

11261  
12  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA

DE MEXICO

Facultad de Medicina  
Unidad de Posgrado

"ANALISIS DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y ZIMODEMOS DE  
Entamoeba histolytica EN INDIVIDUOS PORTADORES ASINTOMATICOS"

T E S I S

que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biomédicas,  
especialidad Parasitología, presenta:

MARIA DEL CARMEN SANCHEZ GUILLEN

TESIS CON  
FALSA DE ORIGEN

México, D. F.  
1991



## **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

Lista de abreviaturas .....	i
Lista de figuras .....	iv
Lista de tablas .....	vi
Agradecimientos .....	vii
Resumen .....	ix
1. ANTECEDENTES GENERALES	
1.1. Importancia de la amibiasis .....	2
1.2. Biología de <u>Entamoeba histolytica</u> .....	4
1.3. Epidemiología de la amibiasis .....	11
1.4. Manifestaciones clínicas .....	15
2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS	
2.1. Inmunología de la amibiasis .....	19
2.2. Procedimientos inmunológicos para el diagnóstico de la amibiasis .....	30
2.3. Antígenos relevantes en <u>E. histolytica</u> .....	40
3. HIPOTESIS .....	51
4. OBJETIVOS .....	53
5. ESTRATEGIA GENERAL .....	55

6.	<b>MATERIAL Y METODOS</b>	
6.1.	Origen de los sueros .....	61
6.2.	Obtención de heces .....	62
6.3.	Cultivo de heces en medio de Robinson .....	62
6.4.	Determinación del patrón isoenzimático por la técnica de Sargeaunt .....	64
6.5.	Hemaglutinación Indirecta .....	65
6.6.	Obtención de extractos solubles totales .....	66
6.7.	Cuantificación de proteínas de las preparaciones antigénicas obtenidas, aplicando el micrométodo de Lowry .....	69
6.8.	Separación de proteínas solubles de <u>E.histolytica</u> por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio	
	a) Preparación de geles a concentración constante 10% y en gradiente continuo (5-15%) .....	70
	b) Electroforesis del extracto soluble total ....	72
	c) Procedimientos de tinción del gel de poliacrilamida .....	72
6.9.	Transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa	
	a) Electrotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa .....	73
	b) Tinción de papel de nitrocelulosa .....	74
	c) Revelado de la reacción antígeno-anticuerpo ..	76

7.	<b>RESULTADOS</b>	
7.1.	Patrón isoenzimático .....	79
7.2.	Hemaglutinación Indirecta .....	82
7.3.	Determinación del rendimiento de proteínas en los extractos totales solubles del parásito .....	84
7.4.	Análisis electroforético de los extractos totales solubles del parásito .....	86
7.5.	Inmunolectrotransferencia .....	93
7.6.	Análisis del patrón de reconocimiento de antígenos de <u>E.histolytica</u> por los anticuerpos presentes en el suero de pacientes con infección intestinal por otros parásitos .....	101
7.7.	Análisis de los patrones de reconocimiento antigénico por los sueros de pacientes con parásitos de diferentes zimodemo .....	106
8.	<b>DISCUSION</b> .....	113
9.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	133
10.	<b>ANEXO</b> .....	136
11.	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	145

LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A</b>	Angström ( $10^{-10}$ )
<b>ADAT</b>	Amortiguador de dilución del 1er Anticuerpo en Transferencia
<b>AE</b>	Amortiguador de Electroforesis
<b>AL</b>	Aglutinación con partículas de látex
<b>anti-</b>	Anticuerpo contra-
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>AT</b>	Amortiguador para transferencia
<b>BMSE</b>	Buffer solubilizador de muestra para Electroforesis
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>CAC</b>	Coproanticuerpos
<b>CIEF</b>	Contrainmunolectroforesis
<b>Con A</b>	Concanavalina A
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	Sulfato de cobre con 5 moléculas de agua
<b>ELISA</b>	Inmunoensayo enzimático ligado a enzima (Enzyme linked immunosorbent assay)
<b>FB</b>	Floculación con Bentonita
<b>FC</b>	Fijación de Complemento
<b>Fe</b>	Hierro
<b>FPF</b>	Fijación en Papel Filtro
<b>Gal/GalNAC</b>	Galactosa/N-acetilgalactosamina
<b>GPI</b>	Enzima glucosa fosfatoisomerasa
<b>h</b>	hora(s)
<b>HCl</b>	Acido clorhídrico
<b>HE</b>	Enzima hexoquinasa

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
IA	Inmovilización de Amibas
ICF	Inmunoensayo en Capa Fina
ID	Inmunodifusión de Ouchterlony
IEF	Inmunolectroforesis
IET	Inmunolectrotransferencia (Immunolectro transfer blot)
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
Ig(s)	Inmunoglobulina(s)
IHA	Hemaglutinación Indirecta (Indirect Hemagglutination Assay)
INF-gamma	Interferón gamma
kDa	kilodaltones
LPPG	Lipopeptidofosfoglican
LPS	Lipopolisacáridos
M	Molaridad
mA	miliAmperes
ME	Enzima málica
mg	miligramos
mg/ml	miligramos por mililitro
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
min	minutos
mM	miliMolar
ml	mililitros
mm	milímetro
N	Normalidad
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio

NaOH	Hidróxido de sodio
nm	nanómetro ( $10^{-9}$ )
ng	nanogramos ( $10^{-9}$ )
PAGE-SDS	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PGM	Enzima fosfoglucomutasa
pH	Potencial de hidrogeniones
PHA	Fitoheماغلوتينina
pHMB	para-Hidroximercuribenzoato
PMAC	Precipitación en membrana de acetato de celulosa
PNC	Papel de Nitrocelulosa
PRA	Antígeno libre de glucógeno rico en polisacáridos
PT	Precipitación en tubo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N'-N'N'-tetrametildiamina
UI/ml	Unidades Internacionales/mililitro
$\mu\text{m}$	micrómetro ( $10^{-6}$ )
V	Voltios
xg	Unidades de centrifugación en gravedad
ZP	Zimodemo patógeno
ZNP	Zimodemo no patógeno

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo biológico de <u>Entamoeba histolytica</u> ....	6
Figura 2.	Diagrama sobre las vías aferentes y eferentes de la inmunidad mediada por células en la amibiasis invasora.....	25
Figura 3.	Esquema del sistema empleado para la transferencia de proteínas al Papel de Nitrocelulosa.....	75
Figura 4.	Estrategia general.....	56
Figura 5.	Estrategia experimental para estandarizar la Inmunolectrotransferencia.....	58
Figura 6.	Patrón isoenzimático de los parásitos presentes en las heces de individuos con amibiasis asintomática.....	80
Figura 7.	Frecuencia de títulos de anticuerpos determinados por Hemaglutinación Indirecta en muestras séricas de individuos infectados con <u>E.histolytica</u> de Zimodemo definido.....	83
Figura 8 A y B	Análisis electroforético de las fracciones solubles e insolubles de trofozoítos de <u>E.histolytica</u> tratadas bajo diferentes condiciones.....	87
Figura 9.	Análisis electroforético de extractos solubles de <u>E.histolytica</u> .....	94

Figura 10.	Tinción de Papel de Nitrocelulosa transferido con extracto total soluble de <u>E.histolytica</u> ..	96
Figura 11.	Identificación de antígenos de <u>E.histolytica</u> reconocidos por anticuerpos de pacientes asintomáticos determinado por Inmunolectro transferencia.....	98
Figura 12.	Reconocimiento de antígenos de <u>E.histolytica</u> por sueros de individuos con infección por otros parásitos intestinales.....	104
Figura 13.	Análisis por Inmunolectrotransferencia de muestras séricas de individuos asintomáticos infectados con <u>E.histolytica</u> de Zimodemo Patógeno.....	107
Figura 14. A y B	Análisis por Inmunolectrotransferencia de muestras séricas de individuos asintomáticos infectados con <u>E.histolytica</u> de Zimodemo No Patógeno.....	108

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Procedimientos inmunológicos empleados para el diagnóstico de amebiasis.....	31
Tabla 2.	Frecuencia y caracterización del Zimodemo de parásitos obtenidos de heces de individuos con amebiasis asintomática.....	81
Tabla 3.	Eficacia de la extracción de proteínas de trofozoitos de <u>E.histolytica</u> empleando diferentes métodos.....	85
Tabla 4.	Frecuencia en el reconocimiento de antígenos de <u>E.histolytica</u> en ensayos de Inmuno-electrotransferencia por sueros de pacientes con parásitos de Zimodemo determinado.....	111

Mi mas profundo agradecimiento para la Dra. Guadalupe Ortega-Pierres quien siempre me brindó su asesoría y apoyo para la realización de este trabajo y además, me brindó algo mas precioso: su amistad.

Mi agradecimiento para el Quím. Raúl Argüello García por su desinteresada colaboración y compañerismo durante el desarrollo del trabajo.

Al M. en C. Roberto Cedillo Rivera por sus sugerencias e interés en el desarrollo del proyecto.

A los integrantes del laboratorio 12 del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV porque con su convivencia y compañerismo hicieron grata mi estancia durante el desarrollo de este trabajo.

Lilián Yépez	Rocío Fonseca	Rosario Salinas
Raúl Argüello	Ramón Coral	Javier Hernández
Gaspar Herrera	Antonio Enciso	René López
	Arturo Pérez-Taylor	

A mi jurado con todo respeto:

Dr. Onofre Muñoz Hernández

M. en C. Irene de Haro Arteaga

Dra. Paz Ma. Salazar Schettino

M. en C. Alicia Valadez Salazar

Por su buena disposición y sugerencias

**RESUMEN**

## RESUMEN

Amibiasis es la infección en el humano causada por el parásito intestinal Entamoeba histolytica la cual puede manifestarse en forma sintomática intestinal o extraintestinal o bien ser asintomática. Se han propuesto muchos factores para explicar la variabilidad en el resultado de la interacción entre el huésped y el parásito. Entre éstas, está la diferencia en la virulencia de cepas de E.histolytica, y algunos métodos tales como la determinación del patrón isoenzimático (Zimodemo), se han aplicado en la diferenciación de cepas de este parásito (Sargeant y cols, 1978).

