanto resulta obvio que no es una metodología simple de implementar como técnica rutinaria en laboratorios asistenciales.

Así mismo, aun persiste la controversia de la división en especies separadas de *E. histolytica* y *E. dispar*, que aunque los investigadores más prolíferos en el área apoyan este concepto, existen numerosos resultados que se contraponen a esa hipótesis. Además, como en el caso de *Giardia*, diferencias tanto en el patrón isoenzimático como variaciones encontradas en el genoma de diferentes aislados de este parásito no han producido que la comunidad científica los separe en diferentes especies (71).

Como se verá más adelante, existen variadas técnicas de PCR para poder diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar*. En este caso, nuestro anticuerpo 6C12 ha sido utilizado para capturar los quistes dispersos en una suspensión de materia fecal mediante la utilización de perlas magnéticas a las que les fue conjugado el anticuerpo. Esto permitió la obtención de quistes libres de contaminantes presentes en la materia fecal que pueden interferir tanto en la extracción de ADN de la materia fecal como en la reacción de PCR.

Los ensayos serológicos para la identificación de *E. histolytica* han resultado útiles en países desarrollados donde las infecciones con este parásito no son muy comunes. Por otra parte, en zonas endémicas donde la población está expuesta permanentemente a este parásito, estos tipos de ensayos carecen de utilidad ya que no pueden distinguir entre una infección pasada y una actual (97). La detección de anticuerpos en suero en pacientes con Amebiosis resulta muy útil en el diagnóstico de la Amebiosis extraintestinal, donde el título de anticuerpos es muy alto. Estos test serológicos detectan anticuerpos contra *E. histolytica* en aproximadamente el 95% de los casos de Amebiosis extraintestinal, 70% en pacientes con Amebiosis intestinal invasiva y un 5% en los portadores asintomáticos (39). Se han desarrollado diferentes métodos serológicos como hemaglutinación indirecta (HAI), aglutinación en látex (AL), inmunoelectroforesis (IEF), contrainmunoelectroforesis (CIE), inmunofluorescencia indirecta (IFI), fijación de complemento (FC) y enzimoinmunoensayo (ELISA) (39, 60, 68).

La CIE era la técnica comúnmente usada en el pasado, la FC presenta una menor sensibilidad que otras técnicas utilizadas para el diagnóstico de Amebiosis y un mayor costo razón por la cual no es muy usada en la mayoría de los laboratorios (60).

La HAI es un método sencillo de realizar y muestra una elevada sensibilidad, aunque esta sensibilidad es más baja en pacientes con absceso amebiano ya que pueden dar falsos negativos en las dos primeras semanas del comienzo de los síntomas.Estudios realizados por Hung en 1999 afirman que este test resulta una herramienta útil para el

diagnóstico de pacientes con HIV que presentan síntomas intestinales (60).

Con respecto a la técnica de aglutinación en látex podemos destacar la gran ventaja de su rapidez, ya que en pocos minutos se puede contar con el resultado. Un trabajo publicado por Van Door en el 2005 situó a la especificidad de esta técnica en un 99,5%, con una sensibilidad de 92% en pacientes con absceso hepático y 100% en los enfermos con colitis amebiana. Por otra parte la detección de anticuerpos utilizando IFI es un método rápido, fiable y reproducible, ayuda a diferenciar un absceso amebiano de otro de diferente etiología y por último permite distinguir entre una infección reciente de una pasada (60). Estudios dirigidos por Jackson en 1984 indicaron que el monitoreo de los niveles de IgM por IFI puede tener valor clínico en caso de Amebiosis invasora. Los niveles de IgM pueden llegar a ser negativos en un período corto de tiempo después de la infección y/o ser negativos luego del tratamiento. En los casos de Absceso Hepático Amebiano la especificidad y la sensibilidad son muy altas incluso más que ELISA, por lo tanto un resultado negativo indicaría que el paciente nunca tuvo Amebiosis invasiva. Sin embargo esta prueba requiere habilidad en el cultivo y en la preparación del antígeno por lo cual es difícil de llevar a cabo en un laboratorio de rutina(60).

ELISA es el más popular de los métodos utilizados en todo el mundo tanto para diagnóstico de pacientes con sintomatología luego del examen de materia fecal como para estudios epidemiológicos de enfermedad asintomática. Es una herramienta valiosa sobre todo en los casos de absceso hepático amebiano (AHA) y fácil de implementar en un laboratorio clínico. La sensibilidad de este ensayo en pacientes con AHA se encuentra cercana al 100% y no presenta reacción cruzada con amebas no patógenas, por lo que resulta de utilidad para el diagnóstico (39). En un estudio realizado por ELISA en una zona endémica de Vietnam, se observó que el 80% de los individuos infectados con *E. histolytica*, incluso los portadores asintomáticos, tenían anticuerpos contra ameba en suero, resultados que fueron confirmados por PCR en tiempo real (74).

Aunque parezcan confiables, la mayoría de los métodos que detectan anticuerpos séricos en pacientes infectados utilizan parásitos mantenidos en cultivo como antígenos de captura, de modo que no se sabe si todas las amebas presentan los mismos antígenos, cómo amebas tan relacionadas pueden dar resultados diferenciales y, por último, el problema de determinar infección presente o pasada, sintomática o asintomática, y a su vez la necesidad de equipamiento específico hacen de las mismas prácticas muy poco usadas por la comunidad médica.

Por otro lado, la detección de antígenos de amebas se basa en la identificación de antígenos del parásito en lugar de anticuerpos en muestras clínicas. Poseen algunas ventajas con respecto a otros métodos de diagnóstico de Amebiosis: algunos de estos ensayos con capaces de diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar* y *E. moshkovskii*, son fáciles de utilizar, poseen buena sensibilidad y especificidad y pueden ser usados en pruebas de rastreo (*screening*) a gran escala para estudios epidemiológicos (33). Por otra parte, poseen la desventaja de que los antígenos sufren desnaturalización cuando las muestras son fijadas, por lo tanto este test se limita solamente a muestras recién emitidas o congeladas (33).

Hay diferentes tests de detección de antígenos de trofozoítos disponibles comercialmente para uso de diagnóstico *in vitro*. Los test de ELISA desarrollados utilizan anticuerpos monoclonales para la captura de antígenos exclusivos de trofozoítos, los más usados frecuentemente son aquellos dirigidos contra diferentes epitopes de Galactosa/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAC) de *E. histolytica* (*E. histolytica* II, TechLab, Blacksburg, VA) o contra el antígeno rico en serina (Optimun S Kit, Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel, Germany), los cuales están sólo presentes en membrana plasmática de los trofozoítos (86) y son imposibles de detectar cuando la misma está recubierta por la pared quística. También poseen la desventaja de que su sensibilidad es menor después de que se inicio la terapia antiameboide, y que estos antígenos sufren desnaturalización cuando las muestras son fijadas, limitando el uso del test sólo a muestras frescas o congeladas. La evaluación de estos ensayos en un estudio realizado en Bangladesh demostró que poseen una mayor sensibilidad que la microscopía y que el cultivo (60). Por otra parte se observó que la sensibilidad es inferior que la técnica de PCR en la diferenciación de *E. histolytica* de *E. dispar* (86). Otros investigadores han detectado falsos positivos por reactividad cruzada con *E. dispar* (60). Por lo tanto, esta técnica tendría una utilidad limitada por lo que en países desarrollados se ha cuestionado su uso. Existen otros test comerciales no tan utilizados son Entamoeba Celisa Path Kit (Cellabs, Brookvalle, Australia) que utiliza un anticuerpo monoclonal específico contra la lectina de adherencia y la ProSpecT (Remel Inc.) el cual detecta un antígeno específico de *E. histolytica* en materia fecal, este último es un test que puede detectar tanto *E. histolytica* y *E. dispar* , sin embrago no puede diferenciarlas, además presenta el inconveniente de que no pueden usarse muestras fijadas con formalina, con lo cual nos limitamos al uso de muestras frescas o congeladas. La sensibilidad de este test fue comparado con la microscopía

tradicional(60, 86).

