

302827



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

4
2ej

Modificación del cultivo de Robinson para incrementar la positividad en el diagnóstico de la amibiasis, y su comparación con otras metodologías. Estudio isoenzimático de las cepas obtenidas

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

Enriqueta Patricia de Lachica Giles.

MEXICO, D F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

	Pag.
CAPITULO I	
INTRODUCCION	1
CAPITULO II	
ANTECEDENTES.....	5
CAPITULO III	
PARTE EXPERIMENTAL.....	12
3.1.-Diseño experimental.....	12
3.2.-Material, reactivos y equipo.....	13
3.2.1.-Material biológico.....	13
3.2.2.-Material de laboratorio.....	13
3.2.3.-Reactivos.....	14
3.2.4.-Equipo.....	16
3.2.5.-Preparación de reactivos.....	16
3.3.-METODOLOGIA.....	21
3.4.-ANALISIS ESTADISTICO.....	28
CAPITULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	29
4.1.-Resultados.....	29
4.2.-Discusión.....	48
CAPITULO V	
CONCLUSIONES.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	53

SECRET
NO DISSEM
EXCLUDED FROM
ALL DISSEM

CAPITULO 1

INTRODUCCION

El diagnóstico de amibiasis en el laboratorio, se basa en el hallazgo de amibas en materia fecal (59, 70, 72); o anticuerpos específicos en suero, aunque su presencia no indique forzosamente una parasitosis actual. (22, 27, 58).

Ambos métodos tienen sus propios problemas inherentes. El examen de heces frescas es el método mas utilizado, pero poco confiable (73) por varias razones: 1) Es una técnica de identificación visual, donde se busca la presencia del parásito por diversos métodos como el Faust-Ferreira, Dietil-Eter, Mertiolate-Iodo-Formol y tinción con hematoxilina (59, 77). 2) La aparición intermitente de quistes en heces, 3) La cantidad de estructuras que pueden confundirse con el protozooario (macrófagos que han ingerido células rojas, o bien leucocitos) 4) Sustancias que interfieren en el examen de materia fecal (1, 41) 5) La no identificación correcta de Entamoeba histolytica (debido a que se necesita personal capacitado para distinguir al parásito enquistado o al trofozoito) 6) Así como la correcta preparación de los reactivos y de la muestra, (23 y 73) hacen que se reporten usualmente, muchas falsas-positivas y falsas negativas .

El otro método usado como diagnóstico es el análisis serológico. En pacientes con absceso hepático amibiano, el 85-90% (2, 12 y 27) presentan anticuerpos circulantes, independientemente de la técnica inmunológica empleada. Sin

embargo, pacientes con disentería amibiana y que requieren de hospitalización, sólo del 50-80% presentan anticuerpos, cuando la colonización es por amibas invasoras. (16, y 19)

Los inconvenientes de las pruebas serológicas son múltiples, entre ellos están las variaciones de los títulos de anticuerpos obtenidos al utilizar diferentes antígenos, así como el tipo de metodologías; unas mas sensibles que otras. (8 y 15)

El cultivo de Entamoeba histolytica se ha llevado a cabo desde hace muchos años con el fin de estudiar la amibiasis "in vitro" y elucidar su comportamiento "in vivo" (5, 53, 67, 69), por lo cual, ésta metodología va ganando terreno en esta área, al mismo tiempo que ofrece la posibilidad de utilizarla como una prueba diagnóstica. El inconveniente que presenta este procedimiento es el tiempo de crecimiento (más de 72 hrs.) (57), que lo hace poco práctico.

Los primeros intentos de cultivo suponían que los productos del metabolismo bacteriano favorecían la producción de sustancias químicas para el crecimiento amibiano, ya que se encontraba una disminución en el número de bacterias proporcional al incremento de amibas. (68).

El medio de cultivo se obtenía mediante una solución de tioglicolato, glucosa y almidón, incubados en presencia de una bacteria Gram negativa durante 24 hrs., a 37^o C. El

sobrenadante obtenido, después de centrifugar a 2000 rpm durante 45 min., constituía el medio de cultivo de Shaffer-Frye. (68). Más tarde, otros medios de cultivo fueron descritos sin utilizar bacterias (10, 11, 12, 13, 14, 48); sin embargo, todos ellos adolecían del sentido práctico para utilizarlos como medio diagnóstico, por las características de las sustancias que los componían.

Otro punto importante, aparte del diagnóstico de la amibiasis, es el poder diferenciar una cepa no patógena de una patógena, procedentes de portadores asintomáticos o de pacientes con patología digestiva.

La virulencia de las cepas de Entamoeba histolytica está determinada por diferentes parámetros; entre ellos el estudio de zimodemos (63, 61, 62, 64), con los que se han caracterizado numerosos aislamientos, mediante el patrón electroforético de las enzimas glucosa fosfoisomerasa (E.C.5.3.1.9.), fosfoglucomutasa (E.C.2.7.5.1.), L-malato NADP oxidorreductasa (E.C.1.1.1.40.) y hexoquinasa (E.C.2.7.5.1.).

El patrón muestra que los pacientes con amibiasis invasora, presentan zimodemos distintos de aquellos que son portadores asintomáticos (59). El estudio de estos patrones isoenzimáticos en casos humanos y asociado al cuadro clínico en el momento del aislamiento, podrían ser usados como marcadores bioquímicos para diferenciar entre las subespecies de E. histolytica patógenas y no patógenas (20); sin embargo los experimentos realizados recientemente (39, 40,

71) demuestran que existen cambios de zimodemo de cepas no patógenas a patógenas.

Todos estos esfuerzos por elucidar las necesidades metabólicas, llevaron a investigar las condiciones que determinan la patogenicidad amibiana en el huésped humano (de lo cual se conoce muy poco), y los factores que pueden causar la conversión de Entamoeba histolytica de un parásito inofensivo a un invasor agresivo.

El objetivo de este trabajo fué modificar el medio de cultivo de Robinson, para Entamoeba histolytica, donde se observará un crecimiento rápido, variando los factores de crecimiento en el medio, responsables de la propagación de Entamoeba histolytica, la eficiencia de éste, comparativamente con el medio de Robinson y el método coproparasitoscópico de Faust; así como el estudio del patrón electroforético de este protozoario aislado en el medio de cultivo modificado.

La hipótesis del presente trabajo fué considerar que la modificación de nutrientes en el medio de cultivo, traen como consecuencia un mayor y más rápido crecimiento amibiano.

CAPITULO II

ANTECEDENTES.

Se conoce realmente poco acerca de los factores de crecimiento de los trofozoitos de Entamoeba histolytica, por lo que es necesario determinar los efectos que causan, sobre la propagación del parásito, las sustancias que se encuentran en los complejos biológicos adicionados al medio de cultivo.

Más de una cuarta parte de las enzimas conocidas, contienen iones metálicos fuertemente unidos o requieren de ellos para su actividad. Estos son el fierro, magnesio, manganeso, cobalto y cinc entre otros. Se han hecho estudios sobre el requerimiento de éstos iones para la actividad enzimática en medios de cultivo. (52).

Swith y Meerovith (54) demostraron la importancia del fierro en el crecimiento amibiano.

En cuanto a los cofactores orgánicos requeridos por las enzimas amibianas para desempeñar sus funciones catalíticas, son posiblemente introducidas al interior del trofozoito por un proceso de pinocitosis. (52)

Existen sustancias que los trofozoitos de amibas no sintetizan y otras que sí, pero las cantidades formadas son insuficientes para satisfacer sus requerimientos nutricionales.

Se ha observado que las amibas requieren para su crecimiento, de sustancias como el colesterol, -que también induce un

aumento en la virulencia (75)-, glucosamina -necesaria para el crecimiento de los trofozoítos (18)-, glicerol fosfato (52) y aminoácidos, todos ellos imposibles de ser sintetizados a partir de los carbohidratos, por lo que éstos son incorporados del medio de cultivo.

De igual manera, los precursores de ácidos nucleicos estimulan el crecimiento amibiano (54), como son la adenosina, adenina y AMP en orden creciente de eficacia.

De esta manera, se han efectuado numerosos estudios para conocer completamente los requerimientos nutricionales de las amibas, para de ésta forma, poder establecer un medio de cultivo definido que ayude en el estudio de aspectos metabólicos, inmunológicos y de diagnóstico para el control adecuado de éste parásito.

Los primeros trabajos sobre los intermediarios del metabolismo de Entamoeba histolytica utilizaron un medio difásico con una flora multibacteriana indefinida, pero las condiciones de crecimiento no eran reproducibles. (28).