Con el objeto de establecer una posible correlación entre el análisis del zimodemo y los datos serológicos de individuos infectados con el parásito intestinal E.histolytica, se llevó a cabo un estudio epidemiológico transversal en la Comunidad de Cadereyta, Querétaro, México que es endémica para la enfermedad. Se colectaron 2,048 muestras de heces y suero de individuos portadores asintomáticos. En 80 de ellos se pudo establecer el Zimodemo de las amibas presentes en su intestino y se determinó el título de anticuerpos por Hemaglutinación Indirecta (IHA) y el reconocimiento de antígenos específicos de E.histolytica con la técnica de Inmunolectrotransferencia (IET).

En 25 casos, se identificó un patrón de zimodemo patógeno mientras que en 55 un no patógeno. Los valores obtenidos por IHA en las muestras séricas probadas variaron de negativos a 1:256 frente a una dilución menor a 1:8 y no mostraron correlación con el tipo de zimodemo determinado. La reactividad de los sueros hacia los antígenos de E.histolytica por la técnica de IET, resultó compleja y se observó reacción con varias proteínas del parásito independientemente del título de anticuerpos y del zimodemo del parásito recuperado de las heces. Entre estos componentes, los de 165, 119, 98-100, 65, 50-52 kDa fueron los mas frecuentemente reconocidos independientemente del zimodemo del parásito, aunque el grupo de sueros de individuos con parásitos de zimodemo no patógeno reconoció preferentemente la proteína de 165 kDa.

## **1. ANTECEDENTES GENERALES**

### 1.1. Importancia de la amibiasis.

El interés en el estudio de muchas enfermedades parasitarias se ha incrementado en los últimos 5 a 10 años, y en el caso de la amibiasis, las investigaciones han sido particularmente abundantes (Guerrant, 1986).

La amibiasis es la infección que ocurre en el humano por el protozoario intestinal Entamoeba histolytica y, aunque las formas intestinales de la enfermedad son las mas frecuentes, el daño extraintestinal (a hígado principalmente) es la causa principal de morbilidad y muerte (Martínez-Palomo, 1987).

A pesar de que los datos epidemiológicos son aún muy limitados, se estima en forma razonable que la amibiasis ocupa el tercer lugar entre las causas de muerte por parásitos y es una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial (WHO, 1969).

En algunas áreas geográficas, el parásito infecta a más del 40% de los individuos de la población desconociéndose las causas de ello. En la mayoría de los individuos, E.histolytica vive como comensal inocuo. En un pequeño porcentaje (1-10%), este parásito por mecanismos que actualmente están en investigación, puede causar enfermedad al invadir la mucosa del colon o diseminarse hacia otros órganos.

Un aspecto de importancia en el control de la amibiasis es el estudio de la respuesta inmune que se activa en el individuo infectado. La inducción de inmunidad protectora funcional en la amibiasis humana aún no se ha demostrado satisfactoriamente. Sin

embargo, se ha observado la producción de anticuerpos específicos en la amibiasis invasora (Kotcher, 1970; Elsdon-Dew, 1970; Krupp, 1970; Juniper y col, 1972; Mahajan y col, 1972 y Patterson y col, 1980), de ahí que las pruebas serológicas resulten muy importantes para su diagnóstico.

En los últimos 25 años se ha difundido el uso de técnicas inmunológicas para el diagnóstico de la amibiasis que resultan útiles no solo para el diagnóstico clínico de la enfermedad, sino también para el estudio epidemiológico de la misma (Healy, 1988).

En la actualidad los principales esfuerzos se han centrado en la identificación de moléculas que resulten específicamente antigénicas y que puedan ser empleadas en dichas pruebas inmunológicas, permitiendo establecer una correlación con el estado del paciente y la gravedad de la infección.

## 1.2. Biología de Entamoeba histolytica

El género Entamoeba incluye muchas especies relacionadas con el humano: E.histolytica (Schaudinn, 1903); E.hartmanni (Von Provazek, 1912); E.coli (Grassi, 1879; Hickson, 1909) y E.gingivalis (Gros, 1849; Smith y Barret, 1914), de éstas, sólo E.histolytica es causante de enfermedad.

La clasificación de las especies de Entamoeba se basa en el número de núcleos en la fase de quiste maduro, que pueden ser ocho, cuatro o uno. En el grupo de amibas con quistes tetranucleados encontramos a E.histolytica que se diferencia de E.hartmanni, cuyo quiste tiene también 4 núcleos porque ésta tiene un diámetro menor a 10  $\mu\text{m}$ , además de ser no patógena. También existe la cepa Laredo de E.histolytica que es también no patógena y crece a temperatura ambiente, y a E.moshkovskii que es una amiba de vida libre. Estos caracteres, aunados a otros de tipo morfológico, permiten una diferenciación con E.histolytica, organismo de interés en este estudio.

Dos de los aspectos más interesantes en la biología de E.histolytica son la inexplicable variabilidad en su potencial patogénico y la restricción por áreas geográficas de la forma invasora de la amibiasis, a pesar de la distribución mundial del parásito (Sargeant, 1988). En un ambiente adecuado en colon, el parásito sobrevive y generalmente permanece en la luz como un comensal, donde se multiplica y forma quistes sin producir un efecto patológico evidente. En algunas ciudades desarrolladas, sin

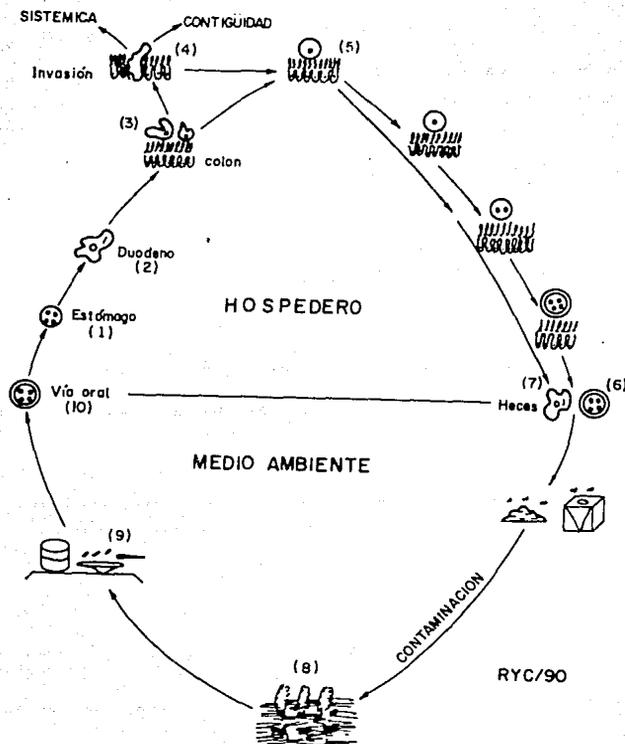
embargo, una infección en el humano con esta especie de Entamoeba se asocia comúnmente con la forma invasora de la enfermedad manifestada como disentería amibiana y/o amibiasis hepática.

La etapa quística<sup>(1)</sup> es la forma infectante para el hombre, ya que es altamente resistente a la destrucción por los factores ambientales y puede permanecer viable por muchas semanas, en presencia de humedad.

Cuando los quistes alcanzan el intestino delgado, desenquistan<sup>(2)</sup>, liberando una amiba tetranucleada, la cual probablemente se divide, aportando un sólo núcleo a ocho trofozoitos<sup>(3)</sup>. Estos trofozoitos son móviles y se adhieren a la superficie del intestino, principalmente en las áreas de estasis del colon y proliferan por división asexual<sup>(4)</sup> (Figura 1).

Las formas del parásito que se encuentran en los tejidos son llamadas trofozoitos<sup>(4,5)</sup>, éstos son las formas "comedoras" móviles con un sólo núcleo y pseudópodos. Los trofozoitos, arrastrados en la materia fecal, son estimulados a enquistarse en colon<sup>(6)</sup>, con la formación de barras cromatoidales, una pared quística y hasta 4 núcleos<sup>(7)</sup>. En las heces disentéricas o diarreicas debido al corto tiempo de tránsito, no se permite la formación de quistes y los trofozoitos pueden ser expulsados en la materia fecal<sup>(8)</sup>.

Los trofozoitos no juegan ningún papel en la transmisión de la enfermedad, excepto en la amibiasis cutánea, ya que su inmersión en agua o bien su desecación, resulta en una rápida destrucción de los mismos. Esta forma es la responsable de producir la patología en los tejidos.



**FIGURA 1. CICLO BIOLÓGICO DE *E. histolytica*.**

(1) Quiste tetranucleado (forma infectante), (2) Pérdida de quitina en fase de desengastamiento, (3) Trofozoitos jóvenes, (4) Reproducción asexual de trofozoitos, (5) Invasión a mucosa intestinal y diseminación, (6) Quiste "no patógeno" en la luz del intestino, (7) Quiste en heces, (8) Trofozoitos en heces, (9) Contaminación de vegetales con aguas negras, (10) Contaminación de alimentos por malas condiciones de higiene.

No se reconocen reservorios en la naturaleza involucrados en la epidemiología de la amibiasis humana, aunque se han estudiado primates infectados. Los únicos reservorios para la infección del hombre son los huéspedes humanos asintomáticos o portadores, los cuales continuamente eliminan quistes que accidentalmente llegan a los alimentos o son ingeridos cuando las condiciones de higiene son precarias<sup>(9,10)</sup>.

Un estudio detallado del ciclo biológico de E.histolytica fue hecho por Dobell en 1928 a partir de un cultivo de una amiba obtenida de un mono; pero más recientemente Baker y col (1972) caracterizaron el ciclo reconociendo el proceso de enquistamiento en amibas mantenidas en cultivo axénico.

Aspectos moleculares. Los trofozoítos de E.histolytica son anaerobios facultativos, requieren de un pH bajo (6-6.5) y un medio de cultivo complejo para su crecimiento. Son uninucleados, poseen una membrana doble de 120 Å, una área denominada uroide con vesículas hacia el exterior de la membrana celular, la cual está rodeada por un glucocálix externo veloso de 20-30 nm de grosor.

