



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“CUAUTITLAN”

DETERMINACION DE DOSIS INFECTIVA 50 Y 100 %, DE
Entamoeba histolytica CEPA HM-1 IMSS OBTENIDA EN CULTIVO
AXENICO EN HAMSTERS LACTANTES Y EL ESTUDIO DE ALGUNOS
FACTORES QUE MODIFICAN ESTA PRUEBA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

RAMONA ROJAS GALVAN

Director de la Tesis: M.V.Z. PABLO MARTINEZ LABAT



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	20
Material y Métodos	21
Resultados	29
Discusión	50
Conclusiones	54
Bibliografía	55

RESUMEN

Es necesario contar con un método que permita evaluar la virulencia de las amibas . Se ha observado que el hamster lactante es más susceptible para producir absceso hepático amibiano que el hamster adulto, además de las ventajas que representa en la manipulación de los animales así como la reducción del número de amibas-inoculadas y la vía de inoculación.

Se determina la DI_{50} y DI_{100} con trofozoítos de cultivo axénico de la cepa de E. histolytica HM-1 IMSS. Obteniéndose valores de 1730 y 20000 amibas para cada dosis respectivamente.

En los parámetros estudiados en estas determinaciones fueron: tipo de suero empleado (bovino o caballo) en el cultivo, tiempo de cultivo (48 y 72) , agitación del inóculo y agitación del inóculo con respecto al tiempo .

En donde se observó que los parámetros estudiados son importantes para la determinación de la Dosis Infecciosa. Se observó que al emplear suero de bovino la DI_{50} es más baja que con suero de caballo así como para el tiempo de cultivo la DI_{50} es más baja - (valor extrapolado) para 48 horas de cultivo que para 72 horas de cultivo .

Es muy notable la importancia que tiene la agitación del inóculo ya que si se agita se observa una diferencia de porcentaje de infectividad de un 45.3 % . La agitación del inóculo con respecto al tiempo debe ser constante de no ser así se observa variación en el porcentaje de infectividad (p. ej. de 0' a 15' de un 30% en un inóculo no agitado.

INTRODUCCION

Generalidades

La amibiiasis es una enfermedad infecciosa endémica debida - al protozoo conocido como Entamoeba histolytica (E. histolytica). Aunque existen otras amibas que parasitan al hombre E. histolytica es la única patógena; en el intestino humano pueden encontrarse también Entamoeba coli, Endolimax nana, Iodamoeba butschilii y Dientamoeba fragilis, y en cavidad bucal puede haber Entamoeba gingivalis. Pero con la excepción de E. histolytica ninguno de los protozoos mencionados tiene la capacidad - de producir lesiones en el intestino, ni mucho menos de invadir tejidos extraintestinales. Parásitos semejantes a la amiba, como Hartmannella sp., que pueden producir meningoencefalitis, llegan a confundirse con ella, pero son de ocurrencia tan excepcional que constituyen verdaderas rarezas.

Aunque la forma más frecuente de amibiiasis es la intestinal y ésta de origen en muchos casos a un síndrome bien característico (diseñerfa amibiana), la enfermedad no está limitada sólo al aparato digestivo; en ciertos casos los parásitos migran de la pared del intestino a otras partes del organismo, dando lugar a graves complicaciones. La sintomatología de las formas extraintestinales de la amibiiasis dependerá de su localización.

Frecuencia

La amibiiasis estranmitida de hombre a hombre y existe practicamente en todos los países del mundo. Aunque habitualmente se considera como una enfermedad tropical, porque su frecuencia es más elevada en países de climas cálidos y húmedos. En la ciudad de México la amibiiasis ocupa el cuarto lugar como causa de muerte.

E. histolytica es un protozoario de la clase Rhizopoda y -- del género Entamoeba. El ciclo de vida de E. histolytica es complejo y en el se producen algunos cambios en la morfología del parásito; los más importantes son el quiste y el trofozoito o forma móvil. Las formas intermedias, el prequiste y el metaquiste, son parte del ciclo biológico (21).

Morfología

En preparaciones no teñidas, el quiste es una estructura redonda u oval que mide de 3.5 a 25 micras de diametro; cuando se tñe de manera adecuada muestra de 1 a 8 núcleos, pero lo más común es que sean 4, con una membrana nuclear delicada que presenta condensaciones de cromatina agregados sobre la superficie interna, con un endosoma central formado por uno o varios gránulos dispuestos en un órgano compacto. Los quistes de E. histolytica también muestran cuerpos cromatoides con puntas romas que facilitan su distinción. El citoplasma es ligeramente granular y puede contener algunas vacuolas (figura 1) (4).

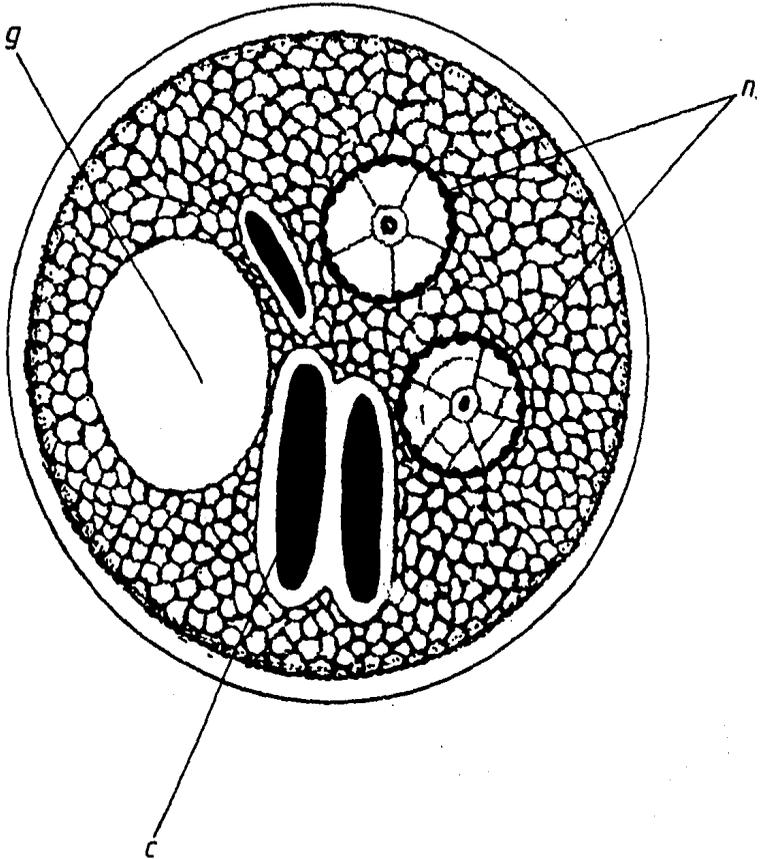


Figura 1.- Quiste binucleado; g, vacuola de glucogeno; n, nucleos;
c, cuerpos cromatoides.

Aunque existen observaciones experimentales (21) muy sugestivas de que la ingestión de trofozoítos de E. histolytica puede producir la enfermedad, aún en presencia de niveles altos de acidez gástrica, la infección habitualmente se adquiere por la ingestión de quistes; una vez que el parásito se encuentra dentro del organismo el quiste se rompe después de reduplicación-- de cada núcleo, el citoplasma que rodea cada núcleo aumenta de tamaño y los trofozoítos resultantes pueden ser identificados en los tejidos. Estos trofozoítos miden de 6 a 40 micras de diámetro y en preparaciones teñidas muestran una membrana citoplasmica delgada; el contenido se divide clásicamente en dos porciones: una zona externa o exoplasma, que es más clara y que da lugar a pseudópodos, y una zona interna, o endoplasma finamente granular y con muchas vacuolas. El núcleo ocupa aproximadamente una quinta parte del volumen celular y aparece como una esfera central rodeada de una membrana delgada, con cromatina granular dispuesta en masas irregulares. El cariosoma es prominente y -- con frecuencia está en el centro del núcleo, aunque en ocasiones puede ser más o menos excentrico; representa una área de condensación de cromatina y en los cortes histológicos aparece como un punto obscuro. El área entre el cariosoma y la membrana nuclear es clara y muestra fibrillas acromáticas (figura 2) (4).

Estudios de morfología al microscopio electrónico revelan -- que el citoplasma del trofozoíto de E. histolytica es caracterizado por la ausencia de organelos que son típicos de las célu--

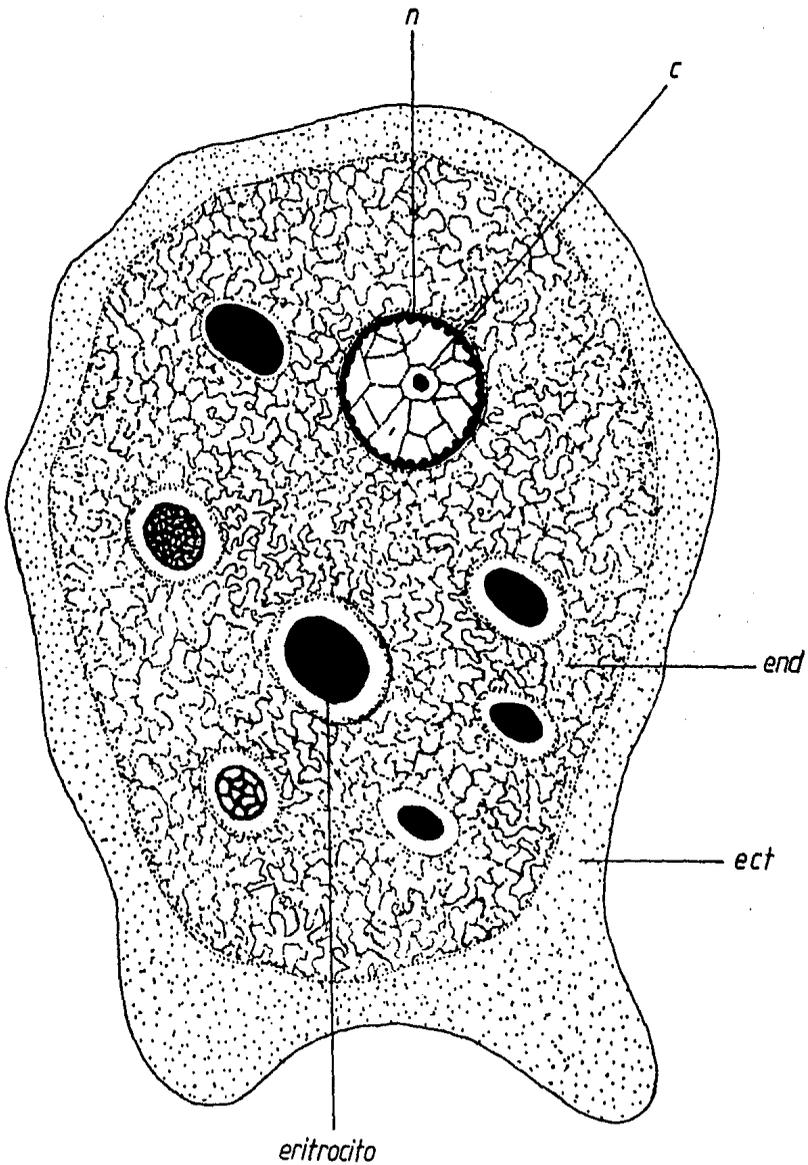


Figura 2.- Trofozoïto que contiene eritrocitos después de su ingestión; n, núcleo; c, cariosoma; end, endoplasma -- ect, ectoplasma; eritrocito.

