

5
207**Universidad Motolinia, A.C.**

ESCUELA DE QUIMICA
Con Estudios Incorporados a la U.N.A.M.



SEGUIMIENTO DE PORTADORES ASINTOMÁTICOS
DE Entamoeba histolytica, EN EL MUNICIPIO DE
CADEREYTA, QUERETARO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
MARIA JOSEFA ESCOBAR TORREZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE

Pág.

CAPITULO I

INTRODUCCION	1
--------------------	---

CAPITULO II

INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA

2.1.- Antecedentes históricos	3
2.2.- Epidemiología	4
2.3.- Morfología y ciclo vital de <u>Entamoeba histolytica</u> ...	4
2.4.- Patogénesis	7
2.5.- Clasificación de Entamoeba con base en sus isoenzimas .	9
2.6.- Métodos de diagnóstico	12
2.6.1.- Examen en fresco	12
2.6.2.- Coproparasitoscópico	12
2.6.3.- Cultivo	14
2.6.4.- Métodos indirectos	15
2.7.- Índices de patogenicidad	15
2.7.1.- Formación de absceso	15
2.7.2.- Aglutinación en presencia de concanavalina A	15
2.7.3.- Adherencia	16
2.7.4.- Fagocitosis	16
2.7.5. Resistencia al complemento	16
2.7.6.- Patrón isoenzimático	16

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- Diseño del experimento	17
------------------------------------	----

3.2.- Material	18
3.2.1.- Material biológico	18
3.2.2.- Material de laboratorio	18
3.2.3.- Reactivos	19
3.3.- Metodología	20
3.3.1.- Método de concentración de Faust y colaboradores	20
3.3.2.- Cultivo monoxénico de Robinson	21
3.3.3.- Electroforesis de isoenzimas	21
3.3.3.1.- Lisado amibiano	21
3.3.3.2.- Electroforesis en gel de almidón y determinación del patrón isoen- zimático	23
3.3.3.3.- Cámaras para electroforesis	24
3.3.3.4.- Revelado de isoenzimas	25
3.4.- Resultados	27
CAPITULO IV	
DISCUSION	31
CAPITULO V	
RESUMEN	33
CAPITULO VI	
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFIA	35
APENDICE	39

INTRODUCCION

El estudio de las isoenzimas presentes en trofozoitos de Entamoeba histolytica, aislados en varios países del mundo, ha dado como resultado la caracterización de más de veinte patrones isoenzimáticos de E. histolytica (12,27).

Estos patrones isoenzimáticos han sido clasificados en dos categorías: patógenos y no patógenos, los no patógenos que son la mayoría de los casos, han sido aislados de portadores asintomáticos con serología negativa; los patógenos corresponden a individuos de casos bien definidos de amibiasis invasora (disentería amibiana o absceso hepático), caracterizados por la presencia de corrimiento electroforético beta para la fosfoglucomutasa (PGM) y corrimiento rápido para la enzima hexoquinasa (HK) (35,36,37).

Reportándose también que los patrones isoenzimáticos de las cepas no sufren cambios tanto en patógenos como en no patógenos, cuando se cultivan en presencia de bacterias en el medio de Robinson (23,32).

Establecido lo anterior y con base en un estudio previo realizado por el grupo del Dr. Onofre Muñoz, en el municipio de Cadereyta, Querétaro, en la zona Centro Occidental de la República Mexicana, en el presente trabajo de tesis se seleccionó un total de 104 individuos con antecedentes de portador asintomático de E. histolytica para realizar un estudio de seguimiento en portadores con duración promedio de 9 meses, planteándose el siguiente objetivo: Determinar por el método de Sargeant, si existen cambios en cuanto al comportamiento electroforético de las cepas aisladas de los

portadores antes mencionados, los cuales no recibieron tratamiento antiambiano a lo largo del estudio.

De ser así, los portadores de E. histolytica, podrán presentar cepas con patrones isoenzimáticos diferentes a los encontrados al inicio del estudio, lo que nos indicaría posiblemente, que las cepas cambian de patrón electroforético como respuesta a cambios en el microambiente del intestino de las personas infectadas con el parásito, o bien, como estrategia de evasión de la respuesta inmune del huésped.

INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA

2.1.- ANTECEDENTES HISTORICOS.

El mérito de haber descubierto a Entamoeba histolytica corresponde a Lösch (3,17,18) en 1875, en San Petesburgo, Rusia, al encontrar trofozoitos del parásito en materia fecal de un enfermo de disentería, pero sin lograr definir la relación entre amiba y colitis aguda. Años después Kartulis, (El Cairo, 1886); Hiava (Praga, 1887); y Le Fleur (Baltimore, 1891); dieron a conocer pruebas clínicas y anatomopatológicas de que la amiba era causa de disentería y absceso hepático (3,4).

Posteriormente, en 1893 Quincke y Ross confirmaron la existencia de más de una especie de amibas parásitas del intestino humano y descubren el ciclo biológico de la amiba con la transformación de sus trofozoitos a quistes, los cuales eran la forma infectante (18).

Schaudinn, en 1903 establece los detalles estructurales de dos especies de amibas encontradas en el hombre; a la patógena la nombró Entamoeba histolytica y Entamoeba coli a la especie no patógena. En 1913, Walker y Sellars confirman el poder patógeno de la primera y la inocuidad de la segunda (18).

Cuttler, en 1918, Boeck y Drohhlav, en 1925, logran cultivar in vitro a Entamoeba histolytica en condiciones mixtas (2,4).

Jacobs, en 1947, Shaffer y cols., en 1948 y Robinson en 1968, cultivaron el parásito en condiciones monoxénicas (16,30,42).

Diamond logró establecer una metodología para el cultivo axénico de E. histolytica con lo cual se inició una nueva etapa en los

estudios morfológicos, fisiológicos, inmunológicos y bioquímicos - del parásito (7,8,9).

2.2.- EPIDEMIOLOGIA.

El agente etiológico de la amibiasis es Entamoeba histolytica protozoario que pertenece al Reino Animalia, Phylum Protozoa, Subphylum Sarcomastigophora, Superclase Sarcodina, Clase Rhizopodea, Subclase Lobosia, Orden Amoebida, Familia Endamoebidae, Género Entamoeba, Especie histolytica (11).

La amibiasis es una enfermedad infecciosa endémica que es - transmitida de persona a persona, y que existe prácticamente en to dos los países del mundo. Es más frecuente en los trópicos y zonas subtropicales, que en las zonas frías; también se encuentra sumamente elevada en poblaciones carentes de higiene (11,28).

México es desafortunadamente, uno de los países afectados por la amibiasis invasora (13,40,41), donde encuestas serológicas (14, 15) indican que ésta se extiende a todo el país; sin distinción de clima y con una prevalencia global de 15.9% (10,13,14,15,45).

Con excepción de Entamoeba histolytica capaz de colonizar el intestino grueso de un gran porcentaje de la población mundial e - invadir la mucosa intestinal, ninguna de las otras especies de amibas (16) tiene la capacidad de producir lesiones en el intestino - ni mucho menos invadir tejidos extraintestinales (1,3,37).

2.3.- MORFOLOGIA Y CICLO VITAL.