E.histolytica tiene estructuras tipo filamentos y actina, pero no hay microtúbulos citoplásmicos evidentes ni mitocondrias. La carga de superficie negativa parece ser menor en los trofozoítos patógenos, los cuales también han mostrado que poseen receptores para la Concanavalina A (Martínez-Palomo, 1973).

Los organismos carecen de: citocromos, vía metabólica clásica de Embden-Meyerhof, retículo endoplásmico rugoso, tubulina

citoplásmica y aparato de Golgi; tienen un sistema malato-deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y una capacidad limitada para consumir mas del 5% de O<sub>2</sub> (siempre y cuando sus proteínas hierro-azufre estén intactas y sus agentes reductores tales como la cisteína y el ácido ascórbico existan). Contienen también glucógeno, vacuolas digestivas, ectoplasma, endoplasma y cuerpos helicoidales de ribosomas, los cuales se asocian y forman los cuerpos cromatoidales. Los estudios de microscopía electrónica de transmisión y de barrido han revelado que este protozoo anaerobio es alargado y tiene polaridad, su superficie es irregular y presenta muchas vacuolas lisosomales fagocíticas que se tiñen con fosfatasa ácida (Weinbach y col, 1976; Kettis y col, 1977; Martínez-Palomo y col, 1974, 1982; WHO, 1981). Se han demostrado carbohidratos, lípidos y proteínas como componentes en la membrana plasmática y quitina en la pared quística.

Factores de patogenicidad. Por más de cinco décadas, los expertos en amibiasis han tratado de explicar el comportamiento peculiar de E.histolytica -frecuentemente como comensal y menos comúnmente como invasor- en base a 3 hipótesis diferentes: 1) E.histolytica es una sola especie que siempre produce ulceración intestinal, lo cual puede o no dar manifestaciones clínicas (Teoría unicista); 2) E.histolytica comprende a 2 especies diferentes de amibas que morfológicamente son similares y sólo una de las cuales es patógena (Teoría dualista) y 3) la especie E.histolytica está compuesta por un número desconocido de diferentes cepas que pueden actuar como

comensales en intestino (estado de portador o amibiasis luminal) o como patógenos que producen ulceración del intestino grueso y dan lugar a síntomas (amibiasis invasora) (Teoría pluricista) (Orozco y col, 1988).

Bajo condiciones en las cuales los portadores son seleccionados en base a la historia clínica negativa, ausencia de lesiones macroscópicas mostradas por rectosigmoidoscopia y serología negativa, los aislados de E.histolytica han mostrado que no son patógenos en animales de experimentación (Tanimoto-Weki y col, 1973).

Aunque estos y otros estudios han demostrado que las cepas de portadores difieren de las cepas invasoras, no hay aún suficientes evidencias que permitan separarlas como especies diferentes. El aislamiento reciente de un gran número de cepas de varias regiones geográficas, seguido por un estudio del patrón isoenzimático, han apoyado la hipótesis de que cepas invasoras y de portadores corresponden a especies diferentes, pero las enzimas que se estudian participan en la vía glucolítica del metabolismo del parásito y no juegan ningún papel en la patogénesis.

La clasificación de especies de Entamoeba en base a tal patrón isoenzimático fué iniciado por Reeves y Bischoff (1968) empleando un sistema de electroforesis en acetato de celulosa. Asimismo, Sargeant y col han llevado a cabo numerosas investigaciones en las cuales han aplicado tales técnicas para el estudio de isoenzimas de aislados de E.histolytica obtenidas de diferentes continentes (Sargeant y col, 1978, 1979, 1980a y b, 1982a y b, 1984). En base

a esto, hasta la fecha se han considerado los siguientes aspectos:

a) Las especies de amibas recuperadas del intestino de humanos se pueden caracterizar en base a su patrón isoenzimático; b) se han identificado un total de 22 zimodemos diferentes para cepas de E.histolytica obtenidas de diferentes áreas del mundo c) las amibas recuperadas de muestras de heces de casos bien caracterizados de amibiasis invasora (disenteria amibiana o amibiasis hepática) se agrupan en 10 patrones isoenzimáticos diferentes (II, II $\alpha$ -, VI, VII, XI-XIV, XIX y XX). Estos están definidos por la presencia de una banda beta y la ausencia de una banda alfa en la enzima fosfoglucomutasa y por una banda avanzada en la enzima hexocinasa a excepción del patrón XIII; d) todos los demás zimodemos (I, III-V, VIII, IX, X, XV-XVIII) se encuentran en las amibas aisladas de portadores asintomáticos; e) en países tales como Sud-Africa donde hay una alta prevalencia de amibiasis luminal (19.5%), el porcentaje de portadores infectados con E.histolytica que expresan un patrón patogénico es bajo (alrededor del 0.9%) (Sargeant, 1988).

Estos hallazgos parecen apoyar la hipótesis de Brumpt (1925) de que la amibiasis invasora, una importante causa de morbilidad en algunas partes del mundo, es causada por una especie de amiba que biológicamente es distinta de las amibas no patógenas, que tienen distribución mundial.

### 1.3. Epidemiología de la amibiasis.

a) Prevalencia. Las infecciones por E.histolytica están ampliamente distribuidas y producen una enorme carga de enfermos y muertes por colitis y amibiasis hepática. En algunas ciudades como México la amibiasis se cataloga entre las primeras 10 causas de muerte; mundialmente sólo la malaria y la esquistosomiasis causan un mayor número de muertes (Walsh, 1986).

El conocimiento sobre la magnitud y la epidemiología de esta infección se ha visto limitado por la carencia de pruebas confiables de diagnóstico. Considerando esto, las mejores estimaciones sugieren que en 1984 probablemente 500 millones de personas estaban infectadas con E.histolytica y 40 desarrollaron colitis incapacitante o abscesos extraintestinales. Al menos 40,000 muertes, durante ese año, se atribuyeron a la amibiasis (Walsh, 1986). Aún cuando falta mucho por aprender de la epidemiología de este padecimiento, el desarrollo de procedimientos de diagnóstico específicos y sensibles contribuirá de manera importante a este estudio.

La amibiasis intestinal existe casi universalmente, pero con la localización geográfica difieren la prevalencia de la infección y la incidencia de la enfermedad, probablemente porque la transmisión y la invasividad varían bajo diversas condiciones ecológicas y sociales. La ausencia de trabajos publicados sobre amibiasis en algunas áreas específicas del mundo (por ejemplo Afghanistan, Etiopía y otros) probablemente refleje la falta de

interés por parte de los médicos por investigar el padecimiento, más que la ausencia del parásito en la región. Los estudios parasitológicos y seroepidemiológicos de varias partes del mundo tienen muchas limitaciones, de tal forma que se hace difícil su comparación entre ellos debido a las diferencias en los procedimientos metodológicos usados en el diagnóstico de la infección, como por ejemplo en el manejo de la materia fecal, su recolección, concentración, tinción y cultivo. La habilidad del observador para interpretar los resultados de los diferentes procedimientos serológicos que actualmente existen como la IHA, inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunoensayo enzimático (ELISA), inmunoelectroforesis (EFI), inmunodifusión (ID), CIEF, fijación de Complemento (FC) y Aglutinación con partículas de Látex (AL), entre otras. Estas técnicas también presentan diferencias en cuanto al antígeno empleado, el título de anticuerpos considerado como positivo, la persistencia de anticuerpos en el individuo, entre otras cosas (Walsh, 1986). Otros aspectos que hacen difícil una comparación entre los estudios existentes es el error en la selección de la muestra de la población así como la dificultad de identificar cepas patógenas.

**b) Transmisión.** Los requisitos para que ocurra la transmisión se pueden cumplir en todos los tipos de ambientes, ya que el organismo tiene prácticamente una distribución mundial. El fenómeno de transmisión se puede analizar describiendo los factores tanto del parásito como del humano que afectan.

Entre los factores del parásito se considera que la etapa

infecciosa es el quiste tetranucleado que puede sobrevivir en ambientes líquidos y húmedos por largos periodos de tiempo. Por otro lado, los trofozoítos no son importantes en la transmisión puesto que son extremadamente sensibles al ambiente y mueren rápidamente ante cualquier cambio en el mismo, como puede ser la desecación, la digestión enzimática de estómago e intestino. Por lo tanto, aquellos individuos en fase aguda que excretan principalmente trofozoítos, no son los transmisores importantes de E. histolytica al igual que los individuos que padecen amibiasis hepática puesto que raramente excretan un número considerable de quistes.

Finalmente, los quistes inmaduros parecen sobrevivir menos en el medio que los quistes maduros tetranucleados, aunque se requieren estudios más completos al respecto.

El análisis de los factores del huésped que determinan que la transmisión ocurra, conduce a analizar la capacidad del humano para ser reservorio, así como la susceptibilidad a la infección, la cual parece general, aunque factores socioeconómicos, nutricionales y los inherentes al parásito pueden influir en la invasión tisular y la subsecuente morbilidad. Las infecciones experimentales en el hombre con E. histolytica se han producido con inóculos de 2-4 mil quistes administrados por vía oral (Beaver, 1956). Sin embargo, existen evidencias de que se puede producir también con un sólo quiste (Walker y col, 1913). Una vez ingeridas las formas infectantes, en aproximadamente cinco días empiezan a excretarse quistes maduros. En este caso, el periodo medio de incubación es

mucho mayor, por lo que se dice que éste depende del tamaño del inóculo.

Se reconoce que un portador asintomático puede excretar más de 15 millones de quistes por día. Esto varía diariamente, pues las muestras de heces de individuos portadores crónicos son positivos unos días y otros no y en estos casos sólo una proporción de quistes son tetranucleados y maduros. La infección crónica puede perdurar por largos períodos de tiempo (Healy, 1986).

La provisión de agua de buena calidad que ha sido filtrada y tratada químicamente, probablemente no afecta de manera importante la diseminación de quistes, puesto que la mayor proporción de infecciones ocurre a través de alimentos contaminados. Para reducir la transmisión probablemente sea más importante aumentar la cantidad de agua como un prerrequisito para mejorar la higiene antes que mejorar su calidad. Con una mejor higiene personal se tendría menos contaminación de manos y alimentos. Se ha demostrado, que el mejoramiento en la higiene personal y doméstica reduce la tasas de incidencia de diarreas infecciosas al 14-48% (Donta y col, 1977). En este aspecto se han realizado muchos estudios para medir tal reducción en la tasa de infección por Shigella, sin embargo, aún no se han realizado estudios que analicen específicamente la incidencia y prevalencia de la amibiasis.