El estudio de antígenos en saliva ha sido utilizado durante mucho tiempo como métodos para la predicción de enfermedad invasiva. En uno de esos estudios se observó que la presencia de estos antígenos en saliva tenía una moderada sensibilidad (65,8%) y una alta especificidad (97,4%) en infecciones tempranas (colitis amebianas que cursaban con menos de un mes). Aunque en pacientes que no cursaban con una enfermedad invasiva la utilización de este método representa una desventaja ya que la sensibilidad de este ensayo en mucho menor que la detección de antígeno en suero (86).

Se han utilizado otro tipo de muestras como suero y material aspirado de los abscesos hepáticos en estos métodos de detección de antígeno (adhesina de *E. histolytica)*, mostrando una sensibilidad elevada (60, 86), aunque esta técnica sólo se puede realizar en estadíos avanzados de la enfermedad.

También se han comercializado ensayos de inmunocromatografía, TPP (Biosate Diagnostic Inc., San Diego, CA) que detectan simultáneamente antígenos de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium spp*. y *E. histolytica/E. dispar*/*E. moshkovskii* en muestras de heces recién emitidas o congeladas. Algunos autores han conseguido una alta sensibilidad y especificidad al comparar este kit con otros métodos (32). Sin embargo, otros autores han comunicado una baja sensibilidad en este ensayo (77). El protocolo de realización aparenta ser simple (aunque requiere de equipamientos eléctricos), pero tiene el inconveniente de que no diferencia *E. histolytica* del resto de las amebas, ya que el anticuerpo utilizado esta dirigido contra un antígeno común en las tres especies y por ende no puede utilizarse para el diagnóstico. Por otra parte, la muestra de materia fecal debe ser recién emitida y de no ser posible, debe congelarse hasta la realización del ensayo. Este ensayo es solo cualitativo, en el cual una tira inmunocromatográfica es recubierta con mAbs específicos contra una proteína específica de *E. histolytica/E. dispar* (antígeno de superficie de 29 kDa), α-1-giardin *G. lamblia*, y la Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI) de *Cryptosporidium*. Este kit también incluye controles positivos y negativos de los que no se informan sus características. Es frecuente que para los casos positivos para *Entamoeba*, luego se utilice el kit de TechLab "*Entamoeba histolytica* II" (TechLab, Blacksburg, VA, USA). Este producto, como se describe, detecta la lectina Gal/GalNAc del parásito en muestras de materia fecal y se define como capaz de diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar* y se basa en la utilización de anticuerpos monoclonales mediante la técnica de ELISA (32).

La mayor desventaja de estos métodos es el hecho que los antígenos amebianos

no deben ser desnaturalizados y por ello la mayoría utiliza materia fecal fresca. Además, no existen estudios que demuestren la validez de las técnicas con muestras fijadas utilizando diversos conservantes, por lo que resultan en innumerables casos de falsos negativos que complican el diagnóstico. En nuestro caso, el anticuerpo 6C12, en el que demostramos que el epitope es proteico y que no se destruye por la acción de muy diversos tratamientos o la fijación en diversos conservantes de la materia fecal, resulta sumamente valioso para la determinación de la Amebiosis en cualquier tipo de muestra. Además, como se mostró en Resultados, la determinación de la presencia o no de los tres protozoarios parásitos en materia fecal es menos engorrosa y no necesita de ningún equipamiento eléctrico.

Las técnicas basadas en el análisis de ADN, como la PCR, han revolucionado el diagnóstico de la Amebiosis, ya que presenta una gran sensibilidad y especificidad. Sin embargo, en países tropicales y subtropicales donde la Amebiosis es un problema de salud pública considerable, el diagnóstico se sigue realizando por el examen microscópico, ya que estas nuevas técnicas son muy costosas, necesitan equipos especializados y personal entrenado en técnicas de biología molecular.

Las técnicas basadas en la PCR se consideran en la actualidad los métodos de elección para el diagnóstico clínico y estudios epidemiológicos de la Amebiosis en países desarrollados, además la Organización Mundial de la Salud recomienda utilizar esta metodología sustituyendo a los métodos clásicos (74).

Sin embargo, uno de los principales inconvenientes que tiene el diagnóstico molecular de los enteropatógenos está relacionado con la extracción de ADN, ya que la materia fecal es una de las muestras más complejas para realizar una técnica de PCR debido a la presencia de sustancias inhibidoras de la *Taq* polimerasa, como hemoglobina, bilirrubina, sales biliares, pectinas y carbohidratos que se extraen junto con el ADN del parásito, disminuyendo la sensibilidad de la técnica. Por lo tanto la optimización del método de extracción de ADN es crucial para el éxito del ensayo (4). En el pasado, el aislamiento de ADN directamente desde materia fecal era problemático y laborioso. Recientemente han sido desarrollados métodos de aislamiento de ADN de muestras de heces, como Xtrax DNA (Gull Laboratorie, Salt Lake City, UT), Extract MasterFaecal DNA (Epicenter Biotechnologies, WI) los cuales han incrementado notoriamente la sensibilidad de estos ensayos, ya que eliminan interferentes e inhibidores. Actualmente el kit QIAamp DNA stool kit (Qiagen, Hilden, Germany) es el más ampliamente usado en los laboratorios de investigación clínica (93).

Se han desarrollado gran variedad de métodos de PCR y se han utilizado diferentes genes diana para el diagnóstico y diferenciación de las especies de amebas dando todas ellas una gran sensibilidad. La PCR en tiempo real es una nueva y atractiva metodología para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Esta clase de PCR se basa en los métodos convencionales de PCR, pero incorporando la novedad de la detección cuantitativa del producto amplificado mediante fluorescencia. Se han realizado trabajos comparando ambas metodologías obteniéndose la misma sensibilidad en ambas técnicas (68).

Otra ventaja que posee esta técnica es que para la identificación de *E. histolytica* pueden usarse diferentes tipos de muestras como materia fecal, biopsias, aspirados de abscesos hepáticos, etc. La sensibilidad de la PCR es mucho mayor que los tests de ELISA que se disponen comercialmente, y como dato importante cabe destacar que permiten discriminar a *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkosvkii* (4, 33, 77).

Como se destacó anteriormente, el mayor inconveniente de las técnicas de diagnóstico molecular en muestras de materia fecal consiste en la presencia de inhibidores de la *Taq* polimerasa presentes en la muestra proveniente tanto de la dieta como de productos endógenos o producidos por la flora bacteriana. Si bien para este tipo de técnicas pueden usarse muestras de heces en conservantes, cabe destacar que el formol puede tener un efecto inhibitorio sobre la reacción de PCR, Ramos y colaboradores (1999) describen como este efecto inhibitorio de la formalina está directamente relacionado con el tiempo que permanece la muestra en el conservante.

Como se expuso anteriormente se han desarrollado numerosas variantes de esta técnica de PCR con el fin de incrementar la sensibilidad, como el desarrollo de una nested-PCR para la detección simultánea de *E. histolytica* y *E. dispar* con ADN extraído de muestras de materia fecal con examen microscópico positivo (4, 33, 77). Estas técnicas han demostrado tener una alta sensibilidad y especificidad (4, 33, 77).

También se han publicado recientemente ensayos de PCR a tiempo real para la detección simultánea de *E. histolytica*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp*., presentando una excelente sensibilidad y especificidad (4, 33, 77). Por lo cual estos ensayos representan una alternativa por demás interesante para el diagnóstico efectivo de estos parásitos en enfermos con diarrea, aunque sigue resultando una técnica costosa y que requiere equipamiento adecuado por lo cual resulta inalcanzable para centros asistenciales de países en vías de desarrollo donde este tipo de enfermedades representan un serio problema en la salud pública (4, 33, 77).

Un importante avance en esta ha sido contar con un anticuerpo específico contra la pared del quiste del parásito (no sólo del trofozoíto que es muy difícil de encontrar en la mayoría de las muestras) para su captura libre de contaminantes fecales y poder luego realizar reacciones de PCR sobre parásitos aislados y permitir su identificación y caracterización.