Dentro de algunos de éstos medios de cultivo, se encuentra el de Shaffer-Frye, el cual se prepara con un estreptobacilo Gram negativo, anaeróbico, el cual se incuba por 24 horas a 37 C en un medio fluido de tioglicolato conteniendo 1.0% glucosa y 1.0% de almidón de arroz. Este cultivo es centrifugado horizontalmente a 2,000 rpm por 45 minutos. El sobrenadante,

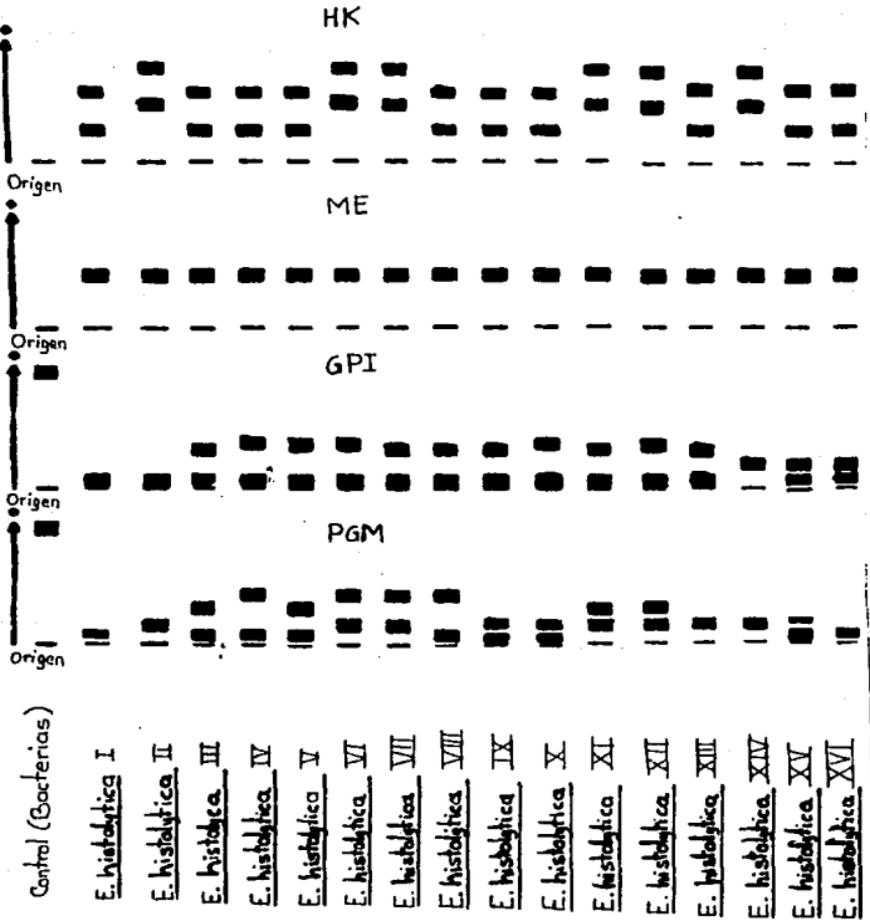
con un contenido de 3 a 7 x 10⁶ bacterias/ml, es recolectado y usado como base del medio. De este fluido se añaden 2.5 ml a tubos de cultivo que contienen 0.1 ml de suero de caballo y 0.7 ml de solución salina al 0.85 % y 1,000 unidades de penicilina G potásica. El medio es entonces inoculado y mantenido en condiciones anaeróbicas.

Las amibas crecían activamente en el medio, con curvas de crecimiento que dependían de la cepa de Entamoeba histolytica utilizada, pero los factores que inducían este crecimiento no estaban bien esclarecidos. (67)

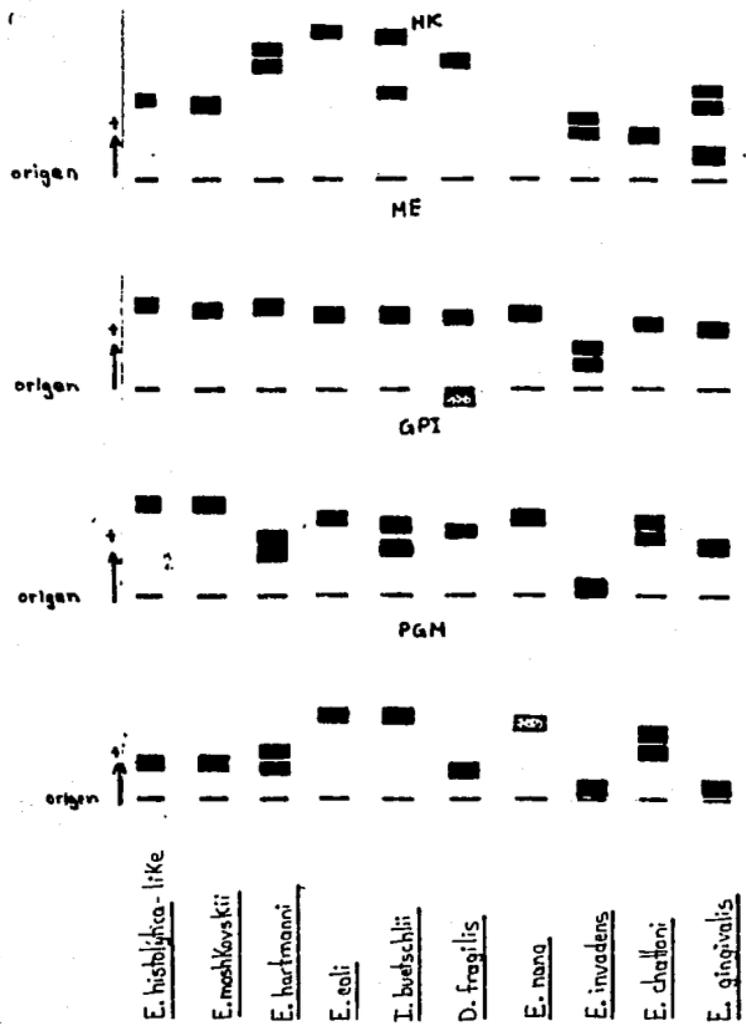
Trabajos ulteriores, utilizaron un medio de cultivo monoxénico, con un asociado bacteriano inhibido conocido, donde las condiciones de crecimiento fueron más fácilmente controlables. (57, 58)

Al obtener una abundante biomasa, es posible clasificar a Entamoeba histolytica en sus diferentes zimodemos por medio de la electroforesis utilizando diferentes isoenzimas para su caracterización. (61)

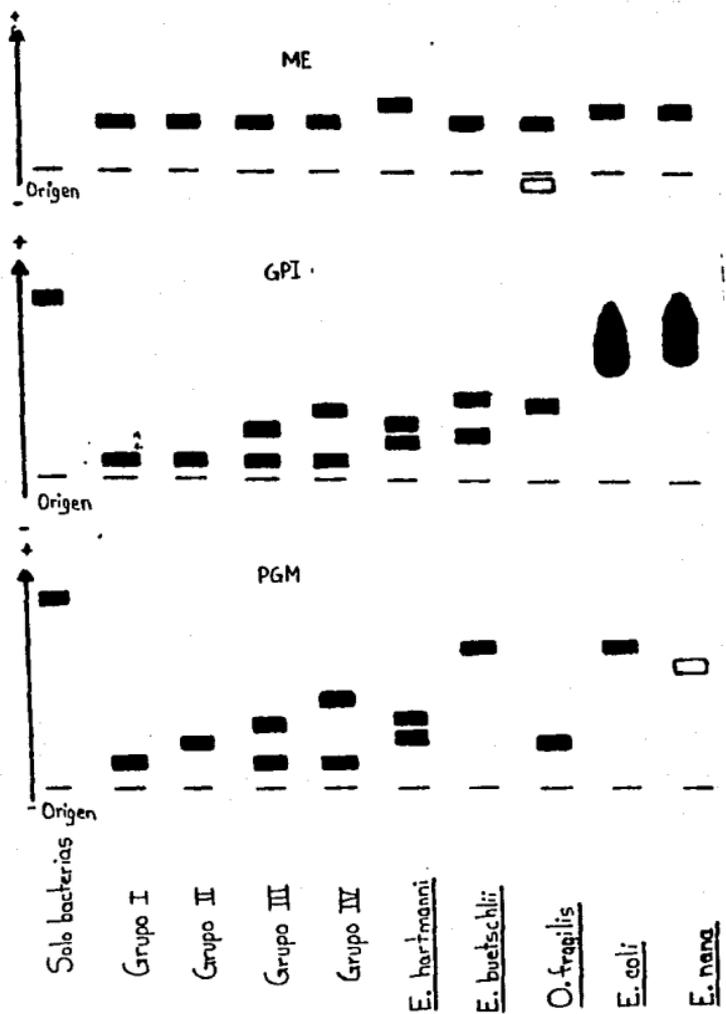
Por otra parte, esta caracterización de isoenzimas de cepas de Entamoeba histolytica, aisladas de casos clínicos, así como de portadores asintomáticos, ha proporcionado la identificación de diferentes zimodemos de amibas tanto patógenas como no patógenas. (61, 62, 63, 64)



Representación diagramática de los zimodemos de E. histolytica



Representación diagramática de zimodemos de otras amibas.



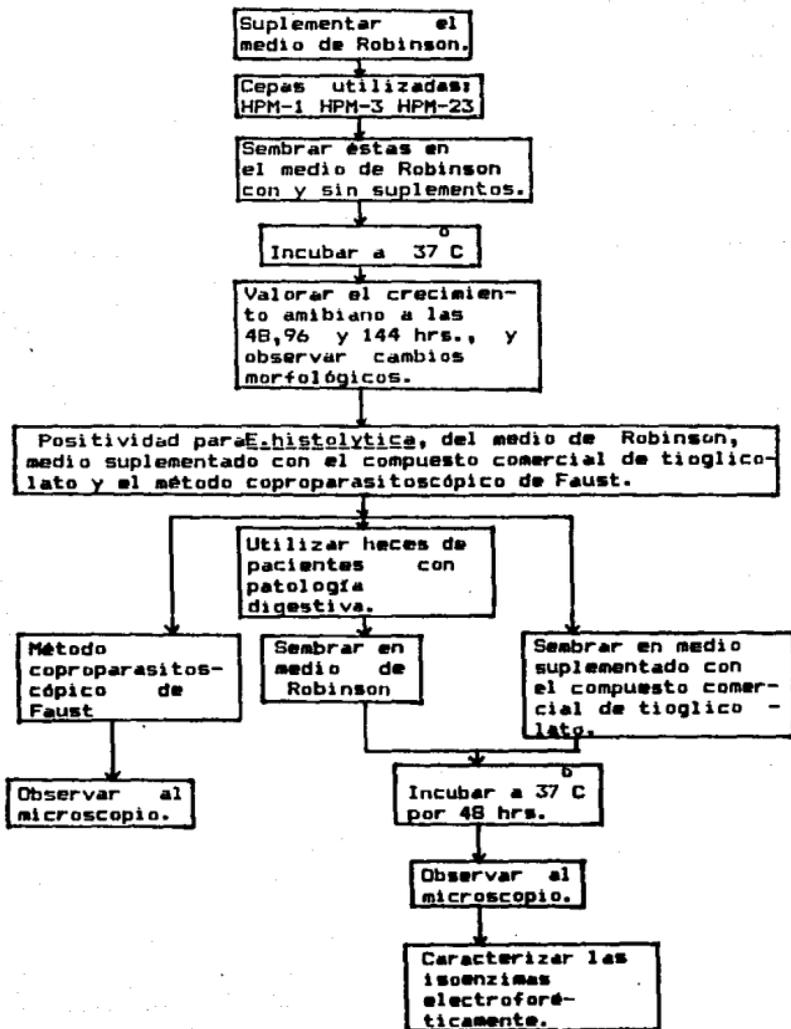
Representación diagramática de la posición de bandas de cada especie de ameba. (por conveniencia se muestra también el control de bacteria).