De los factores del ambiente, se considera la temperatura y el clima. Se conoce que los quistes de E. histolytica son sensibles a temperaturas mayores de 34°C y a los efectos de la luz solar y la desecación (Feachem y col, 1983).

#### 1.4. Manifestaciones clínicas.

Los síndromes clínicos que resultan de la interacción de los factores del huésped con los del parásito varían desde una infección asintomática, una enfermedad intestinal invasora que puede diseminarse a piel u otros órganos, o bien una forma persistente o crónica.

a: Infección asintomática (colonización luminal). La gran mayoría de las infecciones en humanos con E.histolytica (80-99%) son asintomáticas. Estas infecciones usualmente se detectan al practicar un examen de rutina de heces por la excreción de quistes o bien en un examen serológico. Se ha detectado que 2-40% de la población excreta quistes (Elsdon-Dew, 1968; Meerovitch y col, 1978), lo cual depende de la zona y del nivel de sanidad e higiene de la misma.

b: Infección sintomática limitada a colon. Cuando ocurre la invasión a mucosa intestinal, lo más frecuente es que sea en colon ascendente, rectosigmoides y apéndice. Las lesiones ocasionadas por el parásito se localizan a través de las capas de mucosa y tienen la apariencia de úlceras en forma de matraz y pueden identificarse como áreas ligeramente elevadas en un punto amarillento con hemorragia petequiral.

El periodo de incubación es de una a 4 semanas pero puede ser tan prolongado como un año (Bundesen y col, 1936; Craig, 1917). El

inicio puede ser insidioso con dolor en la parte inferior del abdomen o bien ser evidente con diarrea simple, diarrea sanguinolenta, disentería (con o sin tenesmo) o tifoepidemicidad.

El riesgo de una enfermedad más seria y fulminante se ha asociado con los primeros años de vida, embarazo, desnutrición, enfermedad sistémica subyacente y terapia con corticosteroides.

En la forma moderada de la enfermedad el inicio puede ser gradual y la diarrea moderada con síntomas generales ligeros. El tenesmo de la disentería amibiana es usualmente menos severo que el de la disentería bacilar (shigelosis).

En ciertas regiones tales como México y Venezuela, 2-15% de todos los casos de diarrea aguda en niños que requieren hospitalización, están asociadas con una infección por E. histolytica (Gutiérrez-Trujillo, 1979; Romer y col, 1978). En un proceso de disentería amibiana, la leucocitosis sistémica es común pero en heces estas células pueden aparecer picnóticas o bien no existir, probablemente por el efecto letal del parásito sobre los leucocitos.

Se ha reconocido que 1-4% de los casos pueden desarrollar complicaciones al cursar con una amibiasis intestinal siendo las más comunes la perforación intestinal y la subsecuente colitis fulminante. Algunos individuos pueden desarrollar una masa inflamatoria en colon, llamada ameboma, que radiográficamente resulta indistinguible del carcinoma. Ocasionalmente, la infección puede extenderse a partir de una colitis severa a la región perianal, perineal o a pene. Otra complicación menos común de una

rectocolitis amibiana es un intestino crónico irritable, el cual se conoce como colitis ulcerativa post-disentérica.

c: Amibiasis extraintestinal. La amibiasis extraintestinal puede desarrollarse junto con la disentería amibiana. El momento de su aparición puede variar desde unos cuantos meses hasta años después de iniciada la disentería (Adams y col, 1977a y b). En más de 50% de los casos, puede no estar asociado con una historia clínica de amibiasis intestinal. El hígado es el órgano al que mas comunmente se disemina la infección. Los síntomas que se presentan pueden involucrar pérdida de peso, adelgazamiento y fiebre moderada, o bien, una enfermedad febril aguda asociada con dolor vago en el cuadrante superior derecho, dolor a la palpación entre las costillas o malestar pleurítico referido al hombro derecho. Es frecuente ver anemia, leucocitosis, concentración elevada de fosfatasas y transaminasas. Es rara la hepatitis. El diagnóstico se realiza comunmente en base a la sintomatología que refiere el paciente, apoyada en una cuenta alta de leucocitos y existencia de lesiones ocupantes en hígado demostrado por alguno de los siguientes métodos: radiografía de tórax, gammagrafía, ultrasonido o tomografía axial computarizada las cuales muestran que se trata de un sitio ocupante único (78%) en el lóbulo derecho (77%) (Cuarón y col, 1972).

En algunos casos, puede presentarse una extensión directa o metastásica al espacio pleural o pericardio o bien a sitios mas distantes como cerebro, pulmón o riñón (Guerrant, 1986).

## 2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS

## 2.1. Inmunología de la amibiasis.

Aunque se reconoce que Entamoeba histolytica induce ambos tipos de respuesta inmune (humoral y celular), aún no se ha establecido que mecanismos del huésped son responsables de la limitación de la invasión por las amibas y cuales lo protegen de una infección invasora recurrente (Trissl, 1982).

Dentro de los eventos celulares que ocurren durante la infección se pueden enlistar los siguientes: 1) adherencia a la mucosa de colon resultando en colonización intestinal, 2) ruptura de la barrera intestinal por enzimas o toxinas proteolíticas de secreción, 3) lisis de células epiteliales y células de respuesta inflamatoria del huésped que resultan en ulceración de colon e invasión a tejidos mas profundos o a un órgano distante (por ejemplo hígado) y, 4) eficiencia de los mecanismos de defensa inmune del hospedero.

a) Mecanismos de defensa inmunes y no inmunes. Se ha reconocido que el microambiente en el que se desarrolla E. histolytica cuenta con diferentes factores que determinan en mayor o menor grado el que invadan o no el intestino. Entre estos factores se describen pH, moco y flora intestinales, potencial redox, tensión de oxígeno, tipo de metabolitos y anticuerpos sintetizados localmente.

i) Mecanismos no inmunes: Tradicionalmente se ha pensado que las bacterias promueven el comensalismo de las amibas (Ravdin, 1988). Existen varias observaciones que apoyan la idea de que

existen cepas que pierden su resistencia al complemento durante el proceso de axenización (Gillin, 1988), mientras que al reasociarlas con una bacteria, como por ejemplo con Escherichia coli, pueden recuperar su resistencia a complemento y hacerse más virulentas. Por otro lado, en 1984 Bracha y col observaron que al axenizar amibas en presencia de una tensión baja de oxígeno, éstas se hacen más virulentas. Las bacterias afectan también las condiciones fisiológicas y nutricionales del intestino y por ello pueden modificar las tensiones de O<sub>2</sub> y el potencial redox, produciendo grandes cantidades de diferentes metabolitos como ácidos grasos de cadena corta, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y otros ácidos como el succínico y el láctico (Roediger, 1982).

Las bacterias también pueden afectar el establecimiento de las amibas al competir con éstas por el hierro (Fe). Diamond y col (1978) proponen que la capacidad fijadora de las bacterias y los niveles bajos de Fe, pueden representar un mecanismo potencial de resistencia en el cual al secuestrar éstas al Fe limitan el crecimiento de las amibas.

En la luz del intestino, E.histolytica está expuesta a muchos productos de la digestión del huésped, como el colesterol, el cual se ha observado que incrementa su virulencia (Martínez-Palomo, 1982; Sharma, 1959; Biagi y col, 1962; Gargouri, 1967).

Por otro lado, se ha propuesto que la leche contiene una lipasa que es estimulada por las sales biliares, la cual produce diversos productos que son tóxicos para E.histolytica (Gillin y col, 1983, 1985, 1988).

Respecto al papel que desempeña el moco en la amibiasis, se ha observado un mecanismo protector al atrapar trofozoítos e impedir su adhesión a las células del epitelio intestinal bloqueando receptores de alta afinidad. Se ha demostrado que el moco posee ácido siálico, el cual resulta quimiotactante para este parásito (Bailey, 1982) además de N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina. Sin embargo, E.histolytica posee la enzima N-acetilglucosaminasa con lo cual puede destruir esta barrera del intestino (Lundblad y col, 1981). Estos datos sugieren la necesidad de determinar si E.histolytica se ve favorecida o no con los efectos del moco sobre los trofozoítos.

ii) Mecanismos inmunes: Poco se sabe respecto al papel que desempeñan los factores inmunes humorales de intestino que se producen como resultado de la presencia de E.histolytica; sin embargo, se han podido detectar coproanticuerpos por medio de IHA en títulos que varían de 1:128 a 1:1024 en el 80% de los pacientes con amibiasis (Sharma y col, 1978). En un trabajo de Acosta y col (1982), se demostró que los anticuerpos presentes en el contenido intestinal en ratas inmunizadas con trofozoítos corresponden a Igs tipo A, la cual también se ha demostrado en calostro.

Existe gran dificultad para estudiar la respuesta inmune intestinal y su relación con la infección por E.histolytica, pues falta aún reconocer su papel protector in vivo y de igual forma hay pocos estudios acerca de la interacción de este parásito con las células que participan en la respuesta inflamatoria. Aún cuando se ha descrito que las amibas pueden destruir leucocitos in vitro,

estas células también pueden destruir in vitro a las amibas (Guerrant, 1981; Martínez-Palomo, 1982).

En la disenteria causada por bacterias, se ha demostrado que se estimula una respuesta inflamatoria vigorosa con presencia de leucocitos en tejido y heces; por el contrario, la respuesta inflamatoria que se genera en la amibiasis intestinal es moderada o ausente (Biagi y col, 1961). Realmente no se sabe si dicha respuesta es moderada o si las células que participan son destruidas por las amibas. Algunos estudios histopatológicos han demostrado la presencia de amibas cercanas al foco de lisis epitelial y frecuentemente se les observa con eritrocitos ingeridos y en estrecho contacto con las células inflamatorias de la superficie del epitelio intestinal, tales como polimorfonucleares y eosinófilos ingeridos y destruidos por la amiba. Estas células se observan en las lesiones tempranas de amibiasis intestinal, posteriormente pierden sus características de tinción y/o son destruidas por las amibas (Prathap y col, 1970; Griffin y col, 1971).

