



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA

“CONTROL DE CALIDAD DE CULTIVOS AXENICOS  
DE Entamoeba histolytica”

Tesis que Presenta

LUCIA CHAVEZ DUEÑAS

Para Obtener el Grado de

*BIOLOGO*

Los Reyes Iztacala, Edo. de Méx.,

Julio de 1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en el laboratorio y con la asesoría del Dr. Rubén López-Revilla.

DEDICO ESTA TESIS CON CARIÑO

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a aquellas personas que participaron directamente en la elaboración de este Trabajo de Tesis.

Al Dr. Rubén López Revilla, Jefe del Departamento de Biología Celular, por el apoyo que me brindó para mi ingreso y estancia en este Centro de Investigaciones y a sus valiosos consejos y dirección en la realización de este trabajo.

Al Q.B.P. Rodolfo Gómez Domínguez, magnífico amigo y compañero. Por la orientación y ayuda que me brindó en todo momento, y por sus enseñanzas en el cultivo de amibas y su disposición para ayudarme con su amplia experiencia durante la realización de este trabajo.

También quiero hacer patente mi agradecimiento al Fondo de Becas Beckman por haber apoyado económicamente mi estancia en este Centro de Investigaciones.

A la Comisión Dictaminadora del Trabajo de Tesis: Q.B.P. Bertha Hashimoto Yañes, Biol. Ma. de los Angeles Sanabria Espinosa, Dr. Rubén López Revilla, Q.B.P. Rodolfo Gómez Domínguez y Biol. Martha O. Salcedo Alvarez. Por sus valiosas críticas y opiniones durante la revisión de este trabajo.

## CONTENIDO

|                                 |      |
|---------------------------------|------|
| LISTA DE TABLAS . . . . .       | viii |
| LISTA DE FIGURAS. . . . .       | ix   |
| LISTA DE ABREVIATURAS . . . . . | xi   |
| RESUMEN . . . . .               | xii  |

### INTRODUCCION

|  |    |
|--|----|
| A. Amibiasis . . . . .                               | 1  |
| Definición e Importancia. . . . .                    | 1  |
| Morfología y Ciclo de Vida del Parásito . . . . .    | 2  |
| Diagnóstico . . . . .                                | 3  |
| B. Cultivo de <u>Entamoeba histolytica</u> . . . . . | 3  |
| Cultivo Polixénico. . . . .                          | 4  |
| Cultivo Monoxénico. . . . .                          | 5  |
| Cultivo Axénico . . . . .                            | 6  |
| Características del Medio de Cultivo TPS-1. . . . .  | 7  |
| Mantenimiento de los Cultivos Axénicos. . . . .      | 9  |
| Protocolos de Resiembra . . . . .                    | 10 |

### OBJETIVOS

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| A. Objetivo General. . . . .       | 11 |
| B. Objetivos Particulares. . . . . | 11 |

## MATERIALES

|  |    |
|--|----|
| A. Cepas Amibianas . . . . .                 | 12 |
| B. Componentes del Medio de Cultivo. . . . . | 12 |
| C. Reactivos . . . . .                       | 13 |

## METODOS

|  |    |
|--|----|
| A. Preparación del Medio Basal TP. . . . .                               | 14 |
| B. Preparación y Almacenamiento de Suero . . . . .                       | 15 |
| C. Cultivo Axénico de Amibas . . . . .                                   | 16 |
| Precauciones Durante el Cultivo . . . . .                                | 16 |
| Mantenimiento de las Cepas . . . . .                                     | 17 |
| 1. Procedimiento para el cultivo . . . . .                               | 18 |
| 2. Curvas de crecimiento . . . . .                                       | 19 |
| Parámetros de Crecimiento . . . . .                                      | 20 |
| D. Controles de Calidad. . . . .   | 22 |
| Del Suero . . . . .  | 22 |
| Del Panmede y SP. . . . .  | 22 |
| 1. Eficacia para el cultivo amibiano . . . . .                           | 22 |
| 2. Cuantificación de vitaminas . . . . .                                 | 23 |
| 3. Cuantificación de aminoácidos . . . . .                               | 25 |
| E. Producción del Sustituto de Panmede (SP). . . . .                     | 25 |
| F. Determinación de la Actividad Específica de la Papaína. . . . .       | 26 |
| G. Concentración Óptima de Suero para el Cultivo en Medio TPS-1. . . . . | 27 |

## RESULTADOS

|  |    |
|--|----|
| A. Producción de un Sustituto de Panmede . . . . . | 29 |
| Valoración de la Calidad del Panmede. . . . .      | 29 |

|  |    |
|--|----|
| Obtención de un Sustituto de Panmede (SP) . . . . .                              | 34 |
| Calidad de los Mejores Lotes de SP. . . . .                                      | 42 |
| 1. Curvas de crecimiento amibiano. . . . .                                       | 42 |
| 2. Contenido de vitaminas. . . . .   | 47 |
| 3. Contenido de aminoácidos. . . . .   | 47 |
| Esquema del Proceso Final de Elaboración de SP. . . . .                          | 47 |
| B. Efecto del Suero Sobre el Crecimiento Amibiano . . . . .                      | 52 |
| Variabilidad de los Diferentes Lotes de Suero . . . . .                          | 52 |
| Adaptación Amibiana a un Nuevo Lote de Suero. . . . .                            | 54 |
| Concentración Óptima de Suero . . . . .  | 58 |
| 1. Requerimientos específicos de cepa. . . . .                                   | 58 |
| 2. Dependencia del lote de suero . . . . .                                       | 58 |
| 3. Crecimiento con concentraciones de suero habituales<br>y óptimas . . . . .    | 58 |
| C. Estandarización de los Procedimientos de Cultivo Axénico<br>Amibiano. . . . . | 63 |
| Calidad de Diferentes Lotes de Panmede. . . . .                                  | 63 |
| Calidad de Diferentes Lotes de Suero. . . . .                                    | 67 |
| Parámetros de Crecimiento de las Cepas. . . . .                                  | 67 |
| Protocolos de Resiembra de las Cepas. . . . .                                    | 68 |
| DISCUSION . . . . .  | 69 |
| CONCLUSIONES . . . . .   | 76 |
| REFERENCIAS . . . . .  | 78 |



## LISTA DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| 1. Categorías de Calidad del Panmede . . . . .   | 24 |
| 2. Evaluación de la calidad de distintos lotes de Panmede en cultivos de <u>Entamoeba histolytica</u> HMI . . . . .  | 30 |
| 3. Calidad de 15 lotes de Panmede. . . . .   | 33 |
| 4. Contenido vitamínico en cuatro lotes de extracto de hígado. . .   | 50 |
| 5. Contenido de aminoácidos en cuatro lotes de extracto de hígado.   | 51 |
| 6. Crecimiento de cultivos de trofozoítos de <u>E. histolytica</u> HK9 y HMI en medio TPS-1 suplementado con diferentes lotes de suero .                       | 55 |
| 7. Crecimiento de cuatro cepas de <u>E. histolytica</u> cultivadas en medio TP suplementado con suero de caballo a concentraciones habitual y óptima . . . . . | 64 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| 1. Crecimiento de <u>Entamoeba histolytica</u> HMI en medio TPS-1 preparado con 15 lotes diferentes de Panmede . . . . .   | 32 |
| 2. Incremento relativo en el número de trofozoítos de <u>E. histolytica</u> HMI cultivados en medio TPS-1 preparado con 16 lotes de SP elaborados con hígado bovino y papaína a diferentes concentraciones finales (0.33% a 0.62%), sin activar, o activada con cisteína (50 mM) o ditionita (2.2 mM). . . . .   | 36 |
| 3. Actividad específica de la papaína a pH 8.0 en presencia y ausencia de ditionita . . . . .  | 39 |
| 4. Incrementos relativos en el número de trofozoítos de <u>E. histolytica</u> HMI cultivados en medio TPS-1 preparados con siete lotes de SP secos y no secos, preparados con hígado fresco, mezcla tripsina-quimotripsina (TQ), papaína (68.9 U/100 g de hígado) y ditionita (0.65 g/100 g de hígado) . . . . . | 41 |
| 5. Incrementos relativos en el número de trofozoítos de <u>E. histolytica</u> HMI cultivados en medio TPS-1 preparados con siete lotes de SP preparados con hígado, mezcla tripsina-quimotripsina (TQ) y papaína (68.9 U/100 g de hígado). . . . .   | 44 |
| 6. Incrementos relativos en el número de trofozoítos de <u>E. histolytica</u> HMI cultivados en medio TPS-1 preparado con siete lotes de SP elaborados con hígado fresco y tripsina-quimotripsina (TQ) en presencia y ausencia de papaína . . . . .  | 46 |
| 7. Curvas de crecimiento de <u>E. histolytica</u> HMI, obtenidas con los dos mejores lotes de SP y el lote de Panmede usado como control . . . . .   | 49 |

|  |    |
|--|----|
| 8. Diagrama de flujo del proceso de producción de SP . . . . .   | 53 |
| 9. Rendimiento relativo de <u>E. histolytica</u> HM2 en diferentes concen-<br>traciones de un nuevo lote de suero de caballo durante tres<br>resiembras sucesivas. . . . .   | 57 |
| 10. Rendimiento relativo de cinco cepas de <u>E. histolytica</u> cultiva-<br>das en medio TP suplementado con diferentes concentraciones<br>del mismo lote de suero . . . . .  | 60 |
| 11. Rendimiento de trofozoítos de <u>E. histolytica</u> HM2 cultivados<br>en dos lotes de suero de caballo a diferentes concentraciones .  | 62 |
| 12. Cinéticas de crecimiento de cuatro cepas de <u>E. histolytica</u><br>cultivadas en medio TPS-1 suplementado con suero de caballo<br>a las concentraciones habituales y óptimas de suero para cada<br>cepa. . . . . | 66 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|           |   |
|-----------|---|
| ATCC      | American Type Culture Collection  |
| BC        | Lotes de SP procesados en el Departamento de Biología Celular   |
| BT        | Lotes de SP procesados en el Departamento de Biotecnología  |
| CINVESTAV | Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN   |
| I         | Incremento. Número de veces que aumentó el número de amibas de un cultivo con respecto al inóculo   |
| SCAEC     | Sección de Control Analítico y Evaluación de Calidad  |
| SDS       | Dodecil sulfato de sodio  |
| SP        | Sustituto de Panmede (extracto de hígado bovino) preparado en nuestro laboratorio   |
| $t_D$     | Tiempo de duplicación. Es el tiempo que tarda en duplicarse la población amibiana de una cepa en fase log   |
| TCA       | Acido tricloroacético   |
| TP        | Medio basal monofásico para el cultivo axénico de trofozoítos del género <u>Entamoeba</u> . Su denominación deriva de las iniciales de sus componentes esenciales, Tripticasa (T) y Panmede (P) |
| TPS       | Medio TP suplementado con suero normal de caballo   |
| TQ        | Mezcla enzimática que contiene tripsina y quimotripsina   |
| $\mu$     | Tasa de duplicación. Fracción de incremento en la masa de amibas que ocurre en el lapso de una hora   |

## RESUMEN

El cultivo axénico de Entamoeba histolytica se usa ampliamente en la investigación en amibiasis experimental. La precisión y el rigor con que se realicen estos estudios de investigación depende a su vez de la calidad de los cultivos axénicos empleados. Con el objeto de estandarizar y optimizar la calidad de los cultivos axénicos de E. histolytica, hemos evaluado la capacidad que para sustentar el crecimiento amibiano tienen los dos principales componentes del medio TPS-1, el Panmede (extracto de hígado bovino importado de Inglaterra) y el suero de origen animal, cuya calidad es inconsistente de lote a lote. También nos propusimos, como otro objetivo de este trabajo, desarrollar un proceso de elaboración de un extracto de calidad consistente, que pudiese sustituir al Panmede (SP) como componente del medio TPS-1. Al evaluar 15 lotes de Panmede, corroboramos que su calidad variaba ampliamente y por primera vez obtuvimos datos cuantitativos al respecto. Mediante la elaboración de 32 lotes diferentes de SP, que se fueron produciendo con procesos a los que se introdujeron modificaciones sucesivas basadas en la calidad de los lotes previos, desarrollamos un procedimiento para obtener extracto de hígado bovino que confiere al medio TPS-1 las siguientes cualidades: a) soporta el crecimiento amibiano a inóculos menores, b) da mayores rendimientos, c) permite mayores velocidades de crecimiento y d) es consistente de lote a lote, por lo que puede reemplazar con ventaja al Panmede como componente

del medio TPS-1. Al analizar el efecto del suero sobre el crecimiento de E. histolytica (cepas HM1, HM2, HM3, HM38 y HK9) encontramos que el crecimiento amibiano depende del lote de suero y que tanto la concentración óptima de suero como los parámetros de crecimiento son característicos de cepa y también dependen del lote de suero. Por lo tanto, la calidad del cultivo axénico de E. histolytica depende principalmente de: a) la calidad de los lotes de Panmede, b) la calidad de los lotes de suero y c) la concentración de suero. Por lo tanto, la estandarización de los protocolos de resiembra específicos para cada cepa de E. histolytica sólo puede lograrse con lotes definidos de Panmede y suero de buena calidad; para establecerlos proponemos un método basado en los resultados y experiencias obtenidos con este trabajo.

## INTRODUCCION

### A. Amibiasis

#### Definición e Importancia

La amibiasis es una infección de humanos causada por el protozoario parásito Entamoeba histolytica. La forma clínica más frecuente de amibiasis es la intestinal. Ocasionalmente los parásitos atraviesan la mucosa intestinal y distribuyéndose por vía hematógena dan lugar a la forma extraintestinal que casi siempre provoca graves complicaciones (Brandt y Pérez-Tamayo 1970).

La amibiasis ocurre aproximadamente en el 10% de la población mundial en todas las regiones del planeta, por lo que se le considera la más cosmopolita de todas las enfermedades parasitarias (Markell y Voge 1984). Su frecuencia puede determinarse objetivamente a través de estudios serológicos (i. e., detección de anticuerpos contra E. histolytica en el suero). El porcentaje de sueros humanos con niveles detectables de tales anticuerpos en una extensa encuesta serológica realizada en México fue de 5.95; esta encuesta incluyó a 19,442 individuos residentes en localidades distribuídas en todas las regiones geoeconómicas y geomórficas de la República Mexicana; en todas las poblaciones estudiadas hubo casos positivos, lo que demuestra la endemicidad del padecimiento en el territorio nacional (Gutiérrez y col. 1976).

## Morfología y Ciclo de Vida del Parásito

Durante el ciclo de vida de E. histolytica se producen cambios en la morfología que generan las dos formas del parásito: el quiste y el trofozoíto.

El trofozoíto es una célula dinámica y pleomórfica cuya forma y movilidad es extremadamente sensible a los cambios fisicoquímicos del ambiente; se desplaza unidireccionalmente por medio de protrusiones (lobopodios) del citoplasma que pueden formarse en cualquier punto de la superficie del organismo. En general, los trofozoítos tienen forma elongada, presentan lobopódios y una región uroide. Poseen una membrana plasmática y su citoplasma se divide en dos porciones: una zona externa o ectoplasma hialino que da lugar a los pseudópodos, y una zona interna o endoplasma, finamente granular y con vacuolas. El trofozoíto es uninucleado y se multiplica por fisión binaria. Las amibas obtenidas directamente del hígado o de lesiones intestinales son generalmente mayores midiendo entre 20 a 40  $\mu\text{m}$ , mientras que las de heces no disentéricas o de cultivos miden 7 a 30  $\mu\text{m}$  (Martínez-Palomo 1982; Brandt y Pérez-Tamayo 1970).