Las isoenzimas utilizadas para la caracterización de zimodemos, son las siguientes: glucosa fosfato isomerasa (GPI), (E.C.5.3.1.9.), fosfoglucomutasa (PGM), (E.C.2.7.5.1.), L-malato NADP oxidorreductasa (oxalacetato-descarboxilante) (ME), (E.C.1.1.1.40.) y hexocinasa (HK) (E.C.2.7.1.2.) (60).

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL.

3.1.-DISEÑO EXPERIMENTAL.



3.2.-MATERIAL REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1.-MATERIAL BIOLÓGICO

Las cepas de E. histolytica ; HPM-1, HPM-3 Y HPM-23, fueron aisladas de las heces de primates y cultivadas en el medio de Robinson.

Heces de 404 pacientes con patología digestiva, positivas para E. histolytica por los métodos coproparasitoscópico de Faust, medio de cultivo de Robinson y el medio de Robinson suplementado con el compuesto comercial de tioglicolato.

Suero bovino inactivado.

Cepa de Escherichia coli tipo B donada por la Escuela de Medicina Tropical de Londres.

3.2.2.-MATERIAL DE LABORATORIO

Tubos de ensaye.

Frascos alícuotas de 3 ml.

Matraces volumétricos 50,100, y 1000ml.

Pipetas Pasteur.

Telas de alambre para materia fecal.

Gasas húmedas.

Eebudos pequeños.

Tubos de wasserman.

Portaobjetos.

Cubreobjetos.

Mechero de gas.

Recipiente de siracusa.

Tubos de plástico de forma cónica.

Lámina de vidrio 15 x 25 cm.

Matraces erlenmeyer 250 y 2000ml

Probetas 50, 100 y 500 ml.

Vasos de precipitado 250 y 1000 ml.

Pipetas 0.1, 1, 5, y 10 ml.

3.2.3.-Reactivos.

Yoduro de potasio. Q.P. (Bioxon).

Yodo metálico. Q.P. (Bioxon).

Sulfato de zinc. U.S.P. (Bioxon).

Agar bacteriológico. (Bioxon).

Cloruro de sodio. Q.P. (Bioxon).

Alcohol etílico al 96% (J.T. Baker).

Eritromicina.

Peptona de carne. (Bioxon).

Hidróxido de sodio. Q.P. (Bioxon).

Agua destilada.

Almidón de arroz. (Bioxon).

Azul de bromotimol. (Bioxon).

Phtalato de potasio. Q.P. (Bioxon).

Acido cítrico monohidratado. Q.P. (Bioxon).

Fosfato monobásico de potasio. Q.P. (Bioxon).

Sulfato de amonio. Q.P. (Bioxon).

Sulfato de magnesio heptahidratado. Q.P. (Bioxon).

Acido láctico. (J.T. Baker).

Almidón de papa. (Bioxon).

Alcohol polivinílico. Donado por el Instituto Politécnico Nacional.

Cloruro de mercurio. Q.P. (Sigma).

Acido acético glacial. (J.T. Baker).

Glicerina. (Sigma).

Colorante tricrómico de Gomori. (Sigma).

Xilol. (J.T. Baker).

Resina sintética. (Sigma).

Aceite de inmersión. (Sigma).

Tioglicolato sin dextrosa ni indicadores. (Bioxon).

Peptona de caseína. (Bioxon).

Fosfato dipotásico. Q.P. (Bioxon).

Tioglicolato de sodio. Q.P. (Bioxon).

L-cisteína. (Bioxon).

Sulfito de sodio. Q.P. (Bioxon).

EDTA. (Sigma).

Acido caprónico. (Sigma).

Ditioeritritol. (Sigma).

Trizmalato base. (Bioxon).

Acido maléico. (J.T. Baker).

Cloruro de magnesio. Q.P. (Sigma).

Trizmalato-clorhídrico. (Sigma).

NADP. (Sigma).

Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. (Sigma).

Glucosa 1-fosfato. (Sigma).

Nitrozul de tetrazolium. (Sigma).

Metasulfato de fenazina. (Sigma).

3.2.4.-EQUIPO

Centrifuga clínica de 2300 rpa. (Biodynamics I.N.C.)

Microscopio óptico. (Zeiss.)

Autoclave. (Olla de presión Presto con manómetro.)

Horno de temperatura regulable. (Heraeus.)

Incubadora. (Heraeus.)

Centrifugadora con temperatura controlable. (Biodynamics I.N.C.)

Refrigerador. (Kelvinator)

Bomba de vacío. (Adaptado al laboratorio junto con una toma de aire)

Fuente de poder eléctrica. (General Electric.)

Celdas electroforéticas. (Construidas en el Hospital Infantil de México.)

Equipo de enfriamiento para electroforesis. (Construido en el Hospital Infantil de México.)

3.2.5.-PREPARACION DE REACTIVOS.

REACTIVO DEL METODO DE FAUST.

SOLUCION DE SULFATO DE ZINC. Preparar una solución de sulfato de zinc U.S.P. seco granulado, al 33%, con un peso específico de 1.180.

REACTIVOS PARA EL MEDIO DE ROBINSON.

AGAR SALINO. Pesar 1.5 gr de agar bacteriológico BIODON, y 0.7 gr de cloruro de sodio. Aforar a 100 ml con agua destilada y someter a ebullición hasta su total disolución. Esterilizar en frascos con alícuotas de 3 ml a 15 libras y 15 minutos. Dejar solidificar en forma inclinada.

SOLUCION DE ERITROMICINA. Pesar 1 gr de eritromicina, 20 ml de alcohol etílico al 70% y 80 ml de agua destilada. Hacer una dilución al 5% con agua destilada y colocar en frascos con alícuotas de 3 ml.

BACTOPEPTONA. Pesar 20 gr de peptona de carne y aforar a 100 ml con agua destilada. Colocar en frascos con alícuotas de 3 ml y esterilizar a 15 libras por 15 minutos.

SOLUCION DE HIDROXIDO DE SODIO AL 40%. Pesar 40 gr de hidróxido de sodio y aforar a 100 ml con agua destilada.

ALMIDON EN POLVO. Aproximadamente 0.5 gr de almidón de arroz en polvo son utilizados para cada frasco de medio de cultivo.

SOLUCION DE AZUL DE BROMOTIMOL AL 0.04%.

SOLUCION DE PHTALATO DE POTASIO. Pesar 51 gr de phtalato de potasio y disolver en 25 ml de hidróxido de sodio al 40%. Ajustar el pH a 6.2. Disolver en 500 ml de agua destilada estéril y tomar 20 ml de esta solución para disolver en 180 ml de agua destilada estéril.

MEDIO DE CULTIVO R. Pesar 5 gr de cloruro de sodio, 2 gr de ácido cítrico monohidratado, 0.3 gr de fosfato monobásico de potasio, 1 gr de sulfato de amonio, 0.05 gr de sulfato de magnesio heptahidratado, 4 ml de ácido láctico. Agregar 2 ml aproximadamente de la solución de azul de bromotimol al 0.04% y ajustar el pH de 7.2. Disolver en 100 ml de agua destilada y esterilizar a 15 libras por 15 minutos.

MEDIO DE CULTIVO BR. Al medio R agregar un inóculo de la cepa de Escherichia coli tipo B donada por la Escuela de Medicina Tropical de Londres.

MEDIO DE CULTIVO BRS. Al medio de cultivo BR agregar un volumen igual de suero bovino inactivado.

REACTIVOS PARA LA TINCION DE MUESTRAS PARA LA OBSERVACION DE LAS MODIFICACIONES MORFOLOGICAS DE LOS TROFOZOITOS.

FIJADOR PVA (ALCOHOL POLIVINILICO). Se compone de 10 gr de alcohol polivinilico, 125 ml de cloruro de mercurio saturado, 62.5 ml de etanol al 95%, 110 ml de ácido acético glacial y 3 ml de glicerina. Disolver, calentando suavemente a 75^o C, mezclando por rotación hasta obtener una consistencia lechosa.

COLORANTE TRICROMICO DE GOMORI. Pesar 0.6 gr de cromotropo 2R, 0.3 gr de verde claro SF, 0.7 gr de ácido fosfotúngstico. Adicionar 1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de agua destilada.

YODURO DE D'ANTONI MODIFICADO. Pesar 1 gr de yoduro de potasio, 1.5 gr de iodo metálico. Aforar con 100 ml de agua destilada.

ETANOL AL 70% YODADO. A una solución de etanol al 70%, agregar la solución D'Antoni hasta obtener una coloración castaño rojiza.

REACTIVO DE YODO PARA LA APRECIACION CUANTITATIVA DEL CRECIMIENTO AMIBIANO.

YODO YODURADO. Pesar 2 gr de yoduro de potasio, 1 gr de iodo y disolver con 100 ml de agua destilada.

SUPLEMENTOS UTILIZADOS.

COMPUESTO COMERCIAL DE TIOGLICOLATO SIN DEXTROSA NI INDICADORES, BIOXON LOTE OBE-28051. Contiene: Peptona de caseína 2 gr, cloruro de sodio 0.25 gr, fosfato dipotásico 0.15 gr, tioglicolato de sodio 0.06 gr, L-cisteína 0.04 gr, sulfito de sodio 0.02 gr, agar 0.5 gr. Pesar 2.57 gr del compuesto y disolver en 100 ml de agua destilada. Agregar 1.5 gr de agar bacteriológico y esterilizar a 15 libras por 15 minutos. Solidificar en forma inclinada.