Aún no se ha dilucidado completamente el tipo de interacción que E. histolytica establece con elementos inespecíficos del sistema inmune en la luz del intestino con el moco y los compartimentos tisulares, a pesar de la importancia obvia para conocer más de la biología del organismo y de la fisiopatología de la enfermedad (Gillin, 1988).

b). Respuesta inmune celular. Estudios de Stern y col en 1984, con un modelo experimental usando ratones desnudos a los que se

indujo amibiasis hepática, han resaltado la importancia del macrófago como una célula efectora crítica del huésped. Estas observaciones in vivo han indicado que los mecanismos inmunes mediados por células fueron responsables en la limitación de la diseminación por metástasis o por contigüidad de la amibiasis hepática así como de proveer protección contra su recurrencia. Estos modelos han servido de base para todos los estudios que se han llevado a cabo en humanos.

Guerrero y col (1976) demostraron que los linfocitos de pacientes recuperados de amibiasis hepática son citotóxicos para los trofozoítos de E.histolytica, posiblemente por algún producto celular secretado, ya que el sobrenadante de los linfocitos obtenidos después de la incubación con antígenos amibianos, fue amebicida.

Asimismo, estudios in vitro han demostrado que puede ocurrir citólisis celular dependiente de anticuerpos por monocitos al recubrir los eritrocitos con antígenos amibiano en presencia de suero inmune, lo que no ocurre con las células mononucleares (Stemberger, 1978). Los macrófagos, a través de mecanismos oxidativos y no oxidativos parecen estar involucrados en la muerte celular (Murray, 1981). Este autor había reportado previamente un efecto deletéreo de los radicales oxidativos ( $H_2O_2$ ) sobre los trofozoítos de E.histolytica.

Salata y col (1984) observaron la muerte de trofozoítos amibianos por monocitos derivados de macrófagos, activados con Con A o con fitohemaglutinina (PHA) y al añadir suero inmune no se

potenció la muerte de las amibas, lo cual parece indicar que es un proceso independiente de anticuerpos. Estudios por microscopía, de cinética y de adherencia demuestran la necesidad de contacto para que la muerte celular ocurra.

En estudios in vitro se ha podido demostrar que los linfocitos T citotóxicos son capaces de destruir trofozoitos de E. histolytica patógenos. En estudios con anticuerpos monoclonales contra OKT8 y complemento, la actividad amebicida de los linfocitos T citotóxicos estimulados con PHA se vió completamente abolida, lo que sugiere que el fenotipo T8 es el responsable de la actividad amebicida (Salata, 1984).

En la Figura 2 se muestra un modelo que Salata y Ravdin, (1986) proponen para explicar la posible participación de la respuesta inmune celular en la amibiasis invasora.

Estudios recientes demuestran que el interferón gamma (INF-gamma) es una linfocina involucrada en la activación de los linfocitos mononucleares para la muerte o inhibición del crecimiento intracelular de numerosos organismos tales como los siguientes protozoarios parásitos: Toxoplasma gondii, Leishmania donovani y Trypanosoma cruzi (Murray y col, 1983; Pfefferkorn y col, 1984; Wirth y col, 1985). Salata y col (1987) examinaron el papel del INF-gamma in vitro en la activación de macrófagos derivados de monocitos como responsables de la muerte de trofozoitos de amibas patógenas. Al añadir anticuerpos anti-INF-gamma se inhibió en gran medida, aunque no completamente, la capacidad de la Con A o de otras linfocinas inducidas por antígenos

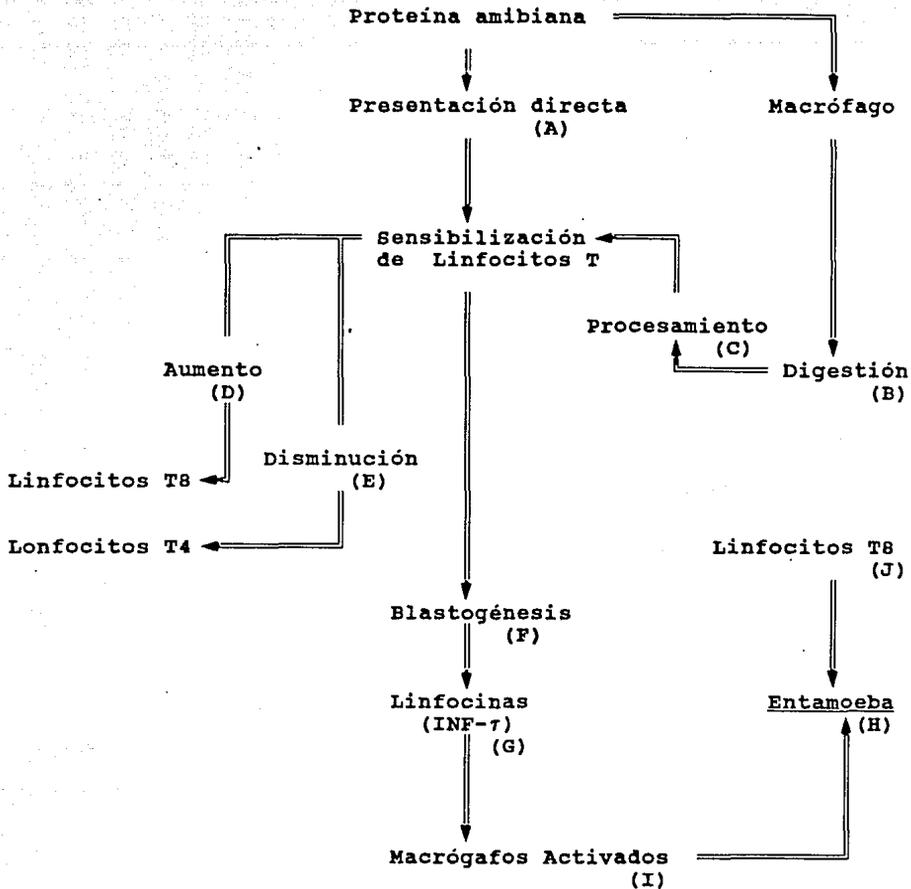


FIGURA 2. DIAGRAMA SOBRE LAS VÍAS AFERENTES Y EFERENTES DE LA INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS EN LA AMIBIASIS INVASORA. En el esquema propuesto por Salata y col (1986) los antígenos ambientales se presentan directamente a células T (LT) (A) o bien después de ser ingerido (B) y procesado (C) por macrófagos. Esta interacción produce cambios en la subpoblación de LT con un incremento en la subpoblación supresoras/ citotóxicas (D) y un decremento en la subpoblación ayudadora/inductora (E). La sensibilización de LT resulta en proliferación (F). Ambos eventos se asocian con producción de linfocinas (G), particularmente  $INF-\gamma$ , que actúa sobre macrófagos (H). Se ha demostrado actividad contra E.histolytica (H) por los macrófagos activados (I) y por los LT citotóxicos (J).

amibianos para activar a los macrófagos que destruyen al parásito.

El análisis de diferentes pruebas que valoran la inmunidad celular tales como la reacción intradérmica, la prueba de la inhibición de macrófagos y la transformación blastogénica hechas por Sepúlveda y col (1982) indican que los anticuerpos circulantes, el complemento y la inmunidad mediada por células participan en la defensa específica de especie contra la invasión de E.histolytica. Los eventos en la secuencia de la respuesta inmune sugieren que la inmunidad celular se desarrolla después. Esto puede indicar el papel de la respuesta inmune mediada por células en la resistencia a la reinfección por E.histolytica.

c) Respuesta inmune humoral. Se desconoce con detalle el papel que desempeñan los anticuerpos que se generan en el huésped en contra de E.histolytica, aunque se han observado anticuerpos antiamibianos específicos tanto locales como sistémicos durante una amibiasis invasora en el humano (Salata, 1988a y b). Además, el inicio de la enfermedad se ha asociado con niveles elevados de anticuerpos séricos (Krupp, 1970; Healy y col, 1970). Se ha demostrado que estos sueros son capaces de causar la muerte a los trofozoítos mediante la activación del complemento.

En estudios seroepidemiológicos, 80-100% de los pacientes con infección invasora de colon o amibiasis hepática desarrollan anticuerpos antiamibianos específicos para E.histolytica del tipo IgG (Thompson y col , 1968; Kessel y col, 1965; Junniper y col, 1972; Patterson y col, 1980; Krupp, 1970 y Kotcher y col, 1970).

Por otra parte Thompson y col en 1970, consideraron que los

individuos con infección colónica asintomática, en una frecuencia muy baja, desarrollan una respuesta inmune que resulta en la producción de anticuerpos. En un estudio hecho por Savanat y col (1974) se encontró una frecuencia relativamente alta de individuos con anticuerpos séricos pero que clínicamente son asintomáticos y eliminan quistes de amibas en las heces. En base a lo anterior Trissl (1982) y Elsdon-Dew (1970) han considerado que ésto es resultado de una infección subclínica o mas bien de una amibiasis invasora previa, pero si el titulo de los anticuerpos detectados es alto, ésto se asocia más con el inicio de la enfermedad.

Aunque el procedimiento metodológico para la detección de los anticuerpos séricos no ha sido el mismo en los diferentes estudios realizados ni el momento de la enfermedad en el cual se recupera la muestra, se ha podido establecer que las Igs G totales se encuentran significativamente elevadas, lo que no ocurre con las IgM e IgA (Trissl, 1982).

En otras infecciones causadas por protozoos se reconoce que hay una producción policlonal de anticuerpos; en la amibiasis no se conoce si la elevación de la IgG es completamente específica para E.histolytica.

Se ha demostrado que antígenos de este parásito son capaces de inducir una respuesta inmune de hipersensibilidad inmediata en individuos de áreas endémicas que se encontraban previamente sensibilizados, lo que sugiere que este tipo de respuesta inmune puede participar en los mecanismos patogénicos de la amibiasis invasora, pero no se ha reportado la detección de IgE. Sin embargo

cuando E. histolytica se asocia con una infección por helmintos, se logran detectar títulos muy bajos de IgE (Maddison y col, 1968; Savanat y col, 1973; Bilgees y col, 1979; Kagan, 1973).