El quiste, forma inmóvil relativamente resistente al ambiente externo, es la fase infectante del parásito. Es redondo o ligeramente oval, mide 8 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro y contiene 1, 2 ó 4 núcleos. El quiste maduro típicamente es tetranucleado (se forma después de dos divisiones sucesivas, a partir de quistes uninucleados). Hasta ahora no hay un método que permita inducir el enquistamiento de E. histolytica en cultivo axénico de forma consistente y reproducible.



## Diagnóstico

El diagnóstico de la amibiasis se basa en la historia clínica y se confirma en el laboratorio. Entre los datos de laboratorio destacan el análisis microscópico, el cultivo y la serología (Kudo 1971). El examen microscópico se realiza mediante la observación directa de trofozoítos en el caso de muestras de heces obtenidas de pacientes con amibiasis aguda (técnica de la "platina caliente") o bien, identificando quistes tetranucleados en concentrados de heces de pacientes con amibiasis crónica. La serología es particularmente útil para el diagnóstico de la amibiasis extraintestinal (Eldson-Dew y col. 1971) y para estudios epidemiológicos.

Para realizar estos estudios serológicos individuales con propósitos diagnósticos y para estudios seroepidemiológicos, se requiere antígeno amibiano que se obtiene de trofozoítos cultivados axénicamente (Diamond 1980). En México, estos estudios se realizan con frecuencia empleando antígeno amibiano producido y distribuido por empresas transnacionales.

### B. Cultivo de Entamoeba histolytica

El cultivo amibiano se ha venido practicando y modificando desde hace más de 60 años. Su evolución ha generado tres sistemas: el polixénico (en el que las amibas crecen en asociación con la flora bacteriana intestinal), el monoxénico (en el que las amibas están asociadas a una sola especie de microorganismos) y el axénico (en el que las amibas crecen en ausencia de cualquier otro tipo de microorganismos).

Aunque se ha escrito mucho al respecto, sólo unos pocos estudios

influyeron directamente para los avances que permitieron el cultivo axénico de E. histolytica.

#### Cultivo Polixénico

Boeck y Drbohlav iniciaron el cultivo de E. histolytica en 1925. Para ello describieron dos medios difásicos: LES y LEA, ambos preparados con una sola capa inclinada de huevo coagulado y una fase superior acuosa con solución de Locke y suero (LES) u ovoalbúmina (LEA). El crecimiento amibiano se obtuvo en presencia de la flora bacteriana que acompañaba al inóculo de materia fecal. El medio LES (con modificaciones) se sigue usando ampliamente en la actualidad.

Dobell y Laidlaw (1926) modificaron el medio de Boeck y Drbohlav reemplazando la capa de huevo de los medios LES y LEA por suero coagulado para producir el medio HSre + S. Además, introdujeron el uso de granos de arroz como fuente de carbohidratos, con los cuales el crecimiento amibiano mejoró y se favoreció el enquistamiento. Actualmente, la harina de arroz se adiciona a todos los medios de cultivo en los que el crecimiento amibiano ocurre junto con el de las bacterias asociadas.

En 1930, Cleveland y Sanders sustituyeron la fase sólida que era preparada con huevo o suero, por una capa de infusión de hígado y peptoagar.

Robinson (1968) ideó un medio en el que la fase sólida se preparaba con agar y la líquida con biotriptasa, eritromicina, harina de arroz y suero. Este medio se usa con frecuencia para el diagnóstico de la amibiasis.

Se han desarrollado varios medios líquidos monofásicos. Uno que

es ampliamente usado es el de infusión de yema de huevo, propuesto por Balamuth y Sandza (1944). En 1982, Diamond describió un nuevo medio monofásico que contiene tripticasa, extracto de hígado, mucina gástrica y suero (medio TYSGM-9). El medio TYSGM-9 puede ser usado tanto para el primocultivo amibiano como para el mantenimiento por subcultivos sucesivos. Algunos medios como los de Boeck y Drbohlav (medio LES), y el de Dobell y Laidlaw (HSre + S); son útiles para el aislamiento y subcultivo de otros protozoarios intestinales además de E. histolytica.

#### Cultivo Monoxénico

El cultivo de E. histolytica con una especie de microorganismos asociados se realizó principalmente con el objeto de lograr el cultivo axénico.

Cleveland y Sanders (1930) fueron los primeros en cultivar E. histolytica monoxénicamente. Trofozoítos aislados de abscesos hepáticos que habían sido producidos experimentalmente en gatos, fueron cultivados en presencia de cada una de 13 especies bacterianas en el medio difásico de infusión de hígado-peptoagar.

Rees y sus colaboradores (1941) cultivaron monoxénicamente E. histolytica en asociación con cada una de 12 especies bacterianas; iniciaron los cultivos con quistes obtenidos por microaislamiento de cultivos polixénicos. El mejor crecimiento amibiano lo obtuvieron mediante la asociación con Clostridium perfringens.

Las investigaciones de Jacobs llevaron a Shaffer y colaboradores a desarrollar el medio Shaffer-Frye (S-F) en 1948. En este procedimiento preacondicionaban medio líquido de tioglicolato mediante el creci-

miento de la especie bacteriana anaeróbica Fusobacterium symbiosum. Después, eliminaban por centrifugación la mayoría de las bacterias y adicionaban penicilina al inóculo amibiano para controlar el crecimiento de las bacterias. El medio S-F modificado por Reeves, Meleney, Frye, Mackdade y Shaffer (Reeves 1957) es ampliamente usado para el cultivo monoxénico de E. histolytica, E. histolytica-like, E. invadens, E. coli y Trichomonas vaginalis.

Phillips (1950) substituyó por Trypanosoma cruzi a las bacterias asociadas en el cultivo monoxénico de E. histolytica. Posteriormente, los cultivos amiba-tripanosoma también se lograron con quistes amibianos obtenidos por micromanipulación de cultivos polixénicos (Phillips 1962). Diamond (1961) empleó amibas asociadas con un tripanosomátido (Crithidia sp.) para iniciar el cultivo axénico de E. histolytica.

#### Cultivo Axénico

McConnachie (1962) reportó el crecimiento axénico de E. invadens en un medio líquido autoclaveable que contenía tripsicasa, Panmede y glucosa.

El primer cultivo axénico de E. histolytica se realizó en el medio difásico TTY-S-CEEM que consistía en una capa sólida de agar nutritivo y una semisólida de caldo suplementado con extracto de embrión de pollo (fresco o hervido) y una mezcla de vitaminas. Resultó de poco valor práctico debido a su naturaleza difásica y a su largo tiempo de preparación (Diamond 1961).

Otro medio difásico para el cultivo axénico de E. histolytica fue el de Wittner (1968) llamado medio CAA, igual en composición y preparación al TTY-S-CEEM pero que incluía además casamimoácidos, lactoalbúmina, ácido mercaptosuccínico y rezarsurina. En comparación con el medio

difásico de Diamond, en este medio el crecimiento amibiano era más rápido y daba mejores rendimientos.

El medio TPS-1 (contiene tripticasa, Panmede, suero y mezcla vitamínica 107) se ideó para iniciar y mantener el cultivo axénico y se caracteriza por su claridad, ausencia de partículas gruesas y fácil preparación (Diamond, 1968). En este medio la amibas eran cosechadas fácilmente y podían ser contadas automáticamente, con lo que fue posible el cultivo amibiano masivo (Diamond, 1968).

Sin embargo, la inconsistencia en la calidad de los lotes de Panmede empleados para preparar el medio TPS-1 llevó a formular el medio TYI-S-33 (Diamond y col. 1978, Diamond 1980). En éste, el Panmede se reemplazó con extracto de levadura y el medio basal fue suplementado con suero, vitamina B<sub>12</sub>, ácido tióctico y la mezcla vitamínica Tween 80. Además de E. histolytica, han sido cultivadas tanto en TPS-1 como en TYI-S-33 las siguientes especies de Entamoeba: E. invadens, E. histolytica-like (Laredo), E. terrapinae, E. barreti y E. moshkovskii.

Gillin y Diamond (1978) desarrollaron un método para el crecimiento clonal de E. histolytica y otras especies de Entamoeba en medio TYI-S-33 semisólido (Gillin y Diamond 1978), que es particularmente útil para la cuantificación de la viabilidad amibiana (Diamond, 1983).

#### Características del Medio de Cultivo TPS-1

Los dos medios monofásicos con los que se cuenta actualmente para el cultivo axénico de E. histolytica (TPS-1 y TYI-S-33) son de calidad inconsistente, lo que provoca a veces dificultades en el cultivo (Diamond y col. 1978; Diamond 1980; R. López-Revilla, comunicación personal).

Aunque en las fórmulas originales los medios TPS-1 y TYI-S-33 se suplementan ambos con las mezclas vitamínicas 107 y el segundo con Tween 80 (Diamond 1968, Diamond y col. 1978) dichos suplementos no son necesarios para obtener cultivos de calidad (R. López-Revilla, J. Rodríguez-Báez, R. Cano-Mancera, datos no publicados). Ambos medios para el cultivo axénico cuentan entre sus componentes esenciales al suero de origen animal; el TPS-1 contiene además un digerido de hígado bovino (Panmede) que se produce solamente en Inglaterra y el TYI-S-33 contiene extracto de levadura.

Si bien Diamond y cols. (1978) elaboraron el medio TYI-S-33 con el objeto de mejorar y sustituir al TPS-1, la experiencia en el laboratorio en el empleo de ambos medios ha demostrado que el medio TPS-1 sustenta mejor el crecimiento amibiano.

El suero es ampliamente utilizado en la preparación de medios de cultivo enriquecidos. Consta de una gran diversidad de especies moleculares incluidas en una matriz proteínica-acuosa mediante uniones iónicas e hidrofóbicas, en complejos apropiados para la nutrición celular (Coriell 1973). Las propiedades estimulantes del crecimiento varían en diferentes lotes de suero, de manera que el lote que soporte excelentemente el crecimiento de una línea celular puede no hacerlo para otra (Coriell 1973).

Para el cultivo amibiano axénico se usa suero de caballo o de bovino (adulto, de ternera, o fetal). Diamond y col. (1978) recomiendan el cultivo amibiano axénico en los medio TPS-1 o TYI-S-33 suplementados rutinariamente con suero al 10 o 15% (v/v), según los requerimientos de las cepas.

Las peptonas promueven el desarrollo abundante de una amplia varie-

dad de microorganismos. El Panmede es una peptona obtenida por hidrólisis enzimática de homogenados de hígado bovino. Es soluble en agua y contiene aminoácidos, péptidos, proteosas, ácidos nucleicos, minerales, vitaminas (ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, biotina, ácido fólico, cianocobalamina) y carbohidratos.

Desafortunadamente, la calidad del Panmede (fabricado en Inglaterra por Paines & Byrne Ltd.) es inconsistente y es cada vez más difícil conseguir lotes adecuados del mismo (Diamond y col. 1978; Diamond 1980; R. López-Revilla, comunicación personal).

No hay referencia en la literatura sobre el proceso de elaboración del Panmede comercial. Sin embargo, Tripathi y col. (1974) produjeron a escala de laboratorio un sustituto de Panmede (para el cultivo axénico amibiano) de mediana calidad empleando papaina para la hidrólisis enzimática de hígado de cabra o búfalo.

#### Mantenimiento de los Cultivos Axénicos

Las cepas de E. histolytica en cultivo axénico se mantienen mediante subcultivos o resiembras sucesivas.

El cultivo axénico de E. histolytica es fastidioso debido a que los trofozoítos son muy lábiles a los cambios ambientales y de los componentes del medio de cultivo. Por ello, el mantenimiento de los cultivos requiere del control constante del crecimiento amibiano.

La selección de los cultivos usados como fuente de inóculo para cada nuevo subcultivo es crítica. Los cultivos adecuados para la resiembra deben: 1) encontrarse en fase logarítmica, 2) tener amibas refringentes, predominantemente uninucleadas, con bastante homogeneidad en su tamaño, 3) tener a la mayoría de las amibas adheridas a la

superficie interna de los recipientes de cultivo, o unidas entre ellas formando grumos pequeños, 4) casi no contener trofozoítos muertos (las amibas muertas poseen un citoplasma altamente granular y contraído) o lisadas, y 5) estar libres de contaminación.

#### Protocolos de Resiembra

López-Revilla y Rodríguez-Báez (1981) mostraron la importancia de los protocolos de resiembra para el mantenimiento de los cultivos axénicos amibianos. Ellos registraron y analizaron la dispersión de inóculos y rendimientos en cultivos de la cepa HK9 hechos con inóculos no controlados y encontraron variaciones notables (hasta de 100 veces) en las magnitudes de la densidad de los inóculos y de los rendimientos. Cuando establecieron un protocolo de resiembra en el que la cepa HK9 podía sembrarse rutinariamente cada cuatro días con 100 amibas/ml encontraron mínima dispersión en los rendimientos.

Las cepas cultivadas axénicamente tienen parámetros de crecimiento característicos, que permiten estandarizar tanto los procedimientos generales de cultivo como los protocolos de resiembra de cada cepa para mantener en óptimas condiciones la calidad de los cultivos (López-Revilla, Rodríguez-Báez 1981). Los criterios que deben definirse para establecer un protocolo de resiembra son: 1) la velocidad de crecimiento exponencial, 2) la densidad de saturación (o rendimiento) de los cultivos y 3) la velocidad de muerte celular que sigue a la fase estacionaria. A partir de estos parámetros es posible definir el inóculo y el tiempo de incubación que permitan obtener los máximos rendimientos y velocidades de crecimiento en las resiembras sucesivas de cada cepa amibiana.



## OBJETIVOS

### A. Objetivo General

De la calidad de los cultivos axénicos amibianos depende en última instancia la calidad del trabajo de investigación en amibiasis experimental. Por ello, el objetivo general de este trabajo fue explorar la posibilidad de estandarizar y optimizar el cultivo axénico de E. histolytica, para lo cual fue necesario evaluar la capacidad que tienen para sustentar el crecimiento amibiano los dos principales componentes de origen animal del medio TPS-1 (Panmede y suero).

### B. Objetivos Particulares

Los objetivos particulares de este trabajo fueron:

1. Evaluar la calidad del Panmede como componente del medio TPS-1.
2. Desarrollar, a escala de laboratorio, un procedimiento controlado para producir un sustituto de Panmede de calidad consistente.
3. Evaluar el efecto del lote y de la concentración de suero sobre el crecimiento amibiano.
4. Definir un mecanismo para establecer protocolos de resiembra específicos de cepa.

## MATERIALES

A. Cepas Amibianas

Se usaron trofozoítos de cinco cepas de E. histolytica de nuestro laboratorio: HM1:IMSS, aislada en 1967 de una úlcera rectal en un paciente mexicano con disentería amibiana (Diamond y col. 1974); HM2:IMSS, aislada en 1965 del exudado de una lesión ulcerosa de un paciente con rectocolitis amibiana (De la Torre y col. 1974); HM3:IMSS, aislada en 1967 de un absceso hepático amibiano (De la Torre y col. 1974); HM38:IMSS, aislada en 1982 de úlcera rectal y drenado de un absceso hepático (De la Torre, comunicación personal); y HK9:NIH aislada en 1951 de material proctoscópico de un prisionero de guerra norcoreano (Diamond 1968).