las eucarióticas como son: mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplasmico rugoso, centriolos y microtubulos. La membrana nuclear es discontinua aproximadamente en 50 por ciento de su superficie, hay áreas de menor densidad en la vecindad inmediata de los poros. Las vacuolas intracitoplasmicas contienen restos bacterianos y estructuras parecidas al almidón, que sugiere la existencia de fenómenos digestivos dentro de la atmósfera de la vacuola. El cariosoma tiene una estructura en todo similar al nucleolo de las células superiores (4, 8 y 21).

Ciclo Biológico

E. histolytica se multiplica por un proceso de división binaria, se ha observado que algunas amibas se dividen de tiempo en tiempo por un mecanismo que recuerda a la conjugación, pero después de algunas divisiones, la motilidad de algunas amibas disminuye y los organismos muestran menos pseudópodos, se hacen redondos y más pequeños, con pérdida de material en su citoplasma. Este estadio se llama prequiste, y es seguido inmediatamente por la secreción de una gruesa membrana y de 2 o 3 divisiones adicionales del núcleo, transformandose en quiste nuevamente. En esta etapa las amibas son susceptibles a cambios de temperatura, pero en condiciones adecuadas de humedad pueden sobrevivir por periodos prolongados. Una vez que llegan al estomago la capsula del quiste es digerida por el jugo gástrico, el citoplasma se divide tantas veces como existen núcleos, y a veces -

un número mayor; este estadio se llama meta quiste. Estas pequeñas amibas llegan a la luz intestinal aumentan de tamaño y se vuelven trofozoitos, completando el ciclo biológico (Figura 3) (21,24).

Metabolismo

El desarrollo normal de el trofozoito de E. histolytica es esencialmente anaerobico, y un potencial redox bajo es requerido para obtener un cultivo óptimo. Este protozoario es considerado como un parásito anaerobico obligado. Las amibas son capaces de consumir oxígeno a pesar de la carencia de mitocondrias y son capaces de crecer en una atmósfera que contenga arriba de 5 por ciento de oxígeno. El crecimiento de E. histolytica requiere carbohidratos específicos; glucosa o polimeros que pueden ser convertidos a glucosa. El conducto de glucosa envuelve un sistema de transporte específico que cuenta para aproximadamente 100 veces la cantidad de azúcar incorporada por endocitosis (15).

El nombre de histolítica aplicado a este parásito indica -- una capacidad para lisar los tejidos. Ciertamente el aspecto -- histológico de los tejidos sugiere la acción de ciertas enzimas histolíticas, la actividad enzimática general está en relación directa con la virulencia de la amibas.

Después de alcanzar el intestino delgado, ya sea por la inyección intracecal experimental, los trofozoitos requieren un -

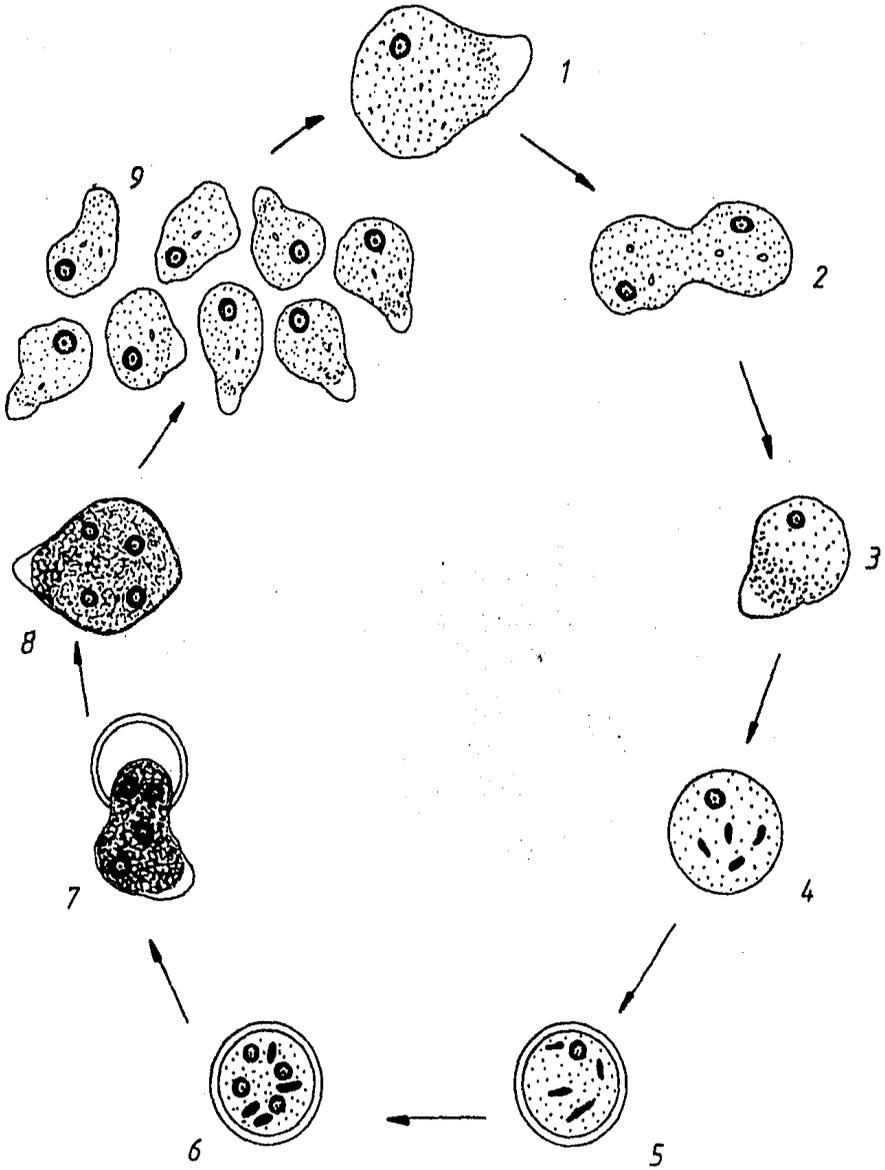


Figura 3.- Ciclo biológico; 1, trofozoito; 2, fisión binaria; -
3, trofozoito; 4, prequiste; 5, quiste; 6, quiste; 7, desenquistamiento; 8, metaquiste; 9, nuevos trofozoitos.

medio adecuado para sobrevivir y multiplicarse, tal medio está aparentemente proporcionado por la luz de la pared del intestino, además a éste complejo grupo de requerimientos contribuyen factores genéticos, dietéticos, fisiológicos y otros no bien de terminados, que dependen del huésped y es posible que las variaciones en estos factores expliquen por qué huéspedes que aparentemente están recibiendo el mismo número de amibas de la misma cepa y por la misma vía, reaccionan de manera diferente; algunos de ellos, desarrollando lesiones extensas con manifestaciones clínicas graves, mientras otros muestran escasa o ninguna respuesta (21).

Relación Huésped-Parásito

De acuerdo con la definición, una cepa particular de E. histolytica derivada, por ejemplo de un caso de amibiasis humana, debe ser considerada como potencialmente patógena para un huésped adecuado, cuando se introduce ya sea por vía bucal, como quiste, o en forma intrainestinal, como trofozoito. Cuando se producen lesiones en el huésped, la cepa amibiana se considera activamente patógena. Por otra parte la virulencia es medida de la patogenicidad, así que, dadas diferentes condiciones para una misma cepa de E. histolytica, la virulencia puede tener variaciones entre márgenes muy amplios. La actividad patogénica de la amiba depende de un potencial inherente en el parásito y de las características de un huésped adecuado, que debe contar-

con ciertas condiciones bajo las cuales el parásito pueda operar. Este potencial inherente es hereditario en la amiba y debe explicar el porqué de algunas cepas de E. histolytica son patógenas mientras que otras del mismo protozoario no lo son, y por qué Entamoeba hartmani, Entamoeba coli y otras amibas son incapaces de producir enfermedad. Un análisis sistemático sugiere que la patogenicidad debe ser definida en términos más operacionales, probablemente relacionados con el comportamiento real -- del parásito, que trae como resultado cambios tisulares y enfermedad. La diferencia entre la amiba patógena que causa enfermedad, puede probablemente ser referida a 2 actividades fundamentales: penetración del epitelio y diseminación de los tejidos.-- La penetración del epitelio es posiblemente el factor primordial de la invasión de la pared intestinal, mientras que la diseminación en los tejidos ocurre después y no siempre es seguida por la producción de lesiones. Por lo tanto se sugiere que los mecanismos de patogenicidad de la amiba son más complejos -- de lo que se ha creído hasta ahora, y que el huésped desempeña un papel muy importante en la determinación de la presencia o ausencia de la enfermedad (21).

