

APLICACION DEL CARBON INMUNOENSAYO Y LA CONTRAINMUNOELECTROFORESIS AL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE *HELICOBACTER PYLORI*

Viviana Méndez,¹ Francisco Hernández,^{1*} Patricia Rivera,² Jorge Fonseca,³ Manuel Sigarán⁴
y Jorge Miranda⁵

Key words: *Helicobacter pylori*, gastritis, úlcera péptica, carbón inmunoensayo, contrainmunolectroforesis.

RESUMEN

Se adaptaron las pruebas de carbón inmunoensayo (CIE) y contrainmunolectroforesis (CIEF) al diagnóstico serológico de *Helicobacter pylori*. La primera careció de reproducibilidad, contrastando con la alta sensibilidad, sencillez y economía, con que se le ha descrito en el diagnóstico de algunas parasitosis. La CIEF mostró un nivel detectable de anticuerpos contra *H. pylori* sólo en el 33% y el 31% de los pacientes con gastritis o úlcera péptica respectivamente. Ni el CIE ni la CIEF, al menos como fueron descritos en este informe, podrían utilizarse en el diagnóstico serológico de *H. pylori*. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1991; 12(3,4): 3-9).

1 Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

2 Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Nacional de Niños, San José, Costa Rica.

3 Departamento de Patología Experimental, Hospital México, San José, Costa Rica.

4 Departamento de Anatomía Patológica, Hospital México, San José, Costa Rica.

5 Departamento de Gastroenterología, Hospital México, San José, Costa Rica.

* Correspondencia.

INTRODUCCION

La serología en las enfermedades infecciosas representa una opción diagnóstica, especialmente en aquellos casos en los cuales la toma de la muestra lleva algún riesgo, se torna engorrosa o molesta para el paciente. Ese es el caso de *Helicobacter pylori*, cuyo diagnóstico se realiza mediante aislamiento, identificación microscópica o bien mediante las pruebas de ureasa; en todos esos casos se requiere la biopsia gástrica (7). Por ello, se han buscado métodos no invasivos, que obvian la endoscopia, como las pruebas de urea marcada con radioisótopos y las pruebas serológicas (7, 10). Para el diagnóstico serológico de *H. pylori*, se han diseñado varias pruebas, como la fijación de complemento y los ensayos inmuno enzimáticos (1, 7). En ambos casos, el hallazgo de anticuerpos contra esta bacteria se correlaciona con la infección activa; además, los estudios seroepidemiológicos muestran un perfil de anticuerpos en la población, que correlacionan con las tasas de aislamiento del agente (1, 7, 10). Sin embargo, las dos pruebas mencionadas requieren cierto cuidado e implementos que no están disponibles en la mayoría de los laboratorios. Por lo tanto, sería deseable contar con una prueba más simple y efectiva.

En ese sentido, el "Carbón Inmunoensayo" (CIE), parece reunir las condiciones ideales. Es una prueba basada en la

marcación de un complejo antígeno anticuerpo con el carbón de la tinta china, permitiendo su identificación microscópica. Fue descrita en 1971(5) y se ha utilizado en el diagnóstico de *Candida albicans* (6), *Aeromonas salmonicida* (8), *Encephalitozoon cuniculi* (16), *Toxoplasma gondii* (2, 3, 4, 14, 17) y enterobacterias como *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *Vibrio* sp (15).

En Costa Rica, Chinchilla y colaboradores han trabajado esta técnica desde hace varios años en el diagnóstico serológico de toxoplasmosis e incluso han hecho el diagnóstico serológico diferencial entre *Toxoplasma* y *Besnoitia* (4); además, la prueba se adaptó a la microscopía electrónica de rastreo (11).

El objetivo de este trabajo es la evaluación del CIE en el diagnóstico serológico de *H. pylori*, comparándole con los resultados de contraelectroforesis (CIEF), otra prueba relativamente simple y conocida en evaluación serológica.