Se ha reportado que las Igs pueden detectarse durante 2 a 11 años. La causa de esta persistencia puede deberse a infección o estimulación antigénica continua (Juniper y col, 1972; Patterson y col, 1980; Healy y col, 1970).

Al mismo tiempo que se producen los anticuerpos circulantes, se genera una gran cantidad de antígenos lo que da lugar a la formación de complejos solubles que podrían participar en la patogénesis de la enfermedad (Gandhi y col, 1988). A este respecto, no se ha demostrado si el complemento se consume o si se presentan manifestaciones clínicas propias de la enfermedad causada por complejos inmunes, aunque los niveles de complemento en el líquido de la lesión en hígado se encuentran disminuidos. Esto hace suponer que dichos complejos podrían contribuir a la patogenia local.

Muchos estudios han demostrado la presencia de copro-anticuerpos en la amibiasis intestinal (Shaalan y col, 1970; Mahajan y col, 1972; Sharma y col, 1978 y Martínez-Cairo y col, 1979). Se ha observado que el tipo de anticuerpo presente es IgA principalmente el cual, en comparación con los anticuerpos séricos, sólo persiste por cortos periodos de tiempo (Sharmay col, 1981). A este respecto se requieren más estudios, y quizá el contar con un modelo animal adecuado.

En un breve análisis respecto al efecto que tiene el complemento sobre los mecanismos de defensa del huésped, se

considera que éste puede participar en 1) lisis directa, como resultado de la activación del complemento sobre la superficie celular sin participar los anticuerpos; 2) daño por el complemento en presencia de anticuerpos y 3) muerte de las amibas mediado por células fagocíticas.

Esto sugiere que la actividad amebicida del suero depende de la actividad del complemento ya sea por la vía alterna o por la vía clásica, como se ha demostrado en diferentes trabajos (resumidos por Calderón, 1988). Por otro lado, Reed y col (1983), han demostrado que cepas patógenas de E.histolytica fueron resistentes al complemento humano, mientras que las cepas no patógenas fueron susceptibles a éste. Otros estudios han demostrado que la exposición in vitro al complemento resulta en amibas con mayor capacidad fagocítica y citotóxica, de ahí que la virulencia en las amibas pueda ser inducida o aumentada por efecto de algunos componentes del huésped.

## 2.2. Procedimientos inmunológicos para el diagnóstico de la amibiasis.

El diagnóstico de la amibiasis frecuentemente se logra empleando uno o mas de los métodos siguientes: clínico, de laboratorio, gabinete y epidemiológico. En el primer caso, los signos y síntomas que aparecen en el cuadro clínico de la amibiasis, pueden permitir el diagnóstico clínico. La respuesta a la pregunta de Mairgairith "unde venis" (De dónde vienes?) asociada a la enfermedad por E.histolytica puede justificar en algunos casos el dar tratamiento al paciente sin un diagnóstico de laboratorio previo ante la sospecha epidemiológica del padecimiento.

Finalmente, la identificación del agente causal, permite confirmar la enfermedad. Para ello se requiere de exámenes de laboratorio, ya sea para demostrar directamente la presencia del organismo, de antígenos o anticuerpos en suero, heces u otros productos biológicos.

El empleo de técnicas inmunológicas para el diagnóstico de la amibiasis ha ido en aumento en los últimos 25 años, lo cual ha permitido tener un mayor conocimiento de la enfermedad (Sepúlveda, 1976; Ackers, 1982; Martínez-Palomo, 1982; Trissl, 1982; Kretschmer, 1986 y Salata y col, 1986).

Actualmente se reconocen 14 pruebas serológicas que han sido aplicadas para el diagnóstico de la amibiasis, de las cuales sólo la tercera parte son actualmente empleadas en el laboratorio de diagnóstico de rutina. En la Tabla 1, se enlistan éstas.

**TABLA 1. PROCEDIMIENTOS INMUNOLOGICOS EMPLEADOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA AMIBIASIS.**

	Fijación de Complemento (FC)
	Inmovilización de Amiba (IA)
	Fijación en Papel Filtro (FPF)
	Inmunoensayo en Capa Fina (ICF)
	Precipitación en Membrana de Acetato de Celulosa (PMAC)
	Floculación en Bentonita (FB)
	Aglutinación en Látex (AL)
**	Inmunodifusión de Ouchterlony (ID)
	Precipitación en Tubo (PT)
	Inmunoelctroforesis (IEF)
**	Contrainmunoelctroforesis (CIEF)
**	Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)
**	Hemaglutinación Indirecta (HAI)
**	Ensayo del Inmunoabserbente Ligado a Enzima (ELISA)
	Western-Blot (WB)

\*\* Técnicas que actualmente se emplean en los laboratorios para diagnóstico de rutina. Fuente: Healy, G., Cap. 41, Ravdin (edit), 1988.

A partir del desarrollo de medios de cultivo axénicos que permitieron el crecimiento y reproducción de trofozoitos de E. histolytica in vitro (Diamond, 1961), se ha asegurado una fuente de trofozoitos que pueden emplearse directamente o para la obtención de antígenos. La mayoría de los antígenos empleados para serodiagnóstico en los últimos 20 años se han obtenido de trofozoitos crecidos en dicho medio de cultivo. Existe en la literatura una gran cantidad de procedimientos para la obtención de antígenos (Swart y col, 1962; Thompson y col, 1968; Ali-Khan, 1974; Jatinandana y col, 1975; Krupp, 1977; Bos, 1977; Thammapalerd y col, 1980).

A pesar de los esfuerzos para definir aquella(s) molécula(s) antigénica(s) que tenga(n) un uso potencial en el diagnóstico serológico, el consenso de la mayoría de los investigadores es que aún no se cuenta con el(los) antígeno(s) adecuado(s).

En 1983, Aust-Kettis y col probaron diferentes fracciones de un extracto soluble completo de E. histolytica cepa NIH-200 y sugirió que un extracto soluble es superior cuando se compara con varios extractos purificados ya que no encontró una correlación entre los síntomas clínicos, la duración de la enfermedad, el origen de la cepa amibiana y una fracción antigénica relevante.

Para 1986, Joyce y Ravdin haciendo uso de la inmunoelectrotransferencia observaron que al menos 9 antígenos idénticos fueron reconocidos por sueros de humanos con amibiasis hepática usando una preparación de antígeno amibiano soluble completo.

Con respecto a la utilidad de desarrollar una prueba inmunológica, se pueden hacer las siguientes consideraciones: 1) es de ayuda para el diagnóstico clínico, epidemiológico y para la decisión terapéutica, especialmente en el caso de individuos con amibiasis hepática donde la detección del organismo no es posible; 2) en los casos de amibiasis intestinal sintomática que cursa con diarrea sanguinolenta o colitis crónica y después de que los procedimientos para la demostración del parásito han fallado como son examen de heces, endoscopia, biopsia.

A continuación se hace una breve análisis de los diferentes métodos que se han empleado para el diagnóstico de la enfermedad:

1. Fijación del Complemento (FC). Kessell y col en 1965 reportaron buenos resultados en el uso de la FC en los casos de amibiasis extraintestinal, lo mismo que Robinson (1972). Cuando Krupp y col (1971) compararon este método con la IHA y con la ID, reportaron una mejor capacidad para la detección de antígenos en la FC. Felgner y col (1973) reportaron también buenos resultados en los casos de amibiasis extraintestinal documentada, pero se detectan falsos positivos con el suero de individuos portadores de otras amibas, lo cual explica en razón de que actualmente no se emplea como diagnóstico de rutina. Así mismo, desde que se pudieron producir antígenos a partir de cultivos axénicos, muy pocos investigadores han empleado la FC como un procedimiento de rutina.

2. Inmovilización de Amibas (IA). El fundamento de la técnica reside en la inmovilización de las amibas después de redondearse por efecto de los anticuerpos presentes en sueros inmunes. Aunque

Biagi y col desarrollaron la técnica en 1961, en la actualidad no se ha reportado su uso. Prakrash (1969) la compara con IHA y considera que la IA es más sensible.

3. Fijación en Papel Filtro (FPF). En 1976, Ruiz-Castañeda publica por primera y única vez el uso de este procedimiento que consiste en poner antígenos de amiba sobre papel filtro y suero. Si éste contiene anticuerpos antiambianos, al añadir azul de bromofenol se presenta una reacción colorida.

4. Precipitación en Membrana de Acetato de Celulosa (PMAC). El primer reporte de este método fue hecho por Sodeman y col (1973) aunque Stamm y col (1977) la utilizan empleando acetato de celulosa como soporte para detectar la reacción antígeno-anticuerpo, después de teñir con nigrosina. Esta es una prueba relativamente rápida ( $\approx 4$  h) cuando se compara con la ID (24-48 h). Esta técnica actualmente no está en uso.

5. Inmunoensayo en Capa Fina (ICF). Nilsson en 1980 reportó una adaptación del procedimiento propuesto por Elwing (1976) para la detección de anticuerpos antiamiba. En una caja de Petri de poliestireno con agar se hacen orificios donde se colocan los antígenos seguido por los sueros de los pacientes en estudio. La reacción se magnifica recubriendo con anti-IgG o anti-IgM. Una desventaja de esta prueba es el gran tiempo que se emplea para llevarla a cabo, por lo cual no se usa actualmente en estudios de rutina.

6. Floculación con Bentonita (FB). Haciendo una modificación al método aplicado al estudio de la triquinosis, Tupasi y col

(1970) aplican la floculación con bentonita para el estudio de la amibiasis. Al hacer la comparación con otras pruebas inmunológicas como HAI e IFI, diferentes autores están de acuerdo en que es útil cuando se emplea para el estudio de un número pequeño de sueros pues una desventaja de esta técnica es la necesidad de sensibilizar bentonita cada 72 h.

7. Aglutinación con partículas de Látex (AL). El uso de partículas de látex sensibilizadas con antígenos de amibas para el serodiagnóstico de la amibiasis fué reportado inicialmente por Morris y col (1970, 1971). Se reconoce que puede ocurrir una floculación inespecífica en presencia de factor reumatoide, lo que ha impedido su uso en estudios de laboratorio de rutina, por lo cual no está disponible comercialmente.