FOSFATO DIPOTÁSICO AL 0.15% EN AGAR SALINO.

TIOGLICOLATO DE SODIO AL 0.06% EN AGAR SALINO.

L-CISTEINA AL 0.04% EN AGAR SALINO.

SULFITO DE SODIO AL 0.02% EN AGAR SALINO.

SOLUCIONES ESTABILIZADORAS PARA LISIS DE ESTRUCTURAS AMIBIANAS.

SOLUCION DE EDTA 200mM. Pesar 2.92 gr de EDTA y diluir con 50 ml de agua destilada.

SOLUCION DE ACIDO CAPRICO 200mM. Pesar 1.16 ml de ácido capríco y diluir en 50 ml de agua destilada.

SOLUCION DE DITIOERITRITOL 200mM. Pesar 1.54 gr de ditioeritritol y diluir en 50 ml de agua destilada.

PLACAS PARA LA ELECTROFORESIS DE LOS LISADOS.

GEL DE ALMIDON. Pesar 8.5 gr de almidón de papa hidrolizada y disolver en 100 ml de solución amortiguadora correspondiente

(136 ml de agua y 24 ml de solución amortiguadora de trizmalato pH 7.4). Calentar a ebullición y desgasificar al vacío para posteriormente colocar en laminas de vidrio 15 x 25 cm para el corrimiento, que se lleva a cabo a 8 C durante 3 hrs a 240 mvs y 140 amperes por celda electroforética.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE TRISMALATO 0.1 M pH 7.4. Pesar 12.14 gr de trizma base, 11.61 gr de ácido maléico, 2.03 gr de cloruro de magnesio, 3.72 gr de EDTA, 12.8 ml de hidróxido de sodio 10 N. Ajustar el pH a 7.4 y llevar a 1 lt. con agua destilada.

REACTIVOS PARA LA PREPARACION DE LAS CELDAS ELECTROFORETICAS.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.2 M, pH 7.0. Pesar 17.4 gr de fosfato dibásico de sodio anhidro, 12.1 gr de fosfato monobásico de sodio. Ajustar el pH a 7.0 y llevar a 1 lt con agua destilada.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE TRISMALATO 0.1 M pH 7.4.

REVELADO DE LAS PLACAS ELECTROFORETICAS.

SOLUCION TRIS-CLORHIDRICO 0.3 M pH 8. Pesar 3.03 gr de tris clorhídrico y diluir en 50 ml de agua destilada, ajustando el pH a 8.0 con HCl. Conservar en refrigeración a 4 C.

SOLUCION DE NADP (NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTIDO FOSFATO) (10 mg/ML). Pesar 10 mg de NADP y disolver en 10 ml de agua destilada. Conservar en refrigeración a 4 C.

GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA. (100 UI/ml)

SIGMA CHEMICAL SNT LOUIS MISSOURI. Conservar a 4 C.

COLORURO DE MAGNESIO 1 M. Pesar 20.32 gr de cloruro de magnesio y diluir con 100 ml de agua destilada. Conservar en refrigeración a 4 °C.

GLUCOSA 1 FOSFATO. Disolver 12.5 mg de glucosa 1 fosfato por ml de agua destilada. Conservar a 4 °C.

NITRO AZUL DE TETRAZOLIUM-NTT (5mg/ml). Disolver en 1 ml de agua destilada, 5 mg aproximadamente de nitroazul de tetrazolium.

METOSULFATO DE FENAZINA-PMS. Disolver en 1 ml de agua destilada, 1 mg de PMS.

AGAR AL 1.2%. Calentar hasta ebullición y conservar en tubos de ensayo en alícuotas de 10 ml. Mantener en el congelador hasta su uso.

3.3.-METODOLOGIA

DETERMINACION DEL INCREMENTO DE TROFOZOITOS POR EL SUPLEMENTO DE LAS DIFERENTES SUSTANCIAS QUE COMPONEN EL COMPUESTO COMERCIAL DE TIOLICOLATO, AL MEDIO DE CULTIVO DE ROBINSON.

El medio de cultivo de Robinson es suplementado con el compuesto comercial BIOXON catálogo E-28051 con tioglicolato sin dextrosa ni indicadores; utilizar cada uno de los componentes de este compuesto como suplementos para investigar cuál de estas sustancias es la responsable del incremento en el número de trofozoitos al subcultivar las tres cepas de *E. histolytica*.

METODO DE CULTIVO MONOXENICO DE ROBINSON CON Y SIN SUPLEMENTOS.
SIEMBRA.

A los frascos de agar inclinado, agregar el almidón de papa y en seguida 4 gotas de la solución de eritromicina. Vaciar 3 ml aproximadamente de medio BR. Colocar en éste medio una muestra aleatoria de heces e incubar a 37 C durante 24 hrs.

CULTIVO.

Después de las 24 hrs de incubación retirar el sobrenadante de excremento de los frascos, agregar almidón de papa, 2 gotas de eritromicina, 2 gotas de la solución de peptona y 3 ml del medio BRS. Incubar a 37 C por 48 hrs.

SUBCULTIVO.

Después de 48 hrs, observar al microscopio, la capa que está inmediatamente arriba del almidón, tomar frascos nuevos de agar inclinado y prepararlos, colocando almidón, 2 gotas de eritromicina, 2 gotas de peptona y 3 ml aproximadamente de medio de cultivo BRS. Tomar de nuevo una o dos gotas de la capa que se encuentra por arriba del almidón y traspasar al frasco nuevo ya preparado.

Incubar a 37 C por 48 hrs, después de las cuales hacer una nueva observación y proceder a subcultivar de la misma manera expresada en éste punto.

OBSERVACION Y VALORACION DEL CRECIMIENTO AMIBIANO A LAS 48, 96 Y 144 HRS DE INCUBACION.

Después de 48, 96 y 144 Hrs., de incubación del subcultivo, con una pipeta pasteur tomar una gota del fondo del cultivo y

deposítarla en un portaobjetos. Tomar un volumen igual de yodo yodurado y hacer una extensión. Observar al microscopio y contar la cantidad de amibas obtenidas utilizando objetivo seco débil de un microscopio óptico. Hacer la cuenta de amibas, de acuerdo a la siguiente escala:

- 1+...10 amibas por campo.
- 2+...20 amibas por campo.
- 3+...60 amibas por campo.
- 4+...80 amibas por campo.
- 5+...100 amibas por campo.
- 6+...120 amibas por campo.
- 7+...150 o más amibas por campo.

TINCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA OBSERVACIÓN DE LAS MODIFICACIONES MORFOLÓGICAS DE LOS TROFOZOITOS.

Para la observación microscópica de las modificaciones morfológicas de los trofozoitos, tomar otra muestra del fondo del cultivo y tñirla con el colorante tricrómico de Gomori. El parámetro utilizado para considerar un cambio morfológico, fué el engrosamiento de la membrana.

PROCEDIMIENTO.

- 1.-Barnizar con suero de albúmina un portaobjetos previamente etiquetado y dejar secar.
- 2.-Colocar 1 gota de la muestra de amibas, y adicionar en el mismo lugar 3 gotas de PVA.
- 3.-Hacer una extensión en el portaobjetos.
- 4.-Esperar de 30 a 60 seg, e introducirlo de inmediato a un recipiente de siracusa con alcohol etílico al 70% yodado por 2 minutos.
- 5.-Lavar con etanol al 70% 2 veces por 2 minutos cada uno.

6.-Lavar con etanol al 50% por 2 minutos.

7.-Lavar con agua corriente.

8.-Introducir en el colorante tricrómico de Gomori de 60 a 90 minutos.

9.-Lavar con etanol al 95% por 5 minutos.

10.-Lavar con etanol al 100% por 1 minuto.

11.-Introducir en xilol por 5 minutos.

12.-Montar la muestra en resina sintética y observar al microscopio con objetivo de inmersión.

COMPARACION DE LA POSITIVIDAD DEL MEDIO DE ROBINSON CON Y SIN SUPLEMENTOS, ASI COMO CON EL METODO COPROFARASITOSCOPICO DE FAUST. METODO COPROFARASITOSCOPICO DE FAUST.

1.- Preparar una suspensión fecal con una parte de la muestra de heces (Del tamaño de una nuez pequeña) aproximadamente en 10 partes de agua tibia del grifo.

2.-Filtrar aproximadamente 10 ml de la suspensión a través de una capa de gasa húmeda en un embudo pequeño, recolectar el filtrado en un tubo de Wassermann.

3.-Centrifugar esta suspensión durante 45 a 60 segundos a 2.300 rpm. Decantar el sobrenadante, agregar 2 ó 3 ml de agua, romper el sedimento por agitación y llenar el tubo de agua nuevamente.

4.-Repetir el paso 3 de 2 a 3 veces, hasta que el sobrenadante quede claro.

5.-Decantar el último sobrenadante y agregar 3 ó 4 ml de solución de sulfato de zinc de peso específico 1.150, romper el sedimento y agregar más solución hasta 1 cm del borde del tubo.

6.-Centrifugar durante 45 a 60 segundos a 2300 rpm por espacio de uno o dos minutos.

7.-Con un asa bacteriológica recoger varias muestras de la película superficial y colocarla en un portaobjetos limpio. Añadir una gota de colorante de yodo y agitar la preparación manualmente para asegurar una tinción uniforme.

8.-Colocar un cubreobjetos y observar al microscopio.

DETERMINACION DEL PATRON ISOENZIMATICO EN CEPAS HUMANAS DE E.histolytica OBTENIDAS EN EL MEDIO DE ROBINSON CON Y SIN SUPLEMENTOS.

Determinar el patrón isoenzimático de E. histolytica electroforéticamente, identificando el corrimiento de la enzima fosfoglucomutasa (PGM).

PROCEDIMIENTO PARA OBTENER LOS LISADOS PARA EL CORRIMIENTO ELECTROFORETICO.