MATERIAL Y METODOS

Para la preparación de suero anti *Helicobacter*, se inmunizaron dos conejos adultos con una suspensión de *Helicobacter pylori*, obtenida de tres aislamientos recientes. Las bacterias fueron fijadas en formalina al 1% en amortiguador de fosfatos salino (pH 7, 4), siguiéndose el esquema descrito por Hebert, 1978 (9). La efectividad de la inmunización se evaluó mediante contraelectroforesis (CIEF), empleando un lisado del mismo antígeno utilizado para la inmunización. Como control negativo, se utilizó el suero de los conejos antes de la inmunización, así como otros sueros de conejos no inmunizados con este antígeno.

Se analizaron mediante CIEF/50 sueros de pacientes atendidos en la consulta de gastroenterología del Hospital México. Los pacientes habían sido remitidos debido a malestares gástricos. De cada paciente se tomó una biopsia a nivel de antro para el diagnóstico de *Helicobacter*; además de aquellas requeridas para su diagnóstico histopatológico.

El diagnóstico de *H. pylori* se hizo siguiendo la metodología previamente descrita (12, 13).

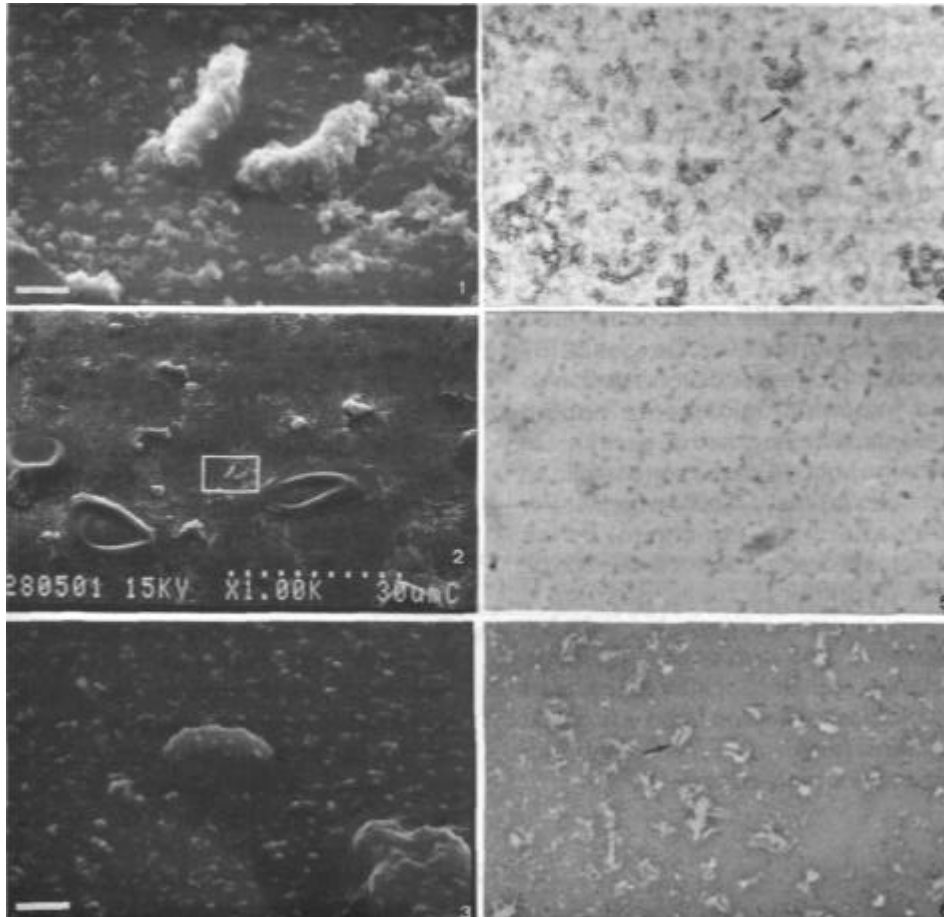
La prueba de CIE se desarrolló siguiendo la descripción de Chinchilla *et al.* (4). Adicionalmente, se incorporó complemento o proteína A (0,25 mg/ml); esta última se mezcló (1:3) con la tinta china 15 minutos antes de aplicarla a la lámina(2).