Entamoeba histolytica pasa por las siguientes fases en su ciclo vital: trofozoito, prequiste, quiste y metaquiste (figura 1) ,- (3,19,41).

a). Trofozoito.- Forma móvil o vegetativa del parásito, se le encuentra en materia fecal líquida o semilíquida y en los tejidos-extraintestinales; tiene dimensiones variables que fluctúan entre 10 y 60 micrómetros de diámetro, según el grado de actividad y la cepa del organismo. Es altamente dinámico y pleomórfico, su movimiento es por medio de pseudópodos hialinos y digitiformes. Las variaciones en el pH, osmolaridad y potencial redox, pueden alte--rar la forma y movilidad de éste parásito. El ectoplasma es hiali--no y transparente, el endosoma es granuloso con aspecto de vidrio--molido. Cuando las preparaciones se tiñen con hematoxilina férrica tricrómico de Gomori o con cualquier otro colorante empleado común--mente para protozoarios se observan claramente las inclusiones cito--plasmáticas como el núcleo redondo y vesiculoso que mide entre 5 y 7 micrómetros de diámetro, la cromatina nuclear en forma de grá--nulos finos y distribuidos uniformemente en la periferia del nú--cleo, un endosoma central constituido por cromatina nuclear. Posee organelos tales como: retículo endoplásmico, ribosomas y complejo--de Golgi. Carecen de mitocondrias, se llegan a observar vacuolas - digestivas con eritrocitos, bacterias, restos celulares y otras estructuras ultramicroscópicas que en conjunto le dan apariencia granular. Los trofozoitos se reproducen por división binaria y se en--quistan durante su fase comensal.

b). Prequiste.- Es el estadio intermedio entre el trofozoito--y el quiste. Es inmóvil, su mecanismo de formación aún se descono--ce, se localiza en el intestino grueso, es redondeado y presenta - un solo núcleo con las características morfológicas descritas an--tes, presenta también vacuolas digestivas y cuerpos cromatoides -

con los bordes romos, se reviste de una doble membrana exterior -- gruesa y refringente (11).

c). Quiste.- Forma infectante del parásito. Es inmóvil se elimina con las heces de los individuos infectados, es redondeado o ligeramente oval, mide entre 5 y 20 micrómetros de diámetro, presenta generalmente 4 núcleos con las mismas características morfológicas descritas antes para el trofozoito, no tiene glucógeno, -- los cuerpos cromatoides son poco visibles. Tanto el citoplasma como el núcleo de los quistes muestran una organización estructural muy similar a la descrita antes para los trofozoitos. Los quistes de E. histolytica maduran por dos mitosis consecutivas del núcleo mediante las cuales se producen cuatro núcleos, cada uno de los -- cuales es la réplica en pequeño del núcleo original, al iniciarse el enquistamiento. Durante este proceso de maduración se consume -- el glucógeno y las barras cromatoidales se hacen menos visibles o desaparecen por completo. Los quistes de E. histolytica son muy -- sensibles a la putrefacción, desecación y temperaturas entre 40 y 50°C (11).

d). Metaquiste.- Es la forma pequeña de la amiba, una vez que el quiste es ingerido, pasa por el estómago y penetra en el intestino delgado. El quiste no experimenta cambios aparentes, mientras se encuentra en lugares en donde la reacción del medio es ácida pero tan pronto como el medio en que se encuentra es neutro o ligeramente alcalino, entra en actividad. Esto, combinado posiblemente -- con la acción de los jugos gástricos debilita la pared del quiste, y permite que la amiba multinucleada (metaquiste) se escurra hacia

el exterior por una pequeña hendidura de la pared que la envuelve. De forma casi inmediata, el citoplasma se divide en tantas partes como núcleos tiene, de tal manera que cada núcleo pasa a ser el centro de un pequeño trofozoito metaquistico. Así, del proceso de desenquistamiento resultan cuatro pequeñas amibas. En condiciones desfavorables para el desenquistamiento en el intestino delgado, los quistes se dejan arrastrar con la materia fecal hacia el intestino grueso y después son evacuados en las heces sin haberse desenquistado (11).

2.4.- PATOGENESIS.

La forma habitual de contraer la infección con Entamoeba histolytica es mediante la ingestión de agua y alimentos contaminados con quistes, aunque la mayoría de los individuos infectados por este parásito no desarrollan los síntomas clásicos de la amibiasis invasora, considerándose por tal motivo, portadores asintomáticos (1,40,45).

El trofozoito o forma móvil, generalmente vive como comensal en la luz del intestino grueso, donde se multiplica y adopta la forma de resistencia que es el quiste, el cual es el responsable de la transmisión de la infección (11).

Clínicamente, la amibiasis intestinal se clasifica como benigna y grave; en la primera, el paciente presenta evacuaciones mucosanguinolentas, pujo y dolor abdominal, designándose como disentería amibiana; la forma grave recibe el nombre de rectocolitis ulcerosa, ameboma de colon y colitis fulminante entre otros (4).

La amibiasis extraintestinal afecta preferentemente al hígado y con menor frecuencia al pulmón, espacio pericárdico y solo ocasionalmente

onalmente al cerebro (40,41).

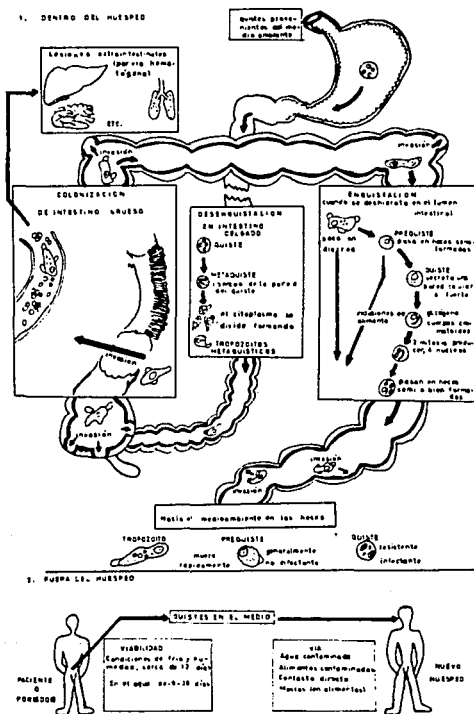


Figura 1. Ciclo vital de Entamoeba histolytica (23).

2.5.- CLASIFICACION DE Entamoeba CON BASE EN SUS ISOENZIMAS.

En muchas ocasiones es casi imposible encontrar diferencias morfológicas significativas entre distintas especies agrupadas en el género Entamoeba e incluso entre los individuos que pertenecen a los distintos géneros de amibas. Debido a lo cual, en los últimos años se ha recurrido a otras características más complejas como son: contenido de proteínas, contenido de ácidos nucleicos, y más específicamente el contenido isoenzimático entre otros; siendo esta última característica la que ha ayudado a diferenciar in vitro los distintos géneros y especies de amibas. Los principios generales que involucran al análisis isoenzimático del género Entamoeba, específicamente Entamoeba histolytica, es precisamente objeto principal en el presente trabajo de tesis.

El análisis isoenzimático surgió del estudio de patrones electroforéticos isoenzimáticos en lisados de diferentes cepas de E. histolytica, usados primeramente para distinguir a ésta de otras especies de amibas (Reeves y Bischof, 1968). Tiene como base el esquema electroforético que presenta cuatro enzimas: la glucosa-fosfato-isomerasa (GPI), la fosfoglucomutasa (PGM), la L-malato-óxido-reductasa (EM) y la hexoquinasa (HK), (29).

Posteriormente esta metodología la aplicaron Sargeant y Williams en geles horizontales, anteriormente Reeves y Bischoff emplearon electroforesis en acetato de celulosa. El objetivo de Sargeant era determinar las diferencias fenotípicas entre amibas patógenas y no patógenas (35,36).

Hasta 1980, Sargeant et.al., sólo utilizaban tres enzimas: - enzima málica, glucosa-fosfato-isomerasa y fosfoglucomutasa, lo-

grando distinguir cuatro patrones de isoenzimas de E. histolytica - pero fué hasta que utilizaron una cuarta enzima, la hexoquinasa, - que se pudo observar con claridad la relación entre cepas patógenas y no patógenas de acuerdo al patrón isoenzimático (35,36).

Los resultados obtenidos por él y sus colaboradores pueden resumirse como sigue:

a). Todas las especies de amibas parásitas del intestino del hombre pueden ser diferenciadas por sus patrones isoenzimáticos.

b). Se han descrito un total de 21 patrones isoenzimáticos - distintos para E. histolytica en las diversas áreas del mundo que padecen la enfermedad (figura 2).

c). Las amibas cultivadas a partir de muestras obtenidas de - casos bien definidos de amibiasis invasora (disentería amibiana o absceso hepático) se agrupan en nueve patrones diferentes de isoenzimas caracterizados por la presencia de bandas específicas en la enzima hexoquinasa en todos los patrones excepto en el XIII.

d). Todos los patrones restantes fueron encontrados en amibas aisladas de posibles portadores.

Recientemente, Mathews y cols. (1983) desarrollaron una técnica de electroforesis en geles continuos horizontales de poliacrilamida, donde obtuvieron resultados similares en la resolución de las bandas isoenzimáticas de los lisados amibianos.