4.3 Caracterización parcial del antígeno reconocido por el mAb 6C12

El anticuerpo 6C12 reconoce una banda de 20 kDa en ensayos de Western Blot sobre trofozoítos inducidos a enquistarse *in vitro*. El antígeno diana de este mAb no ha podido ser caracterizado molecularmente hasta el momento debido a que en quistes maduros, el mismo forma complejos insolubles de muy alto peso molecular (homo o heterocomplejos) y a que el sistema de enquistamiento es muy poco eficiente como para obtener material suficiente para su secuenciación. Sin embargo, se intentó conocer algunas de las características del mismo mediante el tratamiento de quistes con diversas enzimas o químicos hidrolíticos. Así pudimos determinar que reactivos que destruyen carbohidratos no tienen influencia en la reactividad del antígeno para con el anticuerpo, aunque en algunos casos se observó cambios en la morfología de los quistes que pueden ser consecuencia de la acción de estos reactivos sobre otros componentes de la pared quística. Sí quedó claro que ninguna enzima proteolítica tuvo efecto alguno sobre la reactividad de mAb 6C12 con su antígeno, no dejando dudas de la naturaleza proteica del epitope reconocido por el mismo.

Un importante punto a discutir es el hecho que frente a determinados reactivos, los quistes liberaron el antígeno al medio en forma similar a ciertos gusanos cuando se desprenden de su tegumento. No está claro si esa liberación es un artefacto del tratamiento o si bien los quistes utilizan enzimas similares durante su desenquistamiento. Cualquiera sea el caso, fue sorprendente encontrar que ciertos quistes de *Entamoeba coli* (comensal no patógeno) también se teñían con el anticuerpo sólo si *E. histolytica* también estaba infectando ciertos pacientes. La caracterización de ambas especies se realizó no sólo por el conteo de sus núcleos (8 contra 4) sino también por PCRs realizadas por nuestros colaboradores de Suecia. Siendo que *E. coli* por sí sola no es detectada por el mAb 6C12, cuando ambas amebas enquistan, el material secretado por *E. histolytica* puede integrarse a la pared de *E. coli* y no sobre quistes de otros parásitos. Esto hace suponer que ambas amebas poseen similares mecanismos de

formación de sus paredes quísticas y que la liberación del antígeno reconocido por el mAb 6C12 podría ser un evento fisiológico de esta clase de microorganismos. Pese a ello, el valor diagnóstico del anticuerpo no está comprometido porque aunque puedan teñirse quistes de la ameba comensal, esto sólo ocurre si *E. histolytica* está también infectando dicho individuo.

4.4 Diagnóstico de abscesos amebianos

La Amebiosis es considerada una de las enfermedades parasitarias más agresivas que pueden presentarse en el intestino humano, los trofozoítos tienen la capacidad de invadir la mucosa intestinal alcanzando la circulación portal y de esta forma pueden diseminarse en otros órganos y formar en ellos verdaderos abscesos, resultando hígado y pulmón las localizaciones más frecuentes (42, 71). Está estimado que, de todos los casos de Amebiosis la formación de estos abscesos amebianos sólo ocurre en el 1,5 % de los pacientes afectados (31, 71). Es conocido además que en portadores de Amebiosis que tienen una infección con HIV, esta Amebiosis latente puede llegar a ser reactiva, progresiva e invasiva (58, 71).

El diagnóstico de los amebomas es algunas veces dificultoso ya que la sintomatología que los acompaña es altamente variable lo que hace que sea fácilmente confundible con otras patologías como enfermedad de Crohn, abscesos apendiculares, viderticulitis o carcinoma de colon (4, 31, 44, 75).

Si bien las técnicas habitualmente utilizadas de diagnóstico por imágenes como la ultrasonografía, tomografía computada y resonancia magnética tienen una excelente sensibilidad para detectar abscesos y pueden aportar datos importantes como el tamaño, la exacta ubicación y la definición de los bordes, no son útiles para determinar la etiología de los mismos. Las imágenes que brindan para patologías como ameboma hepático, tumores necróticos y abscesos piógenos son idénticas, por lo cual deberían ser complementados con otros estudios que permitan determinar la causa de la enfermedad (42-44, 49, 75).

A pesar de su similitud con diversas enfermedades como tumores o quistes hidatídicos, el diagnóstico diferencial debe ser establecido principalmente con los abscesos piógenos, ya que de su correcta diferenciación dependerá el pronóstico y la estrategia terapéutica que se aplicará (43, 49, 75). Aunque la información epidemiológica muestre que el paciente proviene de una zona endémica de Amebiosis y

presente sintomatología acorde con esa patología, los hallazgos de laboratorio y las imágenes radiológicas obtenidas no son decisivas para determinar una diferencia absoluta entre un absceso amebiano o piógeno. La recuperación de quistes y/o trofozoítos hematófagos de *E. histolytica* en la materia fecal de pacientes con sintomatología hepática fortalece la hipótesis de una etiología amebiana, pero una complicación en el diagnóstico es el hecho de que muchos pacientes con absceso amebiano hepático no tienen la coexistencia de una infección intestinal con *E. histolytica* (49, 75). Además los trofozoítos hematófagos sólo son encontrados en muy bajo porcentaje en los pacientes afectados por lo cual no es un estudio que resulte de utilidad (44, 49).

Si bien uno de los medios de diagnóstico complementarios actuales para el absceso hepático amebiano consiste en la determinación en suero de anticuerpos anti-ameba, para los cuales se disponen de numerosos kits comerciales, presenta el inconveniente de que los niveles circulantes de estos anticuerpos en personas que habitan en zonas endémicas pueden permanecer elevados después de años de una infección con *E. histolytica*, por lo tanto la presencia de estos anticuerpos pueden deberse a una infección pasada y no a la presencia de un absceso actual, lo cual representa una limitación para un diagnóstico certero (4, 42, 43, 75-77).

El hallazgo de trofozoítos de *E. histolytica* o de su ADN en el fluido aspirado en la punción del absceso o más precisamente del material necrótico obtenido de los bordes de la lesión es considerado como una señal para un diagnóstico confirmatorio (8, 42, 43, 49, 75, 76). Trabajos recientes establecen que la detección de ADN del parásito tanto en muestras de sangre, orina o saliva, utilizando la técnica de PCR a tiempo real son altamente sensibles para el diagnóstico de colitis y absceso hepático amebiano, si bien este es un método no invasivo y con una gran sensibilidad presenta el inconveniente de que la mayoría de los laboratorios de diagnóstico clínico no cuentan con este tipo de equipamiento (43, 49).

Algunos autores en trabajos realizados en el 2010 demuestran la presencia de trofozoítos de *E. dispar* en pacientes con abscesos amebianos hepáticos postulando que quizás estos puedan estar asociados o ser potencialmente responsables del daño tisular en intestino e hígado, apoyándose en trabajos previos que sostienen que *E. dispar* podría causar abscesos hepáticos en algunos animales (20, 84, 98).

Las muestras de biopsias pueden ser necesarias para distinguir estos abscesos de un carcinoma o de un adenoma y el hallazgo de trofozoítos en cortes histológicos suele

ser dificultoso debido a la extensa citólisis presente especialmente en casos clínicamente insospechados (31, 49, 98).

En los cortes histológicos los trofozoítos de amebas pueden ser mejor reconocidos mediante la utilización de diversas coloraciones, como la coloración de PAS que muestran una marca en membranas celulares pero no es específica para un determinado tipo celular, así mismo para poder identificar la presencia de estas formas vegetativas no debemos olvidar que es imprescindible contar con personal calificado y entrenado en el área (31, 49, 75). Los anticuerpos que hemos desarrollado podrían resultar de una gran ayuda como herramienta diagnóstica a anátomo-patólogos para ser utilizados en técnicas de inmunohistoquímica, ya que reconocen específicamente trofozoítos de *E. histolytica* y no presentan reacción cruzada con otros trofozoítos de otras especies de amebas, ni de otros parásitos. De esta manera la utilización de estos anticuerpos en este tipo de muestras podrían reemplazar a la utilización de coloraciones inespecíficas y que poseen una sensibilidad inferior para realizar el diagnóstico confirmatorio de esta patología.

4.5 Diagnóstico de la Giardiosis y la Cryptosporidiosis

Como se explicó anteriormente, existen en el mercado diversos productos basados en anticuerpos monoclonales específicos para ensayos de microscopía de inmunofluorescencia (10). Lamentablemente, en el caso de *Giardia* no se conoce el antígeno diana reconocido por esos anticuerpos (10). En nuestro caso particular, luego de haber identificado proteínas específicas presentes en la pared del quiste del parásito (CWP1 y CWP2) (61), pudimos generar proteínas recombinantes que fueron luego utilizadas en la inmunización de ratones para la producción de nuevos anticuerpos monoclonales que las detectan con gran especificidad y sin reacción cruzada con ningún otro componente de la materia fecal. Además, el uso de proteínas recombinantes producidas en bacterias nos permitió generar anticuerpos que detectan epitopes no conformacionales y, por lo tanto, son activos aun sobre proteínas de la pared del quiste que han sido fijadas con diversas sustancias conservantes.