Para la CIEF, se prepararon geles de agarosa al 0,8 por ciento en amortiguador de barbital (0,082 M, pH 8,4) sobre láminas portaobjetos. En cada lámina se inocularon seis alícuotas de 25 µl de cada suero en estudio y a 4 mm en frente de cada suero se inoculó una dosis similar de antígeno sonicado. Las láminas se sometieron a 110 voltios durante 45 minutos. Se leyeron como positivas aquellas parejas de suero y antígeno entre las cuales se observó una banda de precipitación.

RESULTADOS

En la Figura 1 se ilustran algunos resultados del CIE, tanto positivos como negativos, comparando las observaciones al microscopio de luz con las realizadas al microscopio electrónico de rastreo.

A pesar de obtenerse resultados positivos o negativos francos, estos carecen de reproducibilidad, pues en la evaluación del método, repitiendo la prueba 20



Figuras 1 y 2. Electrografías de rastreo de una prueba de carbón inmunoensayo (CIE) positiva.

Figura 1. Corresponde al recuadro señalado en la Figura 2. Se aprecian dos bacilos impregnados por partículas de carbón, que incluso en la bacteria de la derecha demarcan los flagelos. (barra= 10 μ m).

Figura 3. Corresponde a una preparación negativa, en la cual la bacteria no presenta la densidad de gránulos de carbón observada en las figuras anteriores.

Figuras 4 y 6. Corresponden a fotomicrografías tomadas a 1000x. La Figura 4 es una prueba de CIE positiva, en la cual las bacterias se observan delimitadas por gránulos de carbón.

Figuras 5 y 6. Corresponden a preparaciones negativas, fotografiadas en campo claro y contraste de fases respectivamente. En la primera es difícil observar las bacterias por la falta de contraste de la preparación, debido a que no hay carbón impregnando las bacterias. En contraste de fases, pueden observarse los bacilos, aún sin esa capa de carbón.

veces con cada dilución de los sueros control, se encontró que un mismo suero positivo podía dar resultados negativos, que oscilaban entre el 55 y el 90 por ciento de las veces. Contrariamente, un suero negativo daba resultados positivos entre el 5 y 10 por ciento de las observaciones, situación que no mejoró ni con la adición de complemento ni de proteína A (Cuadro 1).

En el caso de CIEF se encontraron 33 (66 por ciento) positivos. De esos 22 (67 por ciento) correspondieron a pacientes que histopatológicamente habían presentado algún grado de gastritis; sin embargo hubo 11 casos con gastritis en los cuales la prueba resultó negativa. Por otra parte, 9 (69 por ciento) de los positivos provenían de pacientes con úlcera péptica, ya fuese gástrica o duodenal; pero en 4 casos la prueba fue negativa. Los dos casos positivos restantes eran de pacientes sin lesiones histológicas; también hubo dos casos normales negativos. En el Cuadro 2 se resumen los resultados de CIEF.

DISCUSION

La prueba de CIE se ha utilizado para el diagnóstico serológico de algunas infecciones bacterianas y micóticas, pero su mayor aplicación ha sido en parasitología y específicamente en *Toxoplasma* (3, 4, 14, 17). Algunos informes indican que esta prueba y la inmunofluorescencia tienen una sensibilidad similar (14, 16, 17). Sin embargo, otros indican que la sensibilidad de la inmunofluorescencia es superior (2, 3). Pero aún así, su bajo costo y sencillez han estimulado a algunos autores y como mencionábamos previamente se sigue utilizando en algunas parasitosis. No obstante, en el diagnóstico serológico de *H. pylori*, los