Actualmente las diferencias entre cepas patógenas y no patógenas de E. histolytica se han ampliado con el análisis de estos patrones isoenzimáticos, los cuales muestran diferencias en algunas enzimas, basadas en la carga, la configuración y el peso molecular de las proteínas. Las enzimas estudiadas participan en la vía gli-

colítica del parásito; pero no parecen tener un papel definido en la virulencia, permitiendo diferenciar a una población de amibas - de poblaciones similares por sus movilidades electroforéticas en - una o más isoenzimas específicas para tratar de clasificar diferen - tes especies de Entamoeba (22).

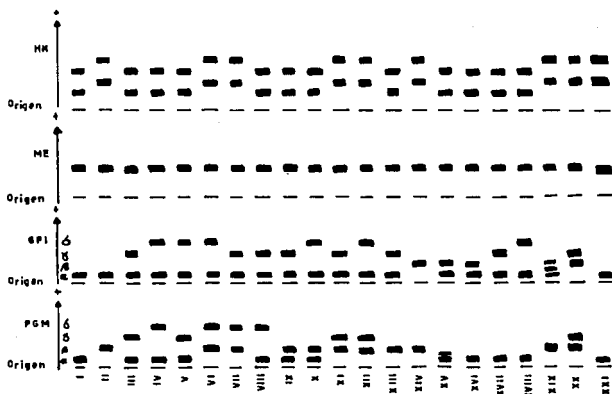


Figura 2. Patrones isoenzimáticos identificados para Entamoeba histolytica, usando Glucosa-fosfato-isomerasa (GPI), EC.5.3.1.9., Enzima Mállica (ME), EC.1.1.1.4.0., Fosfoglucomutasa (PGM), EC.2.7.5.1. y Hexoquinasa (HK), EC.2.7.1.1., - establecidos por Sargeant y cols. (27).

2.6.- METODOS DE DIAGNOSTICO.

El diagnóstico etiológico de la infección por Entamoeba histolytica, se basa en encontrar los organismos característicos en las heces. Dentro de los métodos más importantes se incluyen los siguientes: a) examen en fresco, b) coproparasitoscópico, c) cultivo y d) métodos indirectos.

2.6.1.- Examen en fresco.

Siempre que sea posible, deben examinarse heces recién emitidas y tibias, para la investigación de trofozoitos que es la forma amiboide activa. Esto se logra haciendo una preparación sobre un portaobjetos con solución salina fisiológica tibia y heces recién emitidas, donde se buscará la presencia del trofozoito de E. histolytica. Este examen debe efectuarse con prontitud, debido a la fragilidad de los trofozoitos al contacto con el medio ambiente (11.-33).

Por otro lado, cabe mencionar que la apariencia de los trofozoitos en examen directo en fresco, varía de acuerdo a las características de las heces en las cuales se encuentran; por ejemplo, en heces diarréicas con moco y sangre, su diámetro es de 20 a 40 micrómetros si son activamente móviles, aunque se llegan a observar en el citoplasma unos gránulos refringentes grandes, verdosos que corresponden a eritrocitos fagocitados. Por el contrario, en casos de diarrea simple, los trofozoitos en su movimiento son activos y en forma progresiva, pero no con la velocidad de los anteriores. En heces pastosas son aún más pequeños y menos activos.

2.6.2.- Coproparasitoscópico.

Este examen es más específico para detectar los quistes de E.

histolytica, ya que utiliza heces bien formadas que contienen a los mismos. Este examen presenta varias modalidades entre las cuales - se mencionan las siguientes:

i). Sedimentación.- Consiste en dejar en reposo una muestra - de heces homogeneizada con agua o solución salina isotónica para - concentrar los quistes. Sin embargo, debido a que se utilizan va-- rios reactivos y tubos cónicos, resulta poco económico el método. Las preparaciones quedan muy sucias porque con la sedimentación, a parte de concentrarse formas parasitarias se concentran otros mate~~r~~iales.

ii). Centrifugación.- Este examen es bastante útil para la con-- centración de quistes de protozoarios y huevos de helmintos.

iii). Flotación.- Es un método que utiliza un medio líquido de suspensión más pesado que los parásitos y éstos flotan hacia la su~~r~~perficie pudiendo ser recogidos de la película superficial. Para - que el método sea útil, hay que emplear un medio que no produzca - deformaciones que hagan irreconocibles los quistes. Sin embargo es te método por lo general emplea NaCl con un peso específico de 1.200 que provoca la contracción de los quistes, por lo que es más emple~~a~~do para la identificación de huevos de helmintos.

iv). Flotación-Centrifugación.- Este método combina los prin-- cipios de la gravitación y la centrifugación. La técnica produce - altas concentraciones de parásitos prácticamente libres de detri-- tus. La mayor o menor facilidad para concentrar los parásitos depen~~d~~de del medio de flotación empleado, así como de la especie de pará~~s~~sito de que se trate. La modalidad más empleada de flotación-cen-- trifugación es la de sulfato de zinc. Esta técnica fué desarrolla-

da para cubrir las necesidades del laboratorio clínico (11).

Con ellos se logra una recuperación de quistes de protozoarios y huevos de helmintos, presentes en las heces, y un estado adecuado para su reconocimiento. Todos los parásitos, excepto aquellos huevos que son más pesados que el medio de flotación son recuperados en altas concentraciones y en condición viable. La concentración óptima del sulfato de zinc, tiene un peso específico de 1.180 (11).

Los métodos de concentración, flotación y centrifugación para la obtención de quistes, suelen llegar a ser excelentes para el diagnóstico de infecciones leves que pueden pasar inadvertidas en el examen directo.

2.6.3.- Cultivo.

Una de las formas para cultivar a Entamoeba histolytica es la técnica de Robinson en la cual se siembran muestras de materia fecal en frascos de cultivo con agar salino, medio BR, eritromicina, almidón e incubados a 37°C, con el objeto de obtener la propagación del parásito en su forma de trofozoito por medio de subcultivos - hasta obtener un alto número de ellos (27).

Sin embargo, es claro que este método no es el ideal para el diagnóstico de rutina en el laboratorio clínico, debido a que es tardado además de complicado, y la fragilidad de las amibas y su extraordinaria sensibilidad a la mínima variación en los componentes del medio de cultivo, hacen aún más difícil su manipulación. Sin embargo, hay estudios a gran escala, como el de Norman y Brook en 1955 que informan de 391 resultados positivos de 878 cultivos y corroborados por Robinson en 1968 (30).

2.6.4.- Métodos indirectos.

Los métodos serológicos se aplican principalmente en casos de amibiiasis invasora para detectar y cuantificar los anticuerpos específicos circulantes. Los métodos indirectos positivos no necesariamente reflejan una infección presente, aunque lo contrario no descarta una infección.

Los métodos serológicos incluyen, entre los más importantes: hemaglutinación indirecta (HAI), análisis inmunoenzimático (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI), contraelectroforesis (CTE), aglutinación de látex y fijación de complemento (13,14,15).

2.7.- INDICES DE PATOGENICIDAD.

Las diferencias entre amiba comensal y amiba patógena, pueden radicar en dos actividades fundamentales: 1) habilidad para penetrar el epitelio y 2) la capacidad para diseminarse en los tejidos y producir lesión (40).

Hasta la fecha se han descrito una serie de Indices de Patogenicidad aplicables a todas las cepas de E. histolytica que son los siguientes:

2.7.1.- Formación de absceso.

La inoculación de cepas patógenas de E. histolytica en el hígado de hamsters y otros roedores, produjo un gran número de abscesos; mientras que las cepas de amibas de portadores asintomáticos son incapaces de producir lesión bajo las mismas circunstancias (8, 9).

2.7.2.- Aglutinación en presencia de concanavalina A.

Las cepas patógenas, tienen una alta susceptibilidad a aglutinarse en presencia de concanavalina A, en tanto que las cepas no -

patógenas son menos susceptibles a la aglutinación inducida por -
concanavalina A (43,44).

2.7.3.- Adherencia.

Las cepas patógenas de E. histolytica presentan mayor capacidad de adherencia a células epiteliales.

2.7.4.- Fagocitosis.