Estos anticuerpos anti-*Giardia* detectan las proteínas del correcto peso molecular de aquellas presentes en pared del quiste (61). Además de *Giardia lamblia*, estos anticuerpos detectan la pared del quiste de *Giardia muris*, la especie del parásito que infecta roedores y que son muy comunes de encontrar en animales de laboratorio

(Figura 35). Por tal motivo, los mismos serán de inmensa utilidad para realizar rastreos en un gran número de muestras simultáneamente y con ello el descarte o tratamiento de ratas y ratones en dónde infecciones intestinales podrían influenciar los resultados de la experimentación. Como *G. muris* no infecta humanos ni animales domésticos (3) queda descartada la reacción cruzada que pudiera existir cuando se trabaja con muestras provenientes de mamíferos superiores.

Respecto de *Cryptosporidium*, los anticuerpos que existen en el mercado son bastante útiles en el reconocimiento del parásito en muestras de materia fecal (10) (Figura 36 muestra la detección del parásito en materia fecal de una rata de experimentación y, como en el caso de *Giardia*, pueden ser útiles para la búsqueda de los mismos en bioterios) . Sin embargo, dado que tanta *Giardia* como *Cryptosporidium* son parásitos que generalmente se transmiten por aguas contaminadas, se han informado casos de reacción cruzada entre los anticuerpos anti-*Cryptosporidium* con algas presentes en aguas para consumo. Nuestros estudios indican que estos anticuerpos no reaccionan con microorganismos presentes en aguas de diversa procedencia por lo que son altamente específicos (Tabla 8 y Figura 37).

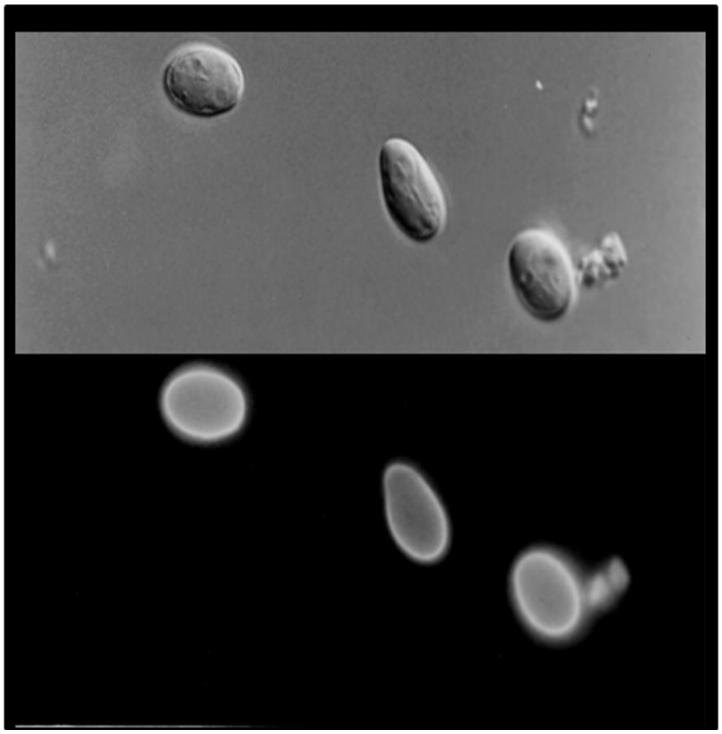


Figura 35. Detección de quistes de *Giardia muris* en materia fecal de animales de experimentación. En el panel superior se muestran tres quistes purificados de materia fecal de una rata Wistar obtenida de un bioterio de animales de experimentación de la Ciudad de Córdoba y su correspondiente inmunofluorescencia utilizando el mAb anti-*Giardia lamblia* CWP2. Dada la reacción cruzada del anticuerpo monoclonal, el mismo pude ser de utilidad para verificar la presencia de este parásito en bioterios utilizados para investigación.

Remarcablemente, nuestros anticuerpos contra este parásito no sólo reconoce todas las especies del mismo que infectan humanos y animales de experimentación (Figura 36), sino que además no tienen reacción cruzada contra ningún microorganismo presente en aguas de lagos, vertientes y ríos que hemos analizado en la Provincia de Córdoba. Esto no deja de aportar información por demás importante para la implementación de nuevas estrategias de control de parásitos en las aguas.

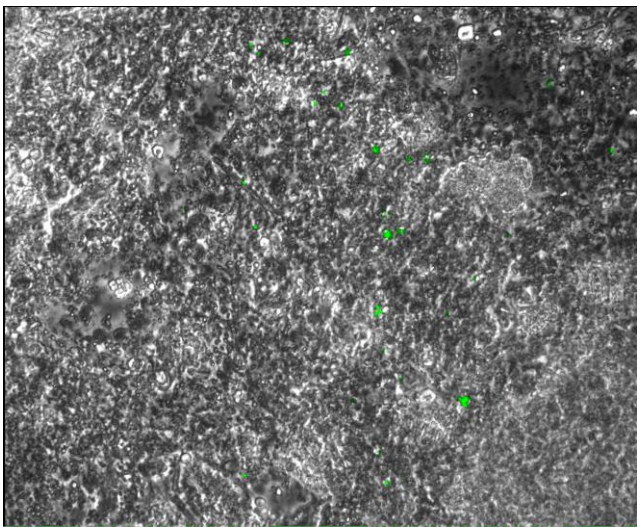


Figura 36. Detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en materia fecal de animales de experimentación. En la fotografía se muestra la superimposición de una imagen de microscopía óptica y la correspondiente a la microscopía de fluorescencia utilizando un mAb anti-*Cryptosporidium* de materia fecal de una rata Wistar obtenida de un bioterio de animales de experimentación de la Ciudad de Córdoba. Los puntos verdes indican los ooquistes que se pueden fácilmente identificar entre los detritus de la materia fecal. Como en el caso de *Giardia*, este mAb pude ser de utilidad para verificar la presencia de este parásito en bioterios utilizados para investigación.

Tabla 8. Reactividad de anticuerpos anti-*Cryptosporidium* con microorganismos de muestras de aguas obtenidas de diversas fuentes de la Provincia de Córdoba.

Muestra de agua	**Reactividad mezcla de mAb anti-*Giardia***	**Reactividad mezcla de mAb anti-*Cryptosporidium***
Lago San Roque	Negativo	Negativo
Río Suquía (La Calera)	Negativo	Negativo
Río Suquía (Córdoba)	Negativo	Negativo
Aguas servidas (Córdoba)	Negativo	Negativo
Agua servidas (Parque)	Negativo	Negativo
Agua de florero	Negativo	Negativo
Agua de natatorio	Negativo	Negativo
Agua de canilla	Negativo	Negativo