B. Componentes del Medio de Cultivo

El hígado bovino se adquirió en el Rastro de Ferrería (Azcapozalco, D.F.) o en el Rastro Viejo (Inguarán, D.F.). Se usaron ocho lotes de suero normal de caballo; tres fueron de origen comercial (Biocel, Laboratorios Myn y Microlab) y cinco fueron producidos en el laboratorio, con sangre obtenida en el Rastro de Iztapalapa (lotes 831, 832, 833, 852A y 852B).

C. Reactivos

Fred Diggins, Gerente General de Paines & Byrne Ltd. donó generosamente 13 lotes de Panmede a Rubén López-Revilla (Nos. 675065, 689029, 693011, 693014, 693017, 697053, 697054, 697055, 697057, 697059, 697061, 700057, 700050); los lotes 646007 y 652008 de Panmede se adquirieron comercialmente. La peptona de caseína purificada de obtuvo de Bioxon de México, S.A.; la caseína (Casec), de Mead Johnson de México, S.A.; la organosilina (Prosil-28) de P.C.R. Research Chemicals, Inc.; la papaína pulverizada se compró en la farmacia París, S.A. (México, D.F.). De Sigma Chemical Company (St. Louis, EE. UU.) se obtuvieron glucosa, L-cisteína, ácido ascórbico, tripsina y ditionita. De J. T. Baker de México, S.A. se obtuvieron ácido tricloroacético y fosfato de potasio monobásico y dibásico.

## METODOS

Algunos métodos que se describen a continuación son los que se usan actualmente en el laboratorio y se basan en unos 12 años de experiencia con los cultivos axénicos amibianos.

A. Preparación del Medio Basal TP

La composición del medio TP corresponde a la fórmula descrita por Diamond (1968), simplificada en su preparación y composición por López-Revilla y Rodríguez-Báez (1981).

Preparación del medio basal (TP):

- | 1. Pesar                 | g/500 ml |
|--------------------------|----------|
| Peptona de caseína       | 5.0      |
| Panmede                  | 10.0     |
| Glucosa                  | 2.5      |
| L-cisteína               | 0.5      |
| Ac. ascórbico            | 0.1      |
| NaCl                     | 2.5      |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 0.3      |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$ | 0.5      |
2. Mezclar los componentes y adicionar 100 ml de agua bidestilada estéril, agitar hasta disolverlos.
  3. Centrifugar la mezcla en tubos Falcon cónicos de 50 ml a 2500 g durante 5 min.
  4. Agregar agua bidestilada hasta completar un volumen de 500 ml.

5. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 10N.
6. Distribuir volúmenes de 11 ml a tubos de cultivo (Pyrex) de 16 X 125 mm con tapón de rosca.
7. Esterilizar los tubos durante 15 minutos a 20 lb/pulg<sup>2</sup>.
8. Después de esterilizar, cerrar bien los tubos, etiquetarlos y almacenarlos a temperatura ambiente (por no más de dos semanas).

#### B. Preparación y Almacenamiento de Suero

El suero comercial se recibió congelado y se almacenó inmediatamente a -20°C. También se usó suero elaborado en el laboratorio, que se almacenaba a la misma temperatura.

El volumen mínimo que se descomplementó para ser usado en los experimentos fue de 800 ml y se preparó de la manera siguiente:

1. Cada frasco de suero se descongeló por inmersión en un baño de agua a 37°C.
2. Para descomplementar el suero, cada frasco se sumergía en un baño a 56°C durante 30 min y se agitaba ocasionalmente (El suero se coagula y se inutiliza si se calienta a 60°C o más).
3. Bajo condiciones asépticas, en una campana microbiológica se colocaban volúmenes de 10 ml de suero descomplementado en viales de cultivo estériles de boca ancha con tapón de rosca (Wheaton, de 20 ml), o de 20 ml en botellas de borosilicato con tapón de rosca (Pyrex).
4. Los frascos con el suero descomplementado se incubaron 5 días a 36°C para probar su esterilidad. Se descartaron los frascos con

suero turbio contaminado.

5. Al terminar satisfactoriamente la prueba de esterilidad, se cubrió el cuello con cinta adhesiva ("masking") y los frascos se etiquetaron detallando el tipo de suero, número de lote, iniciales personales y fecha de la descomplementación y envasado.
6. Los frascos de suero descomplementado se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de usarse.

### C. Cultivo Axénico de Amibas

#### Precauciones Durante el Cultivo

El cultivo axénico de amibas se realizó con la siguiente serie de manipulaciones precisas, con el propósito de evitar la contaminación y asegurar el buen crecimiento amibiano:

1. Se lavaron perfectamente las manos hasta los codos con jabón de tocador antes de iniciar la resiembra.
2. La superficie de trabajo y la campana microbiológica se limpiaron con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% y una toalla desechable de papel antes de la resiembra.
3. Todas las manipulaciones se hicieron en una campana microbiológica en la que sólo las manos del operador entraban en el área estéril.
4. Nunca se manejó más de una cepa simultáneamente en la campana, para evitar la posibilidad de contaminaciones cruzadas entre las cepas amibianas.
5. Se trabajó cerca y atrás de la flama del mechero Touch-O-matic.
6. La adición de suero y los inóculos se hicieron con bulbos y pipetas cortas estériles (Bellco), nunca con la boca.

7. Los cuellos de frascos y botellas se flamearon en forma cuidadosa pero no excesiva antes de quitar los tapones, y las bocas de frascos y botellas y sus tapones se flamearon antes de cerrarlas. Nunca se dejaron los frascos abiertos durante el cultivo.
8. Antes de ser usadas las pipetas cortas, se flamearon 2 a 3 segundos en los sitios que se habían contaminado con los dedos (cerca de la boquilla para conectarlas a los tubos).
9. Cada vez que se manipulaban, la calidad y aspecto de los cultivos se examinaba en el microscopio invertido.

#### Mantenimiento de las Cepas

Las cepas se mantuvieron a través de pases sucesivos de tres tubos cada vez (resembrando el mejor de cada uno de los tres tubos de la resiembra anterior). Al final de la fase exponencial y antes de cada resiembra se observaron los cultivos con el microscopio invertido; los cultivos que contenían trofozoítos móviles, refringentes, íntegros y adheridos a las paredes internas de los tubos, se enfriaban en hielo (cuidando no contaminar con el agua los cuellos y tapones de los cultivos) durante 5 min o hasta que las amibas se desprendían de los tubos.

Los tubos enfriados se secaron con toallas desechables de papel y se agitaron suavemente por inversión; una vez homogeneizadas así las suspensiones amibianas, se determinó su concentración con un hematímetro (Neubauer) y se inocularon los volúmenes apropiados para obtener  $10^3$  o  $10^4$  amibas/ml en cada uno de tres tubos (por cepa) que contenían 11 ml de medio TP suplementado con 1 ml de suero normal de caballo para las cepas HM3 y HK9 (concentración final 9.1% v/v) y con 2 ml para las cepas HM1, HM2 y HM38 (concentración final 18.1% v/v).

Después de cada resiembra los tubos se mantuvieron en incubación vertical a 36°C; se conservaron tanto el cultivo que se usó para el inóculo como los dos tubos restantes de la resiembra anterior hasta asegurarse del crecimiento y ausencia de contaminación de la nueva resiembra.

#### 1. Procedimiento para el cultivo

- a) Se descongelaba un frasco de suero descomplementado mediante inmersión del fondo en un baño de agua a 37°C, evitando absolutamente que se mojara el cuello.
- b) Una vez descongelado el suero, se secaba el frasco por fuera con toallas desechables y se agitaba suavemente por rotación para homogeneizar su contenido.
- c) Se limpiaba el área de trabajo con SDS al 1% y toallas desechables. Se colocaba en posición accesible todo el material que se emplearía en la resiembra.
- d) Se flameaban los tapones de los frascos de suero y de los tubos que contenían 11 ml de medio TP estéril. Con una pipeta corta de 5 ml se extraían volúmenes de suero que eran distribuidos a cada tubo con medio TP (1 o 2 ml según la cepa). La mezcla contenida en estos tubos constituía el medio completo TPS-1.
- e) Los cultivos con amibas en crecimiento exponencial (de los que se obtendrían los inóculos para la resiembra) se colocaban en hielo durante el tiempo necesario para que las amibas se separaran de las paredes del tubo y entre ellas. Cada 2 o 3 min se verificaba el desprendimiento amibiano con el microscopio invertido.



- f) Los tubos enfriados se agitaban unas 10 veces por inversión suave para homogeneizar las suspensiones amibianas.
- g) Con una pipeta estéril corta de 1 ml se tomaba asépticamente una pequeña muestra y se colocaba una gota de la suspensión amibiana en un hematímetro; se contaban las amibas en los ocho cuadros (los usados para la cuenta de leucocitos) y el promedio obtenido de éstos se multiplicaba por  $10^4$  para obtener la concentración (amibas/ml).
- h) Con una pipeta estéril corta de 1 o 2 ml se inoculaban volúmenes suficientes para obtener la concentración requerida en cada tubo.
- i) Se cerraban bien los tapones de los tubos y se homogeneizaba el inóculo mediante inversión suave.
- j) Los cultivos se inoculaban en posición vertical en gradillas metálicas a  $36^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Curvas de crecimiento

Se iniciaron con cultivos en crecimiento exponencial. Cada tubo con amibas que se iban a usar para iniciar el cultivo se enfrió por inmersión en hielo por lo menos 5 min, o hasta que se desprendieron las amibas; el tubo enfriado se secó y se agitó 10 veces por inversión suave para homogeneizar la suspensión amibiana.

Con una pipeta corta de 1 o 2 ml, se extrajo del cultivo original una muestra pequeña y se colocó una gota en un hematímetro; así se calculó la concentración amibiana. Se añadió a cada uno de 21 tubos que contenían 11 ml de medio TPS-1, el volumen apropiado del cultivo anterior para obtener inóculos de  $10^3$  o  $10^4$  amibas/ml. Una vez inoculados todos los tubos, se cerraron bien los tapones y se incubaron

en posición vertical.

Diariamente (a la misma hora), se contaron las amibas de tres tubos diferentes y se obtuvieron las medias y desviaciones estándar. Los datos se anotaron en la hoja de registro de las resiembras; los promedios de las cuentas y los tiempos de incubación se graficaron en papel semilogarítmico de cinco ciclos (inóculos y rendimientos promedio de las resiembras para cada cepa fueron graficados en hojas separadas; los días de incubación se graficaron en las abcisas, y los inóculos y rendimientos en las ordenadas).

Cuando los cultivos llegaron a la fase estacionaria y luego se observó declinación del número de amibas por lo menos durante 48 horas, se dieron por terminados los experimentos, se calcularon los tiempos de duplicación y la velocidad específica de crecimiento para cada cepa y se registró el rendimiento máximo de los cultivos.

#### Parámetros de Crecimiento

Los parámetros que se registraron en los cultivos amibianos fueron cinco:

1. Inóculo. Es el volumen ( $V_1$ ) que se resiembró al iniciar la incubación. El inóculo se calculó con la siguiente ecuación:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

en donde

$C_1$ , concentración (amibas/ml) en el tubo del que se va a resembrar

$C_2$ , concentración (amibas/ml) inicial que se desea obtener en el nuevo cultivo

$V_1$ , volumen (ml) que debe inocularse para que el nuevo cultivo tenga la concentración deseada

$V_2$ , volumen (ml) total del nuevo cultivo que se resiembramos (incluye el medio basal, el suero y la suspensión amibiana inoculada)

Despejando  $V_1$ , queda

$$V_1 = V_2 C_2 / C_1$$

2. Rendimiento. Es la densidad (amibas/ml) alcanzada por los cultivos al tiempo  $t$  de incubación. Depende de la cepa amibiana, del tiempo de incubación, del inóculo, de la calidad del medio basal y del suero.
3. Incremento. Representa el factor de aumento de la población amibiana al tiempo  $t$  con respecto a la población inoculada. Se calcula dividiendo el número de amibas cosechadas (rendimiento) entre las inoculadas:

$$I = \text{Rendimiento} / \text{inóculo}$$

4. Tiempo de duplicación ( $t_D$ ). Es el tiempo que tarda en duplicarse la población amibiana de una cepa en fase log. Depende de la calidad del medio de cultivo y de la velocidad específica de crecimiento de cada cepa. Se calcula así:

$$t_D = t / N$$

$$N = 3.221 \log I$$

En donde  $t$ , tiempo de incubación (en horas) y  $N$ , número de duplicaciones.

5. Tasa de duplicación ( $\mu$ ). Es la fracción de una duplicación que ocurre en el lapso de una hora. Se expresa como el inverso del tiempo de duplicación:

$$\mu = 1 / t_D$$

#### D. Controles de Calidad

##### Del Suero

La calidad de ocho lotes de suero (tres obtenidos comercialmente y cinco procesados en el laboratorio) se determinó mediante los rendimientos amibianos obtenidos al cultivar inóculos de  $10^4$  amibas/ml de la cepa HM1 en medio TP suplementado con suero al 18.1% v/v (2 ml/tubo con 11 ml de TP). Durante cinco resiembras sucesivas, cada 72 h se contaba el número de amibas presentes en el medio que contenía cada lote de suero y así se iniciaba la nueva resiembra con el mismo inóculo.

##### Del Panmede y SP

###### 1. Eficacia para el cultivo amibiano

La valoración de los lotes de Panmede y SP se realizó a través del registro de los parámetros de crecimiento de trofozoítos de la cepa HM1 cultivada en medio TPS-1 preparado con cada uno de los lotes.

Para cada lote evaluado se utilizaron tres cultivos inoculados con  $10^4$  amibas/ml durante cinco resiembras sucesivas. En cada resiembra se registraron los siguientes datos: número de lote, número de resiembra, inóculo, días de incubación, rendimiento, incremento, tiempo de duplicación y morfología.

Se usó como control el lote de Panmede comercial 646007, cuyos incrementos eran por definición del 100%. Se calculó el incremento amibiano (rendimiento/inóculo) promedio de cinco subcultivos en relación con el control (100%) para definir la calidad de cada lote (los

lotes se consideraban malos si daban incrementos de 0-60%, regulares si daban incrementos de 60-80%, buenos si daban incrementos de 80-100% y excelentes si daban incrementos mayores del 100%; ver Tabla 1).

Con los lotes de SP que resultaron de calidad excelente se realizaron curvas de crecimiento para determinar la velocidad de crecimiento y el rendimiento máximo que se obtenía con bajos inóculos de trofozoí- de la cepa HMI:

- a) Se incubaron 21 tubos en medio basal, preparados con el lote de SP que era sometido a prueba, adicionando 2 ml del suero e inóculos de  $10^3$  amibas/ml de cada uno.
- b) Paralelamente, se incubaron otros 21 cultivos con medio basal preparado con el lote de Panmede 646007 (control).
- c) Las amibas de tres cultivos diferentes de cada lote de extracto se contaron diariamente. Cuando se observaba disminución del número de amibas se daba por terminado el experimento.
- d) Al final se comparaban el rendimiento máximo, la velocidad de crecimiento exponencial y el tiempo de duplicación de los cultivos hechos en medio preparado con SP y con el lote control de Panmede.

## 2. Cuantificación de vitaminas

El contenido de vitaminas se determinó cuantificando el crecimiento de microorganismos tipo de la American Type Culture Collection dependientes de cada una de las vitaminas probadas, en los mejores extractos preparados por nosotros (lotes BC31 y BC32) y los lotes de Panmede 646007 y 697053. Este análisis lo realizó la Sección de Control Analítico y Evaluación de Calidad (SCAEC) del CINVESTAV.