Para la caracterización isoenzimática de las cepas de E.histolytica, es necesario lisar el trofozoito amibiano, para dejar libre a la isoenzima a identificar. Las amibas obtenidas del subcultivo que alcanzan una cantidad de quinientos mil o más trofozoitos por mililitro, colocarlas en un tubo de plástico de forma cónica y centrifugar a 350 XG durante 15 minutos. Desechar el sobrenadante y al sedimento adicionar la mezcla estabilizadora, constituida por EDTA, ácido caprónico y ditioeritrol mezclar volúmenes iguales (todos anteriormente preparados a una concentración de 20 mM) la mezcla estabilizadora y el sobrenadante son congelados

durante 24 hrs., a 0 C. Después se centrifuga a 3000 XG a 4 C durante 30 minutos y utilizar el sobrenadante obtenido, para llevar a cabo las determinaciones isoenzimáticas.

CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LOS LISADOS.

- 1.-Marcar la placa del gel para colocar las muestras, espaciadas entre sí por 0.5 cm aproximadamente, a 3 cm por debajo de la mitad de la placa.
- 2.-Colocar las muestras, que son hilos impregnados del lisado amibiano, en las marcas anteriormente hechas.
- 3.-Los hilos deben estar sumergidos en el gel de la placa.

PREPARACION DE LAS CELDAS ELECTROFORETICAS.

- 1.-La celda electroforética consta de 4 divisiones a su ancho, de las cuales, las dos centrales son llenadas a la mitad con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 , y los dos extremos con solución de trisimalato pH 7.4 .
- 2.-Colocar esponjas como puentes de conexión, entre las soluciones de fosfatos y trisimalato.
- 3.-Colocar el refrigerante dentro de la caja electroforética.
- 4.-Acomodar la placa de gel con las muestras sobre el refrigerante y poner en contacto con la solución de trisimalato que está en los extremos, por medio de esponjas humedecidas con la misma solución.
- 5.-Conectar las cajas electroforéticas a una fuente de poder que emite 50 miliamperes por cada caja que se utilice.
- 6.-Cubrir con cristales la placa de gel. (Los cristales no deben tocar el gel.).

7.-Tapar la caja electroforética. (El corrimiento electroforético dura 3 hrs).

En las placas para la electroforesis de los lisados, las muestras son corridas a 8 C, durante 3 horas, a 240 mV y 140 amperes por celda electroforética.

REVELADO E INTERPRETACION DEL PATRON ISOENZIMATICO DE LA ENZIMA FOSFOGLUCOMUTASA (PGM).

Mezclar los reactivos de la siguiente forma y en este estricto orden:

- 1.-Tomar 7 ml de solución trizma HCl, pH 8.0.
- 2.-0.2 ml de solución de cloruro de magnesio 1 M.
- 3.-0.1 ml de NADP.
- 4.-1 ml de solución de glucosa 1-fosfato (12.5 mg/ml)
- 5.-0.1 ml de solución de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. (El frasco reactivo, indica la forma de preparación).
- 6.-1 ml de nitroazul de tetrazolium (5 mg/ml).
- 7.-1 ml de sulfato de fenazina (1 mg/ml).
- 8.-10 ml de agar al 1.2%. Licuar la alícuota de 10 ml en baño maría y agregar a la mezcla reveladora a una temperatura de 40-45 C.

Después de transcurridas 3 hrs de corrimiento, mezclar los reactivos para el revelado de la enzima fosfoglucomutasa (PGM), vertirlos sobre la placa de gel e incubar por 15 minutos a 37 C. Desarrollada la reacción, visualizar la enzima por la presencia del formazán colorido. Las bandas obtenidas, son identificadas de acuerdo a la clasificación de Sargeant. (61).

3.4.-ANALISIS ESTADISTICO.

Las tablas de resultados obtenidas se analizan estadísticamente por probabilidad, para comprobar la independencia de los eventos, así también es demostrado que el muestreo es correcto para la evaluación de los resultados.

La χ^2 se utiliza para probar hipótesis en donde los datos disponibles para el análisis están en la forma de frecuencias. El valor de significancia que se toma es del 95%.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1.-RESULTADOS.

En la FIGURA 1, se muestran los resultados obtenidos, al utilizar la cepa HPM-1 de E. histolytica, donde se observó que la adición de los suplementos al medio de Robinson, no incrementó en forma importante el crecimiento amibiano, excepto cuando se utilizó el compuesto comercial de tioglicolato y el suplemento de tioglicolato por separado, comparativamente al medio de Robinson.

Utilizando la cepa HPM-3 de E. histolytica, se obtienen los resultados que se muestran en la figura 2, donde se observa que no hubo crecimiento al suplementar cisteína y sulfito de sodio después de 144 hrs de incubación. (Es decir, 3 recambios de 48 hrs. cada uno.).

Al cultivar la cepa HPM-23 de E. histolytica en el medio de Robinson con y sin suplementos, se observa un esquema de cultivo diferente, pues la adición de tioglicolato no incrementó en forma importante, el crecimiento amibiano. En cambio, si lo hizo el compuesto comercial, como lo muestra la figura 3.

En relación a los cambios morfológicos de los trofozoitos cultivados en estos medios, se observó un engrosamiento de la membrana cuando se suplementó con tioglicolato y compuesto comercial. Esto se muestra en las figuras 4 Y 5 respectivamente.

Este engrosamiento no se observó en los trofozoitos cultivados en los medios suplementados con cisteína; fosfato dipotásico y sulfito de sodio, así como con el medio de Robinson; presentados por las figuras 6, 7, 8 y 9.

En la determinación de la positividad para *E. histolytica*, al comparar el medio de Robinson, y el método coproparasitoscópico de Faust, el número de heces positivas obtenidas, se presentan en la tabla I. El tratamiento estadístico de éstos resultados, utilizando cuadros tetracóricos, mostraron un valor de $P < 0.001$.

Los resultados de los cultivos positivos con *E. histolytica*, obtenidos al utilizar los medios de Robinson y el suplementado con el compuesto comercial de tioglicolato, se muestran en la tabla II. Al evaluarlos estadísticamente, el valor de probabilidad fué de < 0.001 .

El estudio clínico de los pacientes con trastornos digestivos, mostró que las edades de éstos fluctuaron entre 15 y 65 años. En ellos se muestra que la prevalencia de *E. histolytica*, determinada por los tres métodos se relacionó con la edad y el sexo, en donde el valor más alto, se encuentra en los pacientes de 25 a 44 años y en el sexo femenino, como puede observarse en la tabla III.

En relación a la presencia de síntomas en los pacientes, la tabla IV, muestra predominio del dolor abdominal y diarrea; no se presentaron diferencias estadísticas entre los tres métodos empleados. Esto indicó un correcto muestreo para la evaluación

de los resultados, puesto que los tres métodos, presentaron incidencia semejante en la sintomatología. De tal manera que se pudo determinar que el valor de prevalencia fué de 58.66% cultivando en el medio suplementado con el compuesto comercial de tioglicolato y un valor de $p=0.33$.

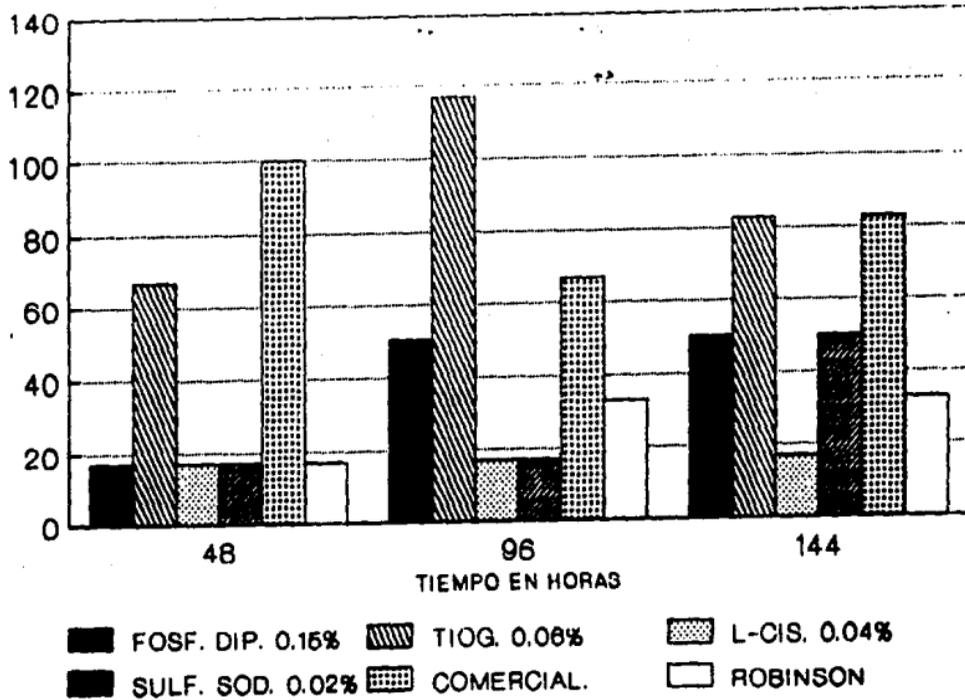
El corrimiento electroforético de la fosfoglucomutasa en los trofozoitos obtenidos de 100 cultivos con el medio de Robinson y el suplementado con el compuesto comercial de tioglicolato se presenta en la tabla V. En ella, se aprecia que la mayor frecuencia se encontró dentro del grupo isoenzimático I con ambos procedimientos de cultivo.

Cuando éstas mismas cepas se cultivaron durante múltiples pases en ambos medios, sólo 12 cepas de E. histolytica, continuaron conservando su patrón electroforético, de zimodemo I, como se muestra en la tabla VII. Las demás cambiaron a otro zimodemo.