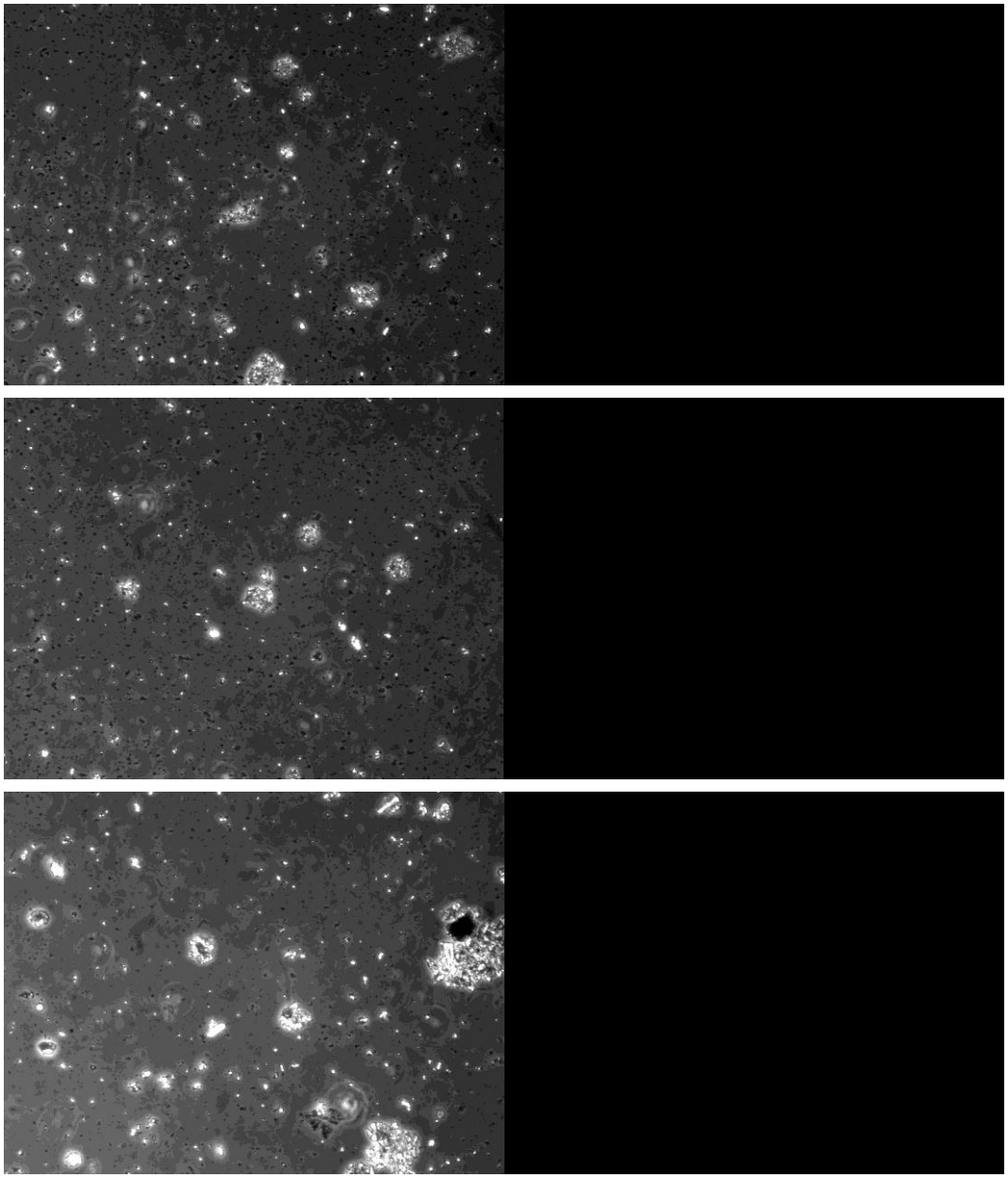


Figura 37. Anticuerpos anti-*Cryptosporidium* no detectan microorganismos en aguas. En la fotografía se muestra una imagen de microscopía de contraste de fases y la correspondiente a la microscopía de fluorescencia utilizando una mezcla de mAbs anti-*Cryptosporidium* en tres muestras de aguas servidas de la Ciudad de Córdoba. Los anticuerpos no tienen reacción cruzada con ningún microorganismo, en especial algas, presentes en aguas de diverso origen.

Es importante destacar que aunque el antígeno que reconocen los anticuerpos monoclonales contra *Cryptosporidium* aun no han sido caracterizados molecularmente, todos los anticuerpos reconocen una única banda en todos los aislamientos estudiados, indicando que esta molécula presente en la pared de ooquistes es altamente conservada e inmunogénica en ratones. Estudios futuros intentaran la purificación de dicha molécula y su caracterización molecular.

4.6 Desarrollo de la primera tira reactiva eficiente para la detección de protozoarios intestinales

La generación de un método simple, barato y eficiente para la detección en muestras de materia fecal de cualquiera (o todos) de los tres protozoarios intestinales más frecuentes es un hecho novedoso y no tiene correlato en la literatura. El único precedente es un sistema de immunocromatografía (10), pero el mismo es más costoso, utiliza equipamiento eléctrico y sólo detecta antígenos presentes en la superficie de trofozoítos de estos tres parásitos y no de sus formas quísticas que son las que encontraremos frecuentemente en la muestras rutinarias de materia fecal y además no tiene la capacidad de discernir entre *E. histolytica*, *E dispar* y *E. moshkovskii*.

Nuestro kit diagnóstico es de fácil utilización ya que sólo es necesario resuspender la materia fecal en una dilución 50/50 con agua corriente y luego lavarla con PBS. En estos primeros ensayos se utilizó un anticuerpo secundario marcado con Peroxidasa para luego revelarlo mediante la producción de color con DAB. Sin embargo, en el futuro planteamos utilizar anticuerpos secundarios marcados con partículas de oro o carbón, lo que evitaría el último paso de la técnica con un tercio de ahorro en el tiempo de ejecución.

Un punto importante a tener en cuenta es la sensibilidad del método. Éste es capaz de reconocer 10 quistes de *Giardia* por ml de materia fecal diluida debido al tamaño de los quistes. Para *Cryptosporidium* el límite de detección es de 50 ooquistes posiblemente debido al escaso tamaño de los ooquistes y por ende, a una menor cantidad de antígeno presente en los mismos. En ambos casos, un anticuerpo se usa para la captura de los mismos sobre el soporte sólido, mientras que un anticuerpo diferente (y que puede reconocer un epitope distinto) se utiliza para la detección. No es este el caso de *E. histolytica*, ya que sólo poseemos un anticuerpo que sirve al mismo tiempo para la captura y para la detección de los quistes, disminuyendo su sensibilidad posiblemente por competencia por el mismo epitope (pese a que el tamaño de los quistes son similares a los de *Giardia*, para *Entamoeba* el límite de detección es de 50 quistes por ml de materia fecal diluida contra 10 de *Giardia*). Esto nos induce a tratar en el futuro de caracterizar molecularmente el antígeno diana, generar nuevos anticuerpos que reconozcan otros epitopes de la molécula y, además, intentar perfeccionar el método de enquistamiento *in vitro* para identificar otros componentes de la pared quística de este parásito para, de nuevo, generar más anticuerpos monoclonales que nos permitan no

sólo aumentar la sensibilidad del test sino también para un mejor rendimiento en la obtención de los controles positivos que el método requiere.

También como un trabajo a futuro hemos pensado en incorporar una cuarta línea de detección para el trofozoíto de *E. histolytica*, con dos anticuerpos diferentes, como en el caso de *Cryptosporidium* y *Giardia*, uno para captura y otro para revelado (ya que por fortuna hemos desarrollados varios anticuerpos contra la forma vegetativa) y de esta manera abarcar en forma completa la detección de todas las formas posibles que pueden estar presentes en materia fecal en esta patología.

4.7 Conclusión

En el desarrollo de este Trabajo de Tesis hemos cumplimentado el Objetivo General y los Objetivos Específicos planteados con anterioridad y hemos demostrado la hipótesis de que mediante la generación y uso de anticuerpos específicos es posible el desarrollo de un método sencillo, específico y sensible para el diagnóstico parasitológico de los tres protozoarios intestinales de mayor prevalencia en el mundo.