8. Inmunodifusión de Ouchterlony (ID). En 1963, Atchley y col probaron por primera vez la precipitación de la reacción antígeno-anticuerpo en geles de agar. Recientemente Katzenstein y col (1982) utilizaron este procedimiento y otros más para el diagnóstico de individuos con amibiasis hepática aguda o crónica. En Sudáfrica (Powell y col, 1964; Maddison y col, 1965), en la India (Vinayak y col, 1974) y en Nigeria (Atakpa y col, 1978) se emplea para el diagnóstico de la enfermedad. En nuestro país se dispone de antígeno en el comercio para realizar la prueba.

9. Precipitación en Tubo (PT). En esta técnica se incluye una modificación del método anterior que consiste en el empleo de tubos microhemáticos. Powell (1968) la utiliza para el diagnóstico de la amibiasis; no se reconoce en la actualidad su uso para el

diagnóstico rutinario.

10. Inmunolectroforesis (IEF). En 1965 fué Maddison quién investigó el uso de esta técnica para el diagnóstico de la amibiasis. Krupp y col (1971) fueron capaces de distinguir entre anticuerpos de una infección activa, de los anticuerpos persistentes después de la curación, por el patrón de arcos que se observa asociado al título de anticuerpos detectados por IHA. La desventaja que presenta este método es que se requiere de mucho tiempo para su realización y una gran cantidad de reactivos. Aunque no es útil para el diagnóstico de rutina, se le considera como una excelente arma de investigación para el estudio de los antígenos de E. histolytica.

11. Contraínmunolectroforesis (CIEF). En 1971 Sepúlveda y col fueron los primeros en reportar buena sensibilidad y especificidad de esta técnica en estudios realizados en México. Actualmente se ha convertido en una prueba diagnóstica de rutina ya que no requiere de muchos reactivos y los resultados se obtienen en un tiempo relativamente corto (1-2 h); esta técnica permite además la valoración cualitativa y semicuantitativa de la respuesta inmune humoral. Se encuentra disponible en equipos comerciales de diferentes grupos, reportándose reproducibilidad en los resultados.

12. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Este procedimiento ha resultado útil tanto para la detección de antígenos como para la detección de anticuerpos (Goldman y col, 1962; 1967). Existe en la literatura internacional una gran cantidad de reportes que lo señalan como un método que posee buena sensibilidad (>95 %) para el

diagnóstico de amibiasis hepática, pero en los casos de amibiasis intestinal, el porcentaje de sensibilidad es muy amplio (50-90%). Es una técnica cuantitativa, sin embargo el tener sus propios títulos de valoración, le impide compararse con títulos considerados positivos por otros autores empleando diferentes procedimientos (IHA, CIEF o ELISA).

13. Hemaglutinación Indirecta (IHA). El diagnóstico de la amibiasis mediante la detección de anticuerpos antiamibianos en sueros empleando eritrocitos sensibilizados con el antígeno fue reportado por Lewis y col (1961) y Kessell y col (1965). En numerosos trabajos se ha empleado este procedimiento de diagnóstico y en igual forma un gran número de investigadores han evaluado la prueba de IHA, comparándola con otras como FC, AL, CIEF, IFI, ID, IA y ELISA. Los resultados demuestran una excelente especificidad, con niveles de sensibilidad de 90-100% en los casos de amibiasis hepática y de 75-90% en los casos de amibiasis intestinal sintomática. Para el diagnóstico en individuos portadores asintomáticos esta prueba ha demostrado una alta variabilidad de los títulos considerados como positivos (5-50%). Elsdon-Dew (1976) señala que esta gran variabilidad en la positividad de la prueba refleja la prevalencia de la enfermedad en ciertos grupos de la población o áreas geográficas. Por este método se detectan anticuerpos por largos periodos (meses o años) después de una aparente curación clínica. Esto ha permitido detectar la prevalencia de la enfermedad en diferentes partes del mundo como Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, Malasia, Filipinas y

Venezuela.

14. Inmunoensayo Enzimático Ligado a Enzima (ELISA). El mejoramiento en las pruebas diagnósticas de una gran variedad de enfermedades ha permitido la adaptación de técnicas inmuno-enzimáticas para el diagnóstico de la amibiasis. Respecto a la técnica, Engvall y col (1971 y 1972) introdujeron el empleo de conjugados de enzimas con Igs antihumanas para detectar y medir cuantitativamente los anticuerpos ligados a los antígenos. Bos en 1975 hizo un reporte preliminar del uso de esta técnica en amibiasis y mas tarde Bos y van den Eijk (1976a y b) hicieron una comparación con IFI e ID con resultados favorables, sobre todo en los casos con amibiasis hepática. El procedimiento ha sido evaluado en diferentes áreas del mundo por diferentes autores (Halpern y col, 1967; Healy, 1968; Juniper y col, 1968; Thompson y col, 1968; Savant y col, 1969; Prakash y col, 1969; Stein y col, 1971; Juniper y col, 1972; Vinayak y col, 1974; Healy y col, 1974; Lin y col, 1981; Guirges y col, 1978; Ortiz-Ortiz, 1978; Sharma y col, 1980). El disponer de la prueba en equipos comerciales, asociado a la rapidez y facilidad para obtener los resultados, la hace una prueba de diagnóstico ideal en laboratorios con un gran número de sueros o para estudios seroepidemiológicos.

15. Inmunolectrotransferencia (IET). Esta prueba se ha empleado para la identificación de antígenos en diversos parásitos tales como Toxoplasma gondii (Sharma, 1983), Trichomonas vaginalis (Garber y col, 1986) y Trypanosoma cruzi (Scharfstein y col, 1983). Joyce y col (1988) han reportado su aplicación en la amibiasis,

resultando ser quizá la prueba más sensible para la detección de anticuerpos antiamibianos, aunque aún no puede ser empleada para diagnóstico clínico debido a su costo y la necesidad de personal experimentado para desarrollar la prueba y así asegurar un estudio de alta calidad.

16. Coproanticuerpos (CAC). Realmente muy poca atención se ha puesto a los anticuerpos excretados en heces. Shaalan y col (1970) emplearon la prueba de FC para detectar dichos anticuerpos y sólo el 34% de los casos clínicos resultaron positivos. Sharma y col (1978), aplicando la técnica de IHA en el sobrenadante de las heces encontraron un 80% de positividad. Estos métodos requieren de una mejor evaluación así como técnicas mas estandarizadas para que puedan emplearse como un procedimiento de rutina.

### 2.3. Antígenos relevantes en Entamoeba histolytica.

La caracterización de los componentes antigénicos de E. histolytica ha representado una de las principales objetos de estudio del parásito. La definición de tales componentes es de relevancia tanto para el mejoramiento de los métodos de diagnóstico, como para el análisis de la respuesta inmune por parte del huésped infectado, incluyendo la posibilidad de inducir inmunidad protectora.

Con el objeto de entender la relevancia de la respuesta inmune en la amibiasis, resulta de particular interés la identificación de los antígenos presentes en E. histolytica, los cuales participan en la interacción huésped-parásito y son reconocidos durante la infección (Sepúlveda, 1982).

Los resultados de estudios previos empleando antígenos obtenidos de amibas cultivadas en condiciones no-axénicas fueron difíciles de interpretar debido a la presencia de material contaminante de bacterias o parásitos (Krupp, 1966; Ali-Khan y col, 1968; Goldman y col, 1962; Shaffer y col, 1956; Neal y col, 1968; Maddison y col, 1965, 1968; Kessel y col, 1965).

En 1961, Diamond describió un medio de cultivo axénico capaz de sostener el crecimiento in vitro de E. histolytica y años más tarde fue capaz de reportar la producción masiva in vitro de amibas usando tal medio (Diamond, 1968). En ese mismo año Thompson y col extrajeron y estandarizaron antígenos amibianos derivados de parásitos crecidos axénicamente.

El material obtenido, denominado histolicina, resultó ser una mezcla heterogénea de proteínas, carbohidratos, lípidos, etc. Este antígeno permitió el estudio de la amibiasis empleando metodología de la Inmunología moderna. A partir de entonces, para la definición de la composición antigénica de las amibas se hizo sólo a partir de amibas crecidas en el medio de cultivo axénico. Brevemente analizaremos los componentes de superficie, citoplasma y de excreción que han podido ser caracterizados como antígenos por diversos autores.

### 1. Antígenos de superficie.

Los antígenos presentes sobre la membrana de superficie de los trofozoitos de E. histolytica deben ser los primeros en ser reconocidos por el sistema inmune del huésped. La existencia e importancia de tales antígenos se ha establecido por la inmovilización de trofozoitos con suero inmune (Brown y col, 1955; Biagi y col, 1961; Beltrán y col, 1965; Yap y col, 1969), por la reacción específica de anticuerpos antiamiba total y anti-lipopeptidofosfoglican (LPPG) con trofozoitos intactos como se reveló por inmunofluorescencia (Goldman y col, 1962; Beltrán y col, 1965; Boonkpucknaving y col, 1967; O'Shea y col, 1974; Calderón y col, 1980a; Isibasi y col, 1982a) y por lisis de trofozoitos por las vías clásica y alterna del complemento (Huldt y col, 1979; Calderón y col, 1980; Ortiz-Ortiz y col, 1978a; Sepúlveda y col, 1973).

Los antígenos de superficie de las amibas se han estudiado con el empleo de proteínas marcadas con yodo radioactivo. En algunos

casos se han empleado mezclas homogéneas completas y en otros membranas citoplásmicas obtenidas de preparaciones radio- marcadas. En la actualidad, la identificación y purificación de antígenos de superficie se ha favorecido por el empleo de anticuerpos monoclonales específicos.

a). Proteínas. Los antígenos de superficie proteínica son difíciles de definir ya que la mayoría de los reportes se refieren a proteínas obtenidas de extractos acuosos totales obtenidos por sonicación (Thompson y col, 1968; Krupp, 1974, 1977; Chang y col, 1979; Sawhney y col, 1980; Sánchez-Nereida y col, 1978) u homogeneización de las amibas (Ali-Khan y col, 1970a y b; Aust-Kettis y col, 1983). Los resultados de tales estudios han revelado un complejo de antígenos de E.histolytica. Esto deriva, sin duda, del uso de diferentes cepas de amibas, de la adición o no de inhibidores de proteasas así como del empleo de diferentes métodos inmunológicos para la detección.