CEPA HPM-I

D.W. TROVANO-1-09

32



Comparacion del crecimiento de *Escherichia coli* en el medio de Robinson con y sin suplementos

FIGURA 1

CEPA HPM-3

MILITONES DE BACTERIAS

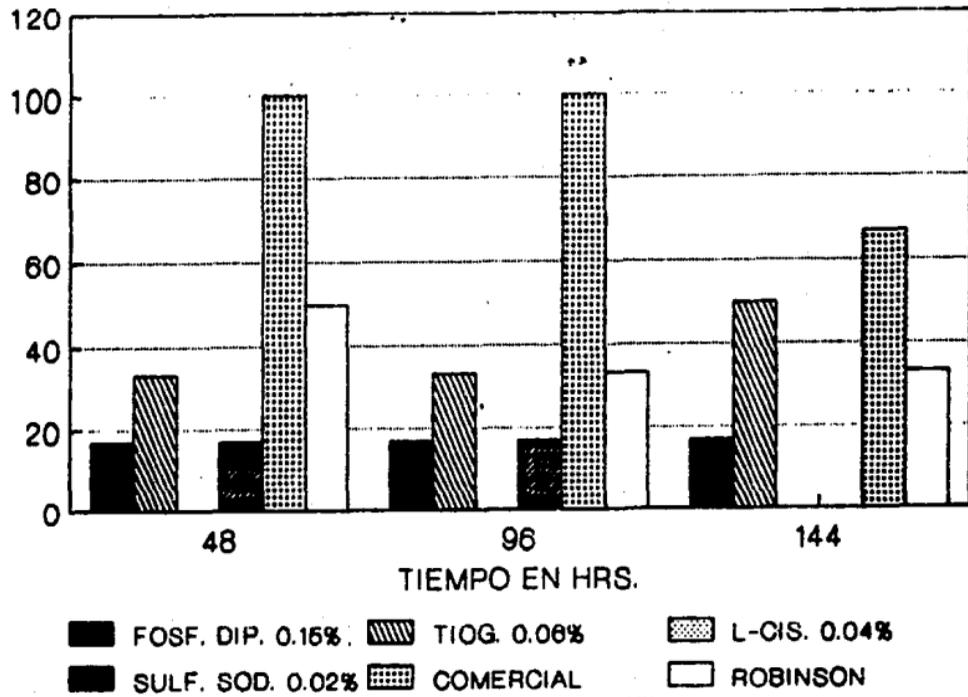


FIGURA 2
Comparación del crecimiento de *E. histolytica* en el medio de Robinson con y sin suplementos, utilizando la cepa HPM-3

CEPA HMP-23

Comparación del crecimiento de *E. histolytica* en el medio de Robinson con y sin suplementos, utilizando la cepa HPM-23

FIGURA 3

34

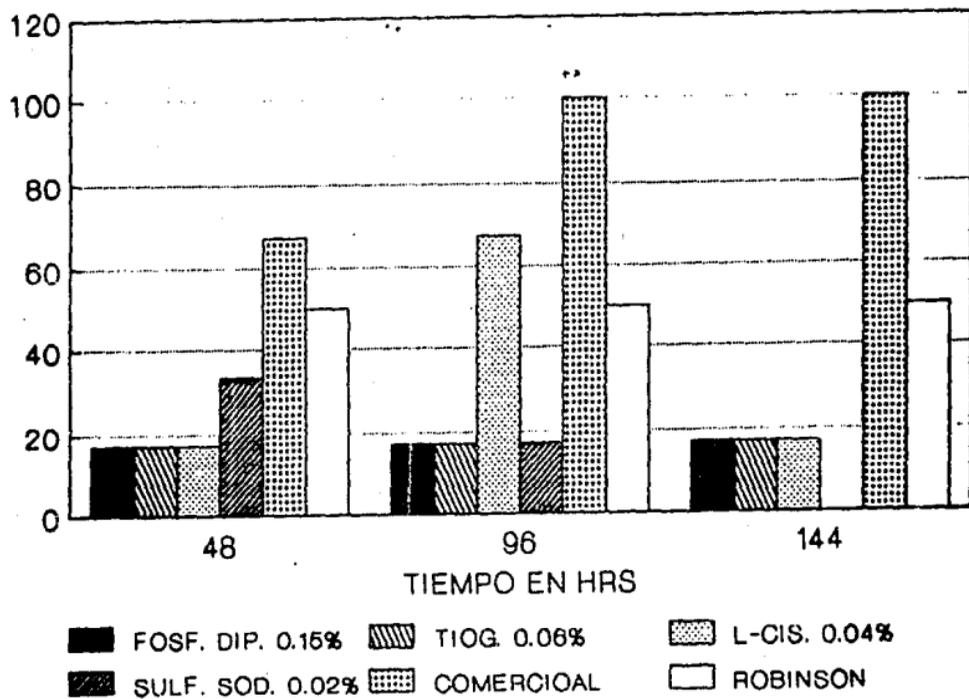


FIGURA 4

Trofozoitos de amibas cultivadas en el medio de Robinson suplementado con el compuesto comercial de tioglicolato. Tinción tricrómica de Gomori de trofozoitos de amibas a las 48 hrs de cultivo.



FIGURA 5

Trofozoitos de amibas, cultivadas con el suplemento de tioglicolato. Tinción tricrómica de Gomori de trofozoitos de amibas a las 48 hrs de cultivo.



FIGURA 6

Trofozoitos de amibas cultivadas con el suplemento de L-cisteína. Tinción tricrómica de Gomori de trofozoitos de amibas a las 48 hrs de cultivo.



FIGURA 7

Amibas cultivadas en el medio suplementado con fosfato dipotásico. Tinción tricrómica de Gomori de trofozoitos de amibas a las 48 hrs. de cultivo.



FIGURA 8

Amibas cultivadas en el medio suplementado con sulfito de sodio. Tinción tricrómica de Gomori de trofozoitos de amibas a las 48 hrs de cultivo.



FIGURA 9

Amibas cultivadas en el medio de Robinson. Tinción tricrómica de Gomori de trofozoítos de amibas a las 48 hrs de cultivo.



TABLA I

Comparación entre la positividad del método coproparasitoscópico y el medio de Robinson a las 48 hrs.

MEDIO DE ROBINSON	METODO COPROPARASITOSCOPICO					
	POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
POSITIVO	54	13.37	116	28.71	170	42.08
NEGATIVO	29	7.18	205	50.74	234	57.92
TOTAL	83	20.55	321	79.45	404	100

$\chi^2=21.46$
 $P<0.001$

TABLA II

Comparación entre la positividad de los medios de Robinson y el suplementado con el compuesto comercial de tioglicolato.

MEDIO COMERCIAL DE TIOGLICOLATO	MEDIO DE ROBINSON					
	POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
POSITIVO	124	130.61	113	127.97	237	142.08
NEGATIVO	46	111.39	121	129.95	167	157.92
TOTAL	170	142.08	234	141.34	404	100

$\chi^2 = 23.66$
 $P < 0.001$

TABLA III

Prevalencia de *E. histolytica* de acuerdo al sexo y edad, determinada por los cultivos positivos de Robinson y el suplementado con el compuesto comercial de tioglicolato y el método coproparasitológico.

EDAD	COPRO(+)				ROBINSON (+)				TIODIGLICOLATO (+)			
	FEM	MASC	N	%	FEM	MASC	N	%	FEM	MASC	N	%
115-24	11	7	18	4.46	30	14	44	10.09	38	16	54	113.57
25-34	28	6	34	8.42	39	17	56	12.7	45	25	70	17.3
35-44	15	4	19	4.7	28	11	39	9.7	32	19	51	12.6
45-54	5	1	6	1.49	7	1	8	1.98	17	6	23	5.69
55-64	3	2	5	1.24	10	6	16	3.96	19	11	30	7.43
65-MAS	1	0	1	0.25	4	3	7	1.73	6	3	9	2.23
TOTALES	53	28	81	20.55	118	52	170	42.08	137	80	217	58.66

TABLA IV

Relación entre la presencia de síntomas y positividad para E. histolytica por el método coproparasitológico y los medios de Robinson y el suplementado con el compuesto comercial de tioglicolato.

DIAGNOSTICO	ROBINSON (+)		ROBINSON (-)		TIOGLICOLADO (+)		TIOGLICOLADO (-)		ICOPRO (+)		ICOPRO (-)	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
DOLOR ABDOMINAL	125	172.53	148	153.25	171	172.15	82	49.1	23	63.86	174	154.01
DIARREA	38	122.35	59	125.21	56	125.63	41	124.55	18	21.69	83	125.62
MOCO	10	5.88	20	8.55	17	7.17	82	9.50	8	9.64	21	6.48
IGNIBRE	0	4.71	28	11.97	17	7.17	20	11.98	7	8.43	15	4.62
TOTALES	170	142.08	234	157.92	227	158.66	167	141.34	83	20.54	321	179.45

TOTAL DE MUESTRAS=404
P=0.32

TABLA V

Frecuencia de patrones isoenzimáticos de las cepas aisladas de heces humanas y subcultivadas en los medios de Robinson y el suplementado con el compuesto comercial de tioglicolato.

F R E C U E N C I A S		
ZIMODEMOS	TIODGLICOLATO	ROBINSON
II	61	74
III	5	0
III	32	13
IV	2	3
<u>E.coli</u>	0	5
<u>E.hartmani</u>	0	5
TOTAL	100	100

TABLA VI

Relación entre los zimodemos obtenidos por la determinación del patrón isoenzimático para la fosfoglucomutasa en 34 cultivos positivos con los medios de Robinson y el suplementado con el compuesto comercial.

ZIMODEMOS	F R E C U E N C I A S	
	TIOSGLICOLATO	ROBINSON
II	18	14
III	2	2
IIII	12	8
IV	2	5
<u>E.coli</u>	0	3
<u>E.hartmani</u>	0	2
TOTAL	34	34

TABLA VII

Número de cepas de *E. histolytica* y de amibas comensales que no cambiaron su patrón isoenzimático, al subcultivarlas en los medios de Robinson y el suplementado con el compuesto comercial de tioglicolato.

IZIMODEMOS	NUMERO DE CEPAS QUE COINCIDEN
I	
II	12
III	1
IIII	2
IIV	1
ITOTAL	16

4.2.-DISCUSION.

Se ha propuesto que el tioglicolato adicionado a cultivos axénicos de E.histolytica, produce una disminución de la movilidad y reproducción de los trofozoítos. La explicación que se da a éste efecto, supone una alteración en la membrana que se relaciona con el deficiente aporte de glucosa, favoreciéndose el enquistamiento. (56)

Sin embargo, ésta sustancia adicionada a cultivos monoxénicos, dió un resultado diferente, con crecimiento inicial muy importante, el cual fué reflejado por el número de trofozoítos obtenidos con las tres cepas estudiadas.

Los resultados obtenidos dieron la impresión de que el fenómeno dependió de la cepa utilizada, debido a que con E.histolytica HPM-1, el crecimiento fué mucho más importante con los medio suplementados con tioglicolato y con el compuesto comercial de tioglicolato, comparativamente con las otras sustancias utilizadas, pudiéndose observar que la L-cisteína por sí sola, no influye de manera importante en el crecimiento de éstos trofozoítos, así como el fosfato dipotásico y el sulfito de sodio.

Sin embargo, la cepa HPM-3 se comportó en forma similar a la anterior, cuando el medio de Robinson fué suplementado con tioglicolato y el compuesto comercial.

Se observaron diferencias en el comportamiento de los trofozoítos de E.histolytica HPM-3 y HPM-23, con respecto a la

cepa HPM-1 , puesto que el crecimiento con el medio suplementado con tioglicolato, fué bajo y con el medio suplementado con el compuesto comercial de tioglicolato, fué alto. Más aún, cuando se suplementó con cisteína, el crecimiento fué nulo.

Se puede decir que la mezcla de todos éstos compuestos conjuntamente con el tioglicolato, incrementaron en forma muy importante el crecimiento de las tres cepas de E.histolytica, haciendo suponer que éste compuesto, puede utilizarse para suplementar el medio de Robinson y así obtener resultados más eficaces que ayuden a un diagnóstico más preciso.

La explicación que se infiere es que éstos, después de un rápido crecimiento, tendieron a enquistarse como lo han sugerido otros autores (37), de tal manera, que esto se reflejó en el engrosamiento de la membrana, suponiendo en ellos un cambio metabólico para iniciar una etapa de resistencia.

De acuerdo a los presentes resultados, la eficiencia del medio de Robinson, comparativamente con el coproparasitoscópico, se demostró por el número de heces positivas (83 contra 170) considerando que se hizo una sólo toma y que los quistes pueden excretarse en cantidades pequeñas intermitentemente, por lo que al analizar una sólo muestra por el método coproparasitoscópico, en el mejor de los casos, sólo se puede identificar del 20 al 40% de los pacientes que están infectados. (36)

Los resultados del cultivo, indicaron que en las mismas

condiciones de muestreo, éste tiene mayores ventajas, de acuerdo a lo expresado anteriormente, pues el método de Robinson, incrementó su positividad a 170 cultivos, es decir 87 resultados positivos más de los obtenidos con el coproparasitoscópico.

Se observa que resultados superiores, ofreció el cultivo de Robinson suplementado con el compuesto comercial de tioglicolato, ya que con éste último, se obtuvo un total de 237 cultivos positivos, de tal forma que se incrementaron 67 muestras más positivas de las anteriores.

Esto no fué sorprendente, debido a que éste es el grupo en donde se ha reportado la tasa más alta de morbilidad en amibiasis. (55)

Los resultados que indican si la composición del medio de cultivo influyó modificando el zimodemo de la cepa y al mismo tiempo, el corrimiento electroforético, se presenta en la tabla VI. En ella se observa que 34 cepas de amibas (que se encuentran contempladas dentro de las 100 cultivos anteriores) cultivadas simultáneamente en los dos medios de cultivo, los cambios en el corrimiento electroforético sólo se presentaron en algunas cepas de E.histolytica, así como en amibas comensales.

Estos resultados, mostraron que la composición de los medios de cultivo sí influye en forma importante con algunas cepas de E.histolytica, puesto que se observaron cambios en los corrimientos de la fosfoglucomutasa.

CAPITULO V

CONCLUSIONES.

El número de trofozoítos obtenidos en los medios de Robinson con y sin suplementos, fué diferente con las tres cepas de amibas.

1.-El medio de cultivo de Robinson suplementado con el compuesto comercial de tioglicolato, aumentó el crecimiento de los trofozoítos de E.histolytica, comparativamente con el medio de Robinson y las demás sustancias que se suplementaron.

2.-El incremento de los trofozoítos en los cultivos, dependió de la cepa de E.histolytica utilizada.

3.-Se observaron cambios morfológicos en la membrana de los trofozoítos, probablemente de tipo metabólico.

4.-En 404 pacientes con trastornos digestivos, el análisis coproparasitoscópico, fué positivo para E.histolytica en 83, con el cultivo de Robinson, 170 y con el suplementado con el compuesto comercial de tioglicolato 237, demostrándose una mayor eficiencia en el último método.

5.-La mayoría de los pacientes parasitados con E.histolytica, fueron de sexo femenino, con edades entre 25 y 44 años, predominando el dolor abdominal y la diarrea.

6.-El patrón electroforético para la fosfoglucomutasa más frecuente, fué el grupo isoenzimático I. Sin embargo, sólo 12 cepas de 34, conservaron su zimodemo I, los demás cambiaron después de múltiples subcultivos.

En éste trabajo, se presenta un medio de cultivo rápido

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Akhtaruzzaman Km, U.Bienzie U, F. Rosenkaimer. R. Guggenmou M. Dietrich. Comparison of different methods for the detection of intestinal protozoa and helminths in stool. Trop. Med. Parasitol. 29:427-31. 1978
- 2.-Ambroiese-Thomas F. Immunofluorescence in diagnostic, postoperative control and seroepidemiology of amebiasis. In Sepulveda B. Diamond Ls. Eds amebiasis Mexico City: Instituto Mexicano del Seguro Social 594-8. 1976
- 3.-Ambrosius K., R. Peña-Alonso. Patología de la amebiasis. Rev. Med. Hosp. Infant. Mex. 43:453-465. 1986.
- 4.-Biagi F. Amibiasis, Enfermedades parasitarias. 3a ed. Edt. LA Prensa medica mexicana. 1980.
- 5.-Boeck W.C., J. Drbohlau. The cultivation of Entamoeba histolytica. Am. J. Hyg. 5:371. 1925.
- 6.-Bracha R., D. Mirelman. Adherence and ingestion of Scherichia coli serotipe O55 by trophozoites of Entamoeba histolytica. Infect. Immun. 40:882-7. 1983.
- 7.-Bradín J. L. Studies on the production of hyaluronidasa by Entamoeba histolytica. Exp. Parasitol. 2:230-5. 1953.
- 8.-Crevenna Pb. Pruebas inmunológicas de amibiasis en un grupo de población de la ciudad de México. Rev. gastroenterol. Mex. 36:100-5. 1971
- 9.-Crevenna Pb. Epidemiología de la amibiasis. Rev. Salud pública de México. 19:411-20. 1977.
- 10.-De La Torre M., R. De La Hoz. R. Couririer, L. Landa, B. Sepulveda. Cultivos axénicos de Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med(MEX) 2(SUPL 1):165, 1971.
- 11.-De La Torre M., R. De La Hoz, L. Filloy. Cultivos axénicos de cepas mexicanas de Entamoeba histolytica HM2:IMSS Y HM3:IMSS. Arch. Inv. Med. (Mex) 5(Supl.2):279, 1974.
- 12.-De La Torre M., L. Landa, B. Sepúlveda. Avances en los métodos para el cultivo de Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med (Mex) 1(Supl 1):89, 1970.
- 13.-Diamond L. S. Techniques for axenic cultivation of Entamoeba histolytica Shaudinn, 1903 and E. histolytica-like amebae. J. Parasit. 54:1047, 1968.
- 14.-Diamond L. S., D. R. Harlow, C. C. Ando Cunnick. A new

medium for the axenic cultivation of E. histolytica and other entamoeba. Trans. P. Soc. Trop. Med. Hyg. 72, 431-432, 1978.

15.-Dupont H. L., L. K. Pickering. Infections of the gastrointestinal tract: Microbiology, pathophysiology, and clinical features. New York: Plenum 1980.

16.-Dysentery epidemic in Central America. Lancet J. 2:969-76.1970

17.-Eaton R. D. P., E. Merovitch, J. W. Costerton. The functional morphology of pathogenicity of Entamoeba histolytica. Trop. med. Parasitol. 64:299-304.1970

18.-Greenberg, J., D. J. Taylor, H. W. Bando,. Glucosamine in the culture of E. histolytica with a mixed bacterial flora. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 5:62-66. 1956.

19.-Healy Gr. Immunologic tools in the diagnosis of amebiasis: Epidemiology in the United States. Rev. Infect. Dis. 8:239-46.1986

20.-Jimenez E., J. Kumate. Correlación clínica de zimodemos de E.histolytica. Arch. Inv. Med. (Mex)13(Supl 3):77, 1982.

21.-Juniper K. Amoebiasis. Clin. Gastroenterol. 73-29.1978

22.-Juniper K. Jr., C. L. Worrel, M. C. Minshew, L. S. Roth, H. Cypert, R. E. Lloyd. Serologic Diagnosis of amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21:157-68.1972

23.-Kagan Ig. Serodiagnosis of parasitic diseases. In: Rose Nr, Friedman H., Eds. Manual of clinical immunology. Washington Kc: American society for microbiology. 573-604.1980

24.-Knigh R. Amoebiasis. Trop. Doct. 4:6-11.1974

25.-Kobiler D., D. Mirelman. Lectin activity in E.histolytica trophozoites. Infect. Immun. 29:221-5, 1980.

26.-Kobiler D., D. Mirelman. Adhesion of E. histolytica trophozoites to monolayers of human cells. J. Infect. Dis. 144:539-46.1981.

27.-Krup Im, S. J. Powell. Antibody response to invasive amebiasis in Durban South Africa. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20:414-20.1971

28.-Kun, E. Y J. L. Bradin. The role of sulfur in the metabolism of E. histolytica. Biochimica et biophysica Acta 11, 312-303. 1953.

29.-Lobel Ho., I. G. Kagan. Seroepidemiology of parasitic

diseases. Ann. Rev. Microbiol. 32:329-47.1978.

30.-Lushbaug W. B., A. F. Hofbaues. A. A. Kairalla. J. R. Cantey F. E. Pitmann. Relationship of cytotoxins of axenically cultivated E. histolytica to virulence. Gastroenterology 86 1488-95, 1984.

31.-Lynch E. C., I. M. Rosenberg, C. Gilter. An ion-channel forming protein produced by Entamoeba histolytica. The embo. Journal 1:801-4.1982.

32.-Martinez-Palomo A. The biology of E. histolytica Research studies Press. 21:515-20.1982.

33.-Martinez Palomo A. La amebiasis como problema de salud pública. Epidemiología. Sector salud. (Mex) 1:29-32, 1986.

34.-Martinez-Palomo A. Biology of E. histolytica in: Human parasitic diseases, Vol. 2. Amebiasis. Elsevier, New York. 1:11-44 1986.

35.-Markell y Voge. Parasitología, Diagnóstico, prevención y tratamiento. 1a ed. Manual Moderno. PP. 20. 1984.

36.-Mathur, T. N., J. Kaur. The frequency of excretion of cyst of Entamoeba histolytica in known cases of non-dysenteric amoebic colitis based on 21 stools examinations. Indian J. Med. 1973

37.-McCunnachie, E. W. The morphology formation and development of cyst of Entamoeba. Parasitology. 59:41.1969

38.-McLaughlin J., y S. Aley. The biochemistry and functional morphology of the E. histolytica. The Journal of Protozoology 32:221-240, 1985.

39.-Mirelman D., R. Bracha, A. Chayen, Austin Kettis, and L. S. Diamond. Entamoeba histolytica: Effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme patterns and virulence. Exp. Parasitol. 62,142-148, 1986.

40.-Mirelman D., P. Bracha, Wexlera., A. Chayen. Changes in isoenzyme patterns of a cloned culture of non-pathogenic E. histolytica during axenization. Infection and immunity. Dec. Am. Soc For micro. 54(3):827-832, 1986.

41.-Mohapatra Tc, S. C. Sanyal, S. Mithal, P. C. Sen, A. K. Agarwal, M. K. Mishra, J. P. Gupta. Evaluation of parasitological and serological techniques in diagnosis of amoebiasis. Trop. MED. Parasitol. 30:53-8.1979

42.-Moss Delynn M., and H. M. Mathews. A fast electrophoretic isoenzyme technique for the identification of invasive and non-invasive E. histolytica with "E. histolytica-LIKE" organism. J. Protozool. 34(3):253, 1987.

- 43.-Muñoz Mdl., J. Calderón, M. Rojkind. The collagenase of E. histolytica. J. Exp. Med. 155:42-51. 1982
- 44.-Neal R. A. Enzymatic proteolysis by E. histolytica. Biochemical characteristics and relationship with invasiveness. Parasitology, 50:531-550 1985.
- 45.-Drozco E. G. Guarneros, A. Martinez Palomo, T. Sanchez. Entamoeba histolytica. Phagocytosis as a virulence factor. J. Exp. Med. 158 1511-21. 1983.
- 46.-Drozco M. E., A. Martinez-Palomo, B. Chavez. Interacción entre E. histolytica y el epitelio cecal del cobayo. Arch. Invest. Med. (MEX) 9(SUPL 1):261-74. 1978.
- 47.-Drozco M. E., A. Martinez-Palomo, A. Gonzalez Robles, G. Guarneros. Las interacciones entre lectina y receptor median la adherencia de E. histolytica a células epiteliales. Relación de la adhesión con la virulencia de las cepas. Arch. Invest. Med. (MEX) 13(SUPL 3); 159-67, 1982.
- 48.-Pérez E., M. De La Torre, R. De la Hoz. Cultivo y establecimiento de nuevas cepas mexicanas de E. histolytica. Arch. Invest. Med. (MEX) 9(SUPL 1):229, 1978.
- 49.-Ravdin J. I. Pathogenesis of disease caused by E. histolytica: Studies of adherence, Secreted toxins, and contact dependent cytolysis. Reviews of infectious diseases. B:No2:247, 1986.
- 50.-Ravdin J. I., C. F. Morphy, R. A. Salata, R. L. Guerrant, E. L. Hewlett. N-Acetyl D-Galactosamine-inhibitable adherence Lectin of E. histolytica. Partial purification and relation to amoevic virulence in vitro. J. Infect. Dis. 151:804-15. 1985.
- 51.-Ravdin J. I., N. Sperelakis, R. L. Gueirant. Effect of ion channel inhibitor on the cytopathogenicity of E. histolytica. J. Infect. Dis. 146:335-40. 1982.
- 52.-Reeves, R. E. Metabolism of E. histolytica. Advances of Parasitology. 1:106-142. 1984.
- 53.-Reeves R. E., H. E. Meleney, W. W. Frye. A modified schaffer-Frye technique for the cultivation of E. histolytica and some observations on it's carbohydrate requirements. Am. J. Hyg. 66:56, 1957.
- 54.-Reeves, R. E. Y B. West. E. histolytica. Nucleic acid precursors affecting axenic growth. Experimental parasitology. 49:78-82. 1980.
- 55.- Reporte de la dirección general de epidemiología. S. S. Morbilidad de la amibiasis por edades de 1982-1985. México, D.F. 1985.

- 56.-Rivera, P., I. Correa-Lemus. Enquistamiento axénico de *E. histolytica*. Arch. Invest. Med. (Mex) 17(Sup 1) 19-23.1983.
- 57.-Robinson, G. L.; The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. TRANS. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 62:185-294, 1968.
- 58.-Root Dm, F. X. Cole, J. A. Williamson. The development and standardization of an E.L.I.S.A. Method for the detection of *E. histolytica* antigens in fecal samples. Arch. Invest. Mex. (Mex) 9(SUPPL 1):203-10.1978.
- 59.-Ruebush Td II, D. D. Juraneck, R. E. Brodsky. Diagnoses of intestinal parasites by state and territorial public health laboratories. 1976. J. Infect. Dis. 138:114-7.1978.
- 60.-Sargeant P. G. Zymodemes expressing possible genetic exchange in *E. histolytica*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 79,86-89, 1985.
- 61.-Sargeant P. G. and S. E. William. Electrophoretic isoenzyme patterns of *E. histolytica* and *E. coli*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72 164-166, 1978.
- 62.-Sargeant P. G., J. E. Williams, R. Bhojnani, J. Kumate, E. Jimenez. A review of isoenzyme characterization of *E. histolytica* with particular reference to pathogenic and non-pathogenic stocks isolated in Mexico. Arch. Invest. Med. (Mex) 13(Supl 3) 89, 1982.
- 63.-Sargeant P. G., J. E. Williams. J. D. Grene. The differentiation of invasive and non-invasive *E. histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:519-21,1978.
- 64.-Sargeant P. G., J. E. Williams, R. A. Neal. A comparative study of *E. histolytica* (NIH:200 HK9 etc.), *E. histolytica* and other morphologically identical amoeba using isoenzyme electrophoresis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 469-474, 1980.
- 65.-Schule H., S. A. Werroes. Weakly acidic protease has a powerful proteolytic activity in *E. histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. 11:293-300, 1984.
- 66.-Sepúlveda B., A. Martinez Palomo. Amebiasis. In Warren K. S. Mahmood Aaf. Ods. Tropical and geographical medicine. New York. 1:305-18.1984.
- 67.-Shaffer J. G., W. W. Frye. Studies on the growth requirements of *E. histolytica*. I.- Maintenance of a strain of *E. histolytica* through one hundred transplants in the absence of an actively multiplying bacterial flora. Am. J. Hyg. 47:214, 1948.

68.-Shaffer J., R. Schuler, I. Key. Studies on the growth requirements of E. histolytica. The ingestion of altered bacterial structures by E. histolytica in the Shaffer-Frye medium. Am. Jour. Hyg. 56:119-138.1954.

69.-Shaffer J. G., H. S. Sienkiweicz, J. A. Washington. The propagation of E. histolytica in tissue-bearing culture without accompanying bacteria or other microorganisms. Amer. Jour. Hyg. 57:366-379.1954.

70.-Smith Jw. Identification of fecal parasites in the special parasitology survey of the College of Am. Pathologist. Am. J. Clin. Patol 72:3713.1979.

71.-Spingarn C. L., M. H. Edelman. Further observations on the use of streptomycin and penicillin in the cultivation of E. histolytica from stools. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1:412, 1952.

72.-Taylor Dn., A. Garcia, A. S. Benson. Comparative evaluation of diagnostic methods in intestinal parasitology. Presented at the annual meeting of the American Society for Tropical Medicine and Hygiene, November 6, 1980

73.-Walsh J. A. Problems in recognition and diagnosis of Amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Reviews of infectious diseases. 8:228,1986.

74.-Wittner M., R. M. Rosenbaum. Role of bacteria in modifying virulence of E. histolytica. Studies of amebae from axenic cultures. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 19:755-761.1970.

75.-Van Ulleit, H. D. M., J. A. F. Opden Kamp, y L. L. M. Van Deenon, lipid auxotrophy and the effect on lipid composition of E. histolytica. J. Protozool. 22:428-432. 1975.

76.-Vinayak V. K., S. Sawhney, P. Jain, S. Chugh, S. R. Naik, R. N. Chakravarti. Virulence of E. histolytica in the rat and it's comparison with the serological responses of amoebic patients. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75:32-36.1985.

79.-Young J. D., T. M. E. Young, L. P. Lu, J. C. Unkeless, Z. A. Cohn. Characterization of membrane pore-forming protein from E. histolytica. J. EXP. MED. 156:1677-90.1982.

78.-Young Kh., S. L. Bullock, D. M. Melvin, C. L. Spruill. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. J. Clin. Microbiol. 10:852-3.1979.