CAPÍTULO V

BIBLIOGRAFÍA

1. Adam RD. 1991. The biology of Giardia spp. *Microbiol Rev* 55: 706-32
2. Adam RD. 2000. The Giardia lamblia genome. *Int J Parasitol* 30: 475-84
3. Adam RD. 2001. Biology of Giardia lamblia. *Clin Microbiol Rev* 14: 447-75
4. Ahmad N, Khan M, Hoque MI, Haque R, Mondol D. 2007. Detection of Entamoeba histolytica DNA from liver abscess aspirate using polymerase chain reaction (PCR): a diagnostic tool for amoebic liver abscess. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 33: 13-20
5. Ali IK, Hossain MB, Roy S, Ayeh-Kumi PF, Petri WA, Jr., et al. 2003. Entamoeba moshkovskii infections in children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 9: 580-4
6. Amato Neto V, Braz LM, Di Pietro AO, Modolo JR. 1996. [Oocysts of Cryptosporidium sp in feces: comparison of the modified Kinyoun and Heine methods]. *Rev Soc Bras Med Trop* 29: 575-8
7. Ashbolt NJ. 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* 198: 229-38
8. Bhambhani S, Kashyap V. 2001. Amoebiasis: diagnosis by aspiration and exfoliative cytology. *Cytopathology* 12: 329-33
9. Blessmann J, Ali IK, Nu PA, Dinh BT, Viet TQ, et al. 2003. Longitudinal study of intestinal Entamoeba histolytica infections in asymptomatic adult carriers. *J Clin Microbiol* 41: 4745-50
10. Caccio SM. 2004. [New methods for the diagnosis of Cryptosporidium and Giardia]. *Parassitologia* 46: 151-5
11. Caccio SM, Pozio E. 2006. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 4: 429-43
12. Caccio SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV. 2005. Unravelling Cryptosporidium and Giardia epidemiology. *Trends Parasitol* 21: 430-7
13. Campanati L, Holloschi A, Troster H, Spring H, de Souza W, Monteiro-Leal LH. 2002. Video-microscopy observations of fast dynamic processes in the protozoon Giardia lamblia. *Cell Motil Cytoskeleton* 51: 213-24
14. Cavalier-Smith T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc* 73: 203-66
15. Clark CG, Cunnick CC, Diamond LS. 1992. Entamoeba histolytica: is conversion of "nonpathogenic" amebae to the "pathogenic" form a real phenomenon? *Exp Parasitol* 74: 307-14
16. Clark CG, Diamond LS. 1991. The Laredo strain and other 'Entamoeba histolytica-like' amoebae are Entamoeba moshkovskii. *Mol Biochem Parasitol* 46: 11-8
17. Clark CG, Diamond LS. 1993. Entamoeba histolytica: a method for isolate identification. *Exp Parasitol* 77: 450-5
18. Clark CG, Diamond LS. 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* 15: 329-41
19. Conteh L, Engels T, Molyneux DH. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *Lancet* 375: 239-47
20. Costa AO, Gomes MA, Rocha OA, Silva EF. 2006. Pathogenicity of Entamoeba dispar under xenic and monoxenic cultivation compared to a virulent E. histolytica. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 48: 245-50
21. Chacin-Bonilla L. 1995. [Cryptosporidiosis in humans. Review]. *Invest Clin* 36: 207-50
22. Chen XM, LaRusso NF. 2002. Cryptosporidiosis and the pathogenesis of AIDS-cholangiopathy. *Semin Liver Dis* 22: 277-89
23. de StGroth SF, Scheidegger D. 1980. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Methods* 35: 1-21
24. Diamond LS. 1961. Axenic cultivation of Entamoeba hitolytica. *Science* 134: 336-7
25. Diamond LS, Clark CG. 1993. A redescription of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from Entamoeba dispar Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol* 40: 340-4

26. Dobell C. 1916. Incidence and Treatment of Entamoeba Histolytica Infection at Walton Hospital. *Br Med J* 2: 612-6
27. Eisenberg JN, Lei X, Hubbard AH, Brookhart MA, Colford JM, Jr. 2005. The role of disease transmission and conferred immunity in outbreaks: analysis of the 1993 Cryptosporidium outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *Am J Epidemiol* 161: 62-72
28. Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A. 2000. Pathogenesis of intestinal Amebiosis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 13: 318-31
29. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. 2000. Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 30: 1305-22
30. Feely DE, Erlandsen SL. 1981. Isolation and purification of Giardia trophozoites from rat intestine. *J Parasitol* 67: 59-64
31. Fernandes H, D'Souza CR, Swethadri GK, Naik CN. 2009. Ameboma of the colon with amebic liver abscess mimicking metastatic colon cancer. *Indian J Pathol Microbiol* 52: 228-30
32. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. 2007. Laboratory diagnostic techniques for Entamoeba species. *Clin Microbiol Rev* 20: 511-32, table of contents
33. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. 2007. PCR detection of Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar, and Entamoeba moshkovskii in stool samples from Sydney, Australia. *J Clin Microbiol* 45: 1035-7
34. Fraser D. 1994. Epidemiology of Giardia lamblia and Cryptosporidium infections in childhood. *Isr J Med Sci* 30: 356-61
35. Fraser D, Bilenko N, Deckelbaum RJ, Dagan R, El-On J, Naggan L. 2000. Giardia lamblia carriage in Israeli Bedouin infants: risk factors and consequences. *Clin Infect Dis* 30: 419-24
36. García L. 2007. *Diagnostic medical parasitology*
37. Gatti S, Petithory JC, Ardoin F, Pannetier C, Scaglia M. 2001. Asymptomatic amoebic infection: Entamoeba histolytica or Entamoeba dispar? That is the question. *Bull Soc Pathol Exot* 94: 304-7
38. Gonzales ML, Dans LF, Martinez EG. 2009. Antiamoebic drugs for treating amoebic colitis. *Cochrane Database Syst Rev*: CD006085
39. Gonzalez CR, Isibasi A, Ortiz-Navarrete V, Paniagua J, Garcia JA, et al. 1995. Prevalence of antibodies against Entamoeba histolytica in Mexico measured by ELISA. *Epidemiol Infect* 115: 535-43
40. Gore FM, Bloem PJ, Patton GC, Ferguson J, Joseph V, et al. Global burden of disease in young people aged 10-24 years: a systematic analysis. *Lancet* 377: 2093-102
41. Gray DJ, Forsyth SJ, Li RS, McManus DP, Li Y, et al. 2009. An innovative database for epidemiological field studies of neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e413
42. Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA, Jr. 2003. Amebiosis. *N Engl J Med* 348: 1565-73
43. Haque R, Kabir M, Noor Z, Rahman SM, Mondal D, et al. Diagnosis of amebic liver abscess and amebic colitis by detection of Entamoeba histolytica DNA in blood, urine, and saliva by a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 48: 2798-801
44. Haque R, Mollah NU, Ali IK, Alam K, Eubanks A, et al. 2000. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab Entamoeba histolytica II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol* 38: 3235-9
45. Haque R, Mondal D, Kirkpatrick BD, Akther S, Farr BM, et al. 2003. Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on Entamoeba histolytica infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 69: 398-405
46. Hashimoto T, Nakamura Y, Nakamura F, Shirakura T, Adachi J, et al. 1994. Protein phylogeny gives a robust estimation for early divergences of eukaryotes: phylogenetic place of a mitochondria-lacking protozoan, Giardia lamblia. *Mol Biol Evol* 11: 65-71

47. Hehl AB, Hemphill A. 2006. The use of light- and electron microscopy for studies on the cell- and molecular biology of parasites and parasitic diseases. *Schweiz Arch Tierheilkd* 148: 473-81
48. Herbinger KH, Fleischmann E, Weber C, Perona P, Loscher T, Bretzel G. Epidemiological, clinical, and diagnostic data on intestinal infections with Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar among returning travelers. *Infection*
49. Hughes MA, Petri WA, Jr. 2000. Amebic liver abscess. *Infect Dis Clin North Am* 14: 565-82, viii
50. Hunter PR, Thompson RC. 2005. The zoonotic transmission of Giardia and Cryptosporidium. *Int J Parasitol* 35: 1181-90
51. Jackson GJ, Stoll NR. 1964. Axenic Culture Studies of Entamoeba Species. *Am J Trop Med Hyg* 13: 520-4
52. Jirku M, Valigurova A, Koudela B, Krizek J, Modry D, Slapeta J. 2008. New species of Cryptosporidium Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol (Praha)* 55: 81-94
53. Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, Causer L, Wilkins PP. 2003. Evaluation of three commercial assays for detection of Giardia and Cryptosporidium organisms in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 41: 623-6
54. Kane AV, Ward HD, Keusch GT, Pereira ME. 1991. In vitro encystation of Giardia lamblia: large-scale production of in vitro cysts and strain and clone differences in encystation efficiency. *J Parasitol* 77: 974-81
55. Kelsall BL, Ravdin JI. 1994. Amebiosis: human infection with Entamoeba histolytica. *Prog Clin Parasitol* 4: 27-54
56. Knapp RG, Miller MC. 1992. *Clinical epidemiology and biostatistics*. Baltimore
57. Lauwaet T, Oliveira MJ, De Bruyne G, Cornelissen M, Mareel M, Leroy A. 2000. Do Entamoeba histolytica trophozoites signal via enteric microvilli? *Arch Med Res* 31: S124-5
58. Liu CJ, Hung CC, Chen MY, Lai YP, Chen PJ, et al. 2001. Amebic liver abscess and human immunodeficiency virus infection: a report of three cases. *J Clin Gastroenterol* 33: 64-8
59. Lohia A. 2003. The cell cycle of Entamoeba histolytica. *Mol Cell Biochem* 253: 217-22
60. Lotter H, Mannweiler E, Tannich E. 1993. Crude or recombinant proteins applied to latex agglutination, complement fixation and enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of invasive Amebiosis. *Trop Med Parasitol* 44: 277-80
61. Lujan HD, Mowatt MR, Conrad JT, Bowers B, Nash TE. 1995. Identification of a novel Giardia lamblia cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *J Biol Chem* 270: 29307-13
62. Molyneux DH, Hotez PJ, Fenwick A, Newman RD, Greenwood B, Sachs J. 2009. Neglected tropical diseases and the Global Fund. *Lancet* 373: 296-7
63. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. 2003. Genetic diversity within the morphological species Giardia intestinalis and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol* 3: 29-38
64. Morgan UM, Xiao L, Fayer R, Lal AA, Thompson RC. 2000. Epidemiology and strain variation of Cryptosporidium parvum. *Contrib Microbiol* 6: 116-39
65. Newman RD, Jaeger KL, Wuhib T, Lima AA, Guerrant RL, Sears CL. 1993. Evaluation of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Cryptosporidium oocysts. *J Clin Microbiol* 31: 2080-4
66. Palmer CS, Traub RJ, Robertson ID, Devlin G, Rees R, Thompson RC. 2008. Determining the zoonotic significance of Giardia and Cryptosporidium in Australian dogs and cats. *Vet Parasitol* 154: 142-7
67. Petri WA, Jr., Haque R, Lyerly D, Vines RR. 2000. Estimating the impact of Amebiosis on health. *Parasitol Today* 16: 320-1