TABLA 1

## CATEGORIAS DE CALIDAD DEL PANMEDE

| Rendimiento<br>(amibas/ml)      | Calidad   |
|---------------------------------|-----------|
| $6 \times 10^4$                 | Mala      |
| $6 \times 10^4 - 8 \times 10^4$ | Regular   |
| $8 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ | Buena     |
| $>10^5$                         | Excelente |

### 3. Cuantificación de Aminoácidos

La determinación de aminoácidos en dos lotes de SP (BC31 y BC32) y los lotes de Panmede 646007 y 697053 la realizó el Departamento de Biotecnología del CINVESTAV. Para este análisis se empleó un analizador automático Beckman modelo 120C. La cuantificación se basó en la elución cromatográfica de cada uno de los aminoácidos en una columna de resina con amortiguadores de citrato de pH 2.9, 3.2, 4.1 y 6.1 y posteriormente cuantificación colorimétrica con ninhidrina. El uso de este equipo y la preparación de las muestras han sido ampliamente descritas por Moore y Stein (1963).

#### E. Producción del Sustituto de Panmede (SP)

En experimentos independientes se procesaron 32 lotes diferentes de SP, empleando variaciones (en componentes y procesamiento técnico) al procedimiento propuesto por Tripathi y col. (1974).

Fragmentos de 200 g de hígado fresco de bovino libre de material fibroso y vasos sanguíneos, se homogeneizaron con los componentes hidrolíticos y 240 ml de agua bidestilada estéril en una licuadora casera. La digestión del homogeneizado se realizó en vasos de precipitados (Pyrex) de 1000 ml, inmersos en un baño de agua a 37°C. Al término de la incubación, el material no digerido se coaguló por ebullición en un baño de agua hirviente; el coágulo formado se eliminó por filtración en gasa. Para eliminar el material fino no digerido, el filtrado se hirvió durante 5 min, se filtró en gasa y se centrifugó. Por último, el sobrenadante se secó en el horno a 60°C en charo-

las de vidrio (Pyr-O-Rey) de 20 X 30 cm, previamente siliconizadas con una solución de Prosil-28 al 1% y secadas a 100°C durante 10 min. Inmediatamente después del secado, el extracto se almacenó a temperatura ambiente en un frasco de plástico de boca ancha con tapón de rosca. El rendimiento (peso seco) de cada lote de SP se determinó pesando todo el material obtenido después del secado.

El rendimiento (peso seco) de los lotes cuya calidad se evaluó en forma líquida se determinó mediante la desecación de una alícuota en una estufa a 60°C; el material seco se pesó y se calculó en rendimiento por cada 100 g de hígado.

#### F. Determinación de la Actividad Específica de la Papaína

El método usado para la determinación de la actividad enzimática de la papaína (Arnon 1970) se basa en la estimación de los productos de hidrólisis de la caseína que se empleó como sustrato.

Se colocaron 0.1 a 0.8 ml de solución de papaína (50 mg/ml) en tubos de ensayo de 16 X 95 mm. A cada tubo se agregó 0.2 ml de la solución "activante" (solución recién preparada de L-cisteína 50 mM, EDTA 20 mM). Se prepararon dos series de esta manera, a una de las cuales se adicionó en cada tubo 20 µl de ditionita 2.2 mM. Se ajustó el volumen con tris-HCl y el pH a 4.5, 6.7 u 8.0 con HCl 10N o NaOH 10N. Después se agregaron alícuotas de 1 ml de una solución de caseína (al 1% en Tris 50 mM, pH 4.5, 6.7 u 8.0) a cada tubo a intervalos de 1 min. Cada tubo se mezcló y se incubó en una baño de agua a 37°C durante 10 minutos, al término de los cuales se detuvo la reacción adicionando 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%



frío.

Se dejaron reposar los tubos durante 1 h a temperatura ambiente y el material precipitado con TCA se eliminó mediante centrifugación a 360 g (centrífuga Damon/IEC, cabezal 269) por 5 min. La concentración de los productos de la hidrólisis se determinó midiendo en el sobrenadante la absorbancia a 380 nm en un espectrofotómetro Gilford.

La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que bajo las condiciones descritas produjo péptidos de caseína solubles que incrementaron la densidad óptica de los sobrenadantes en una unidad de absorbancia a 280 nm por cada minuto de digestión. La actividad específica se calculó dividiendo el número de unidades entre la masa (mg de proteína) de la enzima.

#### G. Concentración Óptima de Suero para el Cultivo en Medio TPS-1

En medio TPS-1 preparado con suero de caballo de los lotes 852B o 832 (procesados en el laboratorio) se subcultivaron por cinco pases sucesivos las cepas HM1, HM2, HM3, HM38 y HK9 con inóculos constantes de  $10^4$  amibas/ml. El medio TP fue suplementado con concentraciones variables de suero, que fluctuaron entre 4.5% y 36.3% (v/v). Se determinaron los parámetros de crecimiento amibiano y se definió la concentración óptima de suero para cada cepa de la siguiente manera:

1. Se determinó la concentración amibiana de tres cultivos (con amibas en crecimiento exponencial) de cada una de las cinco cepas.
2. De cada cepa se subcultivaron tres tubos con inóculos de  $10^4$  amibas/ml en tubos con 11 ml de medio TP suplementado con 4.5%, 9.1%, 13.6%, 18.1%, 22.7%, 27.2%, 31.8% y 36.3% de suero.

3. Las cepas se resembraron en medio con la misma concentración de suero cada tercer día por cinco subcultivos inoculados con  $10^4$  amibas/ml.
4. Al finalizar el quinto subcultivo se determinaron los parámetros de crecimiento (tiempo de duplicación y rendimiento) promedio de cada cepa en las resiembras hechas con cada concentración de suero.

## RESULTADOS

A. Producción de un Sustituto de Panmede

## Valoración de la Calidad del Panmede

Con el objeto de valorar la calidad del Panmede como componente del medio TPS-1 se analizaron 15 lotes de éste, mediante dos series de cultivos de trofozoítos de E. histolytica HM1, a los que se dieron cuatro pases sucesivos. En cada pase se determinaron los rendimientos e incrementos obtenidos en el medio TPS-1 que fue preparado con cada lote de Panmede. Ambas series de cultivos se realizaron bajo las mismas condiciones experimentales, excepto por el lote de suero y los inóculos amibianos.

En la primera serie se probaron cuatro lotes de Panmede. Los cultivos se hicieron en medio TPS-1 suplementado con suero de Flow Laboratories (lote 29101146) al 15%. Los inóculos fueron de  $1.2 \times 10^3$  a  $3.5 \times 10^3$  amibas/ml. Los rendimientos promedio de los subcultivos obtenidos con cada lote de Panmede fluctuaron entre  $1.63 \times 10^4$  a  $6.27 \times 10^4$  amibas/ml; los incrementos variaron de 9.5 a 55 veces y los tiempos de duplicación ( $t_D$ ) fueron de 20 h a 59 h (Tabla 2, Fig. 1).

En la segunda serie se probaron 12 lotes de Panmede. Los cultivos amibianos, realizados en medio TPS-1 suplementado con suero CINVESTAV 832 al 15% e inóculos constantes de  $10^4$  amibas/ml, dieron rendimientos

TABLA 2

EVALUACION DE LA CALIDAD DE DISTINTOS LOTES DE PANMEDE EN  
CULTIVOS DE ENTAMOEBIA HISTOLYITICA HM1<sup>a</sup>

| Series de experimentos | Lotes de Panmede | Rendimiento (amibas/ml) | Parámetros de crecimiento |                             |
|------------------------|------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|
|                        |                  |                         | Incremento                | t <sub>D</sub> <sup>b</sup> |
| Primera <sup>c</sup>   | 675065           | 2.26 X 10 <sup>4</sup>  | 55.0                      | 20.0                        |
|                        | 689029           | 2.6 X 10 <sup>4</sup>   | 16.7                      | 59.0                        |
|                        | 293011           | 2.7 X 10 <sup>4</sup>   | 16.3                      | 43.0                        |
|                        | 693014           | 1.6 X 10 <sup>4</sup>   | 9.5                       | 36.0                        |
| Segunda <sup>d</sup>   | 675065           | 6.50 X 10 <sup>4</sup>  | 6.5                       | 37.4                        |
|                        | 693017           | 3.55 X 10 <sup>4</sup>  | 4.1                       | 67.0                        |
|                        | 697053           | 8.92 X 10 <sup>4</sup>  | 7.6                       | 29.6                        |
|                        | 697054           | 4.33 X 10 <sup>4</sup>  | 3.5                       | 54.1                        |
|                        | 697055           | 6.97 X 10 <sup>4</sup>  | 6.0                       | 34.4                        |
|                        | 697057           | 2.79 X 10 <sup>4</sup>  | 2.9                       | 109.2                       |
|                        | 697059           | 5.80 X 10 <sup>4</sup>  | 4.6                       | 56.9                        |
|                        | 597061           | 4.24 X 10 <sup>4</sup>  | 4.7                       | 40.0                        |
|                        | 700057           | 5.52 X 10 <sup>4</sup>  | 5.2                       | 36.9                        |
|                        | 700050           | 0.78 X 10 <sup>4</sup>  | 0.9                       | 85.5                        |
|                        | 646007           | 8.24 X 10 <sup>4</sup>  | 7.0                       | 30.7                        |
|                        | 652008           | 6.30 X 10 <sup>4</sup>  | 5.4                       | 31.1                        |

<sup>a</sup>Cuatro pases sucesivos; cultivos de 3 o 4 días

<sup>b</sup>t<sub>D</sub>, tiempo de duplicación en horas

<sup>c</sup>Cultivos en suero de caballo (Flow Laboratories, lote 29101146) al 18.1%. Inóculos de 1.2 X 10<sup>3</sup> a 3.5 X 10<sup>4</sup> amibas/ml

<sup>d</sup>Cultivos en suero de caballo (CINVESTAV, lote 832) al 15%. Inóculos constantes de 10<sup>4</sup> amibas/ml

Figura 1. Crecimiento de Entamoeba histolytica HMI en medio TPS-1 preparado con 15 lotes diferentes de Panmede. Se presenta el rendimiento promedio de cuatro resiembras sucesivas. (A) Inóculos de  $1.2 \times 10^3$  a  $3.5 \times 10^3$  amibas/ml y suero de Flow Laboratories (lote 29101146). (B) Inóculos de  $10^4$  amibas/ml y suero CINVESTAV (lote 832). Los rendimientos amibianos variaron de  $0.78 \times 10^4$  (lote 700050) a  $9.0 \times 10^4$  amibas/ml (lote 697053).

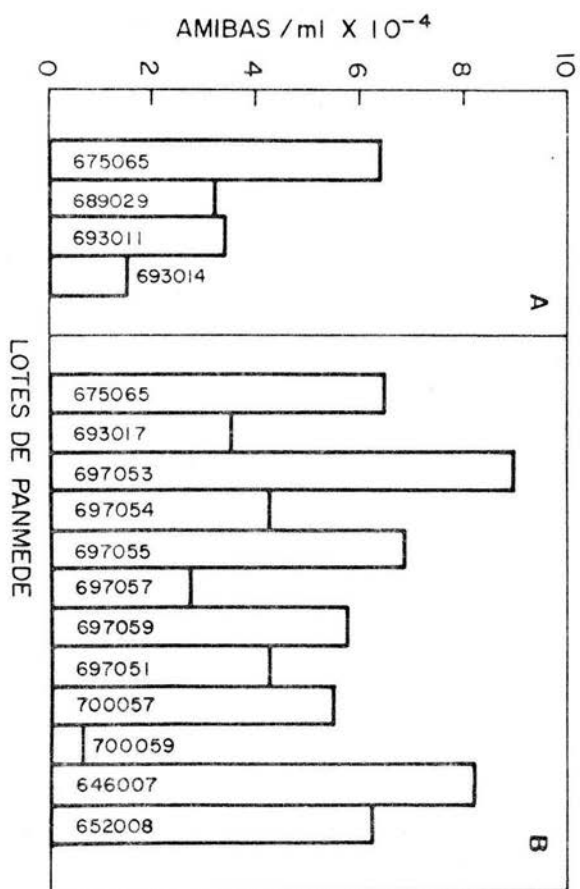


TABLA 3

CALIDAD DE 15 LOTES DE PANMEDE

| Calidad   | Número de lotes |
|-----------|-----------------|
| Mala      | 9               |
| Regular   | 4               |
| Buena     | 2               |
| Excelente | 0               |

de  $7.8 \times 10^3$  a  $8.98 \times 10^4$  amibas/ml. Los incrementos obtenidos fluctuaron entre 0.9 y 7.6 veces y los  $t_D$  fueron 29.6 h a 109.1 h (Tabla 2, Fig. 1).

De acuerdo con las cuatro categorías arbitrarias que se propusieron para calificar a los lotes de Panmede (ver Métodos), ninguno tuvo calidad excelente: hubo seis lotes regulares o buenos y la mayoría (nueve) fueron malos (Tabla 3).

#### Obtención de Un Sustituto de Panmede (SP)

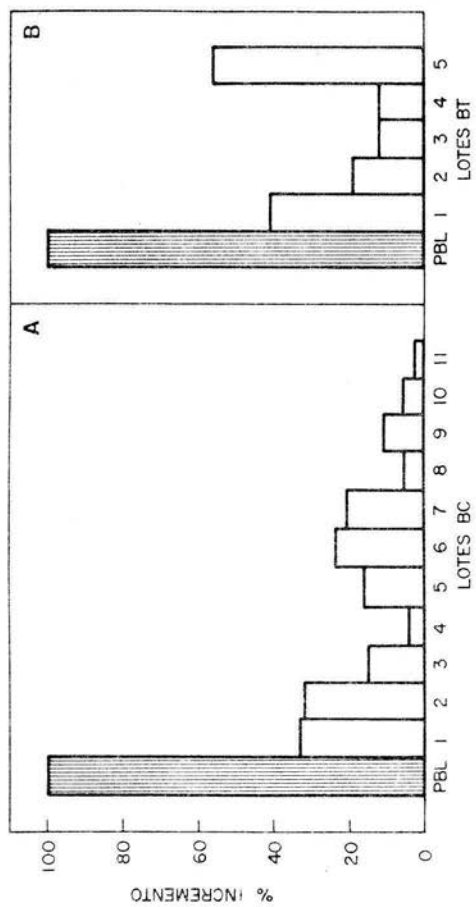
El desarrollo del proceso de producción del extracto de hígado (SP) se consiguió mediante la elaboración de 32 lotes diferentes que se fueron produciendo con modificaciones sucesivas basadas en la evaluación de la calidad de los lotes previos.

Los primeros 16 lotes de SP (BT1 a BT5 y BC1 a BC11) se hicieron mediante la hidrólisis de homogeneizados de hígado bovino con papaína comercial a diferentes concentraciones finales (0.33% a 0.62% p/p) sin activar, o activada (mediante incubación con cisteína 50 mM o ditionita 2.2 mM, por 20 min a 37°C). La elaboración de los 16 lotes varió en cuanto a la proporción de los componentes empleados, en los tiempos de digestión y en los tiempos de ebullición para precipitar el material no digerido. Los trofozoítos de E. histolytica HMI cultivados en medio TPS-1 preparados con cada uno de estos lotes de SP dieron rendimientos amibianos relativos que variaron de 2% a 56% (Fig. 2) con respecto al lote control PBL 646007 de Panmede (cuyos incrementos por definición eran del 100%).

Debido a los bajos rendimientos amibianos obtenidos con estos prime-



Figura 2. Incremento relativo en el número de trofozoítos de E. histolytica HMI cultivados en medio TPS-1 preparado con 16 lotes de SP elaborados con hígado bovino y papaína a diferentes concentraciones finales (0.33% a 0.62%), sin activar, o activada con cisteína (50 mM) o ditionita (2.2 mM). Cada barra representa el promedio de cinco subcultivos iniciados con  $10^4$  amibas/ml. El incremento amibiano en estos lotes varió de 2% a 37% en la serie A y de 10% a 56% en la B, con respecto al obtenido en el medio TPS-1 (100%) que fue preparado con el lote de Panmede 646007.



ros lotes, decidimos optimizar la digestión con papaína; para ello determinamos la actividad específica de la enzima comercial (Arnon 1970) a pH 4.5, 6.7 y 8.0 en presencia y ausencia de ditionita. La actividad de la enzima comercial fue máxima (53 mU/mg) a pH 8.0 en presencia de ditionita (Fig. 3). Esta actividad resultó muy inferior a la papaína cristalina (10 U/mg). Debido a que el costo de ésta última clase de papaína era demasiado alto para usarla en nuestro proceso, los siguientes lotes de extracto fueron obtenidos con otros digestores enzimáticos además de la papaína comercial.

Se procesaron siete lotes de SP (BC12 a BC18) en los que el homogeneizado de hígado se digirió con papaína (68.9 U/100 g de hígado) activada con ditionita, una mezcla que tenía, entre otros componentes, tripsina y quimotripsina (TQ, en diferentes concentraciones) y tripsina (1.6 g/100 g de hígado), aisladamente o en diversas mezclas. La digestión se hizo por tiempos variables a 37°C; los digeridos fueron hervidos y centrifugados. Con el objeto de determinar si el secado influía en la calidad de los siete lotes, se evaluó la calidad de cada extracto preparado sin secar o seco. El rendimiento (peso seco) de los extractos fue de 6 a 11.4 g/100 g de hígado.

Estos lotes permitieron incrementos amibianos relativos que variaron de 15% a 166% con respecto al lote control PBL 646007 (Fig. 4). Estos resultados indicaron que el mejor SP sería un extracto seco elaborado con hígado fresco y la mezcla TQ, suplementada con papaína no activada.

Se optó entonces por realizar un experimento que valorara las conclusiones anteriores y permitiera optimizar la concentración de la mezcla TQ y el tiempo de digestión de los homogeneizados. Se procesaron siete lotes de SP (BC19 a BC25) en los que la digestión de los homogenei-

Figura 3. Actividad específica de la papaína a pH 8.0 en presencia y ausencia de ditionita. El promedio de la actividad específica fue de 53 mU/mg con ditionita (DT) 2.2 mM y de 45 mU/mg sin DT.

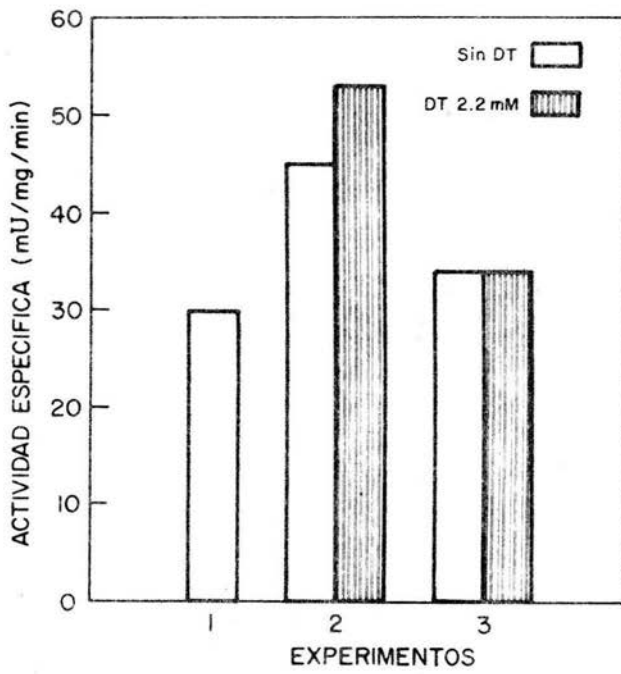
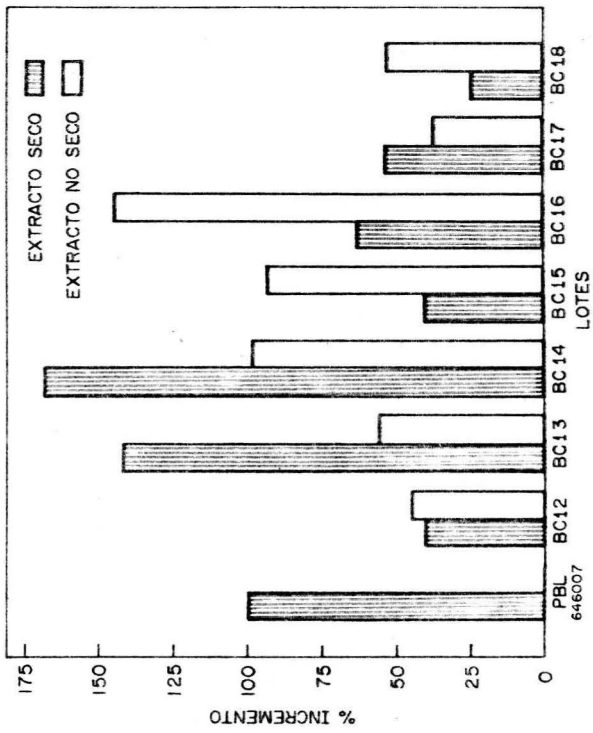


Figura 4. Incrementos relativos en el número de trofozoítos de E. histolytica HMI cultivados en medio TPS-1 preparados con siete lotes de SP secos y no secos, preparados con hígado fresco, mezcla tripsina-quimiotripsina (TQ), papaína (68.9 U/100 g de hígado) y ditionita (0.65 g/100 g de hígado). Las proporciones hígado/TQ fueron variables, los tiempos de digestión de 1 h. El lote BC12 fue preparado con papaína y ditionita; el BC13 con TQ, papaína y ditionita; el BC14 con TQ y papaína; el BC15 con TQ; el BC16 con TQ y un tiempo de digestión mayor; el BC17 con tripsina, papaína y ditionita; el BC18 con tripsina. Los incrementos relativos en subcultivos sucesivos con inóculos de  $10^4$  amibas/ml variaron de 25% a 166% con respecto al lote control PBL 646007 (100%).



zados se realizó con diferentes proporciones de la mezcla TQ en presencia y ausencia de papaína y diferentes tiempos de digestión. También variamos los tiempos y procedimientos de coagulación y separación del material no digerido. El rendimiento (peso seco) de estos lotes varió de 4.3 a 7.8 g/100 g de hígado.

Los cultivos hechos en medio TPS-1 preparado con estos lotes de SP dieron incrementos amibianos relativos que variaron de 25% a 298% (Fig. 5) con respecto al lote control PBL 646007. Los mejores lotes fueron: a) los elaborados con la mezcla TQ suplementada con papaína y tiempos de digestión cortos y b) los obtenidos sólo con la mezcla TQ y tiempos de digestión más largos.

Para afinar el proceso se prepararon otros siete lotes de extracto (BC26 a BC32) en los que la digestión de los homogeneizados se realizó con diferentes proporciones de la mezcla TQ en presencia y ausencia de papaína y diferentes tiempos de digestión. Los incrementos amibianos relativos obtenidos en medio TPS-1 preparado con estos lotes de SP variaron de 81% a 207% (Fig. 6). De los siete lotes, BC31 y BC32 fueron los mejores y superaron ampliamente el crecimiento amibiano obtenido con el lote control PBL 646007; el lote BC31 se elaboró con la mezcla TQ suplementada con papaína (68.9 U/100 g de hígado) y 1 h de digestión, y el BC32 con la mezcla TQ y 4 h de digestión.

#### Calidad de los Mejores Lotes de SP

##### 1. Curvas de crecimiento amibiano

Para seleccionar el mejor de los dos procesos finales de producción de SP (con los que se obtuvieron los lotes BC31 y BC32), se realizaron



Figura 5. Incrementos relativos en el número de trofozoítos de E. histolytica HMI cultivados en medio TPS-1 preparados con siete lotes de SP preparados con hígado, mezcla tripsina-quimotripsina (TQ) y papaína (68.9 U/100 g de hígado).

El tiempo de digestión fue variable y se usaron diferentes proporciones hígado/TQ. El BC19 se elaboró con TQ y papaína; el BC20 con TQ y papaína; el BC21 con TQ y papaína; el BC22 con TQ y papaína; el BC23 con TQ, papaína y 4 h de digestión; el BC23 NS (no seco) con TQ, papaína y 4 h de digestión; el BC24 con TQ y 4 h de digestión; el BC25 con TQ y papaína. Los incrementos relativos obtenidos con inóculos de  $10^4$  amibas/ml variaron de 25% a 298% con respecto al lote control PBL 646007 (100%).

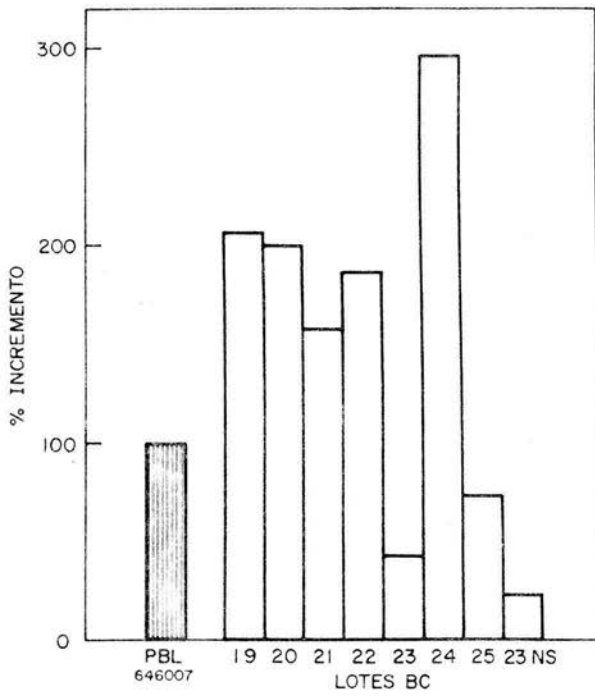
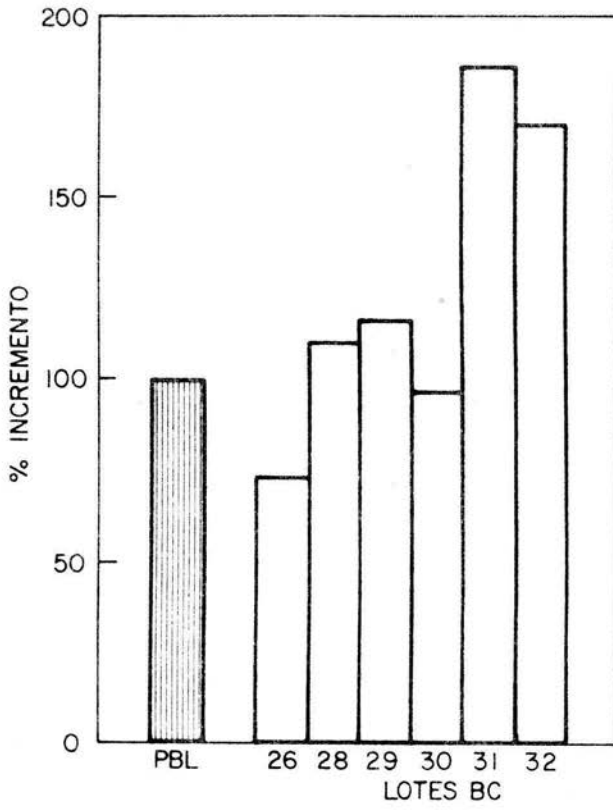


Figura 6. Incrementos relativos en el número de trofozoítos de E. histolytica HMI cultivados en medio TPS-1 preparado con siete lotes de SP elaborados con hígado fresco y tripsina-quimotripsina (TQ) en presencia y ausencia de papaína. Se usaron diferentes proporciones hígado/TQ, los tiempos de digestión fueron de 1 h o 4 h. Los lotes BC26, BC29 y BC30 se elaboraron con TQ, papaína y 1 h de digestión; los lotes BC27 y BC31 con TQ, papaína y 1 h de digestión. Los incrementos promedio en subcultivos sucesivos con inóculos de  $10^4$  amibas/ml variaron de 18% a 207% con respecto al lote control PBL 646007 (100%). El lote BC27 se contaminó con bacterias.



curvas de crecimiento amibiano en medio TPS-1 preparado con cada lote de SP e inóculos de  $2.4 \times 10^3$  amibas/ml; ambos lotes dieron rendimientos amibianos siete veces superiores a los alcanzados en el medio preparado con el lote control de Panmede PBL 646007 (Fig. 7).

## 2. Contenido de vitaminas

Con el objeto de determinar si existía relación entre la calidad del extracto y las vitaminas presentes en el mismo, se determinó el contenido de ellas en los lotes BC31 y BC32, y en los lotes de Panmede 646007 y 697053. Este análisis mostró que el contenido de tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, ácido fólico, y vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina) en los lotes de Panmede fue en promedio 32% menor al de los lotes de SP y un 50% menor que la concentración indicada en la propaganda comercial del Panmede (ver Tabla 4).

## 3. Contenido de aminoácidos

El contenido de 14 de los 17 aminoácidos cuantificados en los lotes BC31 y BC32 de SP fue 8% a 53% inferior con respecto al lote de Panmede 646007 (control), excepto glicina, alanina y amonio, que fueron semejantes (Tabla 5). El contenido promedio relativo de aminoácidos fue mayor en el lote PBL 646007 (considerado arbitrariamente como 100%); con respecto a éste, los lotes PBL 697053, BC31 y BC32 tuvieron contenidos menores en 6%, 14% y 28%, respectivamente.

## Esquema del Proceso Final de Elaboración de SP

Mediante la producción y evaluación de 32 lotes de SP (obtenidos por procesos diferentes y progresivamente mejorados), se pudo definir

Figura 7. Curvas de crecimiento de E. histolytica HMI, obtenidas con los dos mejores lotes de SP y el lote de Panmede usado como control. Iniciadas con  $2.4 \times 10^3$  amibas/ml en medio TPS-I preparado con los lotes de SP BC31 (O) y BC BC32 (●); y el lote de Panmede 646007 (▲).