Índice de Patogenicidad

Los factores genéticos de la enfermedad probablemente tienen a determinar en forma primaria las variaciones de la virulencia de distintas cepas. Los estudios iniciales establecieron

una clara correlación entre infectividad y patogenicidad, por otra parte, y la gravedad del cuadro clínico como índice de virulencia, por tales razones cada cepa tiene su "índice de patogenicidad" propio, probablemente determinado por factores genéticos (8,15,21).

Amibiasis Experimental

E. histolytica es cultivada axénicamente (es decir libre de bacterias) en medio TYI-S-33, el cual es un medio líquido que se prepara fácilmente, donde se ha incrementado la reproducción de la amiba, de 24 horas a 8 horas, aumentando el potencial de crecimiento de los cultivos axénicos (6,9).

Se han realizado estudios de la actividad citopatogénica de extractos amibianos sobre cultivos celulares, encontrándose que los trofozoítos tienen un efecto tóxico y lítico sobre las células, cuyo daño depende principalmente de la cantidad de amibas administradas a los cultivos celulares (24). La citopatogenicidad es asociada con la función de microfilamentos intactos y la movilidad de la amiba así como a receptores de membrana superficial, considerándose como importantes mediadores de la virulencia (1).

El mecanismo citopatogénico se ha estudiado con un modelo "in vitro" utilizando E. histolytica cepa HM-1, cultivada axénicamente y células de ovario de hamster chino (CHO), donde se observaron 3 eventos en la destrucción de las células, como son:-

la adherencia amibiana, la citolisis de la células CHO, adheridas por la amiba y posteriormente la fagocitosis amibiana de -- las células CHO muertas, observandose que la adherencia sólo se lleva a cabo por medio de receptores específicos (13). El análisis cuantitativo de la virulencia de E. histolytica, de 22 especies, por inoculación intrahepática de hamsters lactantes demostró que por la magnitud de la lesión producida, la especie HM-1 es la más virulenta, ya que produjo casi un 100 por ciento de destrucción hepática, además se observó que la eritrofagocitosis esta intimamente relacionada con la virulencia (7,18,19,20).

La manifestación patológica severa de E. histolytica indujo a buscar modelos experimentales que permitieran producir infecciones con el parásito, siendo, gatos, ratas, perros, conejos y cuyos los probados, en los cuales la infección amibiana se limita a la región intestinal; la amibiasis hepática en el gato se vió por inoculación intrahepática con amibas cultivadas monoxénicamente, pero se produjeron muertes tempranas, tal vez producidas por infección bacteriana, los mejores resultados se obtuvieron al inocular de la misma forma a hamsters. La superioridad del hamster es evidente en la susceptibilidad a la infección hepática y en la resistencia relativa a la muerte temprana marcandose aqui el inicio de estudios importantes como es el caso de la virulencia de E. histolytica (22,25). Por estas razones el hamster se considera un buen modelo para estudiar la secuencia histopatológica producida por el protozoario axenicamen

te cultivado, ya que nos puede aportar amplia información sobre ésta enfermedad que es la amibiiasis, así como de la patogénesis y respuesta concernientes. El estado morfológico del parásito - en el absceso hepático del hamster, se encontró participando -- del proceso necrótico, donde se observaron amibas parcialmente destruidas y otras integras, las cuales mantienen la actividad de la lesión, así como células hepáticas en destrucción. Se observó también un proceso inflamatorio caracterizado por la presencia de leucocitos polimorfonucleares y algunos macrófagos -- (14). Las alteraciones histopatológicas producidas en el hígado del hamster son lesiones extensas que muestran escasa inflamación y abundantes zonas de necrosis donde la virulencia de la cepa no depende exclusivamente de la asociación bacteriana ya que algunas cepas de amibas cultivadas en condiciones axénicas tienen una virulencia semejante a las amibas cultivadas en medios monoxénicos, demostrándose así que la virulencia es debida al parásito (2). La producción de los abscesos hepáticos en el hamster, mediante la inoculación directa de los trofozoítos, -- nos inclina a nuevas investigaciones tendientes a determinar -- las dosis infectivas. Sin embargo debe quedar entendido que debido al grado de virulencia de las cepas con que se trabaje se variara la cantidad mínima de trofozoítos que se requiera para la aparición de la lesión (11).

Se obtuvieron buenos resultados en la inoculación intrahepática de E. histolytica en hamsters adultos, pero la virulencia-

de las cepas de este protozoario por medio de la inoculación a hamsters recién nacidos, cuya susceptibilidad a la infección es mayor, asegura que se obtiene uniformidad en la reproducción de las lesiones hepáticas con menos número de amibas inoculadas -- (17).

El hamster lactante como modelo experimental demuestra que la evolución natural de la infección hepática amibiana, no es -- como se había supuesto que la curación era espontánea, sino que por lo contrario, progresa hacia la extención gradual del hígado, dando necrosis y se produce en un termino de 2 a 3 semanas la muerte de la mayoría de los hamsters inoculados. En la evolución anatomopatológica de las lesiones; en donde predominó el -- proceso inflamatorio como fase inicial, constituido por infiltración y proliferación de macrófagos y células epiteloides, -- que gradualmente se fueron sustituyendo por necrosis progresiva del tejido hepático (16).

Tomando ésta información como base de profundas investigaciones, podemos observar que la amibiasis desempeña un papel -- muy importante en los países que se encuentran en vías de desarrollo incluyendo el nuestro, por lo cual existe la necesidad -- de desarrollar preparaciones inmunizantes para ésta parasitosis ya que se trata de una enfermedad a la que nuestra población -- tiene un alto grado de exposición.

Se considera que los productos biológicos constituyen una -- categoría especial de medicamentos, debido a las dificultades y

problemas que presenta su producción, control y empleo. Sus potencias han de controlarse mediante análisis biológicos ya que no se dispone de pruebas químicas o físicas válidas.

La confianza con que se acepten los resultados de las pruebas dependerá no sólo de su congruencia y precisión, sino también de la comprensión de las dificultades que entraña el efectuar dichas determinaciones y de los principios que habrán de aplicarse para determinar su confiabilidad. El animal de prueba más satisfactorio sería el ser humano. Para determinar tanto la inocuidad como la eficacia, se necesitan grupos que oscilan entre varios centenares y varios cientos de miles de personas, según sea el estado de desarrollo en que se encuentra el producto. Por lo consiguiente no será práctico, o posible realizar incluso una prueba limitada en el hombre. Para determinar tanto la inocuidad como la eficacia del producto se pueden utilizar --- otros sistemas biológicos tales como; los cultivos de tejidos y animales experimentales de prueba tales como: ratones, cobayos, hamsters y monos. Estos animales son relativamente poco costosos y por tanto prácticos. Cualquiera que sea el sistema utilizado, el medio de prueba, bien sea cultivo de tejidos o animal, habrá de controlarse cuidadosamente (10).

Un paso importante para evaluar la calidad de un biológico es conocer la virulencia del organismo infectante, así mismo es necesario contar con un modelo animal, lo que implica seleccionar la especie a prueba. El hamster dorado (Cricetus auratus),-

de 1 a 2 días de nacido, por su susceptibilidad a la infección-- con trofozoítos de E. histolytica es un buen modelo experimental que permite realizar estudios de infectividad, citopatogenicidad y neutralización con éste protozoario.

Datos dosis-respuesta

Ciertos campos de la investigación médica, particularmente-- en bacteriología, farmacología, entomología, toxicología, etc., el investigador esta en ocasiones interesado en medir la actividad o potencia de sustancias las cuales demuestran una respuesta graduada cuantificable en un individuo en proporción a la dosis administrada, en cambio la respuesta es característica del individuo, es decir; el individuo responde o no a la dosis empleada dependiendo de la susceptibilidad o tolerancia. La respuesta observada, frecuentemente, (pero no necesariamente) es la muerte-- o supervivencia.

Debido a la variación en la tolerancia de diferentes individuos, es usualmente posible el seleccionar una dosis de la sustancia la cual provoca una respuesta en cierta proporción de un grupo de animales. Si a grupos de individuos comparables se les administran dosis más grandes o más pequeñas del agente, la proporción de los individuos que responden (por ej. los que mueren) variara de acuerdo a esas proporciones. Por lo tanto, mediante-- el empleo de un rango apropiado apropiado de dosis se hace posible el establecer una relación entre la dosis y la respuesta -- tal como una curva dosis-mortalidad, la cual puede ser expresa-

da con una ecuación matemática o ilustrada mediante una gráfica.

Los datos dosis-respuesta están expuestos a una variación considerable (debido al muestreo a partir de una distribución binomial) y son pobremente confiables a menos que el número de animales empleados en cada nivel de dosis sea infinitamente grande, más aún, la relación es excesivamente compleja ya que la respuesta en términos de porcentaje o proporción no está linealmente relacionada a la dosis. La curva de relación de porcentaje de respuesta a dosis aritmética es sigmoidea y puede hacerse simétrica mediante la graficación de porcentaje de respuesta contra los logaritmos de la dosis.

El valor de la Dosis Efectiva al 50 por ciento (DE_{50}) se determina interpolando una línea recta desde el punto donde la respuesta es al 50 por ciento en el eje de las ordenadas donde se señala la dosis. Este punto sobre la ordenada es la DE_{50} estimada.

Se puede hacer una aproximación del error estándar de la DE_{50} mediante el método siguiente:

$$ES_{DE_{50}} = \frac{2S}{\sqrt{2N}}$$

Donde:

S = Desviación estándar de la dosis

N = Número total de animales usados

ES = Error estándar

DE_{50} = Dosis efectiva al 50 por ciento

La determinación del error estándar es un factor importante para poder calcular los límites de confianza de las pruebas.

Los límites de confianza de la DE_{50} aproximados al 95 por ciento se calcula de la siguiente manera:

$$95\% LC_{DE_{50}} = DE_{50} \pm (Z \times ES)$$

Donde:

LC = Límite de confianza

Z = Valor para el 95% (se localiza en tablas)

Determinando los límites de confianza podemos decir si las determinaciones realizadas son o no confiables.

Esto significa que entre más estrechos sean los límites, mayor será la confianza para que el valor del parámetro o la característica quede comprendido dentro de esos límites (3,5).

OBJETIVOS

- 1.- Determinar las dosis infectivas 50 y 100 % de trofozoítos de E. histolytica cepa HM-1 IMSS en hamsters lactantes.
- 2.- Determinar algunos de los factores que pueden modificar esta prueba.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

Entamoeba histolytica cepa HM-1 INSS

Hamsters dorados Cricetus auratus de 1 a 2 días de nacidos

20 camadas por prueba.

Cultivo de E. histolytica

E. histolytica es cultivada axénicamente en medio TVIS-33 - (tripticase, extracto de levadura, hierro, suero de bovino) el - cual contiene componentes altamente nutritivos como:

Regulador de fosfatos	24.39 ml
Extracto de levadura	12.19 g
Tripticase	24.39 g
Glucosa	12.19 g
Cloruro de sodio	2.3 g
Cistefina	1.21 g
Acido ascorbico	0.24 g
Citrato férrico amoniacal	2.4 ml
Llevar con agua bidestilada a	1000.0 ml
Suero de bovino	182.92 ml
Mezcla de vitaminas	36.58 ml

El medio de cultivo base (antes de que se le agregue el suero de bovino y la mezcla de vitaminas) se deposita en un recipiente en el que pueda ser esterilizado con vapor a 15 libras - de presión por 15 minutos, posteriormente se deja en una estufa a 36 °C aproximadamente 48 horas para probar su esterilidad.

Después en una zona estéril ya sea con mecheros o en un flujo laminar se le agrega el suero y la mezcla de vitaminas (los cuales se encuentran previamente estériles) y se envasan 15 ml de medio en cada tubo pyrex 16X150 con tapón de rosca también - estériles, al medio de cultivo antes de envasar se siembran en medios de cultivo para pruebas de esterilidad.

Las amibas son cultivadas en este medio a 35 °C por 48 y 72 horas, los tubos se colocan ligeramente inclinados dentro de la estufa (5,8).

Determinación de la Dosis Infecciosa 50 %

De acuerdo con los objetivos planteados, la determinación de la Dosis Infecciosa 50 % (DI₅₀) se realizó paralelamente con el estudio de la influencia en la infectividad de los siguientes factores: tiempo de cultivo de 48 y 72 horas y tipo de suero empleado en el cultivo de E. histolytica de bovino y caballo. Los tiempos de cultivo para la determinación de la DI₅₀ son aquellos en los cuales se observa un crecimiento amibiano óptimo antes de entrar al periodo de lisis. Con los sueros de bovino o de caballo se obtuvieron rendimientos importantes en la obtención de biomasa amibiana (23).

Las dosis a estudiar fueron: 1 000, 2 000, 5 000, 10 000 y 20 000 trofozoítos en un volumen de 0.03 ml los cuales fueron seleccionados arbitrariamente ya que no existían antecedentes para la determinación de una dosis infecciosa de este protozoario (25).

Para determinar la DI₅₀ se emplearon hamsters dorados (Cricetus auratus), lactantes de 1 a 2 días de nacidos (17).

Preparación de las Dosis a Inocular

3.6 tubos de cultivo amibiano que contienen aproximadamente

109 000 amibas por ml (cada uno) se enfrían en un recipiente -- con agua de hielo por 5 minutos, posteriormente se dejan sedi-- mentar hasta que la mayoría de las células se encuentren en el fondo del tubo, después se eliminan aproximadamente 13 ml de ag brenadante de cada uno de los tubos y se hace una mezcla de los sedimentos amibianos obtenidos.

Para obtener la concentración amibiana de la mezcla se toma un ml de esta y se deposita en una cubeta que contiene 19 ml de una solución reguladora, haciendo así una dilución 1:20. Dilu-- ción que se lee en un contador de células "Coulter Counter".

El resultado de la lectura se multiplica por 40 que es el factor de corrección recomendado por el manual del aparato.

Las dosis de 1 000, 2 000, 5 000, 10 000 y 20 000 amibas se preparan por medio de diluciones (con medio de cultivo) si es necesario, de tal manera que el volumen de aplicación sea de -- 0.03 ml.

Elección y Preparación de los Hamsters para su Inoculación

La elección de las camadas debe ser de tal manera que cada-- camada cuente por lo menos con 10 crías, las cuales deben tener buena apariencia o sea que el color y la textura de su piel -- sean rojiza y suave respectivamente, su temperatura templada, -- que no estén mutilados y que sus movimientos sean normales.

El manejo de los hamsters debe realizarse con mucho cuidado ya que los caracteriza un temperamento agresivo.

Antes de empezar la inoculación se preparan 20 jaulas pre--

viamente limpias con: viruta, zanahoria, alfalfa, media manzana y un trozo de algodón cada y además otra jaula con las mismas características, donde se depositará cuidadosamente a la madre para que permita tomar a las crías de su nido.

Es necesario usar guantes (latex) propios para cirujano y - antes de empezar la inoculación se deben frotar bien las manos con la viruta del nido para que el olor característico de éste se impregne y al momento de poner a la madre con las crías ésta no desconozca a sus hijos y se los coma o mutile; es recomendable además el uso de cubreboca.

Inoculación de los Hamsters

La vía de inoculación es directa en el hígado y la aplicación del inóculo (dosis de amibas a probar) se hace con una jeringa hipodérmica de un ml. Al inocular al hamster se toma éste con la mano izquierda, estirando la piel del abdomen de tal manera que se haga visible por transparencia el órgano hepático, - limpiando previamente la zona de inoculación, se introduce el inóculo al hígado lo cual debe ser lo más rápido posible evitando dejar sangre o residuos del inóculo, de ser así se debe eliminar con un algodón limpio, posteriormente el hamster se deposita en su cama.

La inoculación de los hamsters debe ser sucesiva, al término de ésta se deposita cuidadosamente a la madre con los hijos y - se continúa con la siguiente camada.

Las camadas se mantienen en un lugar limpio, templado y se observan diariamente.

Sacrificio de los Hamsters

El sacrificio de los hamsters se lleva a cabo a los 7 días de la inoculación. Para observar los resultados, se toman al azar el mismo número de hamsters por grupo, seleccionando (no menos de 6), los cuales se sacrifican en una cámara cerrada con éter, posteriormente se fijan en una superficie sólida, ordenados por dilución para que permita la observación de los resultados.

Las lesiones producidas por el protozooario se observan haciendo una insición donde se localiza el órgano hepático. Considerando como positivo el hígado que presenta lesión macroscópica, independientemente de su magnitud.

Aproximación Gráfica del Valor DI_{50}

De los resultados se obtiene un porcentaje de infectividad.

Los valores de porcentaje obtenidos se grafican linealmente en una hoja de papel semilogarítmico, las dosis correspondientes se sitúan sobre la abscisa logarítmica, con el auxilio de una regla, se traza una línea a través de los puntos graficados la cual sea la más próxima de ellos. Después se traza una línea vertical a través del punto donde la curva dosis-respuesta cruza la línea del porcentaje 50 y el punto donde la línea base es intersectada, la cual se observa claramente, éste punto sobre -

la línea base, es la Dosis Infecciosa 50 % estimada.

Determinando los límites de confianza podemos o no afirmar si las determinaciones realizadas son confiables.

Determinación de la Dosis Infecciosa 100 %

La determinación de la Dosis Infecciosa 100 % (DI_{100}) se realizó inoculando 3 camadas de hamsters lactantes (por prueba) -- con 20 000 amibas en un volumen de 0.03 ml (dosis que se seleccionó de acuerdo a los resultados obtenidos en la determinación de la DI_{50}). Las amibas a inocular se cultivaron con suero de bovino y se probaron a las 48 horas de cultivo.

Para hacer el análisis de los resultados se incluyeron todos los hamsters sobrevivientes de la prueba.

Determinación del Efecto de la Agitación del Inóculo sobre la Infectividad de *E. histolytica*

Para observar el efecto de la agitación del inóculo sobre la infectividad de *E. histolytica* se emplearon hamsters lactantes, amibas cultivadas con suero de bovino las cuales fueron -- inoculadas a las 48 horas de cultivo. La dosis seleccionada fue de 20 000 amibas en 0.03 ml que es equivalente a la DI_{100} .

El efecto de la agitación se observó usando 2 grupos de 10-camadas cada uno; en el primer grupo el inóculo se agitó constantemente antes de su aplicación y en el segundo grupo el inóculo no se agitó.

Determinación del Efecto de la Agitación del Inóculo con
Respecto al Tiempo sobre la Infectividad de E. histolytica

El efecto de la agitación de inóculo con respecto al tiempo se observó usando 2 grupos de hamsters lactantes, de 10 camadas cada uno, dichos grupos se inocularon con 20 000 amibas-- en un volumen de 0.03 ml las cuales fueron cultivadas con suero de bovino y de un tiempo de cultivo de 48 horas.

Los 2 grupos se inocularon a intervalos de 0, 15, 30, 45 y 60 minutos.

En el primer grupo las suspensiones amibianas se homogeniza- ron perfectamente mediante agitación antes de inocularse.

En el segundo grupo las suspensiones amibianas no se agita- ron.

La determinación del efecto de la agitación del inóculo en- la infectividad se realiza al observar a los hamsters por lapa- ratomía exploratoria.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en porcentajes de infectividad se muestran en los cuadros I, II, III y IV.

En los cuadros I y II aparecen los resultados obtenidos al emplear inóculos de amibas de 48 y 72 horas de cultivo respectivamente y cultivadas con suero de bovino; en los cuadros III y IV los datos derivados del empleo de amibas cultivadas con suero de caballo y tiempos de cultivo de los inóculos de 48 y 72 horas.

En los datos obtenidos se pueden observar que hay variaciones en los porcentajes de infectividad las cuales dependen directamente de las variables estudiadas, como son: tipo de suero y la edad del inóculo.

INFECTIVIDAD DE E. histolytica EN HAMSTERS
LACTANTES

*DOSIS	Número de Hamsters + / totales	Porcentaje de Hamsters Infectados
1 000	8 / 30	26.2
2 000	17 / 30	56.4
5 000	18 / 24	74.5
10 000	26 / 30	86.4
20 000	29 / 30	96.6

* Número de amibas en 0.03 ml

Cuadro I.- Representa el porcentaje de infectividad de E. histolytica cultivada con suero de bovino e inoculada a las 48 horas de cultivo. En el cuadro se observa claramente que al ir aumentando la concentración de amibas aumenta la infectividad.

INFECTIVIDAD DE E. histolytica EN HAMSTERS
LACTANTES

*DOSIS	Número de Hamsters + / totales	Porciento de Hamsters Infectados
1 000	3 / 12	21.6
2 000	5 / 18	27.3
5 000	10 / 18	55.5
10 000	11 / 18	61.0
20 000	18 / 18	100.0

* Número de amibas en 0.03 ml

Cuadro II.- Representa el porcentaje de infectividad de E. histolytica cultivada con suero de caballo e inoculada a las 48 horas de cultivo. - En el cuadro se observa claramente que al ir aumentando la concentración de amibas aumenta la infectividad.

INFECTIVIDAD DE E. histolytica EN HAMSTERS
LACTANTES

*DOSIS	Número de Hamsters + / totales	Porcentaje de Hamsters Infectados
1 000	21 / 30	69.6
2 000	23 / 30	76.2
5 000	24 / 30	79.8
10 000	27 / 30	89.8
20 000	23 / 26	89.8

* Número de amibas en 0.03 ml

Cuadro III.- Representa el porcentaje de infectividad de E. histolytica cultivada con suero de bovino e inoculada a las 72 horas de cultivo. -- En el cuadro se observa claramente que al ir aumentando la concentración de amibas aumenta la infectividad.

INFECTIVIDAD DE E. histolytica EN HAMSTERS
LACTANTES

* DOSIS	Número de Hamsters + / totales	Porcentaje de Hamsters Infectados
1 000	8 / 24	32.8
2 000	6 / 30	19.4
5 000	12 / 30	33.0
10 000	18 / 30	59.8
20 000	20 / 30	66.6

* Número de amibas en 0.03 ml

Cuadro IV.- Representa el porcentaje de infectividad de E. histolytica cultivada con suero de caballo e inoculada a las 72 horas de cultivo. - En el cuadro se observa claramente que al ir aumentando la concentración de amibas aumenta la infectividad.

En el cuadro V se encuentra representada la DI_{50} de E. histolytica, obtenida al estudiarla con diferentes condiciones (tipo de suero y edad de inóculo) empleadas en la determinación, - así como los límites de confianza de cada prueba.

Las dosis infectivas que aparecen en el cuadro se obtuvieron al graficar los porcentajes de infectividad contra las dosis probadas.

En las gráficas los puntos se unieron por medio de líneas rectas. La DI_{50} se encontró al trazar una línea recta del 50 % en la ordenada a la curva y de ésta a la dosis, situada en la abscisa. Los trazos se hicieron lo más próximos posible (gráficas (1, 2, 3 y 4).

Los límites de confianza fueron resultado de un sencillo análisis estadístico y ésta determinación se realiza con el fin de hacer el experimento más confiable. Los cálculos se hicieron de la manera siguiente:

Desarrollo del cálculo de los límites de confianza para la DI_{50} obtenida al emplear amibas cultivadas con suero de bovino e inoculadas a las 48 horas de cultivo.

Formulas:

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}} \dots \dots \dots \text{formula 1}$$

Donde:

S = Desviación estandar
x = Valor de cada dosis

\bar{x} = Promedio de las dosis
n = Número de dosis

$$ES = \frac{2 S}{\sqrt{2 N}} \quad \dots \dots \text{ formula 2}$$

Donde:

ES = Error estandar

DI₅₀ = Dosis infectiva al 50 %

S = Desviación estandar

N = Número total de animales usados

$$95 \% LC_{DI_{50}} = DI_{50} \pm (Z \times ES) \quad \dots \dots \text{ formula 3}$$

Donde:

LC = Límite de Confianza

Z = Valor para el 95 % (se localiza en tablas)

Desarrollo:

Cálculo de la desviación estandar de acuerdo a la formula 1

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Dosis	*logaritmo de la dosis	x - \bar{x}	(x - \bar{x}) ²
1 000	3.0	- 0.65	0.42
2 000	3.30	- 0.35	0.12
5 000	3.69	- 0.04	0.0016
10 000	4.0	+ 0.35	0.12
20 000	4.30	+ 0.65	0.42
$\bar{x} = 3.65$			

$$\sum (x - \bar{x})^2 = 1.0816$$

$$\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1} = \frac{1.0816}{4} = 0.27$$

n - 1

4

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} = 0.52$$

$$S = \underline{0.52}$$

* Las dosis se transforman a logaritmos para hacer más fácil su manejo.

Cálculo del error estandar de acuerdo a la formula 2

$$ES_{DI_{50}} = \frac{2 S}{\sqrt{2 N}}$$

$$2 S = 1.04$$

$$N = 144$$

$$2 N = 288$$

Sustituyendo

$$ES_{DI_{50}} = \frac{1.04}{\sqrt{288}} = \frac{1.04}{16.97} = 0.061$$

$$ES_{DI_{50}} = \underline{0.061}$$

Cálculo de los límites de confianza de acuerdo a la formula 3

$$95 \% LC_{DI_{50}} = DI_{50} \pm (Z \times ES)$$

$$DI_{50} = 1730 ;$$

$$\log \text{ de la } DI_{50} = 3.23$$

$$Z = 1.96$$

$$ES = 0.061$$

Sustituyendo

$$95 \% LC_{DI_{50}} = 3.23 \pm (1.96 \times 0.061)$$

$$= 3.23 \pm (0.119)$$

$$= 3.23 + 0.119 = 3.34$$

$$= 3.23 - 0.119 = 3.11$$

como los valores se encuentran en logaritmos se obtiene el anti logaritmo correspondiente:

antilog. de 3.34 = 2 187.7

antilog. de 3.11 = 1 288.2

los límites de confianza fueron: (1 288 y 2 187).

** Nota: Se realizaron los mismos calculos para las demás DI_{50} .

La DI_{50} encontrada fué de 1 730 amibas, la cual fué la menor que dió una respuesta al 50 %; o sea que con ésta dosis se obtuvo el 50 % de infectividad y sus condiciones de cultivo fueron: suero de bovino y tiempo de cultivo de 48 horas.

El límite de confianza de la DI_{50} fué de 1 288 y 2 187 como se observa es bastante amplio lo que nos indica que la determinación es confiable o sea que la dosis obtenida esta dentro de estos límites.

En la determinación de la DI_{50} se observó que a una dosis de 20 000 amibas se obtenia un 100 por ciento de infectividad lo cual se comprobó al hacer diversas pruebas empleando ésta cantidad de amibas. En la determinación las amibas que se emplearon fueron cultivadas con suero de bovino e inoculadas a un tiempo de cultivo de 48 horas.

Ciertamente la infectividad que se obtuvo al inocular 20 000 amibas fué del 100 %. Al determinar sus límites de confianza se vió que la dosis estaba dentro del intervalo de 20 816 y 13 061 por lo cual la prueba fué aceptable, cuadros VI y VII.

El efecto de la agitación del inóculo sobre la infectividad de E. histolytica en los hamsters lactantes se estudió en dos -

grupos, inoculando la DI_{100} .

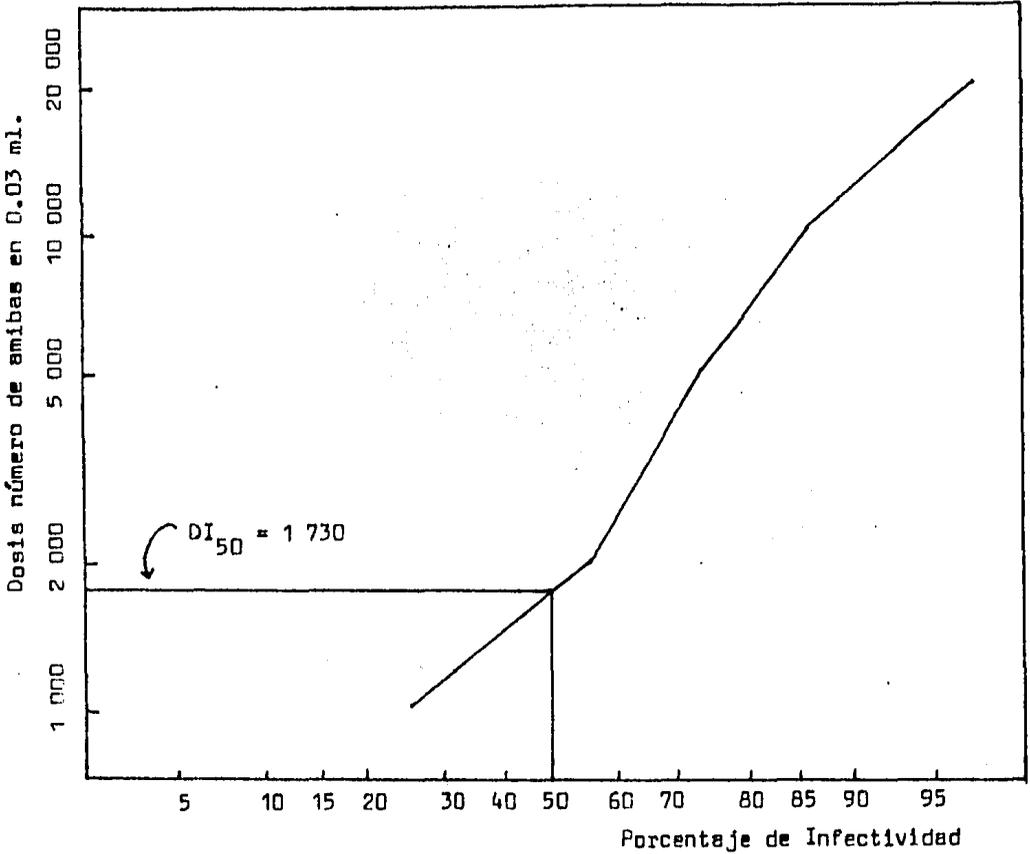
En el primer grupo el inóculo se agitó constantemente al ser aplicado y en el segundo grupo el inóculo no se agitó al aplicarse, ésta prueba se realizó paralelamente. Las amibas utilizadas como inóculos se cultivaron con suero de bovino y de caballo y fueron inoculadas a las 48 horas de cultivo. En los cuadros VIII y IX se observa claramente el efecto de agitación del inóculo sobre la infectividad de E. histolytica, dando una diferencia de porcentaje entre el inóculo agitado y el no agitado - de un 45.3 % en el caso de las amibas cultivadas con suero de bovino y un 46 % en las cultivadas con suero de caballo.

La influencia de la agitación del inóculo con respecto al tiempo en la infectividad también fué estudiada, y las condiciones del experimento fueron: 20 000 amibas en 0.03 ml, cultivadas con suero de bovino e inóculos de 48 horas de cultivo.

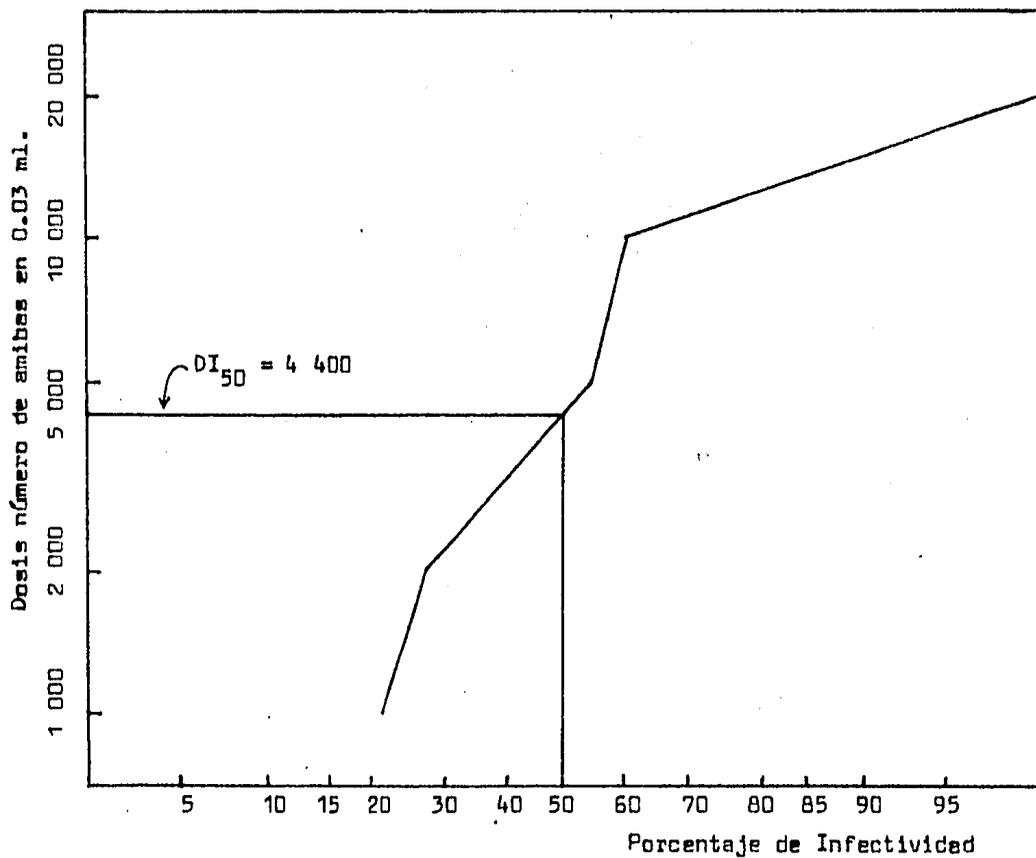
En el cuadro X y la gráfica 5 se representan los resultados de éste experimento, los cuales se expresan en porcentaje de infectividad.

En el grupo 1 (donde se agita el inóculo) se obtiene un porcentaje de infectividad de 98 % en promedio, mientras que en el grupo 2 (donde no se agita el inóculo) el porcentaje de infectividad en promedio es de 51.8 dando una diferencia de porcentaje de 46.8 entre los 2 grupos.

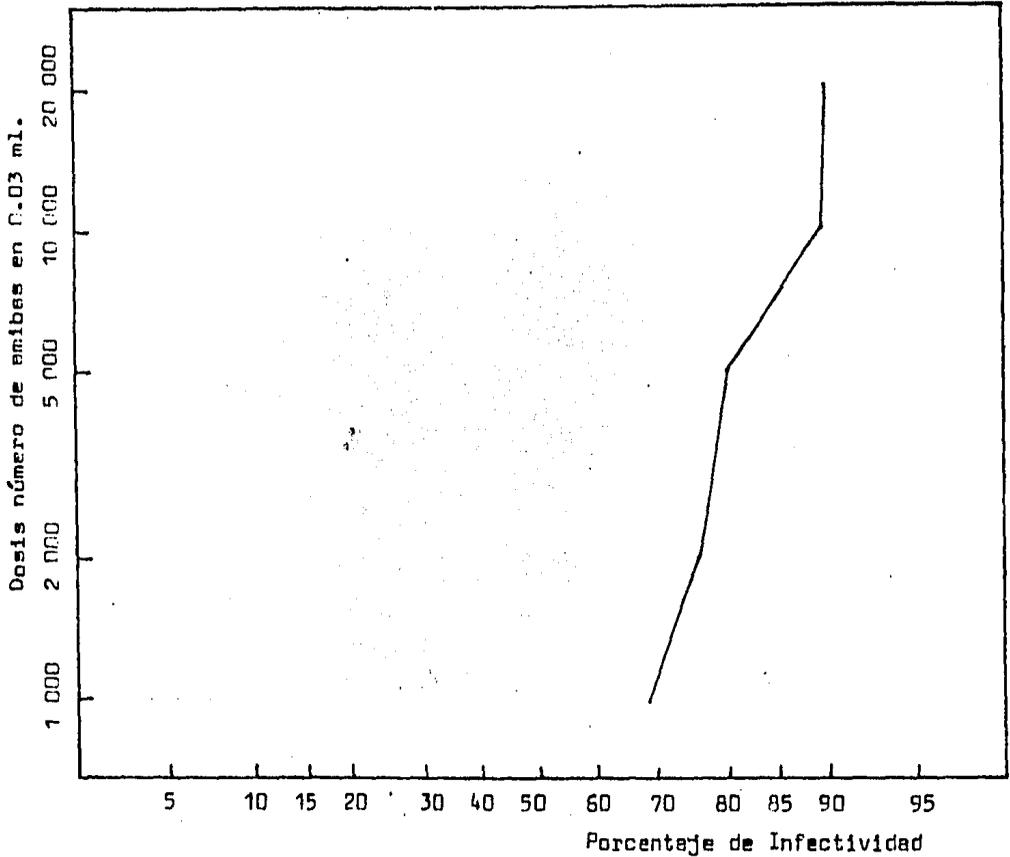
DETERMINACION DE DI_{50} DE E. histolytica CULTIVADA AXENICAMENTE



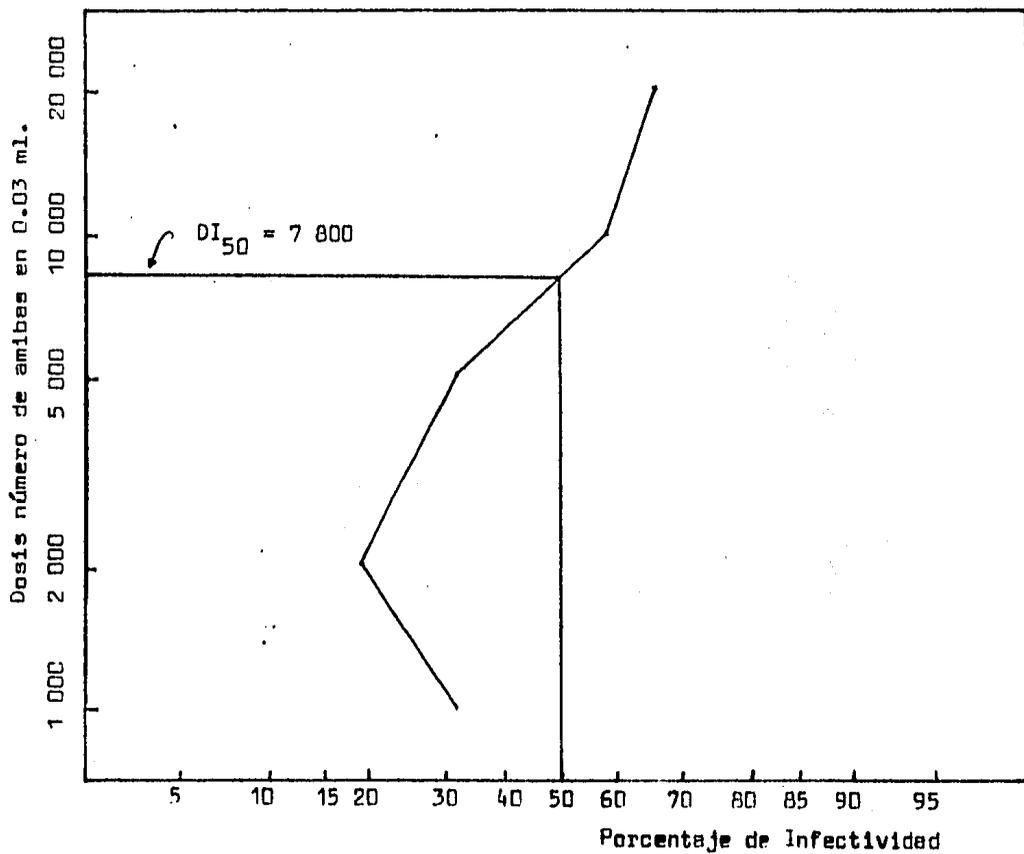
Gráfica 1.- Las amibas utilizadas para ésta determinación se cultivaron con suero de bovino y se inocularon a las - 48 horas de cultivo. La DI_{50} obtenida equivale a 1 730 amibas como se indica en la gráfica.

DETERMINACION DE DI_{50} DE *E. histolytica* CULTIVADA AXENICAMENTE

Gráfica 2.- Las amibas utilizadas para ésta determinación se cultivaron con suero de bovino y se inocularon a las - 72 horas de cultivo. La DI_{50} obtenida equivale a 4 400 amibas como se indica en la gráfica.

DETERMINACION DE LA DI_{50} DE E. histolytica CULTIVADA AXENICAMENTE

Gráfica 3.- Las embias utilizadas para ésta determinación se cultivaron con suero de caballo y se inocularon a las 48 horas de cultivo. No fué posible determinar la DI_{50} en éste caso ya que el trazo de las líneas del 50 % y la de la dosis no puede hacerse ya que la curva cae fuera del 50 % .

DETERMINACION DE LA DI_{50} DE E. histolytica CULTIVADA AXENICAMENTE

Gráfica 4.- Las amibas utilizadas en ésta determinación se cultivaron con suero de caballo y se inocularon a -- 72 horas de cultivo. La DI_{50} obtenida equivale a 7 800- amibas como se indica en la gráfica.

DOSIS INFECTIVAS AL 50 % DE E. histolytica CULTIVADA BAJO
 DIFERENTES CONDICIONES. PRUEBA REALIZADA EN MAMSTERS LACTANTES

TIPO DE SUERO	TIEMPO DE CULTIVO (horas)	DOSIS INFECTIVA 50 %	ERROR ESTANDAR	LIMITES DE CONFIANZA
BOVINO	48	1 730	0.061	1 288 y 2 187
	72	4 400	0.080	3 019 y 6 165
CABALLO	48	*200	0.061	151 y 257
	72	7 800	0.061	5 011 y 10 209

* Valor extrapolado

Cuadro V.- Se indican las DI_{50} obtenidas con diferentes variables como son tipo de suero empleado y el tiempo de cultivo en horas. Se puede observar que las DI_{50} estan dentro de los límites de confianza determinados.

DO SIS INFECTIVA AL 100 % DE E. histolytica CULTIVADA CON SUERO

DE BOVINO E INOCULADA A UN TIEMPO DE CULTIVO DE 48

HORAS

*DO SIS	Número de Hameters + / totales	Por ciento de Hameters Infectados	Límites de Confianza
20 000	28 / 28	100	13 016 y 20 816
	20 / 20	100	
	13 / 13	100	
	Promedio	100	

* Número de amibas en 0.03 ml

Cuadro VI.- Se observa que con una dosis de 20 000 amibas se obtiene un 100 % de infectividad así como los límites de confianza que nos indican que la dosis estudiada ésta dentro de ellos.

DOSIS INFECTIVA 50 y 100 % DE E. histolytica
 CULTIVADA CON SUERO DE BOVINO E INOCULADA A LAS
 48 HORAS DE CULTIVO. PRUEBA REALIZADA EN
 HAMSTERS LACTANTES.

Tiempo de cultivo del inóculo (horas)	Dosis Infecciona 50 % (DI ₅₀)	Dosis Infecciona 100 % (DI ₁₀₀)
48	1 730	20 000

* Amibas inoculadas en 0.03 ml

Cuadro VII.- Se eligieron como dosis infeccionas 50 - y 100 % las que dieron ésta respuesta al mismo tiempo de cultivo.

EFFECTO DE LA AGITACION DEL INOCULO SOBRE LA VIRULENCIA DE E. histolytica
 CULTIVADA BAJO DIFERENTES CONDICIONES E INOCULADA A LAS 48 HORAS DE CULTIVO
 PRUEBA REALIZADA EN HAMSTERS LACTANTES

TIPO DE SUERO	TIEMPO DE CULTIVO DEL INOCULO (horas)	AGITADO grupo 1		NO AGITADO grupo 2	
		Número de Hamsters + /totales	Porciiento de Hamsters Infectados	Número de Hamsters + /totales	Porciiento de Hamsters Infectados
BOVINO	43	6 / 7	88	10 / 17	50
		8 / 8	100	9 / 10	90
		9 / 15	60	5 / 17	29
		12 / 12	100	5 / 15	28
CABALLO	48	3 / 3	100	16 / 18	89
		6 / 6	100	7 / 15	47
		4 / 4	100	4 / 14	29

* Dosis empleado de 20 000 amibas en 0.03 ml por hamster.

Cuadro VIII.- Se observan variaciones en la infectividad con las diferentes condiciones de prueba.

EFFECTO DE LA AGITACION DEL INOCULO SOBRE LA VIRULENCIA DE
E. histolytica. PRUEBA REALIZADA EN HAMSTERS LACTANTES

CONDICIONES	AGITADO grupo 1	NO AGITADO grupo 2	DIFERENCIA DE PORCENTAJE
	Por ciento de Hamsters Infectados	Por ciento de Hamsters Infectados	Agitado - No Agitado
Suero de Bovino (48 horas)	87	41.7	45.3
Suero de Caballo (48 horas)	100	54	46

* La dosis empleada fué de 20 000 amibas en 0.03 ml.

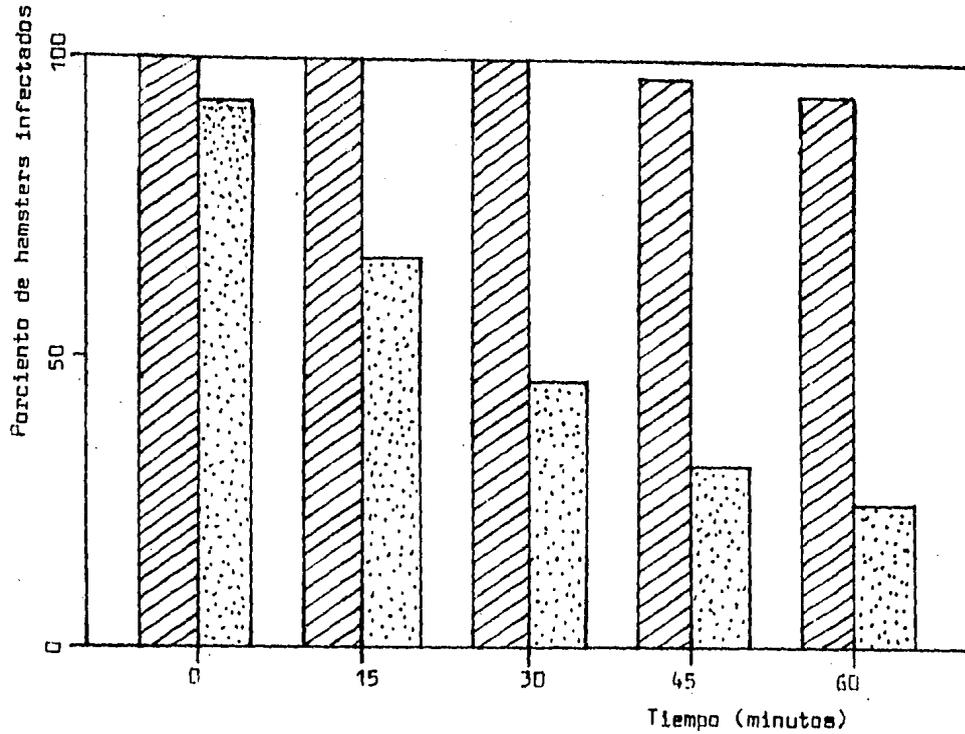
Cuadro IX.- La variación entre el inóculo agitado y el no agitado es alta y esto se puede observar en la diferencia de porcentaje obtenida no importando el tipo de suero empleado.

EFFECTO DE LA AGITACION DEL INOCULO CON RESPECTO AL TIEMPO Y SU REPERCUSSION EN LA INFECTIVIDAD DE E. histolytica CULTIVADO CON SUERO DE BOVINO E INOCULADO A L 5 48 HORAS DE CULTIVO. PRUEBA REALIZADA EN HAMSTERS LACTANTES

TIEMPO EN MINUTOS	AGITADO grupo 1		NO AGITADO grupo 2		DIFERENCIA DE PORCENTAJE
	Número de Hamsters + / totales	Porcentaje de Hamsters Infectados	Número de Hamsters + / totales	Porcentaje de Hamsters Infectados	
0	30 / 30	100	32 / 35	93	46.8
15	40 / 40	100	29 / 45	66	
30	20 / 20	100	15 / 34	45	
45	33 / 35	96	12 / 47	31	
60	32 / 35	94	8 / 38	24	
Promedio		98		51.8	

Cuadro X.- Los resultados de infectividad obtenidos entre el inóculo agitado y el no agitado con respecto al tiempo muestran una gran diferencia de porcentaje 46.8 %.

EFFECTO DE LA AGITACION DEL INOCULO CON RESPECTO AL TIEMPO EN LAS
PRUEBAS DE INFECTIVIDAD DE E. histolytica



Gráfica 5.- Las barras punteadas muestran como en un inóculo no agitado baja la infectividad con respecto al tiempo, con diferencia al inóculo-agitado (barras rayadas) que se mantiene en los 3 primeros tiempos.

DISCUSION

La DI_{50} de E. histolytica es diferente de acuerdo al tipo - suero empleado en el medio de cultivo.

Al usar amibas cultivadas con suero de bovino se encontró - que la DI_{50} fué menor cuando se emplearon inóculos de 48 horas - de cultivo, que cuando se emplearon inóculos de 72 horas de cul - tivo.

En el empleo de amibas de 48 horas de cultivo, la dosis ob - tenida fué de 1 730 amibas, con un límite de confianza de 1 288 y 2 187 amibas y al usar amibas de 72 horas de cultivo se obtu - vó una dosis de 4 400 amibas, con un límite de confianza de --- 3 019 y 6 165 amibas.

Las amibas cultivadas con suero de caballo dan una DI_{50} me - nor con inóculos de 48 horas que con inóculos de 72 horas de -- cultivo.

La dosis que se obtiene al emplear amibas de 48 horas de -- cultivo de 48 horas es menor y se obtiene al extrapolar los da - tos y da un valor de 200 amibas, con un límite de confianza de - 151 y 257. Las amibas de 72 horas de cultivo dieron una dosis - mayor con un valor de 7 800 y un intervalo de confianza de ---- 5 011 y 10 209 amibas.

Con respecto a estos resultados se puede decir que a las -- 48 horas de cultivo las amibas se encuentran en el momento en - el cual son más infectivas, en los resultados se observa que --

a las 48 horas las amibas se encuentran en el momento en el cual son más infectivas, en los resultados se observa que las amibas en ambos casos; ya sea al emplear suero de bovino o de caballo en su cultivo siempre dieron los porcentajes de infectividad más altos.

La determinación de la dosis infectiva 100 % de E. histolytica cultivada con suero de bovino e inóculada a las 48 horas de cultivo, se encontró cercana a 20 000 amibas, por lo que se efectuó una serie de pruebas utilizando ésta dosis.

Posteriormente se comprobó que la dosis infectiva 100 fué de 20 000 amibas con un límite de confianza de 13 061 y 20 816 como se observa la dosis estimada cae dentro dentro del intervalo.

Las dosis infectivas 50 y 100 % fueron de 1 730 y 20 000 amibas respectivamente, las cuales fueron cultivadas con suero de bovino e inóculadas a las 48 horas de cultivo.

Al estudiar la influencia de la agitación del inóculo en la infectividad antes de su aplicación. Se observó que los valores experimentales de las DI_{50} y DI_{100} son modificados debido a la velocidad de sedimentación de las amibas.

Se encontró que si el inóculo no es agitado antes de su aplicación, la dispersión de éste no es homogénea, lo cual produce una baja en el porcentaje de infectividad en el hamster de un 45.3 %, esto es cuando se utilizan amibas cultivadas con suero de bovino.

Cuando se usan amibas cultivadas con suero de caballo se -- produce una baja en la infectividad de un 46 %.

Otro factor importante es el tiempo de inoculación que nos muestra que con un inóculo agitado constantemente se obtiene de un 94 a un 100 % de infectividad, sin embargo si el inóculo no es agitado constantemente el porcentaje de infectividad disminuye de un 93 a un 24 %.

Estos resultados nos indican lo importante que es la aplicación constante del inóculo y que el tiempo de agitación debe -- ser menor de 15 minutos entre cada inoculación.

En el desarrollo de este trabajo aunque no esta dentro de -- los objetivos es importante hacer notar que para llevar a cabo una prueba de virulencia en perfectas condiciones de manejo y -- obtener resultados confiables, es necesario que el animal de -- prueba (hamster lactante) tenga buen trato y limpieza, realizar la prueba tranquila y metódicamente para evitar la exasperación de la madre y en consecuencia el canibalismo.

Cabe mencionar que el modelo elegido fué el mejor ya que para la prueba de infectividad, nos dieron resultados muy constantes y además confiables, debido a la sensibilidad que tiene el hamster al parásito y su fructífera reproducción.

Un factor importante es el cuidado que se tenga en la preparación de los inóculos, que las amibas se encuentren activas y -- que la cantidad de amibas sea lo más exacta posible, esto va a depender también de la precisión del material y aparatos a uti-

lizarse.

La observación y/o exploración de los animales infectados - debe hacerse también en forma organizada, enumerando los hematers tomados al azar y ordenandolos por dosis, esto facilitará la observación y la obtención de los resultados.

CONCLUSIONES

- 1.- En hamsters lactantes de 1 a 2 días de nacidos, la DI_{50} con inóculos de amibas de 48 horas y cultivadas en medios preparados con suero de bovino, tiene un valor menor en comparación con las cultivadas con suero de caballo.
- 2.- La DI_{100} tiene un valor de 20 000 amibas, con inóculos de 48 horas y desarrolladas en medio de cultivo preparado con suero de bovino.
- 3.- Es conveniente realizar pruebas de infección con inóculos de 48 horas de cultivo.
- 4.- Es necesario agitar continuamente el inóculo manteniendo homogénea la suspensión durante el proceso de inóculación.
- 5.- El inóculo debe ser agitado con intervalos de tiempo no mayores de 15 minutos, ya que si se excede éste intervalo se observa una disminución en los resultados de infectividad, debidos a la sedimentación de las células.
- 6.- Es necesario continuar con los estudios sobre la prueba de infectividad de E. histolytica y factores que puedan modificarla.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aguirre, G., Calderon, F., y Tanimoto, W. : "Examen Histológico de las Lesiones Hepáticas en el Hamster Inoculado con Cultivo Axénico de E. histolytica", Arch. Invest. Méd. (Méx) 3 (Supl.2) p 341-348. (1972).
- 2.- Aguirre, G., Calderon, L., Vázquez, S. y Tanimoto, W. : "Estudios Histopatológicos de las Lesiones Hepáticas en Hamsters Inoculados con Distintas Cepas de E. histolytica Desarrollada en Condiciones Axénicas", Arch. Invest. Méd. (Méx.) 4 (Supl.-1 p 109 (1973).
- 3.- Bntson, H.C. : An Introduction to Statistics in the Medical-Sciences. Departament of Public Health. University of Illinois. College of Medicine. Burgess Publishing Co. USA. 1956- p 62-67.
- 4.- Belding, D.L.: Texbook of Parasitology. The Parasitic Amebae of man. Division of Meredith Publishing Company. New York, - Editorial Appleton-Century-Crofts, 3a Ed. 1965. p 35.
- 5.- II Curso Internacional Sobre Producción y Control de Biológicos. Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud, Secretaría de Salubridad y Asistencia. Mé-

xico, 1978.

- 6.- Diamond, S.L.: "Techniques of Axenic Cultivation of E. histolytica Like Amebae", The Journal of Parasitology, Vol. 54, - No. (5), p 1047-1055. (1968).
- 7.- Diamond, Phillips and Bartgis. : "Virulence of Axenically -- Cultivated E. histolytica", Archivos de Investigación Médica, Vol. 4 Supl. 1. p 99. (1973).
- 8.- Diamond, L.S. y Sepúlveda, B. : Amibiasis. Memorias de la -- Conferencia Internacional Sobre Amibiasis. México, Publica-- das por el Instituto Mexicano del Seguro Social. 1976 p 41-52.
- 9.- Diamond, S.L., Harlow, R.D. and Cunnick, C.C. : "A New Me--- dium for the Axenic Cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba", Transactions of Royal Society of Tropical- Medicine and Higyene, Vol. 72, No. (4), p 431-432 (1978).
- 10.- Greenberg, L.: "La Importancia de los Controles en las Prue- bas de los Productos Biológicos", Fuentes, Preparados y Em- pleo de Normas Biológicas. Asesor en Productos Biológicos,- Organización Mundial de la Salud. p 1-7.

- 11.- Hernández, L. y Escobedo, S. : "Producción de Abscesos Hepáticos en el Hamster Bajo Diversas Condiciones de Experimentación", Arch. Invest. Méd. Méx. Vol. 1 p 121 (1970).
- 12.- Informe de un Comité de Expertos de la O.M.S. Amibiasis. Serie de Informes Técnicos No. 421. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1969. p 26-33.
- 13.- Jonathan, I.R. and Richard, L.G. : "Separation of Adherence Cytolytic and Phagocytic Events in the Cytopathogenic Mechanisms of Entamoeba histolytica", Arch. Invest. Méd. (Méx.)-13 (Supl. 3) p 123-127 (1982).
- 14.- Lushbaugh, B.W., Kairalla, D.A., Hofbauer, F.A. and Pittman, E.F.: "Sequential Histopathology of Cavitary Liver Abscess-Formation Induced by Grown E. histolytica", Arch. Invest. - Méd. (Méx) 11 (Supl. 1) p 163-165 (1980).
- 15.- Martínez Palomo, R. M.D., D. Sc. The Biology of Entamoeba histolytica Head. Departament of Cell Biology and Section - Experimental Parasitology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional, Mexico City, México, 1980. p 61-11P.

- 16.- Martínez Palomo, A., Tenimoto, W. and Tena, B.: "Evolución de las Lesiones Producidas en Hamsters por Inoculación de E. histolytica", Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11 (Supl. 1) --- p 169-172 (1980).
- 17.- Mattern, C.F.T. and Keister, B.D. : "Experimental Amebiasis in the New Born Hamster", Amer. J. Trop. Méx. Hyg. 26 p 402 (1977).
- 18.- Mattern, C.F.T., Keister, B.D. and Natovitz, C.P. : "Virulence of Entamoeba histolytica Upon Continuous Axenic Cultivation", Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl. 3). p 185-190. (1982).
- 19.- Orozco, E., Martínez Palomo, A. y López, R.R. : "Un Modelo in vitro Para el Estudio Cuantitativo de la Virulencia de E. histolytica", Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1) ---- p 257-260. (1978).
- 20.- Orozco, M.E., Martínez Palomo, A., Guarneros N., Kobiler, D. y Mirelman, D. : "Receptores Participantes en la Adherencia de E. histolytica a Eritrocitos Humanos", Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl. 3) p 177-182 (1982).
- 21.- Pérez Tamayo, R., Brandt, H.: Amebiasis Pathology of Proto-

- zoal and Helminthic Diseases with Clinical Correlation. ---
New York, Marcial Rojas, R.A., Robert E. Krieger. Co. 1975.
p 145-157.
- 22.- Renertson, J.W. and Thomson, E.P. : "Experimental Amebic Hepatitis in Hamsters", Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (16) p 518
521 (1951).
- 23.- Rodríguez, M.T., Gómez, I., y Gonzalez, P.N. : "Determinación de Curvas de Crecimiento e Inóculos Óptimos de Trofozoitos de *E. histolytica* en Cultivo Axénico". Resúmenes. XII Congreso Nacional de Microbiología, Mérida Yuc. Asociación Mexicana de Microbiología. p 20 (1981).
- 24.- Saiz Fernández, S. y López, R.R. : "Actividad Citopatógena en Extractos de Trofozoitos de *E. histolytica*", Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1), p 155-156 (1978).
- 25.- Tanimoto, W., Sepúlveda, B. y Vazquez, S. : "Lesiones Producidas en el Hígado del Hamster por Inoculación de *E. histolytica* Cultivada en Medio Axénico", Arch. Invest. Méd. (Méx.) 2 (Supl. 1) p275 (1971).