resultados son desalentadores, pues aunque hubo reacciones claramente positivas y negativas con los sueros control respectivos, esos resultados no fueron reproducibles. El problema fundamental en esta técnica es la falta de conocimiento respecto al mecanismo exacto de reacción. Posiblemente se trate de una reacción tipo lectina y el responsable de ella sería alguno de los productos que se utilizan para dar cuerpo a la tinta china, entre los que se mencionan gomas y resinas vegetales. Sin embargo, los fabricantes no han estandarizado el tipo de aditivos empleados, pudiendo variar la composición de la tinta de un lote a otro. Ello hace que aún de una determinada marca de tinta china sólo algunos lotes brinden buenos resultados para el CIE (3, 14,16).

En el caso de la CIEF, si bien la prueba permitió detectar la presencia de anticuerpos, posiblemente carece de la sensibilidad necesaria para reconocer los sueros con bajo título, pues en el 33 por ciento de los casos de gastritis y en el 31 por ciento de los pacientes con úlcera la prueba fue negativa. Sin embargo, si se trabajara con anticuerpos dirigidos hacia antígenos específicos; por ejemplo contra la ureasa de esta bacteria, se podrían mejorar los resultados. En todo caso, la CIEF permitió la evaluación del nivel de anticuerpos en los conejos inmunizados. Pero, no representa una herramienta para el diagnóstico serológico como las pruebas inmunoenzimáticas o la fijación de complemento. En ese sentido el diagnóstico ideal es el aislamiento de la bacteria; aunque puede hacerse un diagnóstico presuntivo con la prueba rápida de ureasa o la observación de bacterias curvadas en mucosa gástrica. Ambas opciones tienen una tasa aceptable de valores predictivos, al menos para los casos

CUADRO 1

REPRODUCIBILIDAD DEL CARBON INMUNO ENSAYO EN EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE *H. PYLORI*

Suero (dilución) ^a	Nº de positivos (%)	Nº de negativos (%)
Positivo (1:1)	4 (20)	16 (80)
Positivo (1:10) ^b	9 (45)	11 (55)
Positivo (1:50)	2 (10)	18 (90)
Negativo (1:1) ^c	1 (5)	19 (95)
Negativo (1:10)	3 (15)	17 (85)
Negativo (1:50)	2 (10)	18 (90)

- a. Sueros de conejo post y preinmunización. Cada dilución se ensayó 20 veces.
 b. La adición de complemento o proteína A produjo un 70 y 10% de resultados positivos respectivamente.
 c. La sustitución del suero por amortiguador de fosfatos produjo 5 a 11% de positividad en la prueba estándar y 35 y 24% cuando se utilizó complemento o proteína A, respectivamente.

CUADRO 2

CORRELACION ENTRE EL DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO Y CONTRAINMUNOELECTROFORESIS EN EL DIAGNOSTICO DE *H. PYLORI*

Diagnóstico histopatológico	Contrainmunolectroforesis		
	Positivo (%)	Negativo (%)	Total
Gastritis ^a	22 (67)	11 (33)	33
Úlcera ^b	9 (69)	4 (31)	13
Normal	2 (50)	2 (50)	4

- a. Incluye gastritis tipo B, desde superficiales hasta crónicas atróficas.
 b. Incluye úlceras pépticas duodenales o gástricas.

positivos, aunque en ambos métodos se requiere de una biopsia (13). De ahí la necesidad de buscar métodos que no requieran la gastroscopía.

SUMMARY

The carbon immunoassay (CIA) and contraimmuno-electrophoresis (CIEP) were used for the serological diagnosis of *Helicobacter pylori*. The former lacked reproducibility, contrasting with high specificity, and low cost as described for the diagnosis of some parasitosis. CIEP showed detectable level of antibodies against *H. pylori* only in 33 per cent and 31 per cent of the patients with gastritis or peptic ulcer, respectively. These data suggest a low sensibility of the CIEP to the serological detection of this agent. Neither CIE nor CIEP, at least as described above, could be used to the diagnosis of *H. pylori*.

AGRADECIMIENTO

Se agradece el apoyo del personal del Departamento de Endoscopia Digestiva del Hospital México, en especial a la Sra. Patricia Jones. Además se agradece la colaboración y financiamiento de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

BIBLIOGRAFIA

1. Bartlett, J. G. *Campylobacter pylori*: Fact or fancy? *Gastroenterology* 1988; 22: 9-38.
2. Bergquist, N. R. y Waller, T.: A novel simple immunoassay for rapid detection of human IgG antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol. Meth.* 1983; 61: 339-344.
3. Chalupsky, J.: Application of the India ink immunoreaction for the diagnosis of toxoplasmosis. *Folia Parasitol. Praha.* 1981; 28: 131-136.
4. Chinchilla, M., Reyes, L., Guerrero, O. y Hernández, F.: Specificity of the carbon immunoassay (CIA) test in the diagnosis of *Toxoplasma* infection. En prensa. *J. Vet. Parasitol.* 1992.
5. Geck, P.: India-ink immuno-reaction for the rapid detection of enteric pathogens. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hungría.* 1971; 18:191-196.
6. Geck, P. S. y Novak, E. K.: The India-ink immuno-reaction as a new method for the rapid diagnosis of yeast strains. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hungría.* 1972; 19: 1-5.
7. Graham, D. Y. Evans, D. G. y Evans, D. J.: *Campylobacter pylori*. The organism and it's clinical relevance. *J. Clin. Gastroenterol.* 1989; 11:543-548.
8. Mc Carthy, D. H. y Whitehead, P.: An immuno-india-ink technique for rapid laboratory diagnosis of fish furunculosis. *J. Appl. Bacteriol.* 1977; 42:429-431.
9. Hebert, G. A., Hollis, D. G., Weaver, R. E., Steigerwalt, A. G., Mc Kinney, R. M. y Brenner, D. J.: Sero groups of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter fetus* defined by direct immunofluorescence. *J. Clin. Microbiol.* 1983; 17:529-538.
10. Hernández, F. y Rivera, P.: *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*): II. Revisión de métodos diagnósticos. *Rev. Cost. Cienc. Med.* 1989; 10:57-62.
11. Hernández, F., Chinchilla M. y Reyes, L.: Carbón inmunoensayo: Una alternativa para microscopia electrónica de rastreo. Memorias IV Jornada Microscopia Electrónica, Cumaná, Venezuela. 1990; págs. 152-153.
12. Hernández, F., Rivera, P., Sigarán, M., Aguilar-Ortiz, M., Rodríguez-Jenkins, O. y Murillo, M.: The first cases of *Helicobacter pylori* reported from Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 1990; 38:481-482.
13. Hernández, F., Rivera, P., Sigarán, M. y Miranda, J.: Diagnosis of *Helicobacter pylori*:

Comparison of an urease test, histological visualization of curved bacteria and culture. *Rev. Inst. Med Trop.* São Paulo. 1991; 33:80- 82.

14. Pakes, S. P. y Lai, W. C.: Carbon immunoassay: A simple and rapid serodiagnostic test for feline toxoplasmosis. *Lab. Animals Sci.* 1985; 35: 370-372
15. Temak, G., Wolff, M. y Britt, D. P. Use of the india ink immunoreaction for the rapid detection of enteric pathogens in two

areas of Nigeria. *J. Hyg. Camb.* 1981; 87: 493-499.

16. Waller, T. The India ink immuno reaction. A method for the rapid diagnosis of encephalitozoonosis. *Lab. Animals Sci.* 1977;11: 93-97.
17. Waller, T. y Bergquist, N. R.: Rapid simultaneous diagnosis of toxoplasma and encephalitozoonosis in rabbits by carbon immunoassay. *Lab. Animal Sci.* 1982; 32: 515-517