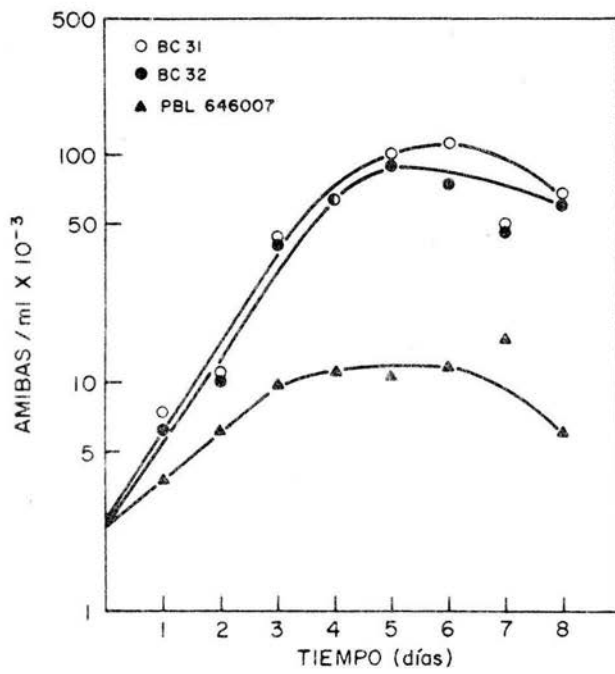


TABLA 4

CONTENIDO VITAMINICO EN CUATRO LOTES DE EXTRACTO DE HIGADO<sup>a</sup>

| Vitaminas                | Panmede               |             |             | SP    |       |
|--------------------------|-----------------------|-------------|-------------|-------|-------|
|                          | Esperado <sup>b</sup> | Lote 646007 | Lote 697053 | BC31  | BC32  |
| Clorhidrato de tiamina   | 1.0                   | 0.8         | 0.6         | 1.8   | 1.8   |
| Riboflavina              | 14.0                  | 12.6        | 13.0        | 11.0  | 13.8  |
| Acido nicotínico         | 47.0                  | 47.0        | 55.2        | 87.0  | 70.0  |
| Acido pantoténico        | 150.0                 | 23.6        | 31.0        | 45.0  | 43.0  |
| Acido fólico             | 2.0                   | 0.4         | 0.5         | 1.3   | 1.2   |
| Vitamina B <sub>12</sub> | 600.0                 | 300.0       | 301.0       | 464.0 | 415.0 |

<sup>a</sup>mg/100 g de extracto para todas, excepto B<sub>12</sub>, que se da en pg/100 g de extracto

<sup>b</sup>Concentraciones en la literatura del Panmede



TABLA 5

CONTENIDO DE AMINOACIDOS<sup>a</sup> EN CUATRO LOTES DE EXTRACTO DE HIGADO

| Aminoácidos     | Panmede     |             | SP          |             |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                 | Lote 646007 | Lote 697053 | Lote BC31   | Lote BC32   |
| Lisina          | 4.52 (7.4)  | 4.36 (7.2)  | 4.06 (6.7)  | 3.47 (5.7)  |
| Histidina       | 1.77 (2.9)  | 1.84 (3.0)  | 1.48 (2.4)  | 1.16 (1.9)  |
| Amonio          | 1.03 (1.7)  | 0.98 (1.6)  | 1.37 (2.2)  | 1.27 (2.0)  |
| Arginina        | 2.67 (4.4)  | 2.92 (4.8)  | 1.07 (1.7)  | 1.22 (2.0)  |
| Acido aspártico | 5.93 (9.7)  | 5.30 (8.7)  | 4.67 (7.7)  | 3.59 (5.9)  |
| Treonina        | 2.89 (4.7)  | 2.49 (4.1)  | 1.97 (3.2)  | 1.72 (2.8)  |
| Serina          | 3.04 (5.0)  | 2.77 (4.5)  | 2.22 (3.6)  | 1.77 (2.9)  |
| Acido glutámico | 9.20 (15)   | 8.89 (15)   | 8.46 (14)   | 7.48 (12)   |
| Prolina         | 3.13 (5.1)  | 3.30 (5.4)  | 3.61 (5.9)  | 2.60 (4.2)  |
| Glicina         | 4.16 (6.8)  | 3.88 (6.4)  | 4.63 (7.6)  | 3.48 (5.7)  |
| Alanina         | 4.43 (7.3)  | 3.81 (6.2)  | 4.94 (8.1)  | 3.40 (5.6)  |
| Valina          | 3.92 (6.4)  | 3.84 (6.3)  | 3.64 (6.0)  | 2.57 (4.2)  |
| Metionita       | 0.62 (1.0)  | 0.76 (1.2)  | 0.32 (0.5)  | 0.39 (0.6)  |
| Isoleucina      | 2.86 (4.7)  | 2.81 (4.6)  | 1.90 (3.1)  | 1.92 (3.1)  |
| Leucina         | 5.71 (9.4)  | 5.85 (9.6)  | 4.76 (7.8)  | 4.43 (7.3)  |
| Tirosina        | 1.59 (2.6)  | 1.80 (2.9)  | 1.12 (1.8)  | 1.08 (1.7)  |
| Fenilalanina    | 3.05 (5.0)  | 3.09 (5.1)  | 1.92 (3.1)  | 1.97 (3.2)  |
| Total           | 60.52 (100) | 56.69 (100) | 52.14 (100) | 43.52 (100) |

<sup>a</sup>Gramos de aminoácidos por 100 g de muestra. Contenido porcentual de aminoácidos entre paréntesis

el proceso con el que se pudo obtener una peptona que puede sustituir ampliamente al Panmede como componente del medio TPS-1.

El proceso seleccionado fue el del lote BC32, debido a que con él se obtiene la máxima calidad y es el más simple. El proceso general de elaboración de SP consistió básicamente en la digestión de un homogeneizado de hígado fresco de bovino a 37°C durante 4 h, el material no digerido se eliminó mediante ebullición, filtración y centrifugación. Por último, el extracto soluble se desecó en una estufa a 60°C (ver fig. 8). El proceso fue continuo y tomó aproximadamente 25 horas; el rendimiento del extracto fue de 6.8 g/100 g de hígado y la mezcla TQ.

La calidad de los tres lotes de SP obtenidos con este procedimiento fue excelente y reproducible. Los componentes básicos empleados en el proceso de elaboración de SP son baratos y fáciles de obtener. El producto final consiste en un polvo café oscuro con característico olor a carne, higroscópico y soluble en agua.

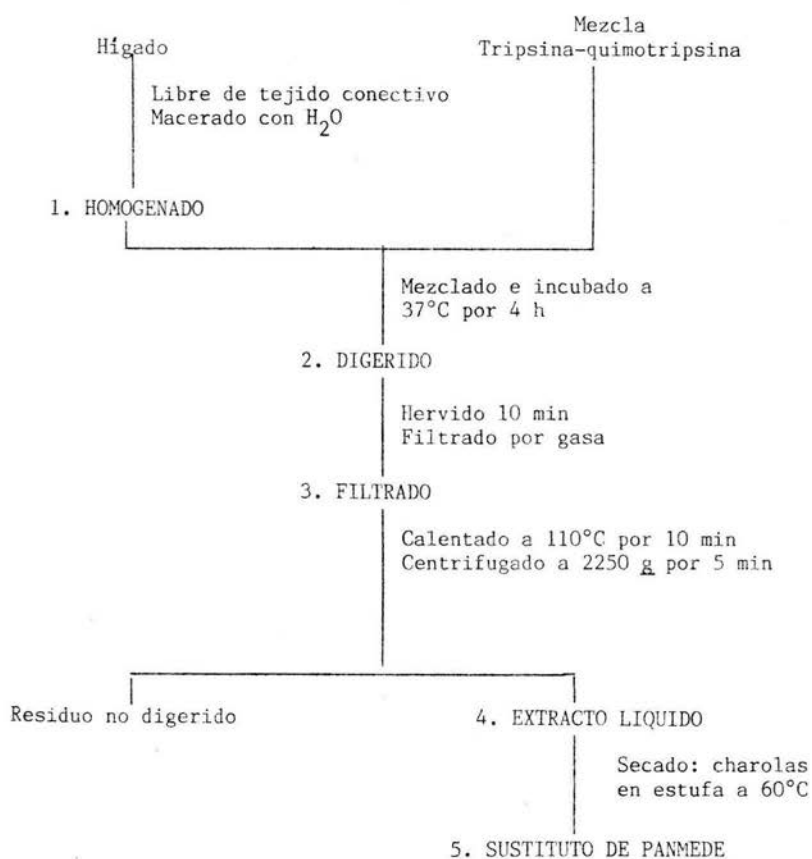
#### B. Efecto del Suero Sobre el Crecimiento Amibiano

##### Variabilidad de los Diferentes Lotes de Suero

Mediante la comparación del crecimiento que promovieron en cultivos de trofozoítos de *E. histolytica* HK9 y HMI, se evaluaron ocho lotes de suero de caballo de diferente origen (tres comerciales y cinco producidos en nuestro laboratorio). Los cultivos se hicieron en medio TP suplementado con suero al 9% para la cepa HK9 y al 18% para la cepa HMI; los inóculos fueron de  $10^4$  amibas/ml.

FIGURA 8

## DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE PRODUCCION DE SP



La cepa HK9 se cultivó en cinco lotes de suero. A las 72 h, los rendimientos promedio obtenidos en cada lote de suero variaron de  $8 \times 10^4$  a  $1.8 \times 10^5$  amibas/ml y las poblaciones se incrementaron de 9 a 13.5 veces (Tabla 6). De acuerdo con estos criterios, el rendimiento de los sueros comerciales fue en promedio 25% inferior a los lotes producidos en el laboratorio.

Para seleccionar el lote de suero que emplearíamos en los siguientes experimentos, se comparó el rendimiento de la cepa HM1 (que es más delicada durante el cultivo) en los lotes CINVESTAV 832, 852A y 852B. Los rendimientos fluctuaron entre  $8 \times 10^4$  y  $1.2 \times 10^5$  amibas/ml, y los incrementos variaron entre 9.6 y 10.8 veces (Tabla 6).

#### Adaptación Amibiana a un Nuevo Lote de Suero

Con el objeto de evaluar el comportamiento de los cultivos amibianos resebrados en un nuevo lote de suero, se registró en tres pases sucesivos el crecimiento de las cepas (HM1, HM2, HM3, HM38 y HK9) en medio TPS-1 suplementado con diferentes concentraciones de suero que variaron del 9.1% al 31.8%.

En la Fig. 9 se ilustran los datos obtenidos con la cepa HM2 (el crecimiento de las demás cepas fue similar). En ella se observa que los rendimientos aumentaron gradualmente en cada resiembra realizada en medio con la concentración óptima del nuevo lote de suero, mientras que a concentraciones mayores o menores de suero el rendimiento fue menor.

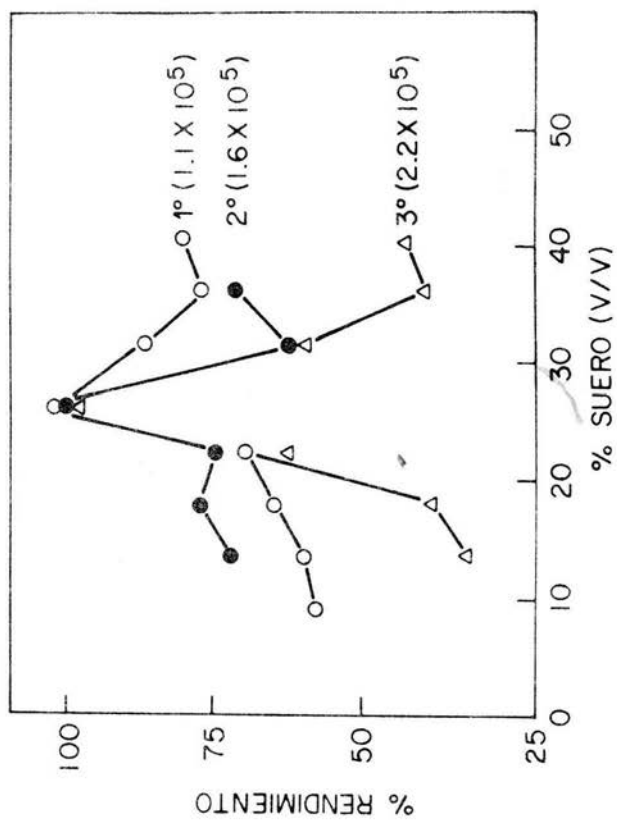
TABLA 6

CRECIMIENTO DE CULTIVOS DE TROFOZOITOS DE ENTAMOeba HISTOLYTICA HK9 Y HM1 EN MEDIO TPS-1 SUPLEMENTADO CON DIFERENTES LOTES DE SUERO

| Cepa | Origen del suero | Rendimiento <sup>a</sup><br>(amibas/ml) X 10 <sup>5</sup> | Incremento |
|------|------------------|---|------------|
| HK9  | Biocel           | 0.8 - 1.0   | 9.0        |
|      | Lab. Myn         | 1.0 - 1.5   | 12.5       |
|      | Microlab         | 0.9 - 1.2   | 10.5       |
|      | CINVESTAV 831    | 1.1 - 1.4   | 12.5       |
|      | CINVESTAV 832    | 1.3 - 1.8   | 15.5       |
|      | CINVESTAV 833    | 1.1 - 1.6   | 13.5       |
| HM1  | CINVESTAV 832    | 0.8 - 1.2   | 10.8       |
|      | CINVESTAV 852A   | 0.8 - 1.0   | 9.6        |
|      | CINVESTAV 852B   | 0.8 - 1.2   | 10.8       |

<sup>a</sup>Inóculos de 10<sup>4</sup> amibas/ml; tiempo de incubación, 72 h; No. de pases, 4

Figura 9. Rendimiento relativo de E. histolytica HM2 en diferentes concentraciones de un nuevo lote de suero de caballo durante tres resiembras sucesivas. Se usaron inóculos de  $10^4$  amibas/ml; los cultivos se realizaron en medio TP con concentraciones de suero que variaron de 9.1% a 36.3% v/v. El rendimiento máximo (100%) se obtuvo con suero al 27% y varió en cada pase sucesivo como sigue: pase 1,  $1.1 \times 10^5$  amibas/ml (O); pase 2,  $1.6 \times 10^5$  amibas/ml (●); pase 3,  $2.2 \times 10^5$  amibas/ml (Δ).



## Concentración Óptima de Suero

### 1. Requerimientos específicos de cepa

Para determinar la óptima concentración de suero para el crecimiento de las cepas HM1, HM2, HM3, HM38 y HK9, evaluamos el efecto del lote CINVESTAV 852B, suplementado en concentraciones que fluctuaron entre 4.5% y 36.3%. Cada cepa se resebró con inóculos de  $10^4$  amibas/ml en cuatro pases sucesivos. Al finalizar los cuatro subcultivos se determinaron los rendimientos relativos de cada cepa con cada concentración de suero.

Los resultados de estos experimentos se presentan en la Fig. 10. En ella se observa que la concentración óptima de suero fue diferente y específica para cada una de las cinco cepas estudiadas (28% para la cepa HM1, 27% para la HM2, 23% para la HM3, 21% para la HM38 y 23% para la HK9).

### 2. Dependencia del lote de suero

El efecto del lote de suero se evaluó mediante el análisis del crecimiento de la cepa HM2 en medio TP suplementado con los sueros CINVESTAV 852B y 832. Las resiembras se hicieron con inóculos de  $10^4$  amibas/ml durante cuatro subcultivos en medio suplementado con concentraciones de suero que variaron de 9% a 36.3%.

La concentración óptima de suero para la cepa HM2 fue 18.1% con el lote 852B y 27.2% con el lote 832 (Fig. 11); a estas concentraciones, el rendimiento de la cepa HM2 fue 107% mayor con el lote 832 (Fig. 11).

### 3. Crecimiento con concentraciones de suero habituales y óptimas

Con el fin de determinar si había diferencias significativas en el



Figura 10. Rendimiento relativo de cinco cepas de E. histolytica cultivadas en medio TP suplementado con diferentes concentraciones del mismo lote de suero de caballo. Se presenta el crecimiento de las cepas HM1, HM2, HM3, HM38 y HK9 cultivadas en medio con concentraciones variables de suero (4.5% a 36.3% v/v) del lote 852B. Los inóculos fueron de  $10^4$  amibas/ml. Las concentraciones óptimas de suero (% v/v) y los rendimientos máximos (amibas/ml) para cada cepa fueron respectivamente: HM1 28%,  $3.5 \times 10^4$ ; HM2 27%,  $8.0 \times 10^4$ ; HM3 23%,  $16.5 \times 10^4$ ; HM38 21%,  $12.8 \times 10^4$ ; HK9 23%,  $14.0 \times 10^4$ .

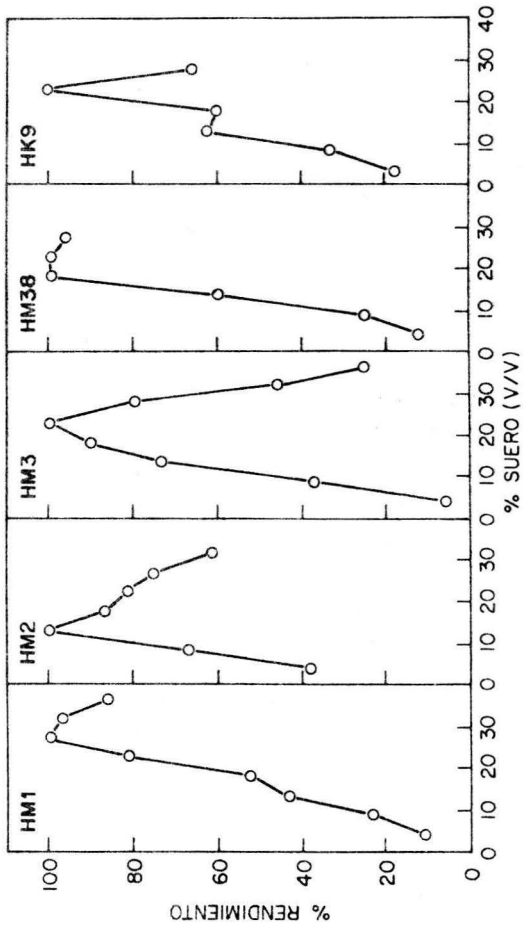
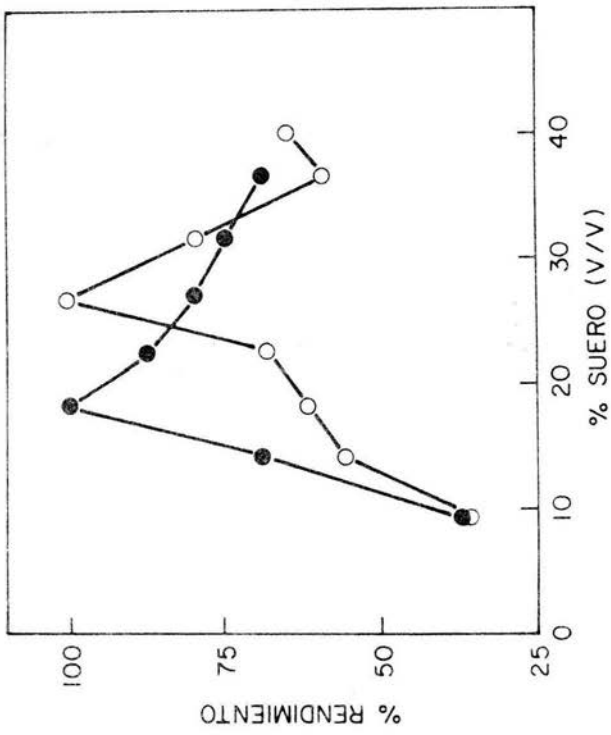


Figura 11. Rendimiento de trofozoítos de *E. histolytica* HM2 cultivados en dos lotes de suero de caballo a diferentes concentraciones. Se presenta el rendimiento porcentual de cuatro subcultivos de HM2 en medio TP suplementado con diferentes concentraciones (9.1% a 36.3%) de los lotes de suero 832 (O) y 852B (●). Los inóculos fueron de  $10^4$  amibas/ml. Para el lote 832, el rendimiento máximo ( $16.6 \times 10^4$  amibas/ml) se obtuvo con suero al 27.2%; para el 852B, el rendimiento máximo ( $8.0 \times 10^4$  amibas/ml) se obtuvo con suero al 18.1%.



crecimiento de los subcultivos realizados con concentraciones óptimas del suero y las empleadas habitualmente en el laboratorio (9% para HM3 y HK9 y 18% para HM1, HM2 y HM38), se determinaron los parámetros de crecimiento.

Los parámetros de crecimiento se calcularon a partir de las curvas de crecimiento respectivas, en cultivos efectuados con componentes del mismo lote de suero (lote 852B para las cepas HM1, HM3 y HM38; lote 832 para la cepa HM2).

Con las concentraciones óptimas de suero se obtuvieron rendimientos 23% a 217% superiores, en tanto que las velocidades de crecimiento aumentaron entre 17% y 36% (Fig. 12). Los parámetros de crecimiento fueron característicos de cepa y se detallan en la Tabla 7.

### C. Estandarización de los Procedimientos de Cultivo Axénico Amibiano

Al evaluar los efectos de la concentración y de los diferentes lotes de suero, así como de los diferentes lotes de Panmede sobre el crecimiento de E. histolytica, encontramos variaciones significativas en los parámetros de crecimiento.

#### Calidad de Diferentes Lotes de Panmede

La comparación de los incrementos y rendimientos de la cepa HM1 cultivada en 15 lotes de Panmede, mostró que la calidad de ellos varía ampliamente; algunos de ellos fueron incapaces de sustentar el crecimiento amibiano (ver Tabla 2, Fig. 1).

Con el procedimiento desarrollado por nosotros (Fig. 8) pudimos

TABLA 7

CRECIMIENTO DE CUATRO CEPAS DE *E. histolytica* CULTIVADAS<sup>a</sup> EN MEDIO TP SUPLEMENTADO CON SUERO DE CABALLO A CONCENTRACIONES HABITUAL Y OPTIMA

| Cepa              | Suero <sup>b</sup><br>(v/v) | Rendimiento máximo |                        | Parámetros de crecimiento   |                                |          |
|-------------------|-----------------------------|--------------------|------------------------|-----------------------------|--------------------------------|----------|
|                   |                             | Días de incubación | amibas/ml <sup>d</sup> | t <sub>D</sub> <sup>e</sup> | $\mu$ <sup>c</sup><br>absoluta | relativa |
| HM1 <sup>f</sup>  | 18%                         | 4                  | 12.6 ± 3.7             | 24.1 h                      | 0.041                          | 0.44     |
|                   | 28%                         | 4                  | 17.8 ± 2.5             | 19.5 h                      | 0.051                          | 0.54     |
| HM2 <sup>g</sup>  | 18%                         | 3                  | 4.1 ± 0.5              | 75.0 h                      | 0.013                          | 0.13     |
|                   | 27%                         | 3                  | 13.2                   | 11.2 h                      | 0.089                          | 0.95     |
| HM3 <sup>f</sup>  | 9%                          | 3                  | 15.8 ± 1.9             | 18.2 h                      | 0.054                          | 0.58     |
|                   | 23%                         | 3                  | 19.5 ± 4.2             | 10.7 h                      | 0.093                          | (1.00)   |
| HM38 <sup>f</sup> | 18%                         | 4                  | 19.0 ± 7.0             | 26.0 h                      | 0.038                          | 0.40     |
|                   | 21%                         | 4                  | 29.8 ± 5.6             | 21.6 h                      | 0.046                          | 0.49     |

<sup>a</sup>Inóculos: 10<sup>4</sup> amibas/ml

<sup>b</sup>La concentración habitual es la primera, la óptima es la segunda

<sup>c</sup> $\mu$  = duplicaciones por hora

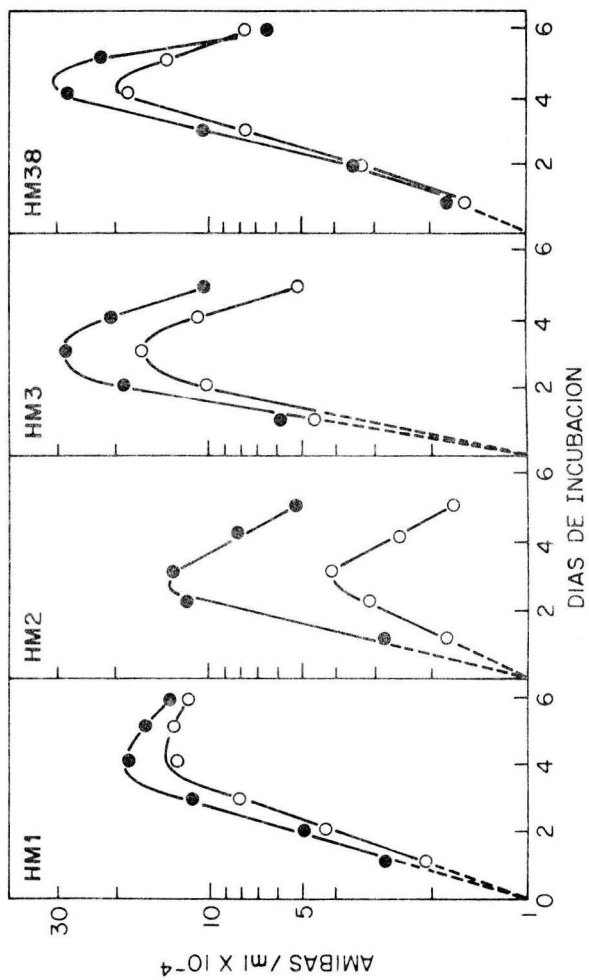
<sup>d</sup>(Promedio ± DE) X 10<sup>-4</sup>

<sup>e</sup>Tiempo de duplicación

<sup>f</sup>Suero del lote 852B

<sup>g</sup>Suero del lote 832

Figura 12. Cinéticas de crecimiento de cuatro cepas de E. histolytica cultivadas en medio TPS-1 suplementado con suero de caballo a las concentraciones habituales y óptimas de suero para cada cepa. Los inóculos fueron de  $10^4$  amibas/ml. Todas las cepas se cultivaron en medio suplementado con el lote de suero 852B, excepto la cepa HM2, que se cultivó en medio con el lote de suero 832. Las concentraciones habituales (O) y óptimas (◐), respectivamente, para cada cepa fueron: HM1 18% y 28%; HM2 18% y 27%; HM3 9% y 23%; HM38 18% y 21%.





obtener un sustituto de Panmede que confería las siguientes cualidades al medio TPS-1 en relación con los cultivos amibianos axénicos: 1) requería inóculos menores, 2) aumentaba los rendimientos, 3) permitía mayores velocidades de crecimiento y 4) era de calidad reproducible (Fig. 7).

#### Calidad de Diferentes Lotes de Suero

La evaluación del crecimiento de las cepas HK9 y HM1 en suero de diferente origen (tres lotes comerciales y cinco producidos en el laboratorio) mostró que los rendimientos amibianos variaron con el lote de suero (ver Tabla 6).

Por otro lado, mediante el cultivo de las cinco cepas amibianas en medio TP suplementado con suero CINVESTAV 852B, se observó que la concentración óptima de suero era específica de cepa y diferente a la empleada rutinariamente en el laboratorio (ver Fig. 10).

También se observó que para una cepa dada la concentración óptima de suero variaba con el lote, como se puede ver en la Fig. 11, donde se muestra el crecimiento de la cepa HM2 en medio suplementado con diferentes concentraciones de dos lotes de suero.

#### Parámetros de Crecimiento de las Cepas

Los parámetros de crecimiento calculados a partir de las curvas de crecimiento de las cepas HM1, HM2, HM3 y HM38 se detallan en la Tabla 7. En ella se muestra que el rendimiento máximo, el tiempo de duplicación y la constante de velocidad de crecimiento exponencial fueron específicos de cepa y dependieron de la concentración de suero (a concentraciones óptimas del lote 852B, los cultivos rindieron 23%

a 217% más amibas que con las concentraciones habituales).

#### Protocolos de Resiembra de las Cepas

Las variaciones en la calidad de los diferentes lotes de suero y de Panmede implican que no se puede usar una sola receta para estandarizar el cultivo axénico amibiano y, por ende, tampoco se puede tener una sola receta para diseñar protocolos de resiembra específicos de cepa. La estandarización únicamente se logrará con un lote dado de suero añadido al medio TP que haya sido preparado con un lote dado de Panmede.

Con base en todos los resultados mostrados previamente, consideramos que los protocolos de cultivo son específicos para cada cepa amibiana y deben considerar los siguientes puntos:

- 1) Selección de un buen lote de Panmede
- 2) Selección de un buen lote de suero
- 3) Determinación de la concentración óptima de suero para cada cepa
- 4) Determinación de los parámetros de crecimiento de cada cepa, obtenidos con diferentes inóculos y a la concentración óptima de suero
- 5) Determinación de los protocolos de cultivo específicos de cepa, en los lotes respectivos de Panmede y suero, mediante el uso de los parámetros de crecimiento de cada cepa. Las variables que deben determinarse son: inóculo y tiempo de incubación
- 6) Confirmación de la validez de cada protocolo a través de la reproducibilidad de los parámetros de crecimiento (mediante seis subcultivos de la cepa en cuestión)

## DISCUSION

El cultivo axénico de Entamoeba histolytica se usa ampliamente en la investigación biomédica, así como en la producción de los antígenos usados para el diagnóstico serológico y estudios epidemiológicos de la amibiasis (Diamond 1980, Benders 1977); la precisión y el rigor con los que se realizan estos estudios depende de la calidad de los cultivos axénicos amibianos.

De los componentes del medio TPS-1 (que es el más usado de los dos con los que se cuenta actualmente para el cultivo axénico), el Panmede (extracto de hígado bovino fabricado en Inglaterra por Pines & Byrne Ltd.) y el suero de origen animal son de calidad inconsistente y provocan variabilidad en la calidad de los cultivos axénicos amibianos.

Para optimizar la calidad de los cultivos axénicos de E. histolytica evaluamos la capacidad que tienen para sustentar el crecimiento amibiano diversos lotes de Panmede y suero. La acentuada inconsistencia de la calidad del Panmede nos llevó a proponer como un objetivo adicional importante de este trabajo, desarrollar un proceso de elaboración de extracto de hígado de calidad consistente que pudiera sustituir satisfactoriamente al Panmede.

La variabilidad de la calidad de los lotes de Panmede la han venido observando todos los laboratorios que realizan el cultivo axénico amibiano en el medio TPS-1. Sin embargo, como ninguno lo había cuantificado, diversos grupos que realizaban el cultivo axénico amibiano en medio

TPS-1 prefieren actualmente utilizar el medio TYI-S-33, introducido también por Diamond y col. (1978). En este medio se sustituyó el Panmede por extracto de levadura y se añadieron otros componentes de composición definida como el citrato férrico amoniacal.

Al introducir el medio TYI-S-33, los autores afirmaron que su calidad era constante; sin embargo, con el tiempo se ha visto que también en este segundo medio existe el mismo problema de variabilidad (con el extracto de levadura, ATCC Media Handbook 1984) que con el TPS-1, que aún dentro de su inconsistencia en nuestras manos ha demostrado soportar mejor el crecimiento amibiano. Por ello, en nuestro laboratorio nos inclinamos por el uso del medio TPS-1 y creímos importante contar con un sustituto de Panmede de calidad tal que asegurara la calidad y constancia del medio.

Inicialmente evaluamos 15 lotes de Panmede y encontramos que su calidad variaba ampliamente, siendo algunos de ellos incapaces de mantener el crecimiento amibiano (Tabla 2, Fig. 1). De acuerdo con los criterios de calidad que propusimos (Tabla 1), ningún lote resultó excelente, hubo seis regulares o buenos y la mayoría (nueve) fueron malos (Tabla 3).