Bajo estas circunstancias, Krupp (1977) afirmó que el esqueleto antigénico básico de las cepas HK-9 y NIH-200 de E.histolytica contiene 14 proteínas. Chang y col (1979) por su parte encontraron no menos de 20 antígenos en la cepa HK-9 y un máximo de 32 antígenos en la cepa HT-31. Los extractos acuosos de las amibas se han fraccionado en cromatografía de exclusión molecular con la finalidad de obtener un material mas homogéneo (Thompson y col, 1968; Krupp, 1974, 1977; Chang y col, 1979; Sawhney y col, 1980; Sánchez-Nereida y col, 1978; Ali-Khan y col, 1970a y b; Aust-Kettis y col, 1983). El perfil de elusión de tales mezclas de antígenos

varía de acuerdo a la longitud y diámetro de las columnas empleadas, el tipo de gel usado; la concentración de la muestra aplicada a la columna y las condiciones de flujo impuestas en el sistema. A pesar de tales variaciones, estos estudios regularmente resultan en 3 y 5 fracciones con pesos moleculares que varían de 14.5 a 650 kDa. La mayoría de las fracciones son glicoproteínas; las fracciones I, II y III son las más antigénicas, mientras que las fracciones IV y V no reaccionan con anticuerpos específicos (Krupp, 1974).

Parkhouse y col (1978) fueron los primeros en usar inhibidores de la actividad proteolítica en lisados de trofozoitos para la extracción de antígenos. Los mismos autores radiomarcaron las proteínas de superficie de las cepas HK-9 y HM-2 de E. histolytica con yodo radioactivo y aislaron una glucoproteína de superficie con peso molecular de 81 kDa. Se hizo cromatografía al extracto completo de E. histolytica HK-9 a través de una columna de Sepharosa-Con A resultando en 3 bandas proteínicas de 20, 30 y 150 kDa de peso molecular, respectivamente, como se identificó por inmunoprecipitación usando suero de un paciente con amibiasis hepática. Aplicando el mismo procedimiento de fraccionamiento con Sepharosa-Con A y radiomarcando con  $^{125}\text{I}$ , se aislaron 6 glucoproteínas de E. histolytica HM-1:IMSS y 4 de la cepa HK-9. Tres de estas glucoproteínas (36, 56 y 67 kDa) estuvieron presentes en ambas cepas (Muñoz y col, 1978). Este marcado selectivo de las proteínas de superficie externa permitieron a Aley y col (1980) identificar 12 glucoproteínas con peso molecular que variaba de 12

a 200 kDa por autorradiografía.

Aust-Kettis y col (1983) no separaron la membrana citoplásmica de E.histolytica cepas HK-9 y NIH-200 radiomarcada con <sup>125</sup>I, y encontraron 12 polipéptidos por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) evidenciados por autorradiografía de un homogeinado amibiano. El peso molecular de las 9 bandas varió entre 9 y 150 kDa.

Joyce y col (1988) encontraron 30 bandas de proteínas en un extracto acuoso total de E.histolytica HM-I:IMSS en presencia de inhibidores de proteasas y sujeto a PAGE-SDS. Seis de esas bandas fueron proteínas de superficie como se mostró por iodación competitiva con lactoperoxidasa. Sus pesos moleculares fueron de 19.5, 23, 24.5, 37, 90 y 170 kDa, siendo las tres últimas glicoproteínas, como se mostró por la unión específica a Con A. El inmunoblot del extracto soluble reveló que al menos 3 de esas proteínas fueron mas frecuentemente reconocidas por sueros obtenidos de 11 pacientes que sufrían de amibiasis hepática, y de esas, las proteínas de 37 y 90 kDa fueron en efecto, glicoproteínas de superficie.

Aust-Kettis (1983) utilizó un pool de 8 sueros humanos inmunes e identificó 7 polipeptidos antigénicos por inmunoelectrotransferencia. De estas las proteínas de 37 y 88 kDa semejan las proteínas de superficie de 37 y 90 kDa respectivamente, que se identificaron por los sueros de los pacientes estudiados por Joyce y col (1986).

Los anticuerpos monoclonales anti-amiba permitieron a Ortiz-

Ortiz y col (1986) definieron una proteína de superficie antigénica determinante y condujeron a Torian y col (1987) para la identificación, caracterización y purificación de una glucoproteína de superficie de 96 kDa que reaccionó específicamente con el suero de pacientes con amibiiasis hepática.

Finalmente, las proteínas de superficie que participan en la adhesión in vitro de trofozoítos de E.histolytica a eritrocitos humanos, células epiteliales y células de ovario de hámster han sido también reconocidos (Rosales-Encina y col, 1987; Ravdin y col, 1985b; Salata y col, 1985a; Arroyo y col, 1986; Chadee y col, 1987; Orozco y col, 1987).

Estas proteínas han sido identificadas usando diferentes métodos, resultando las proteínas de 112 kDa (Arroyo y col, 1986; Orozco y col, 1987), de 170 kDa (Chadee y col, 1987) y la de 220 kDa (Rosales-Encina y col, 1987; Meza y col, 1987).

b. Carbohidratos. Muy poco se sabe acerca de las moléculas polisacáridas presentes en los protozoarios. Se han descrito en Trypanosoma cruzi polímeros de galactosa (Von Brand y col, 1959; Ketteridge, 1978; Gottlieb, 1977) y en Crithidia fasciculata (Cosgrove y col, 1962; Gottlieb y col, 1976).

Korn y col (1974) aislaron y caracterizaron una molécula polisacárida (lipofosfoglican) de Acanthamoeba castellanii, la cual constituye el 31% de la membrana plasmática (Korn y col, 1974; Dearborn y col, 1976; Bailey y col, 1981).

La membrana plasmática de los trofozoítos de E.histolytica tiene 10 nm de grosor y está cubierta externamente por un

glucocálix el cual está constituido por carbohidratos (Lushbaugh y col, 1974; Pinto da Silva y col, 1975).

Martínez-Palomo y col (1973) demostraron que la cubierta de los trofozoítos de E.histolytica contenía manosa y/o glucosa ya que aglutina con Con A. La activación de la vía alterna del complemento, como fué demostrado por Ortiz-Ortiz y col (1978a), sugiere fuertemente la presencia de carbohidratos en la superficie de los trofozoítos de E.histolytica.

La hidrólisis de ácido acético y la precipitación con alcohol resultó en la obtención de polisacáridos de amibas (Martínez-Palomo y col, 1973). La mezcla de estos antígenos reacciona con el suero de conejos inmunizados con trofozoítos amibianos, pero no con el suero de pacientes con amibiasis hepática (Isibasi y col, 1975, 1978).

Usando el método de extracción fenol-agua se obtuvo un complejo antigénico de superficie polisacárido heterogéneo de E.histolytica HK-9 (Isibasi y col, 1982a y b). El análisis químico de este material reveló un 85% de carbohidratos, 8% de péptidos y el resto, lípidos y fosfatos. Este compuesto fué llamado lipopeptidofosfoglican (LPPG), y su composición y localización recuerda fuertemente al LPPG de superficie encontrado en A.catellani (Dearborn y col, 1976). Este antígeno reacciona con el suero de pacientes con amibiasis hepática y hacen reacción cruzada con el aminoglucofosfolípido extraído por Gitler y col (1984).

Un antígeno libre de glucógeno rico en polisacáridos (PRA) fue purificado subsecuentemente del LPPG, ahora obtenido tanto de

E.histolytica HK-9 como de HM-1:IMSS. El material fue el mismo en cualquier cepa y se encontró que contenía glucosa, galactosa y xilosa (Isibasi y col, 1986). Este PRA reacciona fuertemente con el suero de pacientes con amibiasis hepática y su patrón de PAGE-SDS es similar al patrón de lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas. Esto sugiere que, en cuanto al peso molecular concierne, y tal como un LPS de bacteria Gram negativa, el PRA es una molécula heterogénea construida por unidades repetidas de polisacáridos de longitud variable. Estudios de microscopia electrónica han mostrado que el PRA es un complejo polisacárido de superficie (Cruz, 1988).

c. Lípidos. Los lípidos son en general, inmunógenos pobres y tan solo Gitler y col (1984) han identificado un lípido altamente inmunogénico en E.histolytica. Ensayos preeliminarios indicaron que este es un aminoglicofosfolípido que constituye cerca del 3.8% de los lípidos amibianos.

Anticuerpos específicos purificados para este material no pudieron reaccionar con los lípidos totales del medio de cultivo, cuando reaccionan con LPPG. Este sugiere que, además de la fracción glucosídica, la fracción lípida de los LPPG constituye un epitope por sí mismo.

## 2. Antígenos citoplásmicos.

Los antígenos citoplásmicos son todos aquellos presentes en las fracciones proteínicas no reveladas por el marcado de la membrana externa. Por otro lado, hay un grupo bien definido de antígenos citoplásmicos tales como las fracciones lisosomales y ribosomales.

Los lisosomas son vesículas membranosas que contienen fosfatasa ácida como se ha demostrado por citotquímica de alta resolución (Sánchez y col, 1980; Treviño-García y col, 1980). Las fracciones lisosomales y ribosomales se obtuvieron por ultracentrifugación diferencial de un homogeinado de trofozoitos de E.histolytica. Ambos organelos se encontraron en la primera y segunda fracción respectivamente (Cruz, 1988). Las fracciones lisosomales se probaron con sueros de pacientes con amibiasis hepática y resultaron ser bastante antigénicas, con producción de varias bandas de precipitación en inmunodifusión en agarosa. Ambas fracciones se han usado para inducir inmunidad protectora contra una amibiasis experimental (Ortiz-Ortiz, 1978).

Las proteínas ribosomales han resultado ser ácidas y básicas, con un peso molecular que varía de 14 a 112 kDa. En estos trabajos se reveló la ausencia de una proteína ribosomal de 54 kDa en amibas; esta proteína es regