



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZARAGOZA

"ESTUDIO DE CAMPO REALIZADO EN UNA POBLACION SUBURBANA, CON EL OBJETO DE INVESTIGAR LA SUSCEPTIBILIDAD A LA AMIBIASIS DESDE EL PUNTO DE VISTA INMUNOLOGICO ASI COMO SU CORRELACION CON EL GRUPO ISOENZIMATICO DE ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS"

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a n :

JUDITH NAVARRO LUNA

MA. DE LAS MERCEDES ZAMUDIO DURAN



1985



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 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.

I N D I C E

	pág.
1. Generalidades	1
2. Introducción	14
3. Plan de trabajo	16
4. Material	17
5. Métodos	21
6. Resultados	38
7. Análisis de resultados	60
8. Conclusiones	68
9. Bibliografía	70

GENERALIDADES

1. GENERALIDADES

1.1. Antecedentes históricos.

La primera referencia que se tiene con relación a la amibiasis en nuestro país es la de Cooper, en su libro "Epidemic Diseases in Mexico City, 1718-1813", relata que en 1776 hubo aquí una gran epidemia de tifoidea, disentería, neumonía e influenza, y el médico don Joaquín Pfo Escúta opinó: "una enfermedad del hígado ha sido la causa principal de la mortalidad en esos años". La mención específica de "disentería" y la importancia que se dió a "una enfermedad del hígado", sugieren que entonces haya sido aquí - muy abundante la amibiasis, en sus localizaciones cólica y hepática (9).

En cuanto al conocimiento de las amibas fue Rösel van Rosenhof, pintor miniaturista de profesión, tallador de lentes y microscopista por afición, quien descubrió en 1755 un microorganismo que cambiaba constantemente de forma, por lo cual lo llamó "el pequeño proteo". Ehrenberg creó en 1839, el género Amoeba y en 1849 el naturalista ruso Gros describió la primera amiba parásita del hombre conocida, su Amoeba gingivalis, llamada después Entamoeba gingivalis (10).

Así pues, Wilhelm Lambl en 1860 (32) es el primero en referir a la -- amiba como probable causa de padecimiento humano, pues observó los parásitos en las heces de niños afectados por disentería. Este autor también describió a Giardia intestinalis en esta población, atribuyéndole ciertos síntomas a la amiba y otros a la Giardia; una publicación semejante fue hecha por Morris J. Lewis (34) cinco años más tarde, con muchos casos de cólera en la India.

Es pues, hasta 1875 que el Dr. Fedor Aleksandrevitch Lösch (36) publicó, en el número 65 de los "Archivos de Anatomía y Fisiología Patológicas y Medicina Interna", dirigidos por el gran patólogo Rudolf Virchow, los resultados de las observaciones y de la experimentación que hizo en el caso de disentería que padeció un campesino oriundo de la región de Arkanigel, - internado en la clínica del Profesor Eichwald en San Petersburgo, hoy Leningrado. Este trabajo demuestra la etiología del padecimiento no sólo por el descubrimiento de la amiba, sino por ofrecer la primera prueba experimental de su poder patógeno.

En 1836, Stephanos Kartulis (25), médico del Hospital Helénico en Alejandría, publicó, en los "Archivos de Virchow", un relato de sus observaciones en 150 casos de disentería con existencia en las heces de los pacientes, de amibas como las descritas por Lösch. Además, logró transmitir la infección amibiana a unos gatos y afirmó el papel etiológico esencial de la amiba en la disentería.

En 1889 Masiutis publicó sus observaciones en 5 casos de diversas enfermedades, la tifoidea entre ellas, en los que encontró amibas en las heces de sus pacientes, sin síntomas de disentería, por lo cual negó el papel etiológico de aquellos parásitos en la enfermedad.

Pero Kartulis, en 1890, reafirmó sus ideas cuando informó la observación de 2 casos de disentería en Grecia, con amibas en las heces de los enfermos.

Robert Koch (27), mientras estudiaba el cólera en Egipto y después en India, examinó gran número de muestras de heces de enfermos y practicó no pocas necropsias. En 5 casos de disentería, 2 de ellos complicados con abscesos del hígado encontró amibas como las que antes había visto en las heces, en cortes histológicos de úlceras cólicas. Halló también esas amibas en capilares hepáticos cercanos a abscesos, con lo cual puso en claro, en 1887, la relación etiológica entre disentería y absceso hepático, que como coincidencia o complicación era ya conocida.

En Checoslovaquia también Hlava (2) encontró amibas en casos de disentería. En 1887 inoculó con heces de pacientes, abundantes en amibas, a varias especies animales (perros, gatos y otros) y tuvo éxito positivo en 4 gatos, por lo cual afirmó el poder patógeno de tales parásitos. En el mismo año, Kartulis (26) contribuyó nuevamente al conocimiento de la amibirosis cuando notificó la existencia de amibas en 20 casos de absceso hepático, con lo cual lograba confirmar la naturaleza amibiana de esta afección.

Un clínico canadiense William Osler es el primero en reconocer las amibas de Lösch en casos de disentería en el continente americano.

En 1891, W. T. Councilman y H. A. Laflour (11), publicaron su monografía Amoebic Dysentery, basada en 14 casos observados clínicamente en E.U.A. Las principales aportaciones de estos autores clásicos de

la amibiiasis, son: que el padecimiento actual es una entidad anatomoclínica bien definida, y que el agente patógeno es la amiba, a cuya especie da con el nombre de Entamoeba dysenteriae.

Quincke y Rees publicaron un estudio en 1893 en el cual confirman la existencia de más de una especie de amibas parásitas en el intestino humano y descubrieron el ciclo evolutivo de la amiba disentérica.

Kruse y Pasquale en 1894 produjeron disentería en gatitos inoculándolos con pus de absceso hepático, bacteriológicamente estéril, y así dieron nueva comprobación de la capacidad de las amibas para producir disentería sin ir acompañadas por otros géneros.

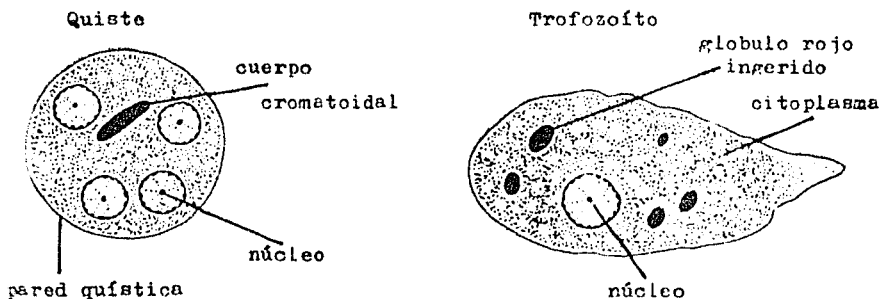
En 1903, Huber precisó los caracteres diferenciales de los quistes de las dos especies de amibas hasta entonces conocidas como parásitas en el intestino humano y, en la misma fecha, Schaudinn (67) fijó con precisión los detalles estructurales de esas dos especies de amibas: a la patógena la llamó Entamoeba histolytica, y Entamoeba coli a la especie constantemente desprovista de poder patógeno.

1.2. Entamoeba histolytica.

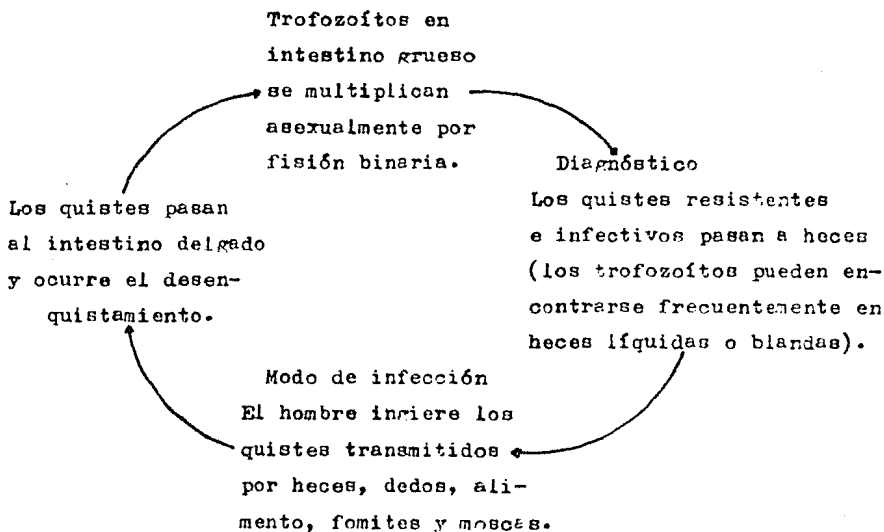
El ciclo de vida de E. histolytica es complejo y en él se producen algunos cambios en la morfología del parásito; los más importantes desde el punto de vista médico son el quiste y el trofozoito o forma móvil; ya que la infección se adquiere fundamentalmente por la ingestión de quistes, una vez dentro del organismo éstos se rompen después de la reduplicación de cada núcleo y dan lugar a los trofozoitos, que son la forma biológica patógena. Las formas intermedias, el prequiste y el metaquiste son parte del ciclo biológico (9).

El quiste es una estructura redonda u oval que mide de 25 u a 35 u de diámetro; muestra de uno a ocho núcleos, pero lo más común es que sean cuatro, con una membrana nuclear delicada con condensaciones de cromatina --- arregadas sobre la superficie interna, con un endosoma central formado por uno o varios gránulos dispuestos en un órgano compacto; los quistes de E. histolytica muestran cuerpos cromatoides con puntas romas, el citoplasma es ligeramente granular y puede contener algunas vacuolas (9).

Los trofozoitos miden de 6 u a 40 u de diámetro y muestran una membrana citoplásmica delgada; el contenido se divide clásicamente en dos porciones: una zona externa, o ectoplasma, que es más clara y da lugar a los pseudópodos, y una zona interna, o endoplasma, finamente granular 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 excéntrico.



Ciclo biológico. Cuando los quistes de esta especie, expulsados con las heces de una persona infectada, han sido ingeridos, pasan al estómago sin sufrir allí alteración perceptible; bajo la acción de los jugos intestinales su membrana va siendo disuelta y cuando llegan a la porción terminal del ileon, ésta se rompe y sale una amiba cuadrinucleada que por división de su citoplasma da origen a cuatro pequeñas amibas uninucleadas, cada una de las cuales se divide a su vez en dos, con lo cual de cada quiste resultan ocho amibas en la fase metaquistica, las que pasan al colon, se fijan sobre la mucosa cólica, pueden penetrar en el espesor de ésta donde se alimentan, se desarrollan y se multiplican. Las de algunas cepas poco virulentas o cuando las condiciones de su ambiente no les son propicias, se quedan sobre la superficie de la mucosa o en la luz del colon, pasan pronto a la fase prequistica y se transforman finalmente en quistes, los que son expulsados al exterior con las materias fecales (42).



Después de alcanzar el intestino delgado, ya sea por la ingestión de quistes o por inyección intracecal experimental, los trofozoitos de E. histolytica requieren un medio adecuado para sobrevivir y multiplicarse. Tal medio está aparentemente proporcionado por la luz y la pared del intestino, que deben estar en un rango de pH y potencial redox adecuados, así como por factores bacterianos y nutricionales necesarios para el crecimiento de las amibas (40). Además, a este complejo grupo de requerimientos contribuyen factores genéticos, dietéticos, fisiológicos, otros no bien determinados, que dependen del huésped y es sólo gracias a que la amiba no parece ser particularmente delicada y selectiva, que su crecimiento y supervivencia son posibles (15, 39, 51); más aún, 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 (72).

El cultivo artificial de E. histolytica ha progresado a través de diferentes etapas: a) E. histolytica en asociación con flora bacteriana compleja o cultivos mixtos (6); b) E. histolytica en asociación con una sola bacteria (Bacteroides symbiosus, Escherichia coli) (59) o con otro protozoario (Trypanosoma cruzi) (53), estos son los llamados cultivos monoxénicos - realizados aproximadamente desde 1950 y c) E. histolytica exclusivamente, - denominado axénico desarrollado a partir de 1961 (14).

El análisis de antígenos de diferentes cepas de E. histolytica mediante inmunoelectroforesis (IEF) fue realizado por Krupp (28) quién demostró que las cepas patógenas de E. histolytica poseen similitud que no comparten con cepas no patógenas.

Ishaq (22) encontró que diferentes cepas de E. histolytica poseen mayor número de antígenos cepa-específicos que comunes. Es posible que tal grado de variación antipéptica sea la causa de re-infección en pacientes que poseen alto título de anticuerpos anti- E. histolytica.

Numerosos intentos se han realizado a fin de obtener el antígeno purificado; los primeros se llevaron a cabo con extracto crudo del cultivo monoxénico de la amiba (1, 2, 3), la bioquímica sugiere que el extracto cru-

do es una glucoproteína.

Recientemente se utilizan cultivos axénicos de la amiba y los extractos crudos se fraccionan mediante cromatografía en columna de Sephadex (29, 66). Es posible demostrar precipitinas con el antígeno amibiano crudo y con todas sus fracciones, sin embargo, las hemaglutininas sólo se ponen en evidencia con la fracción de peso molecular más alto (650 000).

Una aplicación del antígeno amibiano puro es la obtención de antisue-
ros específicos útiles en el inmunodiagnóstico del absceso hepático amibia-
no, el cual está asociado con la aparición de antígeno amibiano en el suero
del paciente. El uso de técnicas como la contraelectroforesis (CIEF),
el radioinmunoensayo (RIA) y la técnica de ELISA en aquellos casos en los -
que no es posible demostrar la presencia de E. histolytica en el pus aspi-
rado, incrementará la positividad en gran proporción o tal vez en todas las
muestras de suero infectado (41).

Muchas hipótesis se han sugerido al considerar el mecanismo por el ---
cuál ciertas cepas de E. histolytica son citolíticas e invasivas. Es posi-
ble que la amiba virulenta elabore enzimas que produzcan el efecto citolít-
tico característico observado en la amibiasis invasiva. Utilizando amibas -
que estuvieron asociadas con bacterias, Neal (52) demostró la presencia de
enzimas proteolíticas que atacaron a la caseína y a la gelatina. Estas en-
zimas fueron inhibidas por el suero. El grado de actividad proteolítica co-
rrelacionó con la invasividad amibiana en modelos experimentales in vivo.
Otras enzimas proteolíticas asociadas con E. histolytica incluyen la trip-
sina, pepsina, amilasa, carboxipeptidasa, glutaminasa, esterasa y hialuro-
nidasa. Sin embargo, tanto las cepas invasivas como no invasivas contienen
tripsina, y la presencia de hialuronidasa no correlaciona con la virulencia
del parásito in vivo (23). También se han identificado proteasas que son --
inhibidas por suero y precipitadas por el suero de pacientes con absceso --
hepático amibiano (7, 38, 46, 47).

Diversas observaciones destacan la importancia del contacto entre la -
amiba y la célula blanco para que se desarrolle el efecto citolítico; se ha
postulado que E. histolytica libera toxinas o enzimas a través de varias --
estructuras observadas con el uso de microscopio electrónico de barrido ---
(lisosomas activos de superficie, extensiones dendríticas y extensiones de
superficie) (37).

E. histolytica también posee la actividad de colagenasa en su membrana plasmática por lo que requiere el contacto directo con el sustrato. Posiblemente esta enzima juegue un papel importante en los mecanismos de invasión tisular, ya que en el curso de la amibiasis intestinal invasora la amiba penetra activamente en la mucosa y submucosa de intestino grueso (19, 50, 56). Los estudios de microscopía electrónica del epitelio intestinal - de tejidos infectados in vivo e in vitro (autopsias de humanos y animales de experimentación), muestran que la lámina basal y el tejido conectivo de la submucosa son dañados (16, 73). El colágeno es el mayor componente de la lámina basal y de la matriz extracelular del intestino (49, 55, 62).

La clasificación de parásitos mediante isoenzimas fue iniciada por separación electroforética de lisados de Trypanosomas (8). En el caso de E. histolytica uno de los primeros en clasificarla haciendo uso de la separación electroforética en acetato de celulosa de diversas enzimas glucolíticas fue Reeves (57, 58).

Sargeant ha trabajado con trofozoítos de E. histolytica en cultivo monoxénico y caracterizándolos de acuerdo a su patrón isoenzimático mediante electroforesis en gel de almidón, ha demostrado que E. histolytica puede clasificarse hasta en 18 diferentes zimodemos. En sus investigaciones realizadas en la ciudad de México ha encontrado sólo 13 zimodemos de los cuales 3 están claramente asociados con amibiasis clínica invasiva, mientras que los restantes se obtuvieron a partir de portadores asintomáticos. Las enzimas útiles para esta clasificación son: málica (EM), fosfoglucoisomerasa (PGI) y fosfoglucomutasa (PGM). En este sistema la denominada banda beta en PGM parece ser el marcador de patogenicidad en los zimodemos (63, 64, 65).

1.3. Amibiasis.

Se entiende por amibiasis la infección por Entamoeba histolytica - (67), un protozoo de la clase Rhizopoda y del género Entamoeba (30); incluyendo los casos de infección en la luz intestinal o amibiasis luminal, y los casos en que, cuando la amiba invade, se produce amibiasis tisular; obviamente se incluyen bajo el concepto de amibiasis tanto los casos asintomáticos, como los que presentan enfermedad clínica, dado que la presencia de sintomatología es circunstancial y cambiante a lo largo de la infección (5).

La amibiasis es un padecimiento endémico transmitido de hombre a hombre, que existe prácticamente en todos los países del mundo. Aunque habitualmente se considera como una infección tropical, y no hay duda de que su frecuencia es más elevada en países con climas cálidos y húmedos, la amibiasis ha sido observada prácticamente en todas las latitudes (43). Los diferentes grupos sociales y económicos estudiados han mostrado variaciones extremas en la frecuencia de la infección y de los síntomas clínicos, aun dentro de la misma área geográfica (68).

No existe un procedimiento estandarizado para determinar la frecuencia de la amibiasis en un lugar y tiempo determinados, valorando los distintos parámetros que en la actualidad son importantes de medir. De esta manera, los datos disponibles de distintas áreas del mundo no son verdaderamente comparables.

En relación a la frecuencia de la infección según puede determinarse por coproparasitoscópicos, en México las cifras confiables oscilan entre 5 y 55 por ciento, estimándose que en promedio, probablemente el 27 por ciento de la población lleva E. histolytica. En Brasil, estas cifras oscilan entre 5 y 48 por ciento. En Colombia, entre 20 y 67 por ciento, estimándose en promedio la cifra de 40 por ciento. En Chile, se calcula que el 17.6 por ciento de la población tiene la infección. En Costa Rica, en una extensa encuesta, se encontró 27 por ciento con infección. (5)

Es evidente que:

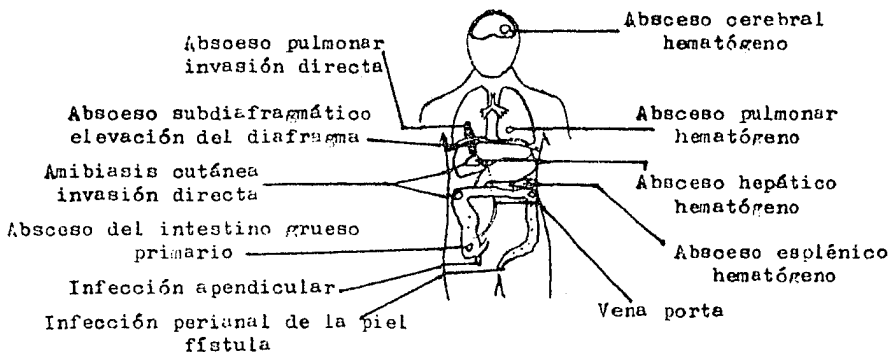
- 1) La infección es muy frecuente, pues en muchas regiones se expresa en porcentaje de población no seleccionada.
- 2) Prácticamente no hay área del mundo que esté libre de amibiasis, -

sun cuando se presenta con importancia variable.

- 3) A la luz de los datos disponibles, se puede ver que aproximadamente una cuarta parte de la población de América Latina tiene amibiasis, seguramente la mayor parte en forma asintomática, pero constituyendo una sólida fuente de infección.

El investigador en salud pública, haciendo encuestas en población general mediante exámenes coproparasitológicos, ha encontrado muchas personas con E. histolytica, pero sin manifestaciones de enfermedad; estas frecuentes infecciones asintomáticas han originado una serie de consideraciones peculiares por parte de los investigadores que no manejan otros aspectos de la amibiasis.

Esta infección, desde el punto de vista anatomopatológico, la podemos encontrar sin producir lesiones en el huésped, o bien, produciendo lesiones necróticas con poca reacción inflamatoria en el intestino grueso, con menor frecuencia en el hígado y con mucha menor frecuencia en la piel, el cerebro y otros órganos (24, 33, 35, 45, 54, 71).



Desde el punto de vista clínico, la amibiasis se puede presentar como: a) una infección asintomática, b) con diversos cuadros intestinales - que pueden dividirse en amibiasis intestinal aguda o crónica, c) con cua-

droso referidos a patología hepática que podemos dividir en hepatitis y absceso hepático amibiano, d) como una amibiasis cutánea o e) ocasionalmente con manifestaciones clínicas de las diversas complicaciones (5).

Correlación entre las distintas etapas de la migración de Entamoeba histolytica en el hombre y los diversos cuadros clínicos de la amibiasis.

Localización del parásito	Tipo clínico de amibiasis	CPS	Reacción serológica	Tipos de amibiasis	
Colonización de la luz intestinal	1. Portador	+	-	Luminal	Intestinal
Invasión de la pared intestinal	2. Asintomática 3. Intestinal crónica 4. Intestinal aguda 5. Ameboma	+	+	Tifoidal	
Invasión del hígado	6. Hepatitis aguda 7. Absceso hepático	-	+	Suprahepático	Extra-intestinal
Invasión de otros órganos y tejidos	8. Diversas localizaciones viscerales 9. Cutánea	-	+		Intestinal

CPS: Examen coproparasitológico.

El diagnóstico de certeza se realiza cuando se encuentran los trofozoitos de E. histolytica. Se practican reacciones inmunológicas tales como la de hemaglutinación, contraelectroforesis, aglutinación de látex y

otros, con buenos resultados, sobre todo en amibiasis extraintestinal (67, 70).

En los casos de amibiasis e independientemente del tipo clínico de que se trate, se deben realizar exámenes coproparasitológicos (CPS), tanto por el método directo o en fresco, como por concentración, por lo menos en 3 - ocasiones; si el paciente es un lactante o un preescolar, la toma de la muestra para el CPS directo debe realizarse con cucharilla rectal (60).

En los casos de amibiasis intestinal aguda es útil practicar rectosigmoidoscopia, tanto para observar el estado de la mucosa como para tomar muestras de materia fecal y de secreción mucosa mediante el raspado de alguna úlcera e investigar la presencia de trofozoítos (44).

Es útil realizar también radiografías simples del abdomen en posición anteroposterior y lateral, con el fin de observar si existe festoneamiento de la mucosa del colon o dilatación tóxica del colon ("colon toxicamibiano") o de perforación intestinal (74).

Si se sospecha amibiasis hepática, además de los estudios anteriores se deben realizar pruebas funcionales hepáticas, pruebas de sangrado y coagulación y radiografías simples en posición anteroposterior y lateral de la región toracoabdominal, para observar el área hepática así como las características del diafragma. Para establecer el tamaño, localización y número de abscesos, el gammagrama hepático es de gran utilidad (17).

En caso de que se puncione el absceso, se debe enviar el producto obtenido al laboratorio, para el estudio parasitológico y para el cultivo de piógenos.

En la amibiasis mucocutánea, el examen parasitológico de la secreción de la lesión puede mostrar los trofozoítos de E. histolytica, pero este estudio se hace negativo con las primeras dosis de las drogas anti-amibianas. Ayuda al diagnóstico la biopsia del borde de la úlcera.

En los casos de amibiasis intestinal crónica se emplearán drogas anti-amibianas que no se absorban y que actúen fundamentalmente en la luz intestinal; se recomiendan las siguientes, por vía bucal: metronidazol-hidroxi-quinoleína y dicloroacetamida (olorofenoyamida).

Los casos de amibiasis intestinal aguda se deben manejar con drogas de acción sistémica y se recomiendan las siguientes: metina o dehidro

emetina, por la vía intramuscular.

Si no hay vómitos o intolerancia, puede administrarse metronidazol. Al administrar metronidazol no se deben ingerir bebidas o medicamentos que contengan alcohol.

La amibiasis hepática, en cualquiera de los tipos clínicos que han sido señalados, se deben manejar con emetina, dehidroemetina o metronidazol. En caso de no observarse mejoría o de que existe el peligro de ruptura del absceso hepático, está indicado practicar punción o drenaje.

Las drogas de elección en los casos de amibiasis cerebral, mucocutánea, pulmonar o de otros sitios, son la emetina o la dehidroemetina; es -- probable que el metronidazol intravenoso sea también útil.

Es conveniente aclarar que todas las drogas antiamibianas actúan contra los trofozoítos de E. histolytica y no tienen ninguna acción contra los quistes.

INTRODUCCION

2. INTRODUCCION

2.1. Fundamentación de la elección del tema.

La parasitosis por E. histolytica se encuentra extendida en todo el mundo; puede considerarse un padecimiento endémico entre el paralelo 40 norte y el 30 sur (21).

La mayor parte de los autores consideran que la tasa de infección en promedio es del 20% de la población mundial, la cual se encuentra infectada por este parásito (31). Sin embargo, el número de pacientes que sufre realmente la enfermedad amibiana es muy variable en los distintos países (4, 12), es decir, sólo la minoría de los parasitados presenta evidencia de invasión tisular, ya sea colitis amibiana o un absceso hepático amibiano. Por lo tanto, la tasa de infección en una población que tiene E. histolytica no es un índice fiel para juzgar la frecuencia de la amibiasis clínica en una zona geográfica (68). De acuerdo con este criterio, se demuestra que ciertos países son más duramente agotados por el padecimiento, en vista de lo cual se les ha aplicado el significativo nombre de "patrias de la amibiasis" (13). Indudablemente, México es una de estas "patrias de la amibiasis", constituyendo un problema de salud pública.

2.2. Planteamiento del problema

En México, la tasa de infección se estima en los alrededores del 5 al 75% predominando en los medios pobres y mal saneados (18, 61). Una gran proporción de los infectados son portadores sanos y sólo una minoría enferma, correspondiendo esto al 6% (31), por lo que como ya se mencionó, para juzgar la frecuencia y gravedad de la amibiasis invasora en nuestro medio o en un área geográfica será necesario conocer la cantidad de abscesos hepáticos amibianos o el nivel de anticuerpos anti-amibianos presentes. Consideramos que un enfoque que no se le ha dado a este problema, es evaluar la capacidad inmunológica del huésped y hacer correlación de ésta con el diferente grado de patogenicidad que presenta E. histolytica juzgado esto por su capacidad de invasión al determinar el título de anticuerpos anti-amibianos, así como el patrón electroforético presente en la amiba.

2.3. Objetivos

Investigar si existe una correlación entre la educación (malos hábitos de higiene), deficiencia en los servicios de salud y presencia de E. histolytica invasora o si es una relación huésped-parásito (condicionada - por el estado nutricional del huésped y la capacidad de daño del parásito).

Determinar si hay una correspondencia entre la sintomatología del portador y el patrón electroforético de la E. histolytica aislada.

Evaluar la posible interacción entre una deficiencia inmunológica y - el patrón electroforético de E. histolytica presente en el portador y en - un paciente con sintomatología de amibiasis.

2.4. Hipótesis de trabajo.

El título de anticuerpos presentes en el suero contra los diferentes grupos isoenzimáticos de E. histolytica, no es significativo en una población de portadores sanos (no presentan evidencia de invasión tisular).

Así mismo el grupo isoenzimático de la amiba aislada no corresponde - al determinado en una persona con amibiasis invasora.

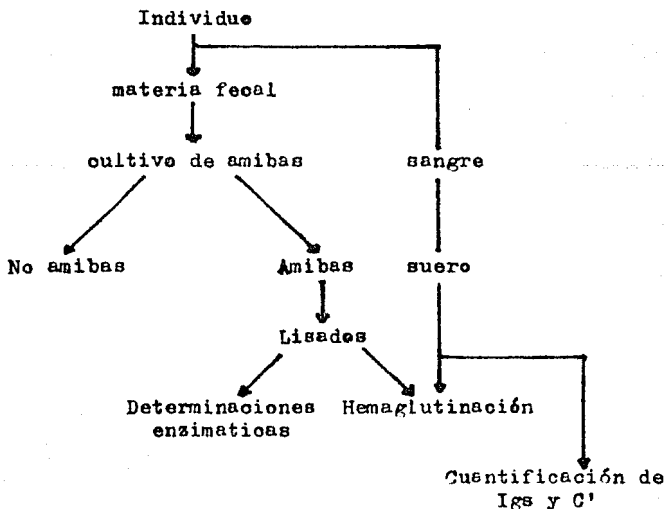
**PLAN
DE
TRABAJO**

3. PLAN DE TRABAJO

El muestreo se efectúa en la colonia José López Portillo (Delegación Ixtapalapa), con especímenes de materia fecal provenientes de familiares de personas que asisten al Centro Comunitario de Salud "José López Portillo" (IX-1) por molestias de índole gastrointestinal, a los cuales se les proporcionan los recipientes adecuados y las instrucciones necesarias para la realización de una correcta toma de la muestra.

Cada una de las muestras se somete directamente a la técnica del cultivo monoxénico de E. histolytica, los casos positivos se subcultivan tantas veces como sea necesario hasta tener una buena cantidad de amibas. Este es el material que se utiliza para preparar los lisados destinados a las determinaciones enzimáticas como a la hemaglutinación pasiva.

Por último, a partir de aquellas personas que presentan la amiba al cultivo, se obtiene una muestra de sangre, misma que sirve para llevar a cabo las determinaciones serológicas que permitan evaluar la respuesta inmune del huésped hacia el parásito en estudio.



M A T E R I A L

4. MATERIAL

4.1. Equipo

autoclave
balanza analítica
balanza granataria
bomba de vacío
cámaras de enfriamiento
celdas para electroforesis
centrifuga clínica
espectrofotómetro
fuente de poder
homogenizador
incubadora
microscopio compuesto
pH-metro
refrigerador
tanque de congelación con H_2 líquido
termómetro

4.2. Material

abatelenguas
aplicadores de madera
algodón
bulbos de succión
canastillas
cubrebocas
cubreobjetos 24 X 24 mm.
espátulas de acero inoxidable
estuche de disección
frascos de vidrio con tapón de rosca cap. 5 ml.
frascos de vidrio de boca ancha
gasa
gradillas
guantes de asbesto

4.3. Reactivos

ácido caproico
ácido cítrico . H_2O
ácido clorhídrico
ácido láctico
ácido maleico
ácido málico
agar bacteriológico
alcohol etílico
almidón en polvo
almidón hidrolizado
azul de bromotimol
azul de tiazolil
carbonato de sodio
citrato de sodio
cloruro de magnesio
cloruro de sodio
ditioeritritol
EDTA
eritromicina
fenol (Folin-Diocalteu)
fosfato dibásico de sodio
fosfato monobásico de potasio
fosfato monobásico de sodio
fructosa-6-P
glucosa
glucosa-1-P
glucosa-6-P-deshidrogenasa
hidróxido de sodio
metosulfato de fenazina
NADP
peptona
sulfato de amonio
sulfato de cobre . $5H_2O$
sulfato de magnesio

guantes de hule
hielo
hilo
jeringas desechables de 5 ml.
láminas de vidrio para electroforesis 15 X 23 cm.
ligaduras
manguera de hule
masking-tape
matraces aforados cap. 1 l., 500 ml. y 100 ml.
matraces Erlenmeyer cap. 6 l., 500 ml., 250 ml. y 100 ml.
matraces Kitasato cap. 500 ml.
mecheros Bunsen, Fisher
microdilutores
micropipetas 100 ul., 50 ul. y 20 ul.
palanganas de plástico 10 X 25 X 35 cm.
papel aluminio
papel Glassine
papel milimétrico
papel parafilm "M"
perillas de succión
pipetas graduadas 10 ml., 5 ml., 2 ml. y 1 ml.
pipetas Pasteur
placas para microtitulación
portaobjetos 25 X 75 mm.
probetas graduadas 500 ml., 250 ml., 100 ml. y 50 ml.
puntas de plástico para micropipetas
tapones de hule, números: 0 y 6
tela adhesiva
triple con tela de asbesto
tubos capilares
tubos de ensaye 12 X 75 mm. y 13 X 100 mm.
tubos de plástico de fondo cónico con tapón de rosca cap. 50 ml.
tubos de vidrio con tapón de rosca 15 X 150 mm.
vasos de precipitados cap. 1 l. y 100 ml.
viales de plástico para congelación cap. 2 ml. y 5 ml.

tartrato de sodio y potasio

TRIS

yodo

yoduro de potasio

E. histolytica cepa HM-1

Escherichia coli cepa "B"

equipo para inmunodifusión radial cuantitativa

glóbulos rojos de carnero

suero bovino

suero de conejo

suero de pacientes con absceso hepático amibiano

suero de personas que presentan la amiba al cultivo

M E T O D O S

5. METODOS

5.1: Muestreo.

5.1.1. Población. Habitantes de la colonia José López Portillo, -- Delegación Iztapalapa. Participan concretamente, aquellas - personas que conviven en la casa de algún paciente que asig - te al Centro Comunitario de Salud (IX-1) "José López Porti - llo" por molestias de índole gastrointestinal.

5.1.2. Muestras.

5.1.2.1. Materia fecal. Cada una de las familias involucra - das recibe el material suficiente y adecuado, así como las instrucciones necesarias para la realiza - ción de una correcta toma de la muestra. Por cada persona se solicitan tres muestras de materia fe - cal que se colectan en frascos de vidrio de boca - ancha, limpios, sin combinaciones con la orina de la persona u objetos extrínsecos microscópicos.

Las muestras se recogen en días alternados o en ocasiones en días espaciados por intervalos ma - yores.

Siempre, antes de someter la muestra al culti - vo monoxénico se lleva a cabo el examen macroscópi - co, anotando: consistencia, presencia de moco y -- sangre.

5.1.2.1. Suero. A partir de las personas que presentan la - amiba al cultivo.

Se extrae sangre por punción venosa, se deja coagular a temperatura ambiente, se desprende el - coágulo de las paredes del tubo y se somete a cen - trifugación a 3 000 rpm durante 5 min.; por último se separa el suero que se fracciona en alícuotas - de 0.5 ml. las cuales se conservan en congelación hasta que sea necesario utilizarlas.

5.2. Cultivo monoxénico de E. histolytica.

5.2.1. Siembra.

5.2.1.1. Agar salino. En 1 l. de agua destilada se disuelven 7 g. de cloruro de sodio y se rehidratan 15 g. de agar bacteriológico que se disuelve por agitación constante y calentamiento hasta ebullición. - La solución se deja enfriar aproximadamente a 45°C, entonces se distribuye a frascos de vidrio con tapón de rosca en alcuotas de 2.5 ml., se esteriliza a 15 lb/pulg.² durante 15 min. y se dejan solidificar en forma inclinada.

5.2.1.2. Almidón en polvo. Surtido por Drug Houses, Inglaterra.

5.2.1.3. Eritromicina en solución. Se prepara a una concentración de 5 ug/ml utilizando agua destilada estéril. Se conserva congelada en alcuotas de 2.5 ml. en frascos de vidrio con tapón de rosca.

5.2.1.4. Peptona en solución al 10%. Es el medio de cultivo para la cepa "B" de Escherichia coli, la cual fue donada por el Dr. Sargeant (College of Tropical - Medicine, Londres, Inglaterra).

5.2.1.5. Medio "R".

5.2.1.5.1. Solución concentrada. Se disuelven, en 2.5 l. de agua destilada: 125 g. de cloruro de sodio, 50 g. de ácido cítrico - monohidratado, 12.5 g. de fosfato dibásico de sodio, 25 g. de sulfato de amonio, 1.25 g. de sulfato de magnesio heptahidratado y 100 ml. de ácido láctico.

5.2.1.5.2. Solución de hidróxido de sodio al 40%. En 500 ml. de agua destilada, se disuelven 200 g. de hidróxido de sodio.

5.2.1.5.3. Solución de azul de bromotimol al 0.04%. 0.04 g. de azul de bromotimol se disuelven en 25 ml. de alcohol etílico, se añora a 100 ml. con agua destilada.

A 100 ml. de la solución concentrada, se adicionan 7.5 ml. de hidróxido de sodio al 40% y 2.5 ml. de azul de bromotimol al 0.04%. Se ajusta el pH=7.3 y se afora el volumen a 1 l. con agua destilada, para después esterilizar a 15 lb/pulg.² durante 15 - min.

- 5.2.1.6. Medio "B R". 100 ml. del medio "R" se inoculan con 1 gota del cultivo de E. coli cepa "B", se incuban a 37°C durante 48 h. Después puede conservarse a temperatura ambiente hasta por un período de 2 meses.

PROCEDIMIENTO:

Adicionar al agar salino: 5 mg. de almidón en polvo, 4 gotas de eritromicina en solución, 2 ml. de medio "B R" y 50 mg. de materia fecal. Incubar a 37°C durante 24 h.

5.2.2. Cultivo.

5.2.2.1. Almidón en polvo. (inciso 5.2.1.2.)

5.2.2.2. Eritromicina en solución. (inciso 5.2.1.3.)

5.2.2.3. Peptona en solución al 20%. En 100 ml. de agua destilada, se disuelven 20 g. de peptona. La solución se distribuye a frascos de vidrio con tapón de roca en alícuotas de 2.5 ml., se esteriliza a 15 lb/pulg.² durante 15 min. y se conserva en refrigeración hasta el momento de su uso.

5.2.2.4. Ftalato de potasio en solución. 204 g. de ftalato de potasio se disuelven en 100 ml. de hidróxido de sodio al 40%, se ajusta el pH=6.3 y se afora el volumen a 2.0 l. con agua destilada. La solución se esteriliza a 15 lb/pulg.² durante 15 min. Al momento de su uso se lleva a cabo una dilución 1:10 con agua destilada estéril.

5.2.2.5. Medio "B R S".

5.2.2.5.1. Medio "B R". (inciso 5.2.1.6.)

5.2.2.5.2. Suero bovino. Una vez que el suero bovino es clarificado por centrifugación y

filtración, se inactiva por calentamiento en baño María a 56°C durante 30 min. Se mezclan volúmenes iguales de medio "B R" y de suero bovino, al momento de su uso.

PROCEDIMIENTO:

Descartar, con pipeta Pasteur, el sobrenadante del frasco que contiene la siembra de la materia fecal, cuidadosamente, sin remover el sedimento. Adicionar al sedimento: 5 mg. de almidón en polvo, 2 gotas de eritromicina en solución, 2 gotas de peptona en solución, 1.5 ml. de ftalato de potasio (dilución 1:10) y 1.5 ml. de medio "B R S". Incubar a 37°C durante 48 h.

5.2.3. Subcultivo.

5.2.3.1. Solución yodoyodurada. Se mezclan 1 g. de yodo y 2 g. de yoduro de potasio y se disuelven en 100 ml. de agua destilada.

5.2.3.2. Agar salino. (inciso 5.2.1.1.)

5.2.3.3. Almidón en polvo. (inciso 5.2.1.2.)

5.2.3.4. Eritromicina en solución. (inciso 5.2.1.3.)

5.2.3.5. Peptona en solución al 20%. (inciso 5.2.2.3.)

5.2.3.6. Ftalato de potasio en solución. (inciso 5.2.2.4.)

5.2.3.7. Medio "B R S". (inciso 5.2.2.5.)

PROCEDIMIENTO:

Obtener, con pipeta Pasteur, removiendo cuidadosamente el sedimento del frasco que contiene el cultivo de materia fecal, una pequeña muestra del mismo. Colocar 1 gota en un portaobjetos que ya tiene 1 gota de solución yodoyodurada, mezclar y observar en el microscopio la presencia de amibas; las amibas viables se tiñen de color amarillo obscuro. Una vez que se ha comprobado la presencia de amibas, se procede a inocular un frasco de agar salino que contiene: 5 mg. de almidón en polvo, 2 gotas de eritromicina en solución, 2 gotas de peptona en solución, 1.5 ml. de ftalato de potasio (dilución 1:10) y 1.5 ml. de medio "B R S". Incubar a 37°C durante 48 h.

Este procedimiento se repite tantas veces como sea necesario hasta tener una buena cantidad de amibas.

Los cultivos que resultan negativos en la observación microscópica -- del sedimento, se subcultivan a ciegas, y, si no hay recuperación de amibas a partir de este primer subcultivo, se descartan.

5.3. Preparación de los lisados.

5.3.1. Amibas. A partir de materia fecal sometida al cultivo monoxénico de E. histolytica (inciso 5.2.)

5.3.2. Solución salina isotónica (SSI). 8.5 g. de cloruro de sodio se disuelven en 50 ml. de agua destilada.

5.3.3. Mezcla estabilizadora.

5.3.3.1. EDTA, solución 200 mM. 2.92 g. de EDTA se disuelven en 50 ml. de agua destilada.

5.3.3.2. Acido caproico, solución 200 mM. 1.16 ml. de ácido caproico se diluyen con agua destilada, hasta un volumen de 50 ml.

5.3.3.3. Ditioneritritol, solución 200 mM. 1.54 g. de ditioneritritol se disuelven en 50 ml. de agua destilada.

Se mezclan volúmenes iguales de las soluciones de EDTA, ácido caproico y ditioneritritol.

PROCEDIMIENTO:

Las amibas cultivadas se resuspenden en SSI, se colocan en un tubo de plástico de fondo cónico, se centrifugan a 350 X G durante 15 min. se descarta el sobrenadante y se añade al sedimento 1 ml. de la mezcla estabilizadora diluida 1:100 con agua destilada, con la que se deja reposar en el congelador durante 24 h. Después de este período de reposo, la suspensión se centrifuga a 3 000 X G durante 10 min. y el sobrenadante se fracciona en alícuotas de 50 ul. que conservan en congelación a -190°C, en un tanque de N₂ líquido, hasta el momento de su uso.

5.4. Determinaciones enzimáticas.

5.4.1. Fosfoglucoisomerasa. (PGI)

5.4.1.1. Preparación de los lisados (inciso 5.3)

5.4.1.2. Corrimiento electroforético.

5.4.1.2.1. Solución amortiguadora fosfatos 0.2M -- pH=7.0 (SAF 0.2M pH=7.0). 12.15 g. de fosfato monobásico de sodio y 17.40 g. de fosfato dibásico de sodio anhidro, se disuelven en 750 ml. de agua destilada, se ajusta pH=7.0 y se afora a 1 l. con agua destilada.

5.4.1.2.2. Solución amortiguadora fosfatos 0.015M pH=7.0 (SAF 0.015M pH=7.0). El SAF 0.2M pH=7.0 (inciso 5.4.1.2.1.) se diluye en proporción 1 pte. + 6.5 ptes. con agua destilada (dilución 1:7.5).

5.4.1.2.3. Gel de almidón. 2.5 g. de almidón hidrolizado se disuelven en 25 ml. de SAF 0.015M pH=7.0 (inciso 5.4.1.2.2.) mediante agitación constante y calentamiento hasta ebullición. Inmediatamente se desgasifica utilizando vacío y luego se vierte a la placa de vidrio para electroforesis y se deja enfriar para su uso.

PROCEDIMIENTO:

Para la electroforesis en gel de almidón se emplean cámaras con celdas de enfriamiento, manteniéndose así la temperatura constante a 8°C. El tiempo de corrimiento es de 3 h. en un campo eléctrico de 240 mV y 140 mA. Se utiliza solución amortiguadora SAF 0.2M pH=7.0.

5.4.1.3. Desarrollo de la reacción enzimática.

5.4.1.3.1. TRIS:clorhídrico 0.3M pH=8.0. 3.03 g. de TRIS se disuelven en 75 ml. de agua destilada, se ajusta pH=8.0 con ácido clorhídrico, se afora a 100 ml. con ---

- agua destilada y se conserva en refrigeración a 4°C hasta su uso.
- 5.4.1.3.2. Cloruro de magnesio 1M ($MgCl_2$ 1M). --- 20.32 g. de cloruro de magnesio se disuelven en 100 ml. de agua destilada y se conserva en refrigeración a 4°C hasta su uso.
- 5.4.1.3.3. NADP 10 mg/ml. 500 mg. de NADP se disuelven en 50 ml. de agua destilada y se conserva en refrigeración a 4°C hasta su uso.
- 5.4.1.3.4. Fructosa-6-fosfato (F6P) 10 mg/ml. 50 mg. de F6P se disuelven en 5 ml. de agua destilada y se conserva en refrigeración a 4°C hasta su uso.
- 5.4.1.3.5. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) 100 UI/ml. Disuelta en agua destilada, se conserva en refrigeración a 4°C hasta su uso.
- 5.4.1.3.6. Metosulfato de fenazina (PMS) 1 mg/ml. 10 mg. de PMS se disuelven en 10 ml. de agua destilada y se conserva en refrigeración a 4°C hasta su uso.
- 5.4.1.3.7. Azul de tiazolil (MTT) 5 mg/ml. 15 mg. de MTT se disuelven en 3 ml. de agua destilada y se conserva en refrigeración a 4°C hasta su uso.
- 5.4.1.3.8. Agar al 1.2%. 1.2 g. de agar bacteriológico se rehidratan, se disuelven por agitación constante y calentamiento hasta ebullición en 100 ml. de agua destilada. Se fracciona en porciones de 10 ml. en tubos de ensaye que se conservan en refrigeración a 4°C hasta su uso.

PROCEDIMIENTO:

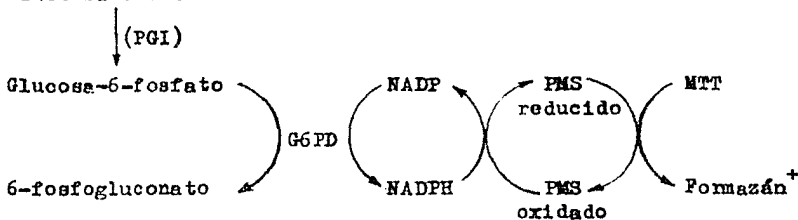
Para el desarrollo de la reacción enzimática, una vez terminado el período de corrimiento electroforético, se utiliza una mezcla reveladora que se pone en contacto con el gel de almidón durante un período de incubación a 37°C durante 2 h.; la producción de formazán revela la posición de la enzima.

La mezcla reveladora es la siguiente:

TRIS:clorhídrico 0.3M pH=8.0	7.0 ml
Cloruro de magnesio (MgCl ₂) 1M	0.2 ml
NADP 10 mg/ml	0.5 ml
Fructosa-6-fosfato (F6P) 10 mg/ml	0.2 ml
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) 100 UI/ml	0.5 ml
Metosulfato de fenazina (PMS) 1 mg/ml	1.0 ml
Azul de tiazolil (MTT) 5 mg/ml	1.0 ml
Agar al 1.2%	10.0 ml

Reacción que se propone:

Fructosa-6-fosfato



⁺ Compuesto colorido.

5.4.2. Fosfoglucomutasa. (PGM)

5.4.2.1. Preparación de los lisados. (inciso 5.3.)

5.4.2.2. Corrimiento electroforético.

5.4.2.2.1. Solución amortiguadora TRIS:maleato 0.1 M pH=7.4 (SATRIS:maleato 0.1M pH=7.4).

12.14 g. de TRIS, 11.61 g. de ácido maleico, 2.03 g. de cloruro de magnesio, 3.72 g. de EDTA y 12.8 ml. de solución de hidróxido de sodio 10N, se disuelven en 750 ml. de agua destilada, se ajusta

pH=7.4 y se afora a 1 l. con agua destilada.

5.4.2.2.2. Solución amortiguadora TRIS:maleato -- 0.01M pH=7.4 (SATRIS:maleato 0.01M pH=7.4). El SATRIS:maleato 0.1M pH=7.4 (inciso 5.4.2.2.1.) se diluye 1:10 con -- agua destilada.

5.4.2.2.3. Gel de almidón. 2.5g. de almidón hidrolizado se disuelven en 25 ml. de SATRIS:maleato 0.01M pH=7.4 (inciso 5.4.2.2.2.) mediante agitación constante y calentamiento hasta ebullición. Inmediatamente se desgasifica utilizando vacío, luego se vierte a la placa de vidrio para -- electroforesis y se deja enfriar para -- su uso.

PROCEDIMIENTO:

Para la electroforesis en gel de almidón se emplean cámaras -- con celdas de enfriamiento, manteniéndose así la temperatura constante a -- 8°C. El tiempo de corrimiento es de 3 h. en un campo eléctrico de 240 mV y 140 mA. Se utilizan las soluciones amortiguadoras: SAF 0.2M pH=7.0 en los electrodos de las cámaras y SATRIS:maleato 0.1M pH=7.4 entre los electro-- dos y el gel de almidón.

5.4.2.3. Desarrollo de la reacción enzimática.

5.4.2.3.1. TRIS:clorhídrico 0.3M pH=8.0. (inciso 5.4.1.3.1.)

5.4.2.3.2. Cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 1M. (inciso 5.4.1.3.2.)

5.4.2.3.3. NADP 10 mg/ml. (inciso 5.4.1.3.3.)

5.4.2.3.4. Glucosa-1-fosfato (G1P) 12.5 mg/ml. 625 mg. de G1P se disuelven en 50 ml. de -- agua destilada y se conserva en refrige-- ración a 4°C hasta su uso.

5.4.2.3.5. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) 100 UI/ml. (inciso 5.4.1.3.5.)

- 5.4.2.3.6. Metosulfato de fenazina (PMS) 1 mg/ml.
(inciso 5.4.1.3.6.)
- 5.4.2.3.7. Azul de tiazolil (MTT) 5 mg/ml (inciso 5.4.1.3.7.)
- 5.4.2.3.8. Agar al 1.2%. (inciso 5.4.1.3.8.)

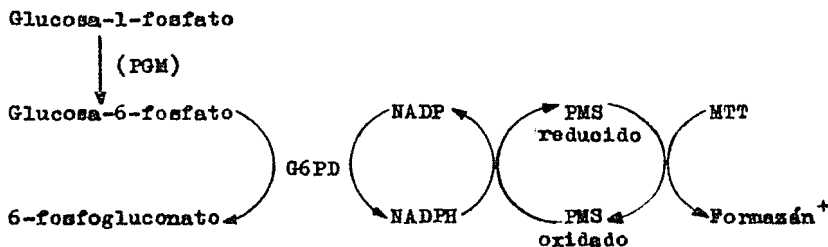
PROCEDIMIENTO:

Para el desarrollo de la reacción enzimática, una vez terminado el período de corrimiento electroforético, se utiliza una mezcla reveladora que se pone en contacto con el gel de almidón durante un período de incubación a 37°C durante 2 h.; la producción de formazán revela la posición de la enzima.

La mezcla reveladora es la siguiente:

TRIS:clorhídrico 0.3M pH=8.0	7.0 ml
Cloruro de magnesio (MgCl ₂) 1M	0.2 ml
NADP 10 mg/ml	0.5 ml
Glucosa-1-fosfato (G1P) 12.5 mg/ml	1.0 ml
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) 100 UI/ml	0.1 ml
Metosulfato de fenazina (PMS) 1 mg/ml	1.0 ml
Azul de tiazolil (MTT) 5 mg/ml	1.0 ml
Agar al 1.2%	10.0 ml

Reacción que se propone:



⁺Compuesto colorido.

5.4.3. Enzima málica. (EM)

5.4.3.1. Preparación de los lisados (inciso 5.3.)

5.4.3.2. Corrimiento electroforético. (inciso 5.4.1.2.)

5.4.3.3. Desarrollo de la reacción enzimática.

5.4.3.3.1. TRIS:clorhídrico 0.3M pH=8.0. (inciso - 5.4.1.3.1.)

5.4.3.3.2. Cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 1M. (inciso 5.4.1.3.2)

5.4.3.3.3. NADP 10 mg/ml (inciso 5.4.1.3.3.)

5.4.3.3.4. Malato 1M. 6.7 g. de ácido málico se disuelven en 50 ml. de agua destilada y se conserva en refrigeración a 4°C hasta su uso.

5.4.3.3.5. Metosulfato de fenazina (PMS) 1 mg/ml. (inciso 5.4.1.3.6.)

5.4.3.3.6. Azul de tiazolil (MTT) 5 mg/ml (inciso 5.4.1.3.7.)

5.4.3.3.7. Agar al 1.2%. (inciso 5.4.1.3.8.)

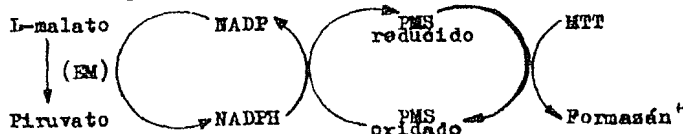
PROCEDIMIENTO:

(inciso 5.4.1.3.)

La mezcla reveladora es la siguiente:

TRIS:clorhídrico 0.3M pH=8.0	7.0 ml
Cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 1M	0.2 ml
NADP 10 mg/ml	0.5 ml
Malato 1M	0.1 ml
Metosulfato de fenazina (PMS) 1 mg/ml	1.0 ml
Azul de tiazolil (MTT) 5 mg/ml	1.0 ml
Agar al 1.2%	10.0 ml

Reacción que se propone:



⁺Compuesto colorido.

5.5. Hemaglutinación pasiva.

5.5.1. Antígenos. Extracto crudo de trofozoítos de E. histolytica cepa HM-1, y proteínas obtenidas de los lisados de E. histolytica (inciso 5.3.), de cada uno de los diferentes patrones enzimáticos determinados por electroforesis (inciso 5.4.)

Se utilizan en concentración de 2 mg/ml de proteína, - para sensibilizar a los glóbulos rojos de carnero (GRC).

5.5.1.1. Determinación de proteínas por el método de Lowry.

Las proteínas pueden determinarse por métodos colorimétricos midiendo el color azul que se produce - al agregar el reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu a una solución alcalina de aquéllas. La intensidad del color depende de su contenido de tirosina y - triptofano. El análisis se lleva a cabo directamente en una solución de proteínas sin digestión previa.

5.5.1.1.1. Hidróxido de sodio, solución 0.1N. 4g. de hidróxido de sodio se disuelven en - 250 ml. de agua destilada, luego se añora a 1 l. con agua destilada.

5.5.1.1.2. Carbonato de sodio, solución al 2% en - hidróxido de sodio 0.1N. 2 g. de carbonato de sodio se disuelven en 100 ml. - de solución 0.1N de hidróxido de sodio.

5.5.1.1.3. Tartrato de sodio, solución al 1%. 1 g. de tartrato de sodio se disuelve en 100 ml. de agua destilada.

5.5.1.1.4. Sulfato de cobre pentahidratado, solución al 0.5% en tartrato de sodio al 1%. 0.1 g. de sulfato de cobre pentahidratado se disuelven en 20 ml. de solución - al 1% de tartrato de sodio.

5.5.1.1.5. Reactivo A. Justamente antes de usarlo, se agrega 1 ml. de la solución de sulfato de cobre pentahidratado (inciso 5.5.

1.1.4.) a 50 ml. de la solución de carbonato de sodio (inciso 5.5.1.1.2.).

- 5.5.1.1.6. Reactivo B. Reactivo de fenol según Folin-Ciocalteu.
- 5.5.1.1.7. Solución proteica patrón. Albúmina sérica bovina 0.5 mg/ml.
- 5.5.1.1.8. Solución salina isotónica (SSI). (inciso 5.3.2.).

Curva patrón. A partir de la solución proteica patrón se realizan diluciones con SSI, de manera que al manejar volúmenes de 0.4 ml. se tengan: 0.01 mg., 0.02 mg., 0.03 mg., 0.05 mg., 0.10 mg., 0.15 mg., y 0.20 mg. de proteína. A cada una de éstas, se agregan 2 ml. de reactivo A, se mezclan y se dejan en reposo a temperatura ambiente durante 10 min. - entonces, se agregan 0.2 ml. de reactivo B, se mezclan y se dejan en reposo a temperatura ambiente durante 30 min., período de tiempo en que hay desarrollo de color azul. Por último, se realiza la lectura de D. O. en un espectrofotómetro a 500 nm. Con estos datos se construye una curva patrón al graficar: concentración proteica contra D. O.

Los antígenos, en solución, se someten al mismo procedimiento utilizando diluciones 1:10 y 1:20 en cada caso; los resultados de D. O. obtenidos, se interpolan en la curva patrón. Una vez que se conoce la concentración proteica de cada solución, se ajusta a 2 mg/ml para su uso.

5.5.2. Glóbulos rojos de carnero sensibilizados con antígeno.

5.5.2.1. Glóbulos rojos de carnero (GR).

- 5.5.2.1.1. Alsever modificado, solución estéril. - 24.6 g. de glucosa, 9.8 g. de citrato de sodio dihidratado, y 5.04 g. de cloruro de sodio se disuelven en 1.2 l. de agua destilada, se ajusta pH=6.1 con --

ácido cítrico y se esteriliza por filtración.

La sangre de carnero, extraída en forma aséptica, se conserva entre 2°C y 5°C en un volumen igual de la solución estéril de Alsever modificado. La sangre de carnero conservada en esta forma, se deja reposar en refrigeración durante una semana (período de estabilización), antes de usarla.

5.5.2.2. Antígenos, concentración proteica 2 mg/ml. (inciso 5.5.1.).

5.5.2.3. Solución salina isotónica (SSI). (inciso 5.3.2.).

5.5.2.4. Ácido tánico, solución al 1%. 1 g. de ácido tánico se disuelve en 100 ml. de agua destilada, se conserva en refrigeración a 4°C, hasta su uso. Justamente entonces, se hace una dilución 1:20 000 en SSI.

5.5.2.5. Solución amortiguadora de fosfatos pH=6.4 (SAF pH=6.4).

5.5.2.5.1. Fosfato monobásico de potasio, solución 0.15M. 20.41 g. de fosfato monobásico de potasio se disuelven en 250 ml. de agua destilada y luego se afora a 1 l. con agua destilada.

5.5.2.5.2. Fosfato dibásico de sodio anhidro, solución 0.15M. 21.29 g. de fosfato dibásico de sodio se disuelven en 250 ml. de agua destilada y luego se afora a 1 l. con agua destilada.

67.8 ml. de solución 0.15M de fosfato monobásico de potasio se mezclan con 32.2 ml. de solución 0.15M de fosfato dibásico de sodio anhidro y 100 ml. de SSI.

5.5.2.6. Solución amortiguadora de fosfatos pH=7.2 (SAF pH=7.2). 24 ml. de solución 0.15M de fosfato monobásico de potasio se mezclan con 76 ml. de solución --

0.15M de fosfato dibásico de sodio anhidro y 100 - ml. de SSI.

5.5.2.7. Suero normal de conejo. El suero se inactiva a 56°C durante 30 min., después de adsorberlo con un volumen igual de GRC empacados, la adsorción se realiza incubando esta mezcla a 37°C durante 1 h., refrigerando a 4°C durante una noche; la separación del suero adsorbido se realiza mediante centrifugación a 2 500 rpm durante 15 min.

Una vez que los GRC se han lavado tres veces con SSI, mediante centrifugación a 2 500 rpm durante 15 min., se prepara una suspensión de GRC al 2% en SAF pH=7.2 (D.O. = 0.5 a 555 nm.). Se toma 1 volumen (v.) de la suspensión de GRC al 2% en SAF pH=7.2 y se mezcla con 1 v. igual de ácido tánico 1:20 000 para incubarlos a 37°C durante 10 min., enseguida se centrifugan a 2 500 rpm durante 5 min., se elimina el sobrenadante y el paquete celular se lava dos veces con SAF pH=6.4 centrifugando a 2 500 rpm durante 5 min.; el paquete celular es entonces resuspendido en 1 v. de SAF pH=6.4 (suspensión de GRC-T al 2% en SAF pH=6.4).

La unión de los correspondientes antígenos con los GRC-T, se lleva a cabo de la siguiente manera:

tubo del antígeno

4 v., SAF pH=6.4

1 v., GRC-T al 2%

1 v., antígeno (2 mg/ml)

5 v., SAF pH=6.4

1 v., GRC-T al 2%

los tubos se dejan en reposo a temperatura ambiente durante 10 min. enseguida se lavan las células centrifugando a 2 500 rpm durante 5 min, se elimina el sobrenadante para añadir a cada tubo 2 v. de suero normal de conejo diluido 1:100 en SAF pH=6.4, se mezclan suavemente y luego se centrifugan a 2 500 rpm durante 5 min. decantando el sobrenadante, finalmente el paquete celular se resuspende en 1 v. de suero normal de conejo diluido 1:100 en SAF pH=6.4, así se obtienen GRC-T-ag al 2% y GRC-T al 2%.

5.5.3. Suero normal de conejo. (inciso 5.5.2.7.).

5.5.4. Sueros problema. Suero de personas que presentan la amiba - al cultivo. (inciso 5.1.2.1.).

5.5.5. Suero control positivo. Suero de pacientes con absceso hepático amibiano.

PROCEDIMIENTO:

La hemaglutinación se lleva a cabo en placas para microtitulación (pozos de fondo cóncavo).

El suero normal de conejo diluido 1:100 en SAF pH₇6.4 se usa como diluyente de los sueros, con 50 ul. de éste en todos los pozos se realizan diluciones, seriadas al doble, de los sueros; de manera que en cada pozo - queden 50 ul. de suero diluido. Después, se añaden a todos los pozos 50 ul. de suspensión de GRC-T-ag al 2%. Los controles se preparan de la siguiente manera: negativos, a) 50 ul. de diluyente + 50 ul. de suspensión GRC-T-ag - al 2% y b) 50 ul. de la primera dilución del suero + 50 ul. de suspensión - GRC-T al 2%; positivo, 50 ul. de diluciones, seriadas al doble, de suero - de paciente con absceso hepático amibiano + 50 ul. de suspensión GRC-T-ag al 2%. Los reactivos se mezclan, oscilando suavemente la placa para microtitulación, durante 3 min, y luego se dejan en reposo a temperatura ambiente durante 24 h.

Interpretación, hemaglutinación: (+) película delgada y difusa de GRC con bordes irregulares, desgarrados, (-) botón de GRC en el fondo del pozo.

El título de anticuerpos es la recíproca de la más alta dilución de suero, capaz de aglutinar los GRC-T-ag.

5.6. Inmunodifusión radial cuantitativa (IRQ).

La concentración de proteínas específicas del suero y otros líquidos corporales, puede conocerse de manera fácil, rápida y específica aplicando el método de IRC que se basa en la precipitación resultante de la reacción antígeno-anticuerpo. El antígeno es una proteína humana y el anticuerpo es una proteína sérica de un animal expuesto al antígeno. La reacción ocurre en un soporte semisólido y es visible como un anillo opaco de precipitación. El área circunscrita por el anillo de precipitación es proporcional a la concentración de antígeno.

5.6.1. Placas. Gel de agarosa al 1.5% en solución amortiguadora de TRIS 0.1M con azida de sodio al 0.1% y 1% o más de antisuero específico de chivo, caballo o borrego.

5.6.2. Soluciones proteicas patrón.

5.6.2.1. IgA: 100, 200 y 400 mg/dl

5.6.2.2. IgG: 422, 845 y 1 690 mg/dl

5.6.2.3. IgM: 50, 100 y 200 mg/dl

5.6.2.4. C₃: 43, 86 y 172 mg/dl

5.6.2.5. C₄: 15, 30 y 60 mg/dl

PROCEDIMIENTO:

5 ul. de las soluciones proteicas patrón correspondientes se aplican en los primeros tres pozos de la placa y en los demás, 5 ul. de los sueros problema. Las placas son incubadas a temperatura ambiente durante 48 h. Después se miden los diámetros de los anillos de precipitación. Con los datos obtenidos se construye una curva patrón al graficar los diámetros al cuadrado de los anillos de precipitación de las soluciones patrón, mg/dl. Los diámetros al cuadrado de los anillos de precipitación de los sueros problema se interpolan en la curva patrón, así se conoce la cantidad de proteína sérica específica.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

- 6.1. Zona muestreada. Colonia: José López Portillo; Delegación: Iztapalapa, D. F.
 - 6.1.1. Localización de los domicilios muestreados, total: 98.
 - 6.1.2. Localización de los domicilios de personas cuya materia fecal resultó positiva al cultivo de amibas, total: 55.
- 6.2. Cultivo de amibas a partir de las muestras de materia fecal.
- 6.3. Cultivo de amibas a partir de las muestras de materia fecal. Casos positivos y negativos, distribución según la edad y el sexo.
 - 6.3.1. Cultivo de amibas. Distribución según la edad en personas - del sexo femenino.
 - 6.3.2. Cultivo de amibas. Distribución según la edad en personas - del sexo masculino.
 - 6.3.3. Cultivo de amibas. Distribución según la edad en personas - del sexo femenino.
 - 6.3.4. Cultivo de amibas. Distribución según la edad en personas - del sexo masculino.
- 6.4. Número de integrantes por familia. Casos negativos y positivos, -- obtenidos en el cultivo de amibas, distribuidos según el número de integrantes por familia.
- 6.5. Clasificación de E. histolytica y amibas comensales obtenidas del cultivo de amibas a partir de materia fecal.
 - 6.5.1.1. Representación de los zimodemos de E. histolytica. Patrón electroforético de las enzimas: málica (EM), fosfoglucoisomerasa (PGI) y fosfoglucomutasa (PGM). (65)
 - 6.5.1.2. Representación de los zimodemos de algunas amibas comensales del intestino humano. Patrón electroforético de las enzimas: málica (EM), fosfoglucoisomerasa (PGI) y fosfoglucomutasa (PGM). (65)
 - 6.5.2. Entamoeba histolytica, obtenida del cultivo de amibas a partir de materia fecal. Clasificación por zimodemos. Total: 35.
 - 6.5.3. Amibas comensales, obtenidas del cultivo de amibas a partir de materia fecal. Clasificación por zimodemos. Total: 30.

- 6.5.4. Clasificación de las amibas obtenidas del cultivo a partir de materia fecal. Total E. histolytica: 35
Total amibas comensales: 30
- 6.6. Características presentadas por las muestras de materia fecal estudiadas de acuerdo a la amiba aislada y al zimodemo correspondiente.
- 6.7. Valores de inmunoglobulinas y componentes de complemento séricos.
- 6.7.1. Valores encontrados para la Entamoeba histolytica zimodemo I.
- 6.7.2. Valores encontrados para la Entamoeba histolytica zimodemo VII.
- 6.7.3. Valores promedio (\bar{X}) encontrados para la Entamoeba histolytica zimodemo III.
- 6.7.4. Valores promedio (\bar{X}) encontrados para la Entamoeba histolytica zimodemo IV.
- 6.7.5. Valores encontrados para la Entamoeba coli zimodemo I y II.
- 6.7.6. Valores encontrados para la Entamoeba hartmanni zimodemo I.
- 6.7.7. Valores encontrados para la Dientamoeba fragilis zimodemo II.
- 6.7.8. Tabla comparativa para los valores de inmunoglobulinas y componentes de complemento séricos obtenidos y los reportados en la literatura.
- 6.8. Reactividad a diferentes antígenos de Entamoeba histolytica.

AV. de las F O R R E S

Gral. MANUEL AVILA CAMACHO

	M-14	M-28	M-42	Calle 15	M-56	M-70	M-84	M-96
	M-13	M-27	M-41	Calle 14	M-55	M-69	M-83	M-95
	M-12	M-26	M-40	Calle 13	M-54	M-68	M-82	M-94
	M-11	M-25	M-39	Calle 12	M-53	M-67	M-81	M-93
	M-10	M-24	M-38	Calle 11	M-52	M-66	M-80	M-92
	M-9	M-23	M-37	Calle 10	M-51	M-65	M-79	M-91
	M-8	M-22	M-36	Calle 9	M-50	M-64	M-78	M-90
Calle 16	M-7	M-21	M-35	Calle 8	M-49	M-63	M-77	M-89
Calle 17	M-6	M-20	M-34	Calle 7	M-48	M-62	M-76	M-88
	M-5	M-19	M-33	Calle 6	M-47	M-61	M-75	M-87
	M-4	M-18	M-32	Calle 5	M-46	M-60	M-74	M-86
	M-3	M-17	M-31	Calle 4	M-45	M-59	M-73	M-85
	M-2	M-16	M-30	Calle 3	M-44	M-58	M-72	
	M-1	M-15	M-29	Calle 2	M-43	M-57	M-71	
				Calle 1				

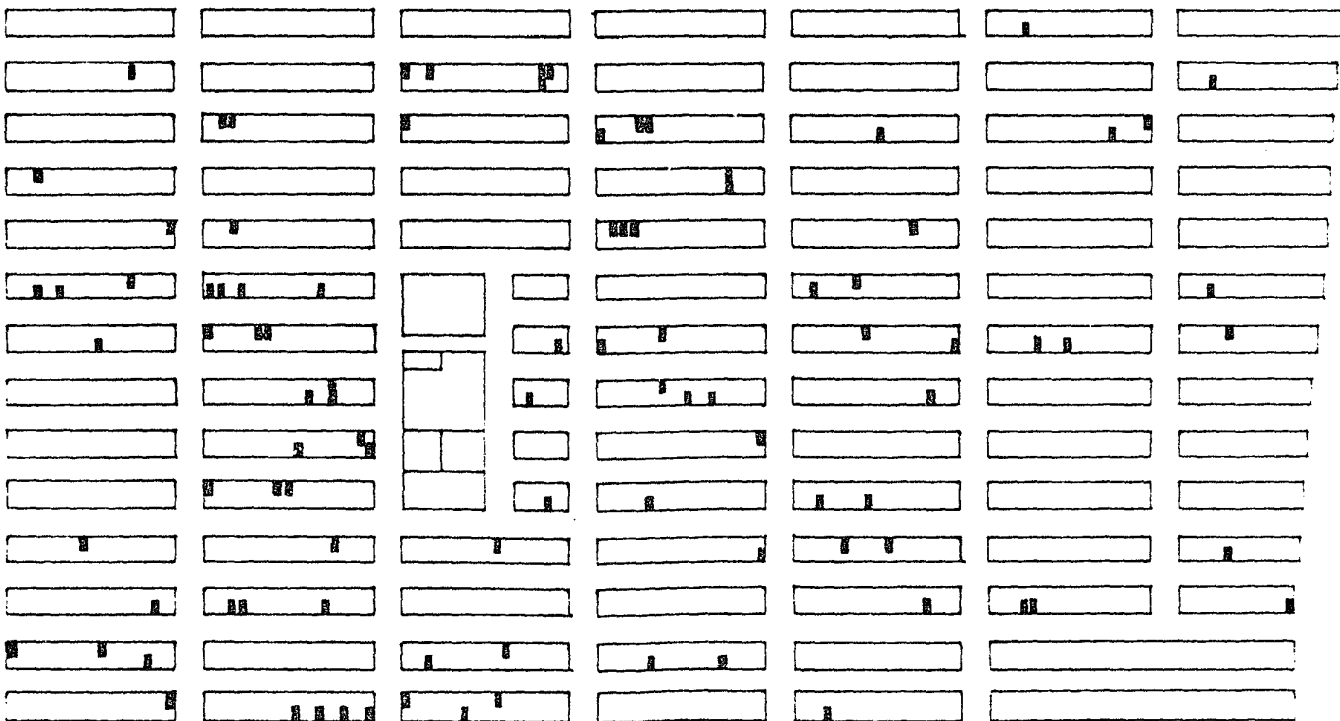
OCTVHO TYNVO

CANAL de GARAY

Fig. 6.1. Zona muestreada. Colonia: José López Portillo; Delegación: Iztapalapa, D.F.
 A. LICONSA, B. Primaria, C. Centro de Salud Comunitario, D. Secundaria,
 E. Jardín de Niños, F. Iglesia, G. Mercado y H. Primaria.

AV. de las TORRES

Gral. MANUEL AVILA CAMACHO



CANAL CHALCO

CANAL de GARAY

Fig. 6.1.1. Localización de los domicilios muestreados, total: 98.

AV. de las T O R R E S

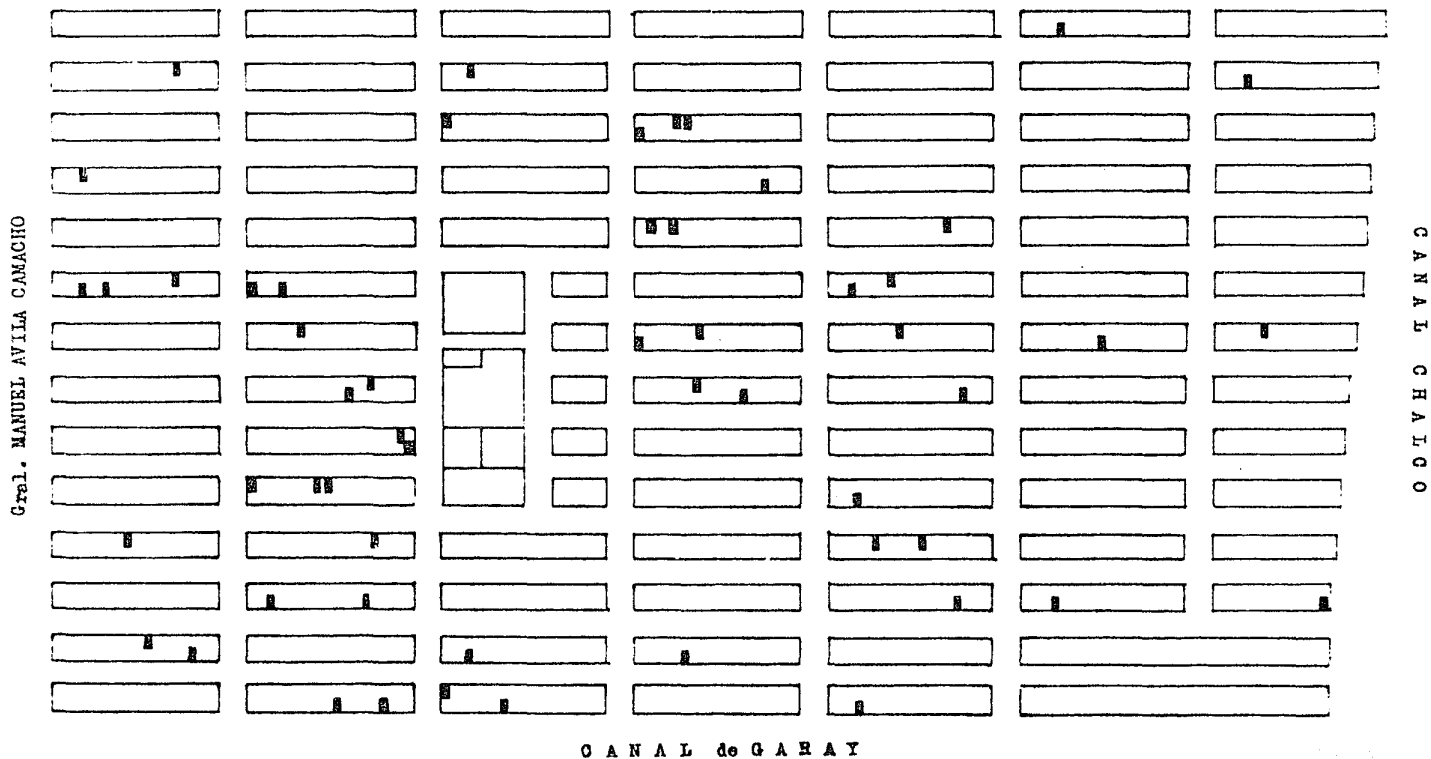


Fig. 6.1.2. Localización de los domicilios de personas cuya materia fecal resultó positiva al cultivo de amibas, total: 55.

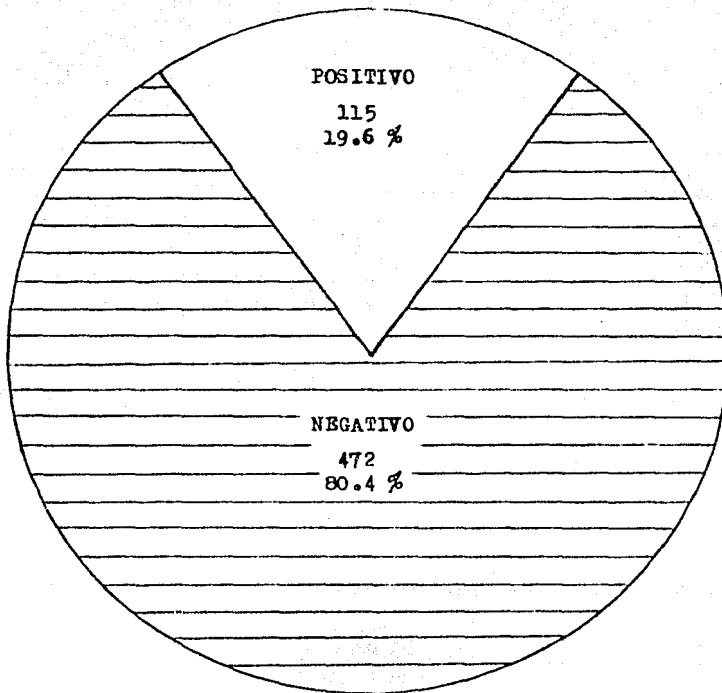


Fig. 6.2. Cultivo de amibas a partir de las muestras de materia fecal.

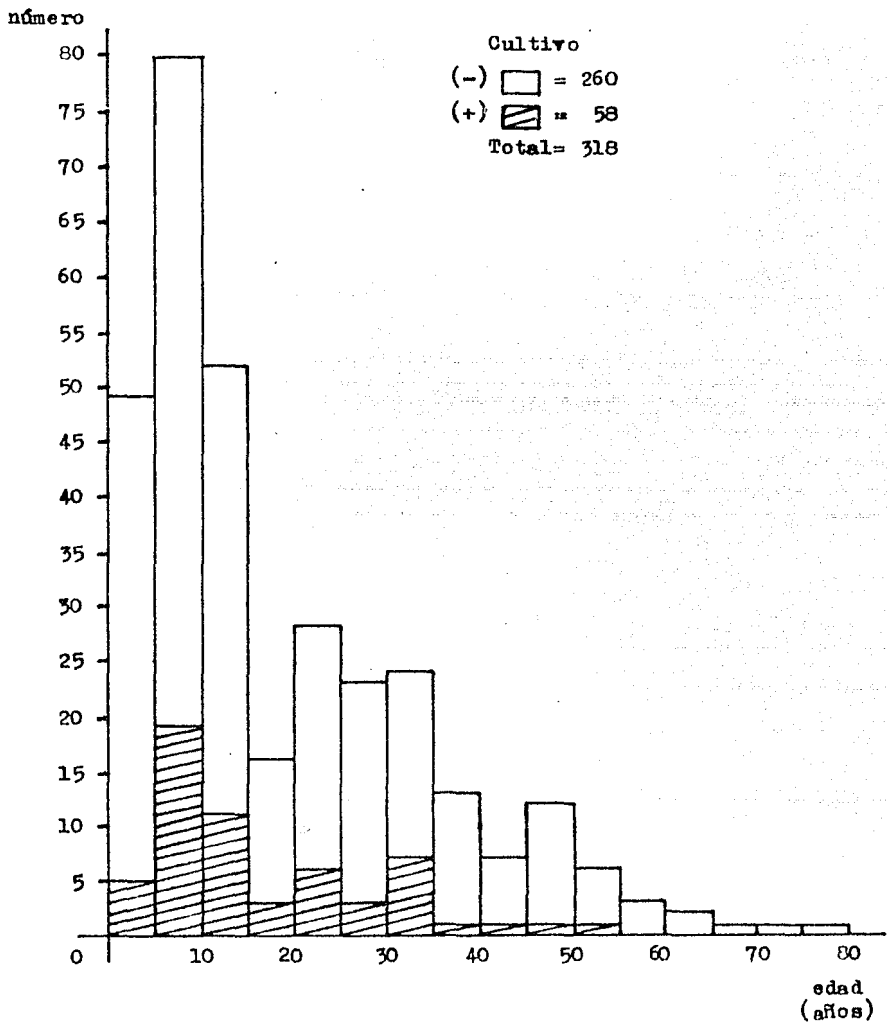


Fig. 6.3.1. Cultivo de amibas. Distribución según la edad en personas del sexo femenino.

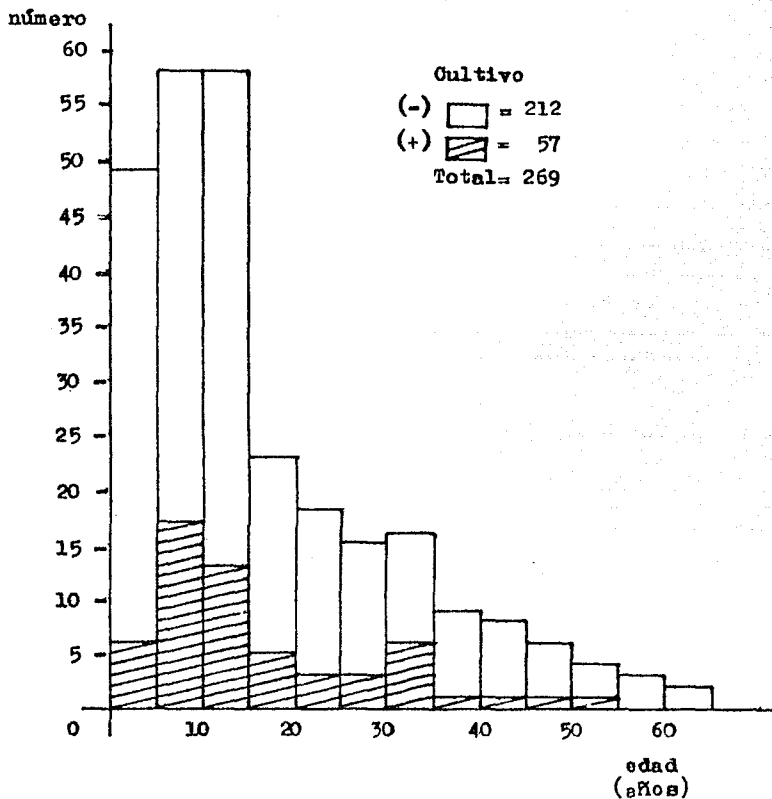


Fig. 6.3.2. Cultivo de amibas. Distribución según la edad en personas del sexo masculino.

Edad (años)	Cultivo			Por ciento cultivo (+)
	(-)	(+)	total	
<15	146	35	181	19.3
15-30	55	12	67	17.9
>30	59	11	70	15.7
T O T A L	260	58	318	18.2

Fig. 6.3.3. Cultivo de amibas. Distribución según la edad en personas del sexo femenino.

Edad (años)	Cultivo			Por ciento cultivo (+)
	(-)	(+)	total	
<15	129	36	165	21.8
15-30	45	11	56	19.6
>30	38	10	48	20.8
T O T A L	212	57	269	21.2

Fig. 6.3.4. Cultivo de amibas. Distribución según la edad en personas del sexo masculino.

Integrantes por familia	no. de familias	CULTIVO			(+) / total	por ciento
		(+)	(-)	total		
2	1	2	0	2	2 / 2	100.0
3	3	3	6	9	3 / 9	33.3
4	6	7	17	24	7 / 24	29.1
5	9	12	33	45	12 / 45	26.7
6	14	32	52	84	32 / 84	38.1
7	9	21	42	63	21 / 63	33.3
8	4	12	20	32	12 / 32	37.5
9	1	3	6	9	3 / 9	33.3
10	1	1	9	10	1 / 10	10.0
11	3	7	26	33	7 / 33	21.2
12	3	7	29	36	7 / 36	19.4
15	1	8	7	15	8 / 15	53.3

Fig. 6.4. Número de integrantes por familia. Casos negativos y positivos, obtenidos en el cultivo de amibas, distribuidos según el número de integrantes por familia.

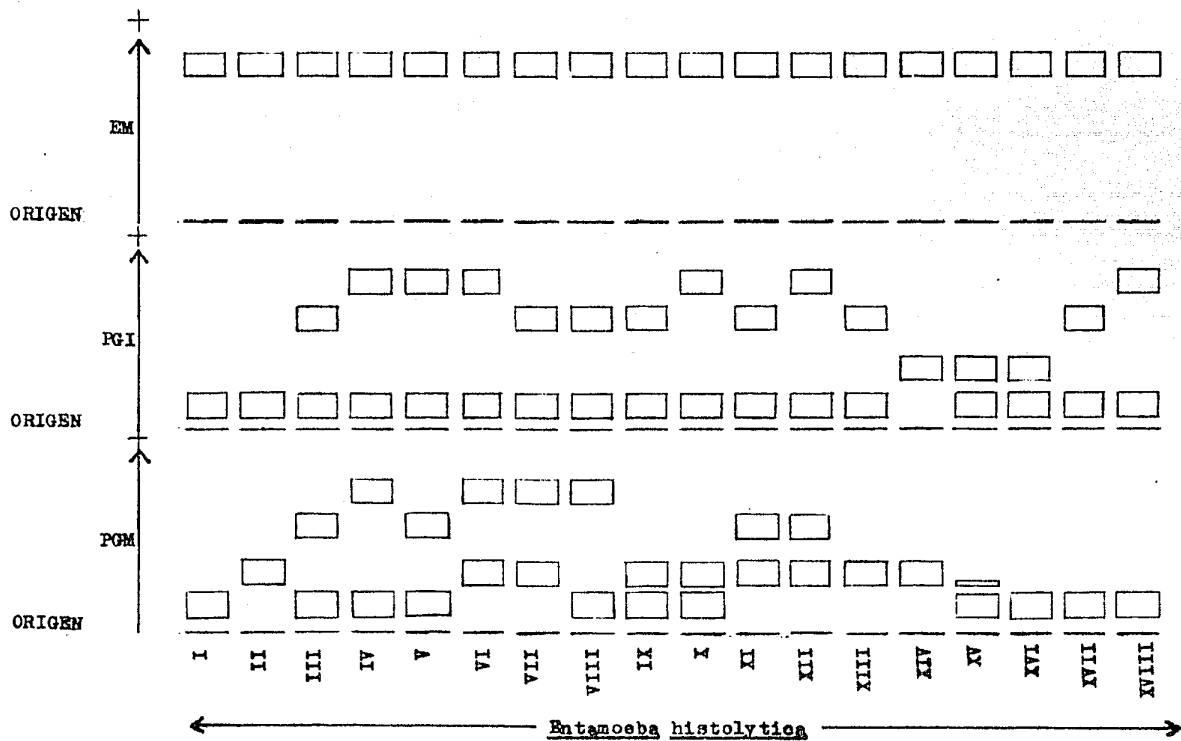


Fig. 6.5.1.1. Representación de los zimodemos de *E. histolytica*. Patrón electroforético de las enzimas: málica (EM), fosfoglucoisomerasa (PGI) y fosfoglucomutasa (PGM).

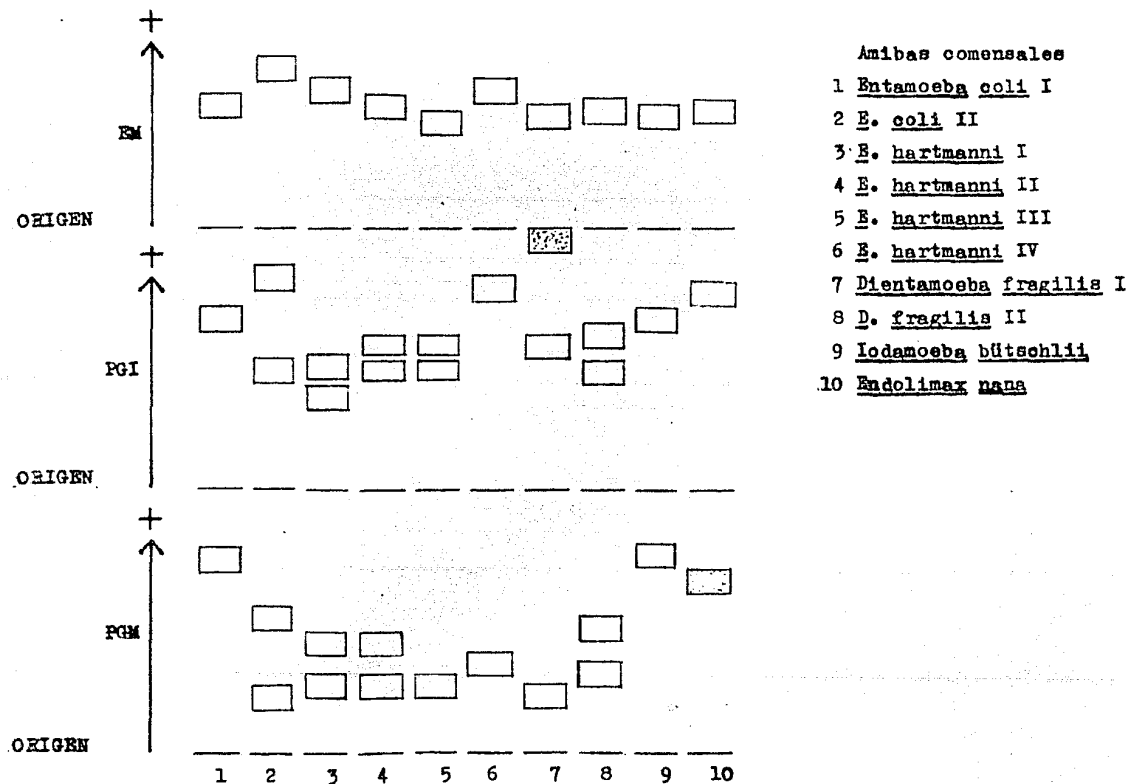


Fig. 6.5.1.2. Representación de los zimodemos de algunas amibas comensales del intestino humano. Patrón electroforético de las enzimas: málica (EM), fosfoglucoisomerasa (PGI) y fosfoglucomutasa (PGM).

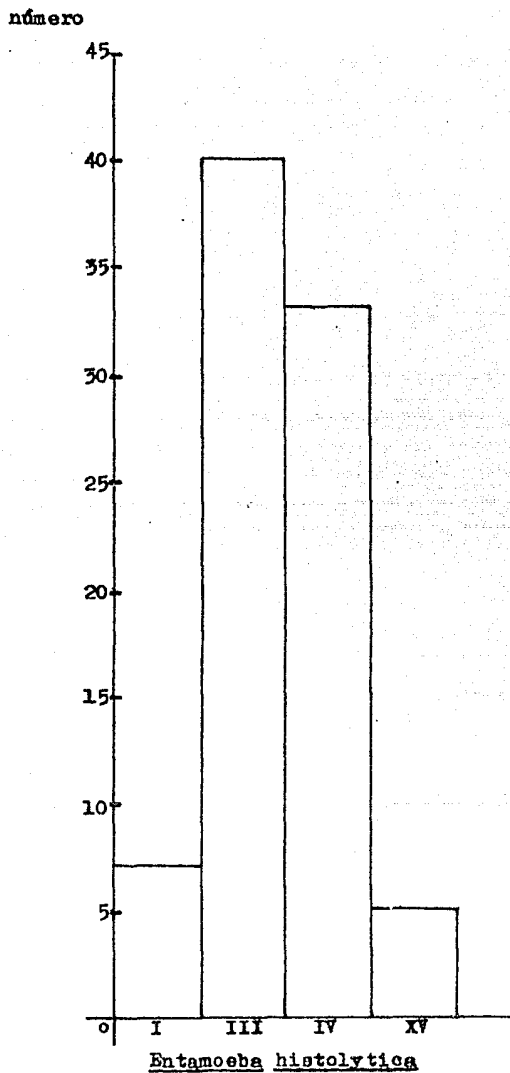


Fig. 6.5.2. Entamoeba histolytica, obtenida del cultivo de amibas a partir de materia fecal. Clasificación por simodemos. Total = 85 .

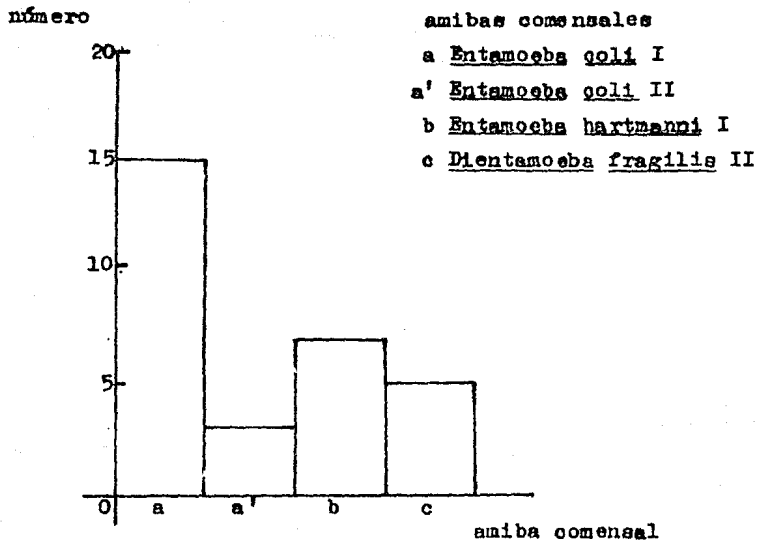


Fig. 6.5.3. Amibas comensales, obtenidas del cultivo de amibas a partir de materia fecal. Clasificación por zimodemos. Total = 30 .

AMIBA	ZIMODENO	número	por ciento
<u>Entamoeba histolytica</u>	I	7	6.1
<u>Entamoeba histolytica</u>	III	40	34.8
<u>Entamoeba histolytica</u>	IV	33	28.7
<u>Entamoeba histolytica</u>	XV	5	4.3
<u>Entamoeba coli</u>	I	15	13.0
<u>Entamoeba coli</u>	II	3	2.7
<u>Entamoeba hartmanni</u>	I	7	6.1
<u>Dientamoeba fragilis</u>	II	5	4.3
	TOTAL	115	100

Fig. 6.5.4. Clasificación de las amibas obtenidas del cultivo a partir de materia fecal. Total E. histolytica = 85
Total amibas comensales = 30

Fig. 6.6. Características presentadas por las muestras de materia fecal agrupadas de acuerdo a la ameba aislada y al zimodemo correspondiente.

Característica	Cultivo Negativo	Cultivo Positivo							
		<u>E. histolytica</u>				<u>E. coli</u>		<u>Entamoeba</u> <u>hartmanni</u>	<u>Dienta-</u> <u>moeba</u> <u>fragilis</u>
		I	III	IV	XV	I	II	I	II
Diarrea	290	4	25	24	4	11	1	4	5
Moco	107	2	7	7	1	1	1	1	1
Sangre	13	0	0	0	1	1	0	0	0
Constipación	80	3	5	4	2	1	2	0	0
Total de casos estudiados	472	7	40	33	5	15	3	7	5

Fig. 6.7.1. Valores encontrados para la Entamoeba histolytica zimodemo I.

Edad (años)	Sexo	IgA	IgG	IgM (mg/dl)	C ₃	C ₄
4	M	-	1250	100	127	46.5
7	M	-	1195	72	90	-
13	M	30	1360	100	132	20.0
33	F	300	1475	185	172	51.4
36	F	405	1580	162	123	32.0

Fig. 6.7.2. Valores encontrados para la Entamoeba histolytica zimodemo XV.

Edad (años)	Sexo	IgA	IgG	IgM (mg/dl)	C ₃	C ₄
4	F	-	1330	170	94	32.0
6	M	200	1175	170	58	46.5
20	F	220	1050	137	94	49.7
13	F	47	1250	185	90	29.5

Fig. 6.7.3. Valores promedio (\bar{X}) encontrados para la Entamoeba histolytica zimodemo III.

Edad (años)	no. de casos	Sexo		IgA	IgG	IgM (mg/dl)	C ₃	C ₄
		F	M					
5-9	12	9	3	82	1194	187	98	38.6
10-14	4	1	3	17	1038	171	102	39.8
15-19	4	3	1	110	958	191	104	32.0
20-24	2	2	0	380	1510	85	106	30.8
25-29	1	0	1	640	1690	170	127	22.4
30-34	3	2	1	298	1333	260	112	22.4
35-39	0	0	0	-	-	-	-	-
40-44	1	1	0	425	1495	170	73	46.5
45-49	1	0	1	220	845	115	108	49.7
50-54	1	0	1	405	1690	208	127	54.5

Fig. 6.7.4. Valores promedio (\bar{X}) encontrados para la Entamoeba histolytica zimodemo IV.

Edad (años)	no. de casos	Sexo		IgA	IgG	IgM (mg/dl)	C ₃	C ₄
		F	M					
0-4	3	0	1	300	1690	170	108	24.3
5-9	8	4	4	103	1291	169	92	33.0
10-14	7	2	5	90	1117	141	109	38.4
15-19	2	0	2	5	1275	185	98	35.5
20-24	2	2	0	168	1290	208	73	30.0
25-29	3	2	1	149	940	163	79	37.9
>30	2	2	0	352	1475	289	72	22.5

Fig. 6.7.5. Valores encontrados para la Entamoeba coli simodemo I y II

Edad (años)	Sexo	IgA	IgG	IgM (mg/dl)	C ₃	C ₄
5	M	47	845	170	86	27.8
5	M	5	845	170	127	49.7
6	F	-	845	100	86	39.0
9	F	30	845	135	90	21.0
9	M	30	845	155	108	18.7
10	F	115	1250	185	123	25.5
30	F	95	1175	155	108	24.4
33	F	240	1475	185	102	25.5
12	M	5	845	185	127	39.0

Fig. 6.7.6. Valores encontrados para la Entamoeba hartmanni zimodemo I.

Edad (años)	Sexo	IgA	IgG	IgM (mg/dl)	G ₃	G ₄
4	M	-	845	100	127	25.5
11	F	63	1050	170	127	49.7
13	F	115	1175	185	90	32.0
14	F	30	1375	185	123	41.7
14	F	200	1375	200	132	32.0
16	M	115	1250	200	58	25.5

Fig. 6.7.7. Valores encontrados para la Dientamoeba fragilis zimodemo II.

Edad (años)	Sexo	IgA	IgG	IgM (mg/dl)	G ₃	G ₄
7	M	30	1050	115	102	27.8
14	M	165	1375	200	105	23.0
24	M	200	1050	185	102	21.0
30	F	63	1375	170	94	49.7

Fig. 6.7.8. Tabla comparativa para los valores de inmunoglobulinas y componentes de complemento séricos obtenidos y los reportados en la literatura.

	Dato observado $\bar{x} \pm d. e.$	Niveles normales (mg/dl)
IgA	130.7 \pm 141.7	60 - 490
IgG	1190.0 \pm 267.5	710 - 1540
IgM	172.2 \pm 48.2	37 - 260
C ₃	100.6 \pm 25.0	55 - 140
C ₄	33.9 \pm 11.4	20 - 50

Fig. 6.8. Reactividad a diferentes antígenos de Entamoeba histolytica.

Antígenos de <u>E. histolytica</u>	Sueros correspondientes a los diferentes zimodermos de <u>E. histolytica</u> .									
	I		II(#)		III		IV		XV	
	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no
I	0	5	-	-	0	5	0	4	0	4
II	0	4	-	-	1	28	0	25	0	4
III	1	4	6	4	2	27	3	22	0	4
IV	0	4	8	2	0	26	4	21	0	4
XV	0	3	-	-	0	4	0	4	0	4

(#): Aunque no se contaba con sueros de personas, en la población muestreada, con E. histolytica zimodermo II en sus heces, estos corresponden a sueros de pacientes con absceso hepático amibiano.

A N A L I S I S
D E
R E S U L T A D O S

7. ANALISIS DE RESULTADOS

7.1. Cultivo de amibas.

Del total de muestras de materia fecal cultivadas (587) aproximadamente la quinta parte resultan positivas (115), es decir, 19.6%.

Las muestras cultivadas corresponden a 318 mujeres y 269 hombres cuyas edades se encuentran comprendidas entre los 0 y los 80 años.

El porcentaje de frecuencia de casos positivos es semejante en ambos sexos, aunque mayor en personas del sexo masculino; distribuido según la edad es semejante tanto en niños como en jóvenes de ambos sexos, sin embargo, es ligeramente alto en adultos del sexo masculino.

Por otra parte, el porcentaje de frecuencia de casos positivos por familia se encuentra entre el 10 y el 38% sin que se observe una franca relación entre éste y el número de integrantes por familia; no obstante, los casos extremos muestran relación inversa.

7.2. Clasificación de las amibas obtenidas al cultivo, en zimodemos.

Se realiza mediante el patrón electroforético de las enzimas: málica (EM), fosfoglucoisomerasa (PGI) y fosfoglucomutasa (PGM).

De las 115 obtenidas, el 73.9% corresponden a Entamoeba histolytica y las restantes son amibas comensales (E. coli, E. hartmanni y Dientamoeba fragilis).

Los zimodemos de E. histolytica son: I, III, IV y XV. Se presentan con mayor frecuencia III, y IV.

Los zimodemos de amibas comensales son: E. coli, I y II; E. hartmanni, I y D. fragilis II.

7.3. Análisis chi-cuadrado para la evaluación de la dependencia entre la sintomatología y la presencia de los diferentes zimodemos de E. histolytica y amibas comensales.

7.3.1. Análisis chi-cuadrado. Con frecuencia deseamos verificar la hipótesis nula de que los datos observados de una muestra son el resultado del hecho de que dos características de una población no tienen relación entre sí. En nuestro caso, el análisis se basa en conteos o frecuencias y no en medidas ta

les como pulgadas, libras o puntajes de pruebas. Se definen categorías mutuamente excluyentes y se registra la frecuencia observada con que los individuos se pueden incluir en esas categorías. Luego se comparan estas frecuencias observadas con las frecuencias que se esperarían si fueran en realidad verdaderas las condiciones hipotéticas.

Si la diferencia entre las frecuencias observadas y las esperadas es demasiado grande para atribuir las a la casualidad, cuando H_0 es verdadera, rechazamos la hipótesis nula de que la condición particular de interés es verdadera.

Cuando se está interesado en saber, respecto de una población, si dos criterios de clasificación están probablemente relacionados; para poder llegar a una decisión sobre la independencia de esos dos criterios, generalmente analizamos los datos de la muestra y sacamos conclusiones acerca de la población a partir de la muestra. Para este tipo de problemas la técnica que más se emplea es la denominada prueba chi cuadrado de independencia. (75)

7.3.2. Aplicación del análisis chi-cuadrado para la evaluación de la dependencia entre la sintomatología y la presencia de los zimodemos de E. histolytica y amibas comensales.

	DIARREA							Total
	ausencia			presencia			Total	
	O	E	$\frac{(O-E)^2}{E}$	O	E	$\frac{(O-E)^2}{E}$		
amibas comensales	9	9.65	0.0437	21	20.34	0.0214	30	
<u>E. histolytica</u> I	3	2.25	0.2500	4	4.74	0.1155	7	
<u>E. histolytica</u> III	15	12.86	0.3561	25	27.13	0.1672	40	
<u>E. histolytica</u> IV	9	10.61	0.2443	24	22.38	0.1172	33	
<u>E. histolytica</u> XV	1	1.60	0.2250	4	3.39	0.1097	5	
Total	37			78			115	

$$\chi^2 = 1.6501$$

	MOCO							Total
	ausencia			presencia				
	O	E	$\frac{(O-E)^2}{E}$	O	E	$\frac{(O-E)^2}{E}$		
amibas comensales	26	24.52	0.0893	4	5.47	0.3950	30	
<u>E. histolytica</u> I	5	5.72	0.0906	2	1.27	0.4196	7	
<u>E. histolytica</u> III	33	32.69	0.0029	7	7.30	0.0123	40	
<u>E. histolytica</u> IV	26	26.97	0.0348	7	6.02	0.1595	33	
<u>E. histolytica</u> XV	4	4.08	0.0015	1	0.91	0.0089	5	
Total	94			21			115	

$$\chi^2 = 1.2144$$

	SANGRE							Total
	ausencia			presencia				
	O	E	$\frac{(O-E)^2}{E}$	O	E	$\frac{(O-E)^2}{E}$		
amibas comensales	29	29.47	0.0074	1	0.52	0.4430	30	
<u>E. histolytica</u> I	7	6.80	0.0058	0	0.12	0.1200	7	
<u>E. histolytica</u> III	40	39.30	0.0124	0	0.69	0.6900	40	
<u>E. histolytica</u> IV	33	32.42	0.0103	0	0.57	0.5700	33	
<u>E. histolytica</u> XV	4	4.91	0.1686	1	0.08	10.5800	5	
Total	113			2			115	

$$\chi^2 = 12.60$$

	CONSTIPACION							Total
	ausencia			presencia				
	G	E	$\frac{(O-E)^2}{E}$	O	E	$\frac{(O-E)^2}{E}$		
ambas comensales	27	25.56	0.0811	3	4.43	0.4616	30	
<u>E. histolytica</u> I	4	5.96	0.6445	3	1.03	3.7678	7	
<u>E. histolytica</u> III	35	34.08	0.0248	5	5.91	0.1401	40	
<u>E. histolytica</u> IV	29	28.12	0.0275	4	4.87	0.1554	33	
<u>E. histolytica</u> XV	3	4.26	0.3726	2	0.73	2.2094	5	
Total	98			17			115	

$$\chi^2 = 7.8848$$

H_0 = los dos criterios de clasificación son independientes

H_1 = los dos criterios de clasificación no son independientes

si $\chi^2 \leq \chi^2_{0.95}$ entonces no se rechaza H_0
(4 g.l.)

síntoma	χ^2	$\chi^2_{0.95}$ (4 g.l.)	
diarrea	1.65	9.488	no se rechaza H_0
moco	1.21	9.488	no se rechaza H_0
sangre	12.60	9.488	se rechaza H_0
constipación	7.88	9.488	no se rechaza H_0

7.4. Análisis de discriminantes aplicado a los valores de Ig_g y C' séricos en las personas con ambas al cultivo de su materia fecal.

7.4.1. Análisis de discriminantes. En medicina, es frecuente que se busque distinguir si un elemento determinado pertenece o no a una cierta población de elementos. Es decir, se tienen dos poblaciones, una de individuos enfermos y otra de personas sanas, y se quiere conocer si existe una forma que permita distinguir a que clase pertenece un nuevo sujeto. Para poder hacer esta determinación, es necesario contar con individuos pertenecientes a ambas poblaciones, a los que además de conocer exactamente si están enfermos o no (a que población pertenecen) se les midan p variables (x_1, x_2, \dots, x_p) que son los síntomas o signos medidos en escala ordinal, de intervalo o de relación (de preferencia cuantitativas).

La idea es conocer si los valores para el individuo en cuestión se "parecen" o están más cercanos en conjunto a los de la población de enfermos que a los de la población de sanos. El método supone que las variables siguen una distribución normal, aunque en la práctica funciona muy bien sin que este último requisito se cumpla. Estas mismas variables son medidas en el nuevo sujeto y basándose en ellas únicamente, es posible conocer si está enfermo o no; es decir, establecer el diagnóstico.

Mediante este análisis se puede medir que tan buena es la discriminación lograda a través de las siguientes medidas:

- 1) todos los individuos de las muestras con valores $x_1 \dots x_p$ conocidos se clasificaron; ahora se obtiene el porcentaje de la clasificación errónea para cada población.
- 2) se obtiene una correlación canónica, es decir, la máxima correlación entre una función lineal de las variables y las funciones indicadoras de cada población (a mayor correlación, mayor eficacia y claridad en la discriminación).
- 3) Se determina el porcentaje de variabilidad que explica cada función discriminante, respecto al total de funciones discriminantes.

Los cálculos para efectuar el análisis son muy elaborados, - por lo que se utilizan paquetes de programas estadísticos como el SPSS (Statistical Package for Social Sciences). ()

7.4.2. Aplicación del análisis de discriminantes para los valores - de I_g y C' séricos en las personas con amibas al cultivo de su materia fecal.

Grupo	Variables
1 amibas comensales	x_1 I_{gA}
2 <u>E. histolytica</u> I	x_2 I_{gG}
3 <u>E. histolytica</u> III	x_3 I_{gM}
4 <u>E. histolytica</u> IV	x_4 C_3
5 <u>E. histolytica</u> XV	x_5 C_4

El grupo mejor clasificado es el 2 (80.0%).

En total se clasificaron correctamente 34.94% de los casos.

Las funciones discriminantes estandarizadas, son:

$$D_1 = -0.20288 x_2 + 0.58578 x_3 - 0.84625 x_4 + 0.22136 x_5$$

$$D_2 = 1.01421 x_2 - 0.44510 x_3 - 0.28652 x_4 - 0.06061 x_5$$

$$D_3 = 0.12536 x_2 + 0.06411 x_3 + 0.01708 x_4 + 1.00005 x_5$$

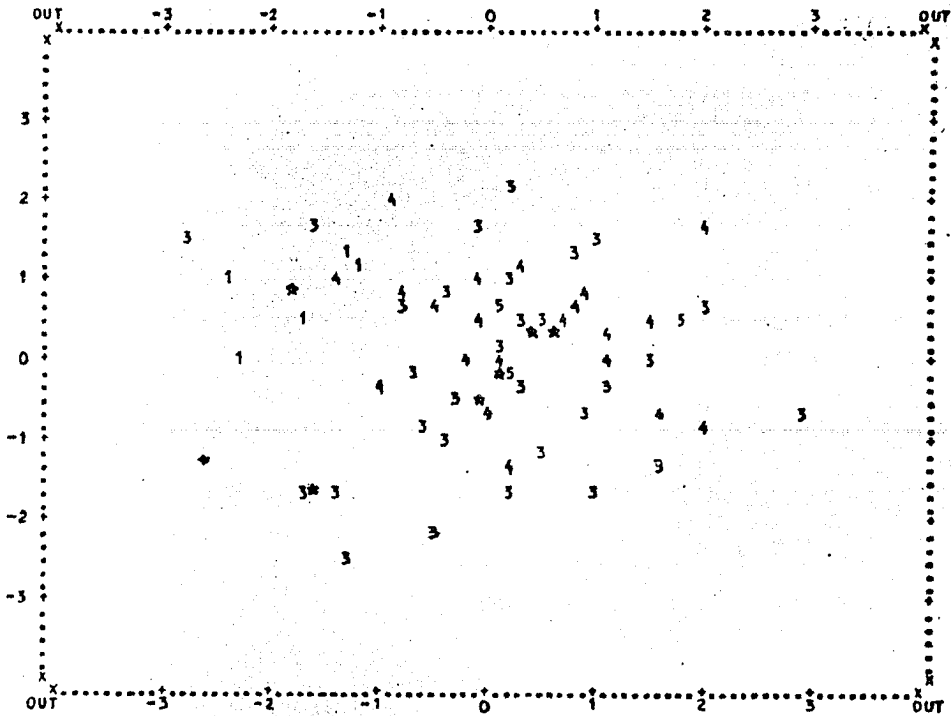
$$D_4 = 0.22008 x_2 + 0.78259 x_3 + 0.48906 x_4 - 0.08674 x_5$$

x_1 no se incluyó por carecer de poder discriminatorio.

Función	Correlación canónica	% de la discriminación
D_1	0.485	53.16
D_2	0.387	30.49
D_3	0.244	10.97
D_4	0.174	5.38

Mapa territorial de la función discriminante D_1 (horizontal) vs. la función discriminante D_2 (vertical).

★ indica los centroides de grupo.



7.5. Reactividad a diferentes antígenos de E. histolytica.

Solamente se presenta reactividad hacia los antígenos II, III y IV; no se presenta hacia los antígenos I y XV.

Los sueros de personas con E. histolytica I, III, IV al cultivo y absceso hepático amibiano presentan reactividad hacia el antígeno III; los sueros de personas con E. histolytica IV al cultivo y absceso hepático amibiano presentan reactividad hacia el antígeno IV; por último, el suero de personas con E. histolytica III al cultivo presenta reactividad hacia el antígeno II.

El suero de personas con E. histolytica XV al cultivo no presenta reactividad hacia ninguno de los antígenos.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

- 8.1. Es posible cultivar Entamoeba histolytica a partir de materia fecal de personas que no presentan sintomatología de enfermedad amibiana (portadores sanos).
- 8.2. El porcentaje de infección (14.48), determinado mediante el cultivo monoxénico de E. histolytica, es bajo considerando que la población muestreada se desarrolla en un medio pobre y mal saneado, tiene malos hábitos de higiene y cuenta con deficientes servicios de salud.
- 8.3. El porcentaje de infección es semejante entre mujeres y hombres de cualquier edad.
- 8.4. Las condiciones de hacinamiento no muestran relación con la frecuencia de infección de las personas que conviven en un mismo lugar.
- 8.5. El patrón electroforético de las enzimas: málica (EM), fosfoglucoisomerasa (PGI) y fosfoglucomutasa (PGM), permite clasificar a las E. histolytica cultivadas en los zimodemos: I, III, IV y XV.
- 8.6. De acuerdo a la sintomatología que presentan los portadores, los zimodemos de E. histolytica I, III, IV y XV no corresponden a una amiba con capacidad invasora; este hecho coincide con las investigaciones realizadas por Jiménez, C. E.
- 8.7. La aplicación del análisis chi-cuadrado permite establecer la independencia entre la sintomatología del portador y el zimodemo de -- E. histolytica cultivada, es decir, no es posible asociar la sintomatología con la presencia de un determinado zimodemo de E. histolytica.
- 8.8. Los niveles séricos de Ig_g y C' en portadores de E. histolytica, - se encuentran dentro de los valores normales.

8.9. Mediante el análisis de discriminantes se reconoce que no es posible correlacionar los niveles séricos de Ig_g y C' con la presencia de un determinado simotipo de E. histolytica.

8.10. La E. histolytica cultivada a partir de portadores sanos no tiene capacidad invasora a juzgar por la escasa reactividad y bajos títulos que presentaron los sueros de estas personas hacia los diferentes antígenos obtenidos.

BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFIA.

1. Alam, M. & Ahmed, S. Studies on the antigenicity of Entamoeba histolytica antigen fractions. Proceedings of the Symposium on Control Mechanisms in Cellular Processes. Bhabha Atomic Research Centre, Bombay. 1973.
2. Alikhan, Z. & Meerovitch, E. A comparative study of the antigen of some of the "histolytica-like" strains of Entamoebae: A qualitative evaluation of antigens by indirect hemagglutination, gel precipitation and immunoelectrophoresis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 17, 528-539. 1968.
3. Alikhan, Z. & Meerovitch, E. Studies on the purification of Entamoeba histolytica antigen by gel filtration. I. Some physicochemical properties of the isolated fractions. Canadian Journal of Microbiology, 16, 485-492. 1970a.
4. Becerra, E., Winvielle, L., Colorado, F. Consideraciones sobre mil casos de enfermos con amibiasis intestinal. Rev. Invest. Clin., 4, - 193-201. 1952.
5. Blagi, F. Enfermedades parasitarias. 2a. ed. La Prensa Médica Mexicana. pp 81-129. 1976.
6. Boeck, W. C. & Drbohlav, J. The cultivation of Entamoeba histolytica. Proc. Nat. Acad. Sci., 11, 235. 1925.
7. Bos, H. J., Leijendekker, W. J., Van Den Eijk, A. & Entamoeba histolytica: Cytopathogenicity, including serum effects on contact-dependent and toxin-induced lysis of hamster kidney cell monolayers. Experimental Parasitology, 50, 342-348. 1980.
8. Bragster, I. A. & Parr, C. W. Trypanosome identification by electrophoresis of soluble enzymes. Nature, 244, 364-366. 1963.
9. Brandt, H. & Pérez-Tamayo, R. Amibiasis. México. La Prensa Médica -- Mexicana. pp 3-30. 1970.
10. Carroll, F. E., Russell, P. F., Clifton, J. R. Craig y Faust: Parasitología Clínica. Salvat editores. pp 125. 1975.
11. Councilman, W. T. & Lafleur, H. A. Amebic dysentery. Johns Hopkins - Hosp. Rep., 2, 395. 1891.

12. De la Torre, M., Tanimoto-Weki, Chávez, R. Aislamiento y caracterización de cepas de E. histolytica obtenidas de portadores. VIII Seminario de Amibiasis. pp 25. 1979.
13. Deschiens, R. L'Amibiase et l'Amibe Disentérique. Paris, Masson et - Cie. pp 127. 1965.
14. Diamond, L. S. Axenic cultivation of Entamoeba histolytica. Science, 134, 336. 1961.
15. Dobell, C. Laidlaw, P. P. Cultivation of Entamoeba histolytica and - some other entozoic amoebae. Parasitology, 18, 206. 1926.
16. Griffin, J. L. Human amebic dysentery. Electron microscopy of Entamoeba histolytica contacting, ingesting, and digesting inflammatory cells. Am. J. Trop. Med. Hyg., 21, 895. 1972.
17. Gutiérrez, T. G., Mercado, A., Sánchez, G. R., Cuaron, A., Pigeon, - O. H. Absceso hepático en niños. Aspectos clínicos, de laboratorio, radiológicos y gammagráficos. Rev. Mex. Pediatr., 34, 197. 1965.
18. Gutiérrez, G. Manual de Infectología. 6a. ed. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. pp 56-65. 1978.
19. Hegner, R., Johnson, G. M., Stabler, R. M. Host-parasite relations - in experimental amoebiasis in monkeys in Panama. Am. J Hyg., 15, 394. 1932.
20. Hlava, J. O. Uplavici. Predbezne sdeleni, Casopis leskaruv oeskych, 5, 26. 1887.
21. Hoare, C. A. Parasitological Reviews, The commensal phase of Entamoeba histolytica. Exp. Parasit., 1, 411-415. 1952.
22. Ishaq, M. & Padma, N. C. Antigenic variations among strains of Entamoeba histolytica. Am. J. of Tropical Medicine and Parasitology, 74, 3, 373-375. 1980.
23. Jarumilinta, R. & Maegraith, B. G. Hyaluronidase activity in stock - cultures of Entamoeba histolytica. Ann. Trop. Med. Parasitol., 54, - 118-128. 1960.
24. Jiménez, R. C., Domínguez, G. E., Ochoa, S. J. Apendicitis amibiana aguda. (Presentación de tres casos). Rev. Mex. Pediatr., 39, 527. - 1970.

25. Kartulis, S. Zur Aetiologie der Dysenteriae in Aegypten. Virchow's -
Arch. f. Path. Anat., 105, 521. 1886.
26. Kartulis, S. Zur Aetiologie der Leberabscesse; lebende Dysenterie-A
moeben in Eiter der dysenterischen Leberabscesse. Zentralbl. f. Bakt.
1, 745. 1887.
27. Kooh, R. Arb. Kaiserl. Gesundheitsamte, 3, 1. 1883.
28. Krupp, I. M. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 15,
349-354. 1966.
29. Krupp, I. M. Protective immunity in amebic infection demonstrated in
guinea pigs. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 23,
355-360. 1974a.
30. Kudo, R. R. Protozoology. 4a. ed. C. C. Thomas, Springfield, Ill. 1954.
31. Kumate, J. & Aranda, E. Enfermedades diarreicas en el niño. 5a. ed. -
Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. pp 236-246. 1978.
32. Lambl, W. D. Beobachtungen und studien aus dem Franz-Joseph Kinders-
pital. Teil I, 1860.
33. León, D. F. & Guzmán, R. R. C. Resultados de la ileostomía derivati-
va en la colitis amibiana ulcerativa grave del niño. Experiencia en
20 casos. Bol. Med. Hosp. Inf. Méx., 29, 43. 1972.
34. Lewis, M. J. Ann. Rep. San. Comm. Gov't India. Calcuta, 1870.
35. Lombardo, L., Alonso, P., Sáenz, A., Brandt, H., Mateos, J. H. Cere-
bral amebiasis. Report of 17 cases. J. Neur. Surg., 21, 704. 1964.
36. Lösch, F. Massenhafte Entwicklung von Amöben in Dickdarm. Virchow's
Archiv. f. Path. Anat., 65, 196. 1875.
37. Lushbaugh, W. B. et al. Cytotoxicity of a cell free extract of Enta-
moeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1), 233. 1978.
38. Lushbaugh, W. B. et al. Inhibition of Entamoeba histolytica cytoto-
xin by alpha 1 antiprotease and alpha 2 macroglobulin. Am. J. Trop.
Med. Hyg., 30, 3, 575-585. 1981.
39. Lynch, E. J. Histopathological observations on the influence of a --
special diet used on experimental amebiasis in guinea pigs. Am. J. -
Trop. Med. Hyg., 6, 313. 1957.
40. Macgregairh, B. G. The pathogenicity of Plasmodia and Endamoeba. Symp.
Soc. Gen. Microbiol., 207. 1955.

41. Mahajan, R. C. & Ganguly, N. K. Amoebic antigen in immunodiagnosis - and prognosis of amoebic liver abscess. Trans. R. Soc. Trop. Med. -- Hyg. 74, 3, 300-302. 1980.
42. Martínez-Báez, M. Manual de parasitología médica. 2da. ed. La Prensa Médica Mexicana. pp 99-100. 1967.
43. Martuscelli, Q. A. Las parasitosis más comunes en México. Rev. Fac. Med. Méx. 11, 21. 1968.
44. Martuscelli, Q. A. y Villamichel, D. M. Amibiasis intestinal aguda - en los lactantes. Rev. Invest. Salud. Pib. (Méx.) 29, 197, 1969.
45. Martuscelli, Q. A. Amibiasis mucocutánea en México. Rev. Fac. Med. - Méx. 52, 277. 1972.
46. Mattern, C. F., Keister, D. B. & Natovits, P. C. Entamoeba histolytica toxin: fetuin neutralizable and lectin-like. Am. J. Trop. Med. -- Hyg. 29, 1, 26-30. 1980.
47. McLaughlin, J., Faubert, G. Partial purification and some properties of a neutral sulfhydryl and an acid proteinase from Entamoeba histolytica. Can. J. Microbio. 23, 420-425. 1977.
48. Méndez, I. y Rodríguez, S. Dos ejemplos de aplicación de análisis -- discriminante en medicina. México. IIMAS, 1978. (Comunicaciones técnicas, Serie Naranja, 179).
49. Minor, R. R. Collagen metabolism. Am. J. Pathol. 98, 227. 1980.
50. Mora, G. J., Martínez-Palomo, A. y Chávez, B. Interacción entre Entamoeba histolytica y el epitelio cecal del cobayo. Arch. Invest. Med. 9 (Supl.1), 26, 1978.
51. Nakamura, M. Nutrition and physiology of Entamoeba histolytica. Bact. Rev. 17, 189. 1953.
52. Neal, R. A. Pathogenesis of amebiasis. Bull. N. Y. Acad. Med. 47, 462-468. 1971.
53. Phillips, B. P. Cultivation of Entamoeba histolytica with Trypanosoma cruzi. Science. 11, 8. 1950.
54. Portillo, L. J. y Beltrán, R. F. Absceso hepático. Observaciones sobre 100 casos. Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx. 22, 719. 1965.
55. Prockop, D. J., Kivirikko, K. I., Tuderman, L. & Guzmán, N. A. The big synthesis of collagen and its disorders. M. Engl. J. Med. 301, 13. - 1979.

56. Rees, C. W. Pathogenesis of intestinal amebiasis in kittens. Arch. Pa-
thol. 7, 1. 1929.
57. Reeves, R. E. & Bischoff, J. M. Classification of Entamoeba species -
by means of electrophoretic properties of amebal enzymes. J. Parasit.
54, 594-600. 1968.
58. Reeves, R. E. Glycolytic enzymes in Entamoeba histolytica. Arch. --
Invest. Méd. (Méx.) 5 (Supl. 2), 411. 1974.
59. Robinson, G. L. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 62, 285-294. 1968.
60. Robledo, E., Navarrete, F. y Fortilla, J. Diagnóstico de la amibiasis
y otras protozoosis intestinales. Medicina. (Méx.) 39, 209. 1959.
61. Rodríguez-Díaz, E. Enfermedades diarreicas en el niño. 5a. ed. Edicio-
nes Médicas del Hosp. Inf. Méx. pp 35-43. 1978.
62. Rojkind, M. Chemistry and biosynthesis of collagen. In Bull. Rheum. -
Dis. 30, 1006. 1979.
63. Sargeant, P. G., Williams, J. E., Kumate, J. & Jiménez, E. The epide-
miology of Entamoeba histolytica in Mexico City. A pilot survey I. --
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 5, 653-656. 1980.
64. Sargeant, P. G. & Williams, E. J. A study of intestinal protozoa in-
cluding non-pathogenic, Entamoeba histolytica from patients in a group
of mental hospitals. Am. J. Public Health. 72, 178-180. 1982.
65. Sargeant, P. G. & Williams, J. E. The morphology in culture of the -
intestinal amoebae of man. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76, 4. 1982.
66. Sawhney, S., Chakravarti, R. N., Jain, P. & Vinayak, V. K. Immunogeni-
city of axenic Entamoeba histolytica antigen and its fractions. Trans.
R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 1, 26-29. 1980.
67. Schaudinn, F. Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhisopo-
den. Arb. a. d. k. Gsndtsamt. 19, 547. 1902-1903.
68. Sepúlveda, B. La amibiasis invasora por Entamoeba histolytica. Gaceta
Médica de México. 100, 101-253. 1970.
69. Sepúlveda, B. Reacciones de hemaglutinación y de precipitación con an-
tígeno amibiano axénico en amibiasis invasora. Arch. Invest. Méd. --
(Méx.). 1 (Supl. 1), 111. 1970.
70. Sepúlveda, B., Aubane, M., Landa, L. y Velázquez, G. Avances en la --
técnica de contrainmunolectroforesis para el estudio serológico de -
la amibiasis. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 3 (Supl.2), 363. 1972.

71. Sepúlveda, B. y Alvarez, G. R. Amibiasis intestinal. Rev. Méd. IMSS. 12, 248. 1973.
72. Smitskamp, H. Amebiasis without dysentery. Neederl. T. Geneesk. 109, 692. 1965.
73. Takeuchi, A. & Phillips, B. P. Electron microscope studies of experimental Entamoeba histolytica infection in guinea pigs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24, 34. 1975.
74. Torres, B. C. y Manzano, S. C. La radiografía simple de abdomen en la amibiasis invasora al colon del niño. Rev. Méd. IMSS. 12, 149. -- 1973.
75. Wayne, W. D. Estadística con aplicaciones a las ciencias sociales y a la educación. McGraw Hill. pp 353-354. 1981.