Un estudio comparativo de fagocitosis de eritrocitos humanos por amibas mostró que las cepas patógenas pueden digerir más células rojas sanguíneas y más rápidamente que las cepas no patógenas- (25,26).

2.7.5.- Resistencia al complemento.

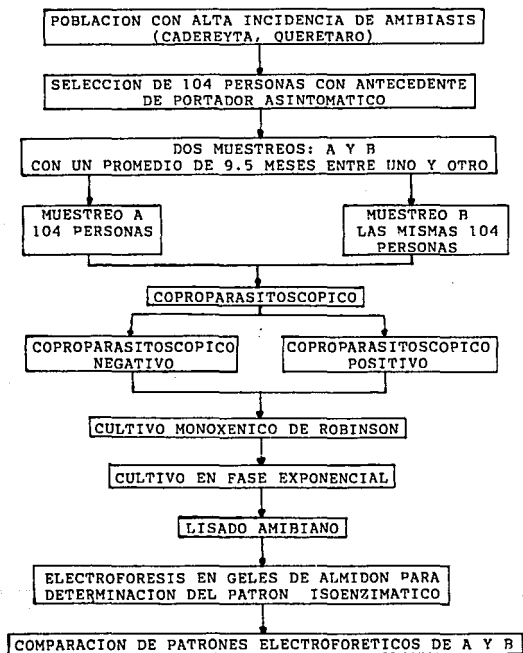
Las cepas patógenas presentan mayor resistencia a lisis por -
complemento (24).

2.7.6.- Patrón isoenzimático.

Estudio que trata de diferenciar in vitro una cepa patógena -
de otra no patógena; a través del análisis electroforético de sus
isoenzimas (35,36).

PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- DISEÑO DEL EXPERIMENTO.



3.2.- MATERIAL.

3.2.1.- Material biológico.

El material requerido fueron heces frescas no tratadas, de 104 individuos que radican en el municipio de Cadereyta, Querétaro, en la zona Centro Occidental de la República Mexicana, que es la zona considerada como la de más alta incidencia de amibiasis en el país.

Se registraron los casos de portadores asintomáticos de E. histolytica, fundamentalmente de área rural; de cada paciente se colectaron los siguientes datos; edad, sexo, ocupación, escolaridad, número de familiares y dormitorios en la vivienda, tipo de servicio de agua y eliminación de excretas, fecha en que se recolectó la muestra, datos clínicos, tratamiento médico y evolución final.

3.2.2.- Material de laboratorio.

Cultivo de Robinson:

- Botellas de Robinson de 7 ml.
- Incubadora.
- Microscopio óptico.
- Asa de platino.
- Mechero Bunsen.

Electroforesis en geles de almidón:

- Matraces de bola de fondo plano de 500 ml.
- Bomba de vacío.
- Peine de acrílico.
- Hilo Crochet blanco # 20.
- Placas de vidrio marginadas.
- Cámaras de electroforesis.
- Marco de acrílico.

3.2.3.- Reactivos.

Método de concentración de Faust y cols. (Apéndice 8.1).

- Solución de sulfato de zinc, densidad 1.180.
- Lugol parasitológico: solución concentrada.
- Solución de trabajo.

Cultivo monoxénico de Robinson (Apéndice 8.2).

- Agar salino inclinado.
- Eritromicina al 1%.
- Biftalato de potasio.
- Medio definido "R" para crecimiento de Escherichia coli.
- Medio amibiano basal "BR".
- Suero bovino.
- Medio completo "BRS" para crecimiento amibiano.
- Bactopeptona al 20%.
- Almidón de arroz.

Electroforesis de isoenzimas (Apéndice 8.3).

- Solución amortiguadora estabilizadora de isoenzimas con concentración 1 mM.
- Solución salina estéril.
- Amortiguador de fosfato con concentración 0.2 M, pH= 7.0.
- Amortiguador Tris/NaOH-malato-EDTA-MgCl₂ con concentración 0.1 M, pH= 7.4.
- Amortiguador Tris/HCl con concentración 0.3 M, pH= 7.4.
- Amortiguador Tris/HCl con concentración 0.3 M, pH= 8.0.
- Nicotinamida adenina dinucleótido (NADP) con concentración de 10 mg/ml.
- Glucosa-6-fosfato (G-6-P) con concentración de 100 UI/ml.

- Malato de sodio con concentración 1.0 M, pH= 7.0.
- Fructosa-6-fosfato (F-6-P) con concentración de 10 mg/ml.
- Glucosa con concentración de 400 mg/ml.
- 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio: azul de tiazolil (MTT) con concentración de 5 mg/ml.
- Metil sulfato de fenazina (PMS) con concentración de 1 mg/ml.

3.3.- METODOLOGIA.

3.3.1.- Método de concentración de Faust y cols.

- a). En un recipiente de vidrio o polietileno de 50 ml aproximadamente, hacer una suspensión homogénea de 1 a 2 g. de materia fecal y 10 ml de agua.
- b). Pasar a través de gasa cortada en cuadros de 15 cm de lado, colocada en un embudo de 7.5 cm de diámetro y coleccionar la suspensión en un tubo de 13 por 100 mm, colocado previamente en una gradilla.
- c). Centrifugar los tubos así preparados a 2,000 r.p.m. durante 1 minuto.
- d). Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento con agua, agitando con un aplicador de madera.
- e). Centrifugar nuevamente y volver a decantar el sobrenadante.
- f). Agregar de 2 a 3 ml de solución de sulfato de zinc a los tubos y homogeneizar perfectamente, llenar los tubos hasta 0.5 a 1 cm por abajo de los bordes.
- g). Centrifugar a 2,000 r.p.m. durante 1 minuto.
- h). Con el asa de alambre limpia o flameada, recoger la muestra de la película superficial que se encuentra en el menisco, durante dos o tres ocasiones sucesivas y depositar en un portaobjeto

de 75 por 25 mm.

i). Colocar dos gotas de lugol parasitológico y homogeneizar con el ángulo de un cubreobjeto de 22 por 22 mm y poner éste sobre la preparación.

j). Llevar la preparación al microscopio y observar con objetivos de 10X y 40X.

3.3.2.-Cultivo por el método de Robinson.

Tratar cada muestra biológica tanto positiva como negativa de acuerdo al método de cultivo monoxénico de Robinson, con el objeto de aislar amibas de heces y obtener propagación de E. histolytica - en su forma de trofozoito.

Tomar aproximadamente 50 mg de heces frescas no tratadas, colocarlas en botellas de Robinson de 7 ml de capacidad las cuales - contienen agar salino inclinado, aproximadamente 4 ml de medio "BR" 2 a 4 gotas de eritromicina al 4% y 10 mg de almidón de arroz.

Incubar a 37°C durante 24 horas. Efectuar revisiones al microscopio cada 24 horas tomando una pequeña cantidad del botón de la muestra, teñir con lugol. En el caso de encontrar trofozoitos en - número igual o mayor a 10 por campo, retirar el sobrenadante y reemplazar por un volumen igual de medio "BRS", dos gotas de lacto-peptona, 2 a 4 gotas de eritromicina y almidón de arroz.

Incubar a 37°C durante 48 horas y realizar subcultivos, tanto como lo requieran las condiciones de crecimiento.

3.3.3.- Electroforesis de enzimas.

3.3.3.1.- Lisado amibiano.

Los cultivos en fase exponencial se procesan a fin de obtener un lisado de cada cepa en estudio, y poder así efectuar el corri-

miento electroforético.

a). Depositar en tubos cónicos graduados de 15 ml, el crecimiento amibiano obtenido en medio de Robinson.

b). Centrifugar a 35,000 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente, eliminar el sobrenadante.

c). Lavar la pastilla amibiana tres veces con solución salina estéril y centrifugar a 35,000 r.p.m. durante 10 minutos a 20°C.

d). Resuspender el paquete celular con un volumen igual de solución amortiguadora estabilizadora de isoenzimas, agitando vigorosamente.

e). Congelar la suspensión amibiana a -70°C durante 12 horas, descongelar rápidamente la suspensión en baño de agua a 37°C.

f). Romper trofozoitos mediante congelación de la muestra en nitrógeno líquido, y descongelar nuevamente en baño de agua a 37°C con agitación manual. Repetir el ciclo congelación-descongelación-un mínimo de 4 veces.

g). Centrifugar la suspensión a 30,000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C y separar el sobrenadante (lisado).

h). En un vaso de plástico con cuatro compartimientos de papel el cual contiene nitrógeno líquido, depositar gota a gota el sobrenadante para formar las perlas del lisado.

i). Depositar las perlas del lisado amibiano en tubos Eppendorf respectivos y etiquetar.

j). Colocar los tubos etiquetados en la caña, anotando la posición y número de canastilla que ocupará dentro del tanque de nitrógeno líquido en la siguiente forma: Posición A, tanque de nitrógeno 1, caña 3, lisado HK 9, fecha.

3.3.3.2.- Electroforesis en geles de almidón y determinación del patrón isoenzimático.

a). En cuatro matraces de bola de fondo plano de 500 a 1000 ml, preparar las muestras de acuerdo a la tabla 1.

b). Calentar a la flama el contenido de cada matraz hasta disolución total agitando vigorosamente.

c). Eliminar los gases con bomba de vacío en cada uno de los matraces y vaciar el contenido de cada uno de ellos, a las placas marginadas, marcadas previamente con la enzima correspondiente y puestas sobre un papel de estrasa.

d). Esperar a que solidifiquen de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente.

e). Marcar los canales con el peine.

f). Impregnar los hilos (Crochet blanco # 20) de 0.9 cm de longitud con el lisado amibiano y colocar en los canales correspondientes en el gel. Limpiar las pinzas después de colocar cada una de las muestras.

g). Acomodar las placas en las cámaras de electroforesis.

h). Adicionar amortiguadores de corrida hasta cubrir los electrodos.

i). Iniciar el corrimiento aplicando 70 mA (16 V/cm^2), durante 3 horas, manteniendo la temperatura entre 8 y 10°C .

j). Al finalizar el corrimiento, retirar las placas de las cámaras y revelar la actividad enzimática (una placa para cada enzima) con la solución reveladora (preparada de acuerdo a la tabla 2). Incubar los geles a 37°C al resguardo de la luz durante 30 a 60 minutos.

k). Comparar los resultados contra una cega ambiente conocida.

1). Fotografiar los geles.

Placa	Enzima	Almidón	Agua desionizada	Amortiguador de fosfatos	Amortiguador Tris/NaOH maleato-EDTA-MgCl ₂
1	GPI	4.5g	37.0ml	3.0ml	-
2	ME	4.5g	37.0ml	3.0ml	-
3	PGM	4.5g	37.0ml	-	4.0ml
4	HK	4.5g	37.0ml	-	4.0ml

TABLA 1. PREPARACION DE GELES DE ALMIDON (36).

3.3.3.3.- Cámaras para electroforesis.

a). Llenar las cámaras para glucosa-fosfato-isomerasa (GPI) y enzima málica (ME) con amortiguador de fosfatos con concentración 0.2 M, pH= 7.0, en todos los compartimientos hasta cubrir los electrodos.

b). Llenar las cámaras para fosfoglucomutasa (PGM) y hexoquinasa (HK), llenando la parte media de la cámara con amortiguador de fosfatos con concentración 0.2 M, pH= 7.0, hasta cubrir los electro

dos y en los extremos con buffer tris/NaOH-málato-EDTA-MgCl₂ con concentración 0.1 M, pH= 7.4, a cubrir los electrodos.

c). Colocar las placas metálicas refrigerantes.

d). Acomodar las placas en las cámaras de electroforesis. Las placas contendrán las muestras.

e). Colocar en cada extremo de las placas, hule esponja humedecido con el amortiguador correspondiente, haciendo puente con el mismo.

f). Sobre las placas con las muestras, colocar placas de vidrio en forma rectangular, oprimiendo las esponjas con los extremos.

g). Presionar con las placas de vidrio cuadradas, las placas rectangulares a fin de evitar deshidratación en el gel y mantener los hules esponja en su lugar.

h). Tapar las cámaras e iniciar el corrimiento.

3.3.3.4.- Revelado de isoenzimas.

La solución reveladora de isoenzimas se prepara una hora antes del tiempo de corrimiento.

a). Colocar al mechero un matraz de 250 ml conteniendo agua - desionizada y el agar noble, todo esto al 1.2% hasta disolución total.

b). En cuatro frascos goteros de aproximadamente 60 ml y de color ámbar marcados con la enzima correspondiente, colocar los substratos específicos para cada una de las enzimas. Finalmente adicionar 10 ml de agar al 1.2% preparado anteriormente.

c). Colocar la rejilla o marco de acrílico sobre la placa y - agregar el contenido del frasco gotero correspondiente.

d). Incubar los geles a 37°C al resguardo de la luz durante -

30 a 60 minutos, realizando la operación lo más rápido posible.

e). Leer y anotar los resultados.

REACTIVO	ENZIMA			
	GPI	ME	PGM	HK
Tris/HCl (0.3 M, pH= 8.0)	7.0 ml	-	7.0 ml	-
Tris/HCl (0.3 M, pH=7.4)	-	7.0 ml	-	7.0 ml
Cloruro de magnesio 1 M	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
NADP (10.0 mg/ml)	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Glucosa 6-fosfato oxidasa genese 1100 U/ml	0.5 ml	-	0.7 ml	0.2 ml
Malato de sodio (1M)	-	0.1 ml	-	-
Fructosa 6-fosfato (10 mg/ml)	0.2	-	-	-
Glucosa (400 mg/ml)	-	-	-	0.1 ml
Glucosa 1-fosfato (25 mg/ml)	-	-	0.5 ml	-
ATP	-	-	-	150 mg
MTT (5 mg/ml)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
PMS (1 mg/ml)	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Agar al 1.2%	10.0 ml	10.0 ml	10.0 ml	10.0 ml

TABLA 2. REVELADORES DE ISOENZIMAS (37).

3.4.- RESULTADOS.

En un total de 208 muestras estudiadas en dos etapas por el método de Robinson se aislaron 75 cepas en la etapa A y 36 en la etapa B, haciendo un total de 111 cepas en ambas etapas.

De las 111 cepas aisladas 71 de ellas pudieron ser lisadas para determinar su patrón isoenzimático (tabla 3).

Etapa	No. de muestras	No. de cepas aisladas	No. de lisados
A	104	75 (67.5%)	56 (74.6%)
B	104	36 (32.5%)	15 (41.6%)
Total	208	111 (53.3%)	71 (64.0%)

TABLA 3. RELACION DE CEPAS AISLADAS Y OBTENCION DE LISADOS PARA LA DETERMINACION DEL PATRON ISOENZIMATICO DE 111 MUESTRAS POSITIVAS AL CULTIVO DE ROBINSON.

El resto no pudieron ser aisladas debido a que no se obtuvieron los cultivos en su fase exponencial para poder obtener los lisados.

En la tabla 4 se muestran los patrones isoenzimáticos encontrados y el número de cepas de cada uno de ellos, cuando se some--

tieron a electroforesis en geles de almidón las 71 cepas que se lograron lisar, encontrándose que 45 de ellas eran fácilmente clasificables dentro de alguno de los 21 patrones isoenzimáticos descritos por Sargeant, para Entamoeba histolytica. Los 26 restantes presentaron patrones diferentes a los ya mencionados, pero fueron clasificados como patógenos y no patógenos con base en el criterio empleado por Sargeant, el cual describe que las cepas patógenas se caracterizan por la presencia de bandas beta y ausencia de bandas-alfa en la enzima PGM y la presencia de bandas de corrimiento rápido para la enzima HK, de todos los patrones excepto en el XIII (27, 32).

PATRON ELECTROFORETICO		ETAPA "A"	ETAPA "B"
I	NP	1	1
III	NP	4	1
IV	NP	3	1
V	NP	2	0
VII	P	2	1
VIII	NP	12	6
IX	NP	3	1
X	NP	2	0
XI	P	1	0
XII	P	1	0
XVII	NP	1	2
NP		0	2
P		24	0
TOTAL		56	15

TABLA 4. NUMERO DE CEPAS CLASIFICADAS DE ACUERDO A LOS PATRONES ISOENZIMATICOS DESCRITOS POR SARGEANT (37). NP= NO PATOGENO, P= PATOGENO.

La tabla 5 muestra el comportamiento del patrón isoenzimático al inicio y al final del muestreo, que tuvo como duración promedio 9 meses entre la etapa A y la etapa B, observándose que de 9 casos-valorables 5 fueron hombres y 4 mujeres, con edades que fluctuaron entre los 3 y los 29 años; dos casos (casos 1 y 2) mostraron el mismo patrón isoenzimático (patrón VIII, no patógeno) en ambas etapas dos casos más (casos 3 y 4), presentaron patrones diferentes al inicio y al final del muestreo, aunque conservaron su carácter no patógeno, el caso 3 cambió de patrón VIII no patógeno, a patrón IX no-patógeno y el caso 4 inició con un patrón III no patógeno y finalizó con un patrón XVII no patógeno. En cuatro casos más (casos 5, 6, 7 y 8) la clasificación de las cepas no presentó afinidad con los patrones de cepas bien caracterizadas, sin embargo revelaron características de cepas patógenas, según el criterio de Sargeant (35, 36), observándose que en la etapa A todos los casos presentaron características de cepas patógenas pero en la etapa B los casos 5 y 6 cambiaron su patrón isoenzimático al VIII no patógeno; el caso 7 - cambió de patrón al IV no patógeno y el caso 8 cambió al patrón - XVII no patógeno. Por último se observó que el caso 9 cambió de patrón, pero conservó su carácter patógeno pues en la etapa A presentó patrón isoenzimático XI patógeno y en la etapa B presentó patrón VII que es también patógeno.

CASO No.	ETAPA "A"	ETAPA "B"	SEXO	EDAD (años)	MESES ENTRE "A" y "B"
1	VIII NP	VIII NP	M	6	9.5
2	VIII NP	VIII NP	M	3	8.5
3	VIII NP	IX NP	F	11	7.5
4	III NP	XVII NP	F	18	8.5
5	P	VIII NP	F	29	9.5
6	P	VIII NP	F	13	15.0
7	P	IV NP	M	14	7.5
8	P	XVII NP	M	4	8.0
9	XI P	VII P	M	10	9.0

TABLA 5. COMPORTAMIENTO DE LOS CASOS VALORABLES AL INICIO Y AL FINAL DEL ESTUDIO. NP= NO PATOGENO, P= PATOGENO.

DISCUSION

En el presente estudio se realizó un seguimiento preciso de - cepas aisladas de 104 individuos que presentaban características - de portadores asintomáticos de E. histolytica con el objeto de observar si existen o no, cambios en el patrón isoenzimático a través del tiempo, o si éstas permanecen inalterables dentro del huésped. Los resultados obtenidos a lo largo de 9.5 meses como promedio, -- muestran que las cepas pueden cambiar su patrón electroforético a lo largo del tiempo y sin influencias externas, puesto que los portadores que fueron muestreados manifestaron no haber hecho cambios en sus hábitos de vida, además de que no recibieron tratamiento -- antiamebiano alguno, durante el tiempo que duró el estudio.

Los patrones electroforéticos de los 9 casos valorados que se obtuvieron al final del estudio, muestran que hubo 4 patrones que fueron clasificados al inicio como patógenos pero sin tener una ca racterización bien definida con base en el criterio establecido por Sargeant (33,35,36,37,38,39), puesto que las enzimas PGM y HK de estos cuatro casos corresponden a cepas patógenas, es decir, presentaron corrimiento tipo beta para PGM y corrimiento rápido para HK pero difieren de los patrones establecidos por Sargeant, en la enzima GPI. Lo anterior podría hacer pensar que se trata de cepas nuevas, ya que ninguna de ellas se pudo caracterizar plenamente - por comparación con los patrones ya establecidos.

Por otro lado, 7 de las 9 cepas valorables mostraron un patrón electroforético final distinto al presentado al inicio del estudio lo que mostraría nuevamente, que las cepas cambian en períodos de

varios meses , puesto que las cuatro cepas clasificadas únicamente como patógenas al inicio del muestreo mostraron un patrón electroforético no patógeno bien definido, al final del mismo. Dos cepas más, mantienen su carácter no patógeno aunque su patrón electroforético fué diferente, y en un solo caso se encontró cambio en el patrón electroforético pero conservó su carácter patógeno, lo anterior podría explicarse con base en los estudios hechos por Mirelman (23), en los cuales sugiere que cambios en el microambiente intestinal del huésped obligan al parásito a cambiar su virulencia y por lo tanto su patrón isoenzimático, tal vez como mecanismo de evasión de la respuesta inmune del huésped.

El seguimiento de los portadores que no pudieron ser evaluados se debió a que por algún mecanismo, hasta hoy desconocido, estos individuos eliminan la infección espontáneamente ya que en la etapa B no se detectó al parásito, esto concuerda con los estudios hechos por Nanda, en la India en 1984 (20).

Por último se confirma lo estudiado por Martínez-Palomo, Meza y cols. (34) , con respecto a que la mayoría de los portadores asintomáticos de E. histolytica albergan en su intestino amibas no virulentas ya que encontramos que 8 de los 9 casos presentaron cepas con patrones isoenzimáticos no patógenos, pero en uno de ellos, -- tanto la PGM como la HK mostraron patrón de amibas patógenas, lo que muestra que hay individuos que presentan la infección asintomática con cepas patógenas.

RESUMEN

Se seleccionó un total de 104 individuos en el municipio de Caderyta, Qro., a las cuales se muestreó en dos etapas, todos presentaron antecedentes de ser portadores asintomáticos de E. histolytica, se estudió el comportamiento de las cepas así como su patrón isoenzimático a intervalos de algunos meses sin que los individuos hubieran recibido tratamiento antiamebiano alguno ni que hubieran modificado sus hábitos de vida.

En todos los casos se investigó la presencia de quistes y trofozoitos de Entamoeba histolytica en las heces no tratadas de estos individuos; cuando se obtuvieron cultivos en fase exponencial, se lisó a las amibas para obtener sus patrones isoenzimáticos en relación con las cuatro enzimas descritas por Sargeant; la fosfoglucomutasa (PGM), la glucosa-fosfato-isomerasa (GPI), la enzima málica (EM) y la hexoquinasa (HK).

Los patrones isoenzimáticos mostrados al final del estudio, permitieron observar cambios en los patrones isoenzimáticos de las cepas de los portadores al cabo de 9.5 meses como promedio.

Se observó también la presencia de cepas patógenas en portadores asintomáticos, así como la eliminación de la infección intestinal al cabo de 9.5 meses como promedio.

CONCLUSIONES

Del presente estudio se puede concluir:

- Las cepas de portadores asintomáticos pueden cambiar su patrón electroforético en un promedio de 9.5 meses, sin que - ésto signifique que no lo puedan hacer en menos tiempo, por lo que se sugiere hacer seguimientos a intervalos de tiempo más cortos.
- Pueden existir cepas patógenas en portadores asintomáticos.
- Hay portadores asintomáticos que son capaces de eliminar - la infección intestinal espontáneamente con el tiempo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALVAREZ, C.R., WONG, CH.M., GARCIA, R.J. Diagnóstico parasitológico e inmunológico de las enfermedades parasitarias. Infectología 4:110. 1984.
- 2.- BOECK, H.I., DROBHLAV, J. The cultivation of Entamoeba histolytica. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 5:371-407. 1925.
- 3.- BRANDT, H.I., PEREZ, R. Amibiiasis. La Prensa Médica Mexicana. México, 417 p. 1970.
- 4.- COUNCILMAN, W.T., LEFLEUR, H.A. Amebic dysentery. Johns Hopkins Hosp. Rep. 2:395. 1981.
- 5.- CUTTLER, D.W. Method for the cultivation of Entamoeba histolytica. J. Path. Bact. 22:22-28. 1981.
- 6.- DIAMOND, L.S. Axenic cultivation of Entamoeba histolytica. Science 134:336. 1961
- 7.- DIAMOND, L.S. Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica, Shaudin 1903 and E. histolytica-like amoeba. J. Parasitol. 54:1050. 1968.
- 8.- DIAMOND, L.S. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:431-432. 1978.
- 9.- DIAMOND, L.S., PHILLIPS, B.P., BARTIGS, I.L. A comparison of the virulence of nine strains of axenicallii cultivated Entamoeba histolytica in hamster liver. Arch. Invest. Med. 5:425. 1974.
- 10.- DUPONT, H.L., PICKERING, L.K. Amoebiasis. Plenum Medical Book. - Comp. Nueva York, 21 p. 1980.
- 11.- FAUST, E.C., ROUSELL, P.R., JUNG, R.C. Clinical Parasitology. Les Febiger, Filadelfia, 888 p. 1970.
- 12.- GATHIRAM, V., JACKSON, T.F. Frequency distribution of Entamoeba histolytica zimodemes in a rural South African population. Lancet 1:719. 1985.
- 13.- GUTIERREZ, G., AUBANEL, M. Encuesta serológica en niños de la ciudad de México por contrainmunolectroforesis. Arch. Invest. Med. 3:271. 1972.
- 14.- GUTIERREZ, G., MARGAIN, J., CASTAÑEDA, R., ENRIQUEZ, R., AUBANEL, M., SEPULVEDA, B. Encuesta Serológica Nacional I. Investigación de anticuerpos contra Entamoeba histolytica en una comunidad semi rural de la costa del Golfo de México. Arch. Invest. Med. 5:475. 1974.

- 15.- GUTIERREZ, G., MUÑOZ, O., LUDLOW, A., ESPINOSA, G., HERRERA, S., SEPÚLVEDA, B. Encuesta Serológica Nacional II. Investigación de anticuerpos contra Entamoeba histolytica en la República Mexicana. En: Memorias de la primera conferencia internacional sobre amibiasis, I.M.S.S., B. Sepúlveda y L.S. Diamond (Eds.) México, 850 p. 1976.
- 16.- JACOBS, L. The elimination of viable bacteria from cultures of Entamoeba histolytica and the subsequent maintenance of such cultures. Am. J. Hyg. 46:172. 1947.
- 17.- LÖSCH, F.A. Massive development of amoebae in the large intestine. Archiv. F. Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin von Rudolf Virchow. 65:196. 1875.
- 18.- MARTINEZ-BAEZ, M. Historia de la amibiasis. En: Memorias de la primera conferencia internacional sobre amibiasis, I.M.S.S., B. Sepúlveda y L.S. Diamond (Eds.), México, 42 p. 1976.
- 19.- MARTINEZ-PALOMO, A. The biology of Entamoeba histolytica. Research Studies Press. John Wiley and Sons L.T.D. Inglaterra, pp. 126-161. 1982.
- 20.- MARTINEZ-PALOMO, A. Las amibas, enemigos invisibles. Fondo de Cultura Económica, México, 102 p. 1982.
- 21.- MARTINEZ-PALOMO, A., GONZALEZ-ROBLES, A., DE LA TORRE, M. Selective agglutination of pathogenic strains of Entamoeba histolytica induced by concanavalina A. Nature New Biology 245:186. 1973.
- 22.- MATHEWS, H.M., MOSS, D.M., HEALY, C.R., VISVESVARA, G.S. Polyacrylamide gel electrophoresis of isoenzymes from Entamoeba species. J. Clin. Microbiol. 17:1009-1012. 1983.
- 23.- NIRELMAN, D. Ameba-bacterian relationship in amebiasis. J. Clin. Microbiol. 2:272-284. 1987.
- 24.- MOGYOROS, M., CALFF, E., GITLER, C. Virulence of Entamoeba histolytica correlates with the capacity to develop complement resistance. Isr. J. Med. Sci. 22:915-917. 1986.
- 25.- OROZCO, E., MARTINEZ-PALOMO, A., LOPEZ, R. Un modelo in vitro para el estudio cuantitativo de la virulencia de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (México) 9:257. 1978.
- 26.- OROZCO-OROZCO, M.E., MARTINEZ-PALOMO, A., GUARNEROS, G. Virulencia y propiedades de superficie de varias cepas axénicas de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (México), 11 (Supl.1): 152-157. 1980.
- 27.- PROCTOR, E.M., WONG, Q., YANG, J., KEYSTONE, J. The electrophoretic isoenzyme patterns of strains of Entamoeba histolytica isolated in two major cities in Canada. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37 (2):296-301. 1987.

- 28.- RAVDIN, J.I., GUERRANT, R.L. Review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. Rev. Inf.-Dist. 4:1185. 1982.
- 29.- REEVES, R.W., BISCHOF, J.M. Clasificación of Entamoeba species - by means of electrophoretic properties of amebal enzymes. J. - Parasitol. 54:594-600. 1968.
- 30.- ROBINSON, G.L. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 62:285-294. 1968.
- 31.- SALAZAR, S.P., HARO de, A.E. Manual de técnicas para el diagnóstico morfológico de las parasitosis. Francisco Mendez Cervantes Eds. México, 199 p. 1986.
- 32.- SARGEANT, P.G. Zimodemes expressing possible genetic exchange in Entamoeba histolytica. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 79: 86-89. 1985.
- 33.- SARGEANT, P.G., y cols. The reliability of Entamoeba histolytica zimodemes in clinical laboratory diagnosis. Arch. Invest. Med. (México) 18:69. 1987.
- 34.- SARGEANT, P.G., BAVEJA, U.K., NANDA, R., ANAND, B.S. influence of geographical factors in the distribution pathogenic zimodemes of Entamoeba histolytica; Identification of Zymodeme XIV in India. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78:96-101. 1984.
- 35.- SARGEANT, P.G., WILLIAMS, J.E. Electrophoretic isoenzyme patterns of Entamoeba histolytica and Entamoeba coli. Trans. Roy. - Soc. Trop. Med. Hyg. 72:164. 1978.
- 36.- SARGEANT, P.G., WILLIAMS, J.E. Electrophoretic isoenzymes patterns of the pathogenic and non pathogenic intestinal amoebae of man. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 73:225-227. 1979.
- 37.- SARGEANT, P.G., WILLIAMS, J.E. A study of intestinal protozoa including non-pathogenic Entamoeba histolytica from patients in a group of mental hospitals. Am. J. Public. Health. 72:178-179. 1982.
- 38.- SARGEANT, P.G., WILLIAMS, J.E., GRENE, J.D. The differentiation of invasive and non-invasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:519-521. 1979.
- 39.- SARGEANT, P.G., WILLIAMS, J.E., JACKSON, T.F., SIMJE, A.E. A zymodeme study of Entamoeba histolytica in a group of South African School Children. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 76:401-402. 1982.
- 40.- SEPULVEDA, B. La amebiasis invasora por Entamoeba histolytica - Gac. Med. (México) 100:101. 1970.

- 41.- SEPULVEDA, B., MARTINEZ-PALOMO, A. Amebiasis. En: Tropical and - Geographical Medicine. K.S. Warren, A.A. Mahmoud (Eds.) Mc. - Graw-Hill, Nueva York, pp. 305-318. 1984.
- 42.- SHAFFER, J.G., FRYE, W.W. Studies on the growth and requeriment- of Entamoeba histolytica. I. Maintenance of a strains of Entamoeba histolytica through one hundred transplants in the absen- ce of an actively multipling bacterial flora. Am. J. Hyg. 47: 214. 1948.
- 43.- TRISSEL, D.A., MARTINEZ-PALOMO, A., ARGUELLO, C., DE LA TORRE, M., - DE LA HOZ, R., PEREZ, E. Surface properties of Entamoeba: Increa- sed rates of human eritrocytes phagocytosis in pathogenic strai- ns. J. Exp. Med. 148:1137-1145. 1977.
- 44.- TRISSEL, D.A., MARTINEZ-PALOMO, A., PEREZ, E. Surface properties - related to concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several Entamoeba strains. J. Exp. Med. 145:653-665. - 1978.
- 45.- WALSH, J.A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infecc. Dis. 8:228-238. 1986.

APENDICE

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

8.1.- Método de concentración de Faust y cols.

Preparación de soluciones.

a). Solución de Sulfato de Zinc (densidad 1.180).

Sulfato de Zinc350 g.
Agua destilada1000 ml.

Disolver el sulfato de zinc en el agua destilada hasta disolución total de la sal; tomar la densidad, si pasa de 1.180, agregar agua y homogeneizar. Si le falta alcanzar la densidad deseada, agregar pequeñas cantidades de la sal hasta alcanzar la densidad deseada.

b). Lugol parasitológico: solución concentrada.

Iodo cristaloides5 g.
Ioduro de potasio10 g.
Agua destilada100 ml.

Disolver el ioduro de potasio en el agua y enseguida agregar el iodo agitando constantemente para que se disuelva la mayor cantidad posible, guardar en un frasco color ámbar procurando que todo el exceso de iodo que quede en el fondo se vacíe en el frasco; esto se hace para que la solución permanezca con la concentración deseada durante largo tiempo.

c). Solución de trabajo.

Solución concentrada de lugol1 volúmen.
Agua destilada1 volúmen.

Mezclar la solución concentrada con el agua destilada y guardar la solución restante en un frasco gotero color ámbar.

8.2.- Cultivo monoxénico de Robinson.

a). Agar salino inclinado.

Disolver 1.5 g de agar noble y 0.7 g de cloruro de sodio en - 100 ml de agua destilada y calentar para disolver completamente el agar. Distribuir alícuotas de 4 ml en botellas de Robinson de 7 ml de capacidad, esterilizar en autoclave durante 15 minutos (a 15 lb/pulg²) y dejar gelificar en posición inclinada a temperatura ambiente y posteriormente almacenar en refrigeración.

b). Eritromicina al 1%.

Disolver 1 g de eritromicina base en 10 ml de etanol al 70%, - dejar reposar dos horas, aforar a 100 ml con agua estéril fría, - distribuir alícuotas de 5 ml en tubos de 13 por 100 mm de tapón de rosca estériles y almacenar en refrigeración.

c). Biftalato de potasio.

Solución concentrada: Disolver 25.5 g de biftalato de potasio en 230 ml de agua destilada, agregar NaOH al 40% hasta disolución total. Ajustar el pH a 6.3 y aforar a 250 ml con agua destilada. - Esterilizar en autoclave, y distribuir en alícuotas de 10 ml en tu bos de 15 por 150 mm estériles y almacenar en refrigeración.

Solución diluída: A 10 ml de la solución concentrada, adicio- nar 90 ml de agua destilada estéril y guardar en refrigeración.

d). Medio definido "R" para crecimiento de Escherichia coli.

Solución concentrada: Disolver 125 g de NaCl, 50 g de ácido - cítrico monohidratado, 12.5 g de KH_2PO_4 , 25 g de sulfato de amonio - 1.25 g de sulfato de magnesio y 100 ml de ácido láctico, en 1000 ml de agua destilada, aforar a 2.5 litros con agua destilada. Distri- buir en alícuotas de 50 ml en botellas de plástico estériles y al-

macenar en refrigeración.

Solución diluída: A 50 ml de medio "R" concentrado, adicionar 1.25 ml de azul de bromotimol al 0.04%, 450 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.0 con NaOH al 40%. Esterilizar en autoclave y re partir en botellas de plástico estériles y almacenar en refrigera-- ción.

e). Medio amibiano basal "BR".

Cultivar Escherichia coli cepa B durante 48 horas a 37°C en medio "R" diluído, en botellas de fondo plano de 100 ml de capacidad de tapón de rosca y guardar a temperatura ambiente hasta por dos - meses.

f). Suero bovino.

Descomplementar el suero clarificado estéril a 56°C durante - 30 minutos. Repartir en alícuotas de 20 ml en tubos de 22 por 75mm estériles de tapón de rosca. Poner a prueba de esterilidad en incu badora a 37°C durante una semana y almacenar en refrigeración.

g). Medio completo "BRS" para crecimiento amibiano.

Mezclar volúmenes iguales de suero bovino descomplementado y medio "BR", incubar durante 24 horas a 37°C y guardar a temperatu- ra ambiente hasta por un mes.

h). Bactopeptona al 20%.

Disolver 20 g de bactopeptona en 100 ml de agua destilada, ca lentar hasta disolver completamente. Distribuir en alícuotas de 5 ml en tubos de 13 por 100 mm con tapón de rosca, esterilizar en au toclave (a 15 lb/pulg²) durante 15 minutos y almacenar en refrigera ción.

i). Almidón de arroz.

Esterilizar 3 g de almidón de arroz por cada frasco de boca ancha con tapón de rosca de poca capacidad, en horno a 150°C durante dos horas y media, guardar a temperatura ambiente.

8.3.- Electroforesis de enzimas.

a). Solución amortiguadora de isoenzimas con concentración 1 mM.

Mezclar 1 ml de ácido amino-n-caprónico con concentración 3 mM y 1 ml de EDTA con concentración 3 mM, pH= 7.0. Guardar en refrigeración hasta por una semana.

b). Solución salina estéril.

Disolver 6.25 g de NaCl, 2.8 g de K_2HPO_4 y 0.4 g de KH_2PO_4 en 800 ml de agua destilada. Distribuir en alícuotas de 100 ml en botellas de tapón de rosca, esterilizar en autoclave y guardar en refrigeración.

c). Amortiguador de fosfatos con concentración 0.2 M, pH= 7.0.

Disolver 87.04 g de Na_2HPO_4 y 60.3 g de NaH_2PO_4 , en 4 litros de agua desionizada, ajustar el pH a 7.0 con NaOH con concentración 10 N, aforar a 5 litros con agua desionizada, esterilizar por filtración y guardar en refrigeración.

d). Amortiguador Tris/NaOH-maleato-EDTA- MgCl_2 , con concentración 0.1 M, pH= 7.4.

Disolver 60.55 g de tris base, 58.05 g de ácido maleico, 21.3 gramos de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 60.55 g de EDTA en 3 litros de agua desionizada. Esterilizar por filtración y guardar en refrigeración.

e). Amortiguador Tris/HCl, concentración 0.3 M, pH= 7.4.

Disolver 9.08 g de tris base en 200 ml de agua desionizada

ajustando el pH a 7.4 con HCl 5 N, aforar a 250 ml con agua desionizada, esterilizar por filtración y guardar en refrigeración.

f). Amortiguador tris/HCl, concentración 0.3 M, pH= 8.0.

Disolver 9.08 g de tris base en 200 ml de agua desionizada, - ajustar el pH a 8.0 con HCl 5 N, aforar a 250 ml con agua desionizada, esterilizar por filtración y guardar en refrigeración.

g). Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, con concentración de 10 mg/ml.

Disolver 0.25 g de NADP en 25 ml de agua desionizada estéril y guardar en refrigeración.

h). Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6PD), con concentración de 100 UI/ml.

Disolver 2.0 mg de G-6PD (2000 UI) en 3.3 ml de amortiguador de citrato de sodio con concentración 0.1 M, pH= 7.0, estéril y -- guardar en refrigeración.

Preparar: Amortiguador de citrato de sodio con concentración 0.1 M, pH= 7.0.

Disolver 0.204 g de citrato de sodio en 10 ml de agua desionizada, ajustando el pH a 7.0 con HCl 5 N, esterilizar por filtración y guardar en refrigeración.

i). Malato de sodio con concentración 1.0 M, pH= 7.0.

Disolver 1.56 g de ácido málico (sal monosódica) en 10 ml de agua desionizada, ajustar el pH a 7.0 con NaOH 10 N, esterilizar - por filtración y guardar en refrigeración.

j). Fructosa 6-fosfato (F-6P), concentración 10 mg/ml.

Disolver 20 mg de F-6P (sal monosódica) en 2 ml de agua desionizada estéril, guardar en refrigeración.

k). Glucosa con concentración de 400 mg/ml.

Disolver 2 g de glucosa monohidratada en 5 ml de agua desionizada y guardar en refrigeración.

l). Glucosa 1-fosfato (G-1P), concentración 25 mg/ml.

Disolver 250 mg de G-1P (sal disódica) en 10 ml de agua desionizada y guardar en refrigeración.

m). 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetraxoleo:azul de tiazolil (MTT), con concentración de 1 mg/ml.

Disolver 20 mg de MTT en 4 ml de agua desionizada y guardar - al resguardo de la luz.

n). Metil sulfato de fenazina (PMS), concentración 1 mg/ml.

Disolver 4 mg de PMS en 4 ml de agua desionizada y guardar - al resguardo de la luz.