68. Pillai DR, Keystone JS, Sheppard DC, MacLean JD, MacPherson DW, Kain KC. 1999. Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar: epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of nonendemicity. *Clin Infect Dis* 29: 1315-8
69. Pinilla AE, Lopez MC, Viasus DF. 2008. [History of the Entamoeba histolytica protozoan]. *Rev Med Chil* 136: 118-24
70. Plutzer J, Karanis P, Domokos K, Torokne A, Marialigeti K. 2008. Detection and characterisation of Giardia and Cryptosporidium in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. *Int J Hyg Environ Health* 211: 524-33
71. Pritt BS, Clark CG. 2008. Amebiosis. *Mayo Clin Proc* 83: 1154-9; quiz 9-60
72. Quinet B. 1996. [Infectious diarrhea in young children and infants]. *Rev Prat* 46: 177-83
73. Ramratnam B, Flanigan TP. 1997. Cryptosporidiosis in persons with HIV infection. *Postgrad Med J* 73: 713-6
74. Rivera WL, Tachibana H, Kanbara H. 1998. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in the epidemiology of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar infections. *Tokai J Exp Clin Med* 23: 413-5
75. Salles JM, Moraes LA, Salles MC. 2003. Hepatic Amebiosis. *Braz J Infect Dis* 7: 96-110
76. Salles JM, Salles MJ, Moraes LA, Silva MC. 2007. Invasive Amebiosis: an update on diagnosis and management. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5: 893-901
77. Santos HL, Peralta RH, de Macedo HW, Barreto MG, Peralta JM. 2007. Comparison of multiplex-PCR and antigen detection for differential diagnosis of Entamoeba histolytica. *Braz J Infect Dis* 11: 365-70
78. Sard BG, Navarro RT, Esteban Sanchis JG. [Non-pathogenic intestinal amoebae: a clinical-analytical overview]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29 Suppl 3: 20-8
79. Sargeaunt PG, Williams JE. 1978. Electrophoretic isoenzyme patterns of Entamoeba histolytica and Entamoeba coli. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72: 164-6
80. Sargeaunt PG, Williams JE, Grene JD. 1978. The differentiation of invasive and non-invasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72: 519-21
81. Schensnovich VB. 1967. [On the life cycle of Entamoeba histolytica]. *Med Parazitol (Mosk)* 36: 712-5
82. Schuurman T, Lankamp P, van Belkum A, Kooistra-Smid M, van Zwet A. 2007. Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of Giardia lamblia in human stool specimens. *Clin Microbiol Infect* 13: 1186-91
83. Shah AA, Shaikh H, Karim M. 1994. Amoebic brain abscess: a rare but serious complication of Entamoeba histolytica infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57: 240-1
84. Shibayama M, Dolabella SS, Silva EF, Tsutsumi V. 2007. A Brazilian species of Entamoeba dispar (ADO) produces amoebic liver abscess in hamsters. *Ann Hepatol* 6: 117-8
85. Smith JM, Meerovitch E. 1985. Primates as a source of Entamoeba histolytica, their zymodeme status and zoonotic potential. *J Parasitol* 71: 751-6
86. Stauffer W, Ravdin JI. 2003. Entamoeba histolytica: an update. *Curr Opin Infect Dis* 16: 479-85
87. Tachibana H, Cheng XJ, Kobayashi S, Matsubayashi N, Gotoh S, Matsubayashi K. 2001. High prevalence of infection with Entamoeba dispar, but not E. histolytica, in captive macaques. *Parasitol Res* 87: 14-7
88. Tasawar Z, Kausar S, Lashari MH. Prevalence of Entamoeba histolytica in humans. *Pak J Pharm Sci* 23: 344-8
89. Thompson RC. 2000. Giardiosis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 30: 1259-67

90. Tovar J, Leon-Avila G, Sanchez LB, Sutak R, Tachezy J, et al. 2003. Mitochondrial remnant organelles of Giardia function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426: 172-6
91. Tzipori S, Griffiths JK. 1998. Natural history and biology of Cryptosporidium parvum. *Adv Parasitol* 40: 5-36
92. van Keulen H, Macechko PT, Wade S, Schaaf S, Wallis PM, Erlandsen SL. 2002. Presence of human Giardia in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for Giardiosis. *Vet Parasitol* 108: 97-107
93. Verweij JJ, Blotkamp J, Brienen EA, Aguirre A, Polderman AM. 2000. Differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar cysts using polymerase chain reaction on DNA isolated from faeces with spin columns. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19: 358-61
94. Walsh JA. 1986. Amebiosis in the world. *Arch Invest Med (Mex)* 17 Suppl 1: 385-9
95. Wright JM, Dunn LA, Upcroft P, Upcroft JA. 2003. Efficacy of antigiardial drugs. *Expert Opin Drug Saf* 2: 529-41
96. Xiao L, Feng Y. 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52: 309-23
97. Ximenez C. 2006. Epidemiology of Amebiosis in Mexico: a molecular approach. *Arch Med Res* 37: 263-5
98. Ximenez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Moran P, et al. Human Amebiosis: breaking the paradigm? *Int J Environ Res Public Health* 7: 1105-20
99. Youn S, Kabir M, Haque R, Petri WA, Jr. 2009. Evaluation of a screening test for detection of giardia and cryptosporidium parasites. *J Clin Microbiol* 47: 451-2
100. Yu X, Van Dyke MI, Portt A, Huck PM. 2009. Development of a direct DNA extraction protocol for real-time PCR detection of Giardia lamblia from surface water. *Ecotoxicology* 18: 661-8

PUBLICACIONES Y TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS DURANTE EL TRANSCURSO DEL TRABAJO DE TESIS

nature Vol 456|11 December 2008|doi:10.1038/nature07585

ARTICLES

Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference

César G. Prucca[1]*, Ileana Slavin[1]*, Rodrigo Quiroga[1], Eliana V. Elías[1], Fernando D. Rivero[1], Alicia Saura[1], Pedro G. Carranza[1] & Hugo D. Luján[1]

Abstract

Giardia lamblia (also called Giardia intestinalis) is one of the most common intestinal parasites of humans. To evade the host's immune response, Giardia undergoes antigenic variation-a process that allows the parasite to develop chronic and recurrent infections. From a repertoire of approximately 190 variant-specific surface protein (VSP)-coding genes, Giardia expresses only one VSP on the surface of each parasite at a particular time, but spontaneously switches to a different VSP by unknown mechanisms. Here we show that regulation of VSP expression involves a system comprising RNA-dependent RNA polymerase, Dicer and Argonaute, known components of the RNA interference machinery. Clones expressing a single surface antigen efficiently transcribe several VSP genes but only accumulate transcripts encoding the VSP to be expressed. Detection of antisense RNAs corresponding to the silenced VSP genes and small RNAs from the silenced but not for the expressed vsp implicate the RNA interference pathway in antigenic variation. Remarkably, silencing of Dicer and RNA-dependent RNA polymerase leads to a change from single to multiple VSP expression in individual parasites.

nature medicine

Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine

Fernando D Rivero[1], Alicia Saura[1], Cesar G Prucca[1], Pedro G Carranza[1], Alessandro Torri[1] & Hugo D Lujan[1]

Abstract

Giardia lamblia is a human intestinal pathogen. Like many protozoan microorganisms, Giardia undergoes antigenic variation, a mechanism assumed to allow parasites to evade the host's immune response, producing chronic and/or recurrent infections. Recently, we found that the mechanism controlling variant-specific surface protein (VSP) switching in Giardia involves components of the RNA interference machinery and that disruption of this pathway generates trophozoites simultaneously expressing many VSPs. Here we use these altered trophozoites to determine the role of antigenic variation in a gerbil model of Giardiosis. Our results show that either primary infection with trophozoites simultaneously expressing many VSPs or immunization with purified VSPs from the transgenic cells protects gerbils from subsequent Giardia infections. These results constitute, to our knowledge, the first experimental evidence that antigenic variation is essential for parasite survival within hosts and that artificial disruption of this mechanism might be useful in generating vaccines against major pathogens that show similar behavior.

Obtención de un anticuerpo monoclonal que distingue *Entamoeba histolytica-dispar* de otras amebas patógenas.

Saura A.[1,2], Carranza PG.[1,2] y Luján HD[1]. [1]Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina, UCC, [2] Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina, UNC. E-mail: asaura@biomed.uncor.edu

El diagnóstico de la Amebiosis, enfermedad causada por *Entamoeba histolytica,* es dificultoso debido a la presencia de cepas patógenas y no patógenas tanto de *E. histolytica* como de *E. dispar*. Habitualmente se realiza visualizando al microscopio óptico los quistes y en algunos casos los trofozoítos en las heces de pacientes. Muy frecuentemente, y por la similitud morfológica con otras amebas, se suele sobre-diagnosticar la enfermedad, dando lugar a tratamientos innecesarios con drogas que poseen evidentes efectos secundarios. Para la obtención de una herramienta con alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la Amebiosis se desarrollaron anticuerpos monoclonales (mAbs) contra quistes aislados de pacientes con disentería amebiana y trofozoítos de *E. histolytica* mantenidos en cultivo. Se analizaron los hibridomas en búsqueda de reactividad por IFA y ELISA contra distintas formas del parásito, siendo el hibridoma 6C12 específico contra quistes y varios otros sólo contra trofozoítos. El mAb 6C12 fue analizado en más de 100 muestras de pacientes infectados con *E. histolytica* y *E. dispar*, caracterizadas por PCR, y fijadas con diferentes métodos dando excelentes resultados en todos los casos. Para verificar la especificidad se testearon más de 50 muestras conteniendo quistes de *Entamoeba coli, E. hartmanni, E. polecki, I. butschli, E. nana, G. lamblia, B. hominis, C. mesnili, C. cayetanensis*, siendo en todos los casos no reactivo. Esta nueva herramienta permite el diagnóstico preciso del complejo *E. histolytica-dispar* y por ende el tratamiento adecuado.

VIII CONGRESO ARGENTINO DE PROTOZOOLOGIA Y ENFERMEDADES PARASITARIAS

NOVIEMBRE DE 2008, ROSARIO ARGENTINA

EP. Desarrollo y caracterización de anticuerpos monoclonales específicos contra ooquistes de *cryptosporidium sp.*

Rivero FD [(1)], **Saura A**, Prucca CG y Lujan HD.

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. FM-UCC. Jacinto Ríos 571. CP 5000.

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria que afecta a innumerables especies del reino animal, incluyendo al hombre. Los agentes causales de esta patología son coccidios del genero *Cryptosporidium,* que infectan el tracto gastrointestinal produciendo fuertes dolores abdominales, diarrea acuosa y deshidratación grave. En humanos es producida principalmente por *C. hominis* y *C. parvum*, aunque en los últimos años se han reportado casos de infección por *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis* y *C. muris*, hecho que demuestra el creciente potencial zoonótico de esta parasitosis.

Las técnicas de diagnóstico actuales poseen una baja eficiencia y son incapaces de reconocer ciertas especies de cryptosporidio*s* infectivos para el hombre.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado 30 anticuerpos monoclonales (mAc) capaces de detectar con alta sensibilidad y especificidad ooquistes de diferentes especies de cryptosporidios. Esto fue posible gracias a que el proceso de inmunización fue realizado con ooquistes purificados a partir de muestras de materia fecal tanto humanas como bovinas. Los cinco mAc que presentaron la mayor intensidad de señal en ensayos de inmunofluorescencia y ELISA, fueron caracterizados por Western blot y desafiados con muestras de materia fecal humanas y de animales infectadas con cryptosporidios.

Estos anticuerpos monoclonales específicos sumados a otros mAc altamente eficientes para detectar quistes de *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*, desarrollados en nuestro laboratorio, constituyen el punto de partida para la creación de un nuevo kit diagnóstico integral de fácil aplicación y alta eficiencia para el monitoreo de las enteroparasitosis de mayor prevalencia a nivel mundial.

VIII CONGRESO ARGENTINO DE PROTOZOOLOGIA Y ENFERMEDADES PARASITARIAS

NOVIEMBRE DE 2008, ROSARIO ARGENTINA

Development of an efficient diagnostic kit for easy and fast detection of pathogenic intestinal parasitic protozoa.

Fernando D. Rivero[1], Alicia Saura[1], Cesar G Prucca[1], Pedro G. Carranza[1],Rachel Chambers[2], Jean Crabtree[3], and Hugo D. Lujan[1]

1 School of Medicine. Catholic University of Córdoba. Córdoba. Argentina.

2 UK Cryptosporidium Reference Unit. Singleton Hospital. Swansea. United Kingdom.

3 Institute of Molecular Medicine. St James' University Hospital. Leeds. United Kingdom.

Giardiosis, Cryptosporidiosis, and Amebiosis are among the most prevalent human enteric infections worldwide. Due to their importance in less-developed countries, these diseases have been recently included in the "Neglected Diseases Initiative" by the WHO. Actually, the diagnostic methods for these pathogens parasites have low efficiency, are laborious, some of them expensive, and demand sophisticated equipments and very well trained personnel. We have developed highly specific monoclonal antibodies (mAb) capable to detect *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*/*dispar* cyst wall molecules and *Cryptosporidium sp.* (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. felis*, *C. cervine* and *C. meleagridis*) oocysts antigens, without cross-reactivity to any other intestinal organisms. These mAbs were tested using genotypified cysts and oocysts by immunofluorescence (IFA), enzyme-immuno (ELISA), dot blot, and Western blot assays. The tests showed high specificity and sensitivity when analyzed in hundreds of stool samples of infected individuals. Using pairs of specific mAbs for *Giardia*, *Entamoeba*, and *Cryptosporidium*, we developed a very inexpensive and easy to use dipstick diagnostic kit. Particular mAbs were applied to a supported membrane for capture of parasites' antigens from tap-water resuspended fecal samples and the presence of the microorganisms was detected by a secondary mAb labeled either with gold particles or horseradish peroxidase. Positive controls consisted in *Giardia* cysts generated in culture, immunopurified *Entamoeba* cyst wall molecules, and *Cryptosporidium parvum* oocysts obtained from infected calves. The method permitted the fast visualization of the presence of the parasites directly from stool samples with high specificity and without the use of any additional equipment, and is being capable to detect as little as ten cysts/oocysts per ml of resuspended stool samples. This dipstick diagnostic kit can be performed in parallel in a high number of samples, do not require experienced personnel, and due to the stability of the reagents, it can be stored in the absence of refrigeration, making this kit a valuable tool for the detection of these parasites in rural and/or poor areas of the world as well as travelers moving to endemic areas where these diarrhea-causing parasites are common.