Los primeros lotes del sustituto de Panmede los elaboramos mediante modificaciones hechas al procedimiento propuesto inicialmente por Tripathi y col. (1974). Introdujimos variaciones en el tipo y concentración de enzimas, tiempos de digestión, mejor eliminación del material no digerido y en las técnicas de secado. Elaboramos 32 lotes diferentes de extracto de manera que los procesos se fueron proponiendo y desarrollando sucesivamente mediante evaluación de la calidad del lote anterior. Cada lote implicó diferencias en las combinaciones

de los componentes y en su tratamiento.

Finalmente desarrollamos un procedimiento con el cual pudimos obtener, a escala de laboratorio, un sustituto de Panmede (SP) que confiere las siguientes cualidades al cultivo en medio TPS-1: 1) calidad consistente, 2) inóculos amibianos menores y 3) mayores velocidades de crecimiento amibiano (Fig. 7).

El esquema general de procesamiento de esta peptona (Fig. 8) consistió en la digestión enzimática de homogeneizados de hígado fresco de bovino durante 4 h a 37°C. De la mezcla de digestión, el material no digerido se eliminó a través de cuatro pasos seriados: ebullición, filtración, ebullición y clarificación por centrifugación. Al final de esta clarificación, se obtenía el extracto soluble que luego era desecado a 60°C en un horno. Nuestro extracto contenía 30% más vitaminas (Tabla 4) y hasta 28% menos aminoácidos (Tabla 5) que el Panmede.

Los componentes básicos empleados son fáciles de obtener y baratos, por lo que de producirse el extracto a mayor escala se reduciría notablemente el costo de los cultivos amibianos por concepto de importación y pérdidas por la calidad del Panmede.

Por otro lado, el SP podría emplearse también para preparar otros medios de cultivo enriquecidos que se emplean para una amplia variedad de microorganismos de interés médico y de requerimientos nutricionales complejos como Trichomonas vaginalis (ATCC catalogue 1982), Trichomonas gallinae (ATCC catalogue 1982), Giardia intestinalis (Visvesvara 1980), Naegleria fowleri y N. gruberi (Simione y col. 1966) y otras especies del género Entamoeba (Diamond 1968, Diamond y Bartgis 1970).

Por lo que respecta al suero, la concentración que usamos habitualmente en nuestro laboratorio es la que recomiendan Diamond y col. (1978). Sin embargo, habíamos notado gran variabilidad en el crecimiento de E. histolytica con diferentes lotes de suero.

Para analizar el efecto del suero sobre el crecimiento de E. histolytica usamos cinco cepas (HM1, HM2, HM3, HM38 y HK9) cultivadas con diferentes concentraciones (de 4.5% a 36.3% v/v) de uno de los mejores lotes de suero (lote 852B, ver Tabla 6); encontramos que la concentración óptima de este lote era diferente a la usada habitualmente y que además era diferente y específica para cada una de las cinco cepas (Fig. 11). También encontramos que la concentración óptima de suero para una misma cepa variaba con diferentes lotes de suero (Fig. 10). La determinación de los parámetros de crecimiento (rendimiento máximo, tiempo de duplicación y duplicaciones por hora) de las cepas (HM1, HM2, HM3 y HM38) mostró que éstos fueron específicos de cepa y dependieron de la concentración de suero adicionado al medio (Tabla 7, Fig. 12). Estos resultados indican claramente que para iniciar el cultivo con un nuevo lote de suero debe definirse su concentración óptima para cada cepa.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo y discutidos hasta aquí indicaron que la calidad del cultivo axénico de E. histolytica en medio TPS-1 depende de dos aspectos generales muy importantes: 1) la variabilidad en la calidad de los lotes de Panmede y 2) la calidad y concentración del lote de suero empleado. Estas variaciones indican que los procedimientos de cultivo seguidos en cualquier laboratorio deben tomar en cuenta ambos factores. De esta manera pueden establecerse protocolos específicos de cepa para lotes definidos de Panmede y suero.

Por la experiencia con los procedimientos de cultivo amibiano que hemos mostrado en este trabajo, proponemos la siguiente serie de pasos sucesivos que deben darse para definir protocolos de resiembra específicos de cepa:

1. Selección de un buen lote de Panmede. Esta selección se puede realizar evaluando el crecimiento amibiano a través de seis subcultivos sucesivos con una cepa fastidiosa (como se describe en Métodos).
2. Selección de un buen lote de suero. Se pueden solicitar muestras de suero de varios proveedores; la mayoría de los proveedores de suero reservan normalmente un lote dado hasta que el comprador pueda seleccionar el más apropiado.

Aunque la calidad de los lotes de suero pueda ser asegurado por el proveedor, el control de calidad generalmente es realizado con una sola línea celular (Freshney 1983). En el caso de E. histolytica los requerimientos de calidad son mayores, por lo que el comprador debe realizar sus propias pruebas. El lote a prueba debe ser capaz de soportar el crecimiento de la cepa más difícil de cultivar de la colección durante seis resiembras sucesivas; además de que el rendimiento amibiano obtenido en el último subcultivo no debe ser inferior al del cultivo inicial, también debe ser por lo menos igual o superior al del lote de suero en uso.

Para un control de calidad más estricto, el nuevo lote de suero debe ser capaz de promover el crecimiento amibiano a inóculos bajos (p. ej.,  $10^3$  amibas/ml) y permitir velocidades de crecimiento y rendimientos mayores al del lote en uso. Estos parámetros pueden determinarse a través de curvas de crecimiento.

3. Determinación de la concentración óptima de suero para cada cepa.

Se determina cultivando por seis resiembras sucesivas cada cepa con concentraciones de suero de 4.5% a 36.3% v/v. Al finalizar la última resiembra se determinan los tiempos de duplicación y rendimientos promedio de cada cepa en las resiembras hechas con cada concentración de suero. La concentración óptima de suero para cada cepa será la que dé mayores rendimientos y menores tiempos de duplicación (ver Métodos).

4. Determinación de los parámetros de crecimiento de cada cepa. Los parámetros de crecimiento se calculan a partir de curvas de crecimiento (ver Métodos) obtenidas con diferentes inóculos (i. e.,  $10^3$  o  $10^4$  amibas/ml) y a la concentración óptima de suero para la cepa en cuestión.
5. Determinación de los protocolos de cultivo específicos de cepa en lotes dados de Panmede y suero. Mediante el análisis de las cinéticas y parámetros de crecimiento específicos de cepa se define un protocolo estricto que consiste en inóculos fijos y tiempos dados de incubación de cada resiembra.
6. Confirmación de la validez del protocolo a través de la reproducibilidad de los parámetros de crecimiento amibiano. La validez se establece a través del registro de la reproducibilidad de los inóculos y la dispersión en los rendimientos amibianos a través de subcultivos sucesivos de la cepa en cuestión. En un protocolo estandarizado las dispersiones deben ser pequeñas (López-Revilla, Rodríguez-Báez 1981).

El control sistemático de la calidad de los cultivos axénicos amibianos a través de la producción a escala suficiente del sustituto de Panmede, la provisión de lotes de suero de calidad adecuada y la estandarización de los protocolos de resiembra servirá para obtener los



cultivos amibianos de calidad óptima que serán empleados para obtener resultados válidos en investigación básica, clínica y epidemiológica de la amibiasis.

## CONCLUSIONES

1. La calidad de los lotes de Panmede varía ampliamente; algunos no llegan a soportar el crecimiento amibiano.
2. Se desarrolló, a escala de laboratorio, un procedimiento controlado para la elaboración de una peptona de hígado bovino que puede sustituir con ventaja al Panmede como componente del medio de cultivo axénico TPS-1, debido a sus siguientes cualidades: a) promueve el crecimiento amibiano a bajos inóculos, b) da rendimientos mayores, c) permite mayores velocidades de crecimiento y d) tiene calidad consistente de lote a lote.
3. El crecimiento óptimo de E. histolytica depende de la concentración de suero adicionado al medio TPS-1.
4. La concentración óptima de suero es específica de cepa y varía con el lote de suero.
5. Los parámetros de crecimiento son característicos de cepa y dependen del lote de suero.
6. La calidad del cultivo axénico de E. histolytica en medio TPS-1 depende principalmente de dos factores generales: a) variabilidad en la calidad de los lotes de Panmede y b) la calidad y concentración de los lotes de suero.
7. Debido a las variaciones en la calidad de los lotes de Panmede y suero puede lograrse la estandarización de los protocolos de resiembra de cada cepa sólo con lotes de Panmede y suero definidos.

8. Se propone el siguiente mecanismo para establecer protocolos de resiembra específicos de cepa. Considera los siguientes pasos sucesivos:

- 1) Selección de un buen lote de Panmede
- 2) Selección de un buen lote de suero
- 3) Determinación de la concentración óptima de suero para cada cepa
- 4) Determinación de los parámetros de crecimiento de cada cepa, obtenidos con diferentes inóculos y a la concentración óptima de suero
- 5) Determinación de los protocolos de cultivo específicos de cepa, en los lotes respectivos de Panmede y suero, mediante el análisis de los parámetros de crecimiento de cada cepa. Las variables que deben fijarse son: inóculo y tiempo de incubación
- 6) Reproducibilidad de la velocidad de crecimiento y del rendimiento de los cultivos en cada cepa amibiana con un protocolo de resiembra dado

## REFERENCIAS

- Arnon R. 1970. Papain. Colowick P.S. y Kaplan O.N. ed. Methods in enzymology. Nueva York: Academic Press 19: 226-244.
- Balamuth W. y Sandza 1944. Simple standardized culture medium for physiological studies on Entamoeba histolytica. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 57: 161-163.
- Benders B., Brauns F. y Zwisler O. 1977. Biochemical and technical considerations regarding the mass production of certain parasitic protozoa. Bull. WHO. 55: 393-402.
- Boeck W.C. y Drbohlav J. 1925. The cultivation of Entamoeba histolytica. Am. J. Hyg. 5: 371-407.
- Brandt H. y Pérez-Tamayo R. 1970. Amibiasis. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. 1-15.
- Chinn B.D., Jacobs L., Reardon L.V. y Rees C.W. 1942. The influence of the bacterial flora on the cultivation of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. 22: 137-146.
- Cleveland L.R. y Sanders E.P. 1930. The production of bacteria-free amoebic abscesses in the liver of cats and observations on the amoebae in various media with and without bacteria. Science 77: 149.
- Coriell L. 1973. Methods of prevention of bacterial, fungal and other contaminations. Fogh J. Contamination in tissue culture. Academic Press Inc. (London) Ltd. 36-38 .
- De la Torre M., De la Hoz R. y Filloy L. 1974. Cultivos axénicos de cepas mexicanas de E. histolytica HM-2:IMSS y HM-3:IMSS. Arch. Invest. Med. 5(supl. 2): 279-282.

- Diamond L.S. 1961. Axenic cultivation of Entamoeba histolytica. Science 134: 336-337.
- Diamond L.S. 1968. Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 and E. histolytica-like amebae. J. Parasitol. 54: 1047-1056.
- Diamond L.S., Phillips B.P. y Bartgis I.L. 1974. A comparison of the virulence of nine strains of axenically cultivated E. histolytica in hamster liver. Arch. Invest. Med. 5(supl. 2): 423-426.
- Diamond L.S., Harlow D.R. y Cunnick C.C. 1978. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Tr. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 431-432.
- Diamond L.S. 1980. Axenic cultivation of Entamoeba histolytica: Progress and problems. Arch. Invest. Med. (Mex.) 11(supl.1): 47-54.
- Diamond L.S. 1983. Lumen dwelling protozoa: Entamoeba, trichomonads, and Giardia. Jensen J.B. In vitro cultivation of protozoan parasites. C.R.C. Press. Florida, USA. 67-70, 84-86 .
- Dobell, C. y Laidlaw P.P. 1926. On the cultivation of Entamoeba histolytica and some other entozoic amoebae. Parasitology. 18: 283-318.
- Eldson-Dew R., Juniper K. y Powell S.D. 1971. The serology of amebiasis. Bull N.Y. Acad. 47: 494-507.
- Freshney R.I. 1983. Culture of animal cells. I. A manual of basic techniques. Alan R. Liss, Inc. New York. 77-78.
- Gillin F.D. y Diamond L.S. 1978. Clonal growth of Entamoeba histolytica and other species of Entamoeba in agar. J. Protozool. 24: 539-543.
- Kudo R.R. 1979. Protozoología. Compañía Editorial Continental, S.A. México.
- Gutiérrez G., Ludlow E., Espinosa G., Herrera S., Muñoz O., Tattoni N. y Sepúlveda B. 1976. Encuesta serológica nacional. II. Investigación de anticuerpos contra Entamoeba histolytica en la República

- Mexicana. En: Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiasis. México. Sepúlveda B. y Diamond L.S. (eds.). 599-608.
- López-Revilla R. y Rodríguez-Báez. 1981. Manual para el cultivo axénico de Entamoeba histolytica. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México.
- Markell E. y Voge M. 1984. Parasitología: Diagnóstico, Prevención y tratamiento. El Manual Moderno, S.A. de C.V. 5a. ed. México. 33-34 . .
- Martínez-Palomo A. 1982. The biology of Entamoeba histolytica. Research Studies Press. Letchworth, Inglaterra. 1-10.
- McConnachie E.W. 1962. A medium for the axenic cultivation of Entamoeba invadens. Nature 194: 603-604.
- Moore S. y Stein W.H. 1963. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. Colowick P.S. y Kaplan O.N. ed. Methods in enzymology. Nueva York: Academic Press. 6: 819-831.
- Phillips B.P. 1950. Cultivation of Entamoeba histolytica with Trypanosoma cruzi. Science. 111: 8-9.
- Phillips B.P. 1962. Further studies with ameba-trypanosome cultures. Am. J. Trop. Med. Hyg. 11: 6-11.
- Rees C.W., Reardon L.V., Jacobs L. y Jones F. 1941. Problems encountered in the growth of Entamoeba histolytica in cultures developed by micro-isolation. Am. J. Trop. Med. 21: 567-578.
- Reeves R.E., Meleney H.E. y Frye W.W. 1957. A modified Shaffer-Frye technique for the cultivation of Entamoeba histolytica and some observations on its carbohydrate requirements. Am. J. Hyg. 66: 56-62.
- Robinson G.L. 1968. The laboratory diagnosis of human parasitic amebae. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 62: 285-294.

- Shaffer J.G. y Frye W.W. 1948. Studies on growth requirements of Endamoeba histolytica. I. Maintenance of a strain on E. histolytica through one hundred transplants in the absence of an actively multiplying bacterial flora. Am. J. Hyg. 47: 214-221.
- Simione Jr. F.P. y Daggett P.M. 1966. Freeze preservation and free-living Naegleria species. J. Parasitol. 62: 49.
- The American Type Culture Collection. 1982. Catalogue of strains. 15a. edición. Maryland, USA.
- The American Type Culture Collection. 1984. Media Handbook. 1a. edición Maryland, USA.
- Tripathi L.M., Varma V. y Mohan Rao V.D. 1974. A substitute for imported Panmede for axenic cultivation of Entamoeba histolytica. Res. and Ind. 19: 98-100.
- Visvesvara G.A. 1980. Axenic growth of Giardia lamblia in Diamond's TPS-1 medium. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 74: 215.
- Wittner M. 1968. Growth characteristics of axenic strains of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903. J. Protozool. 15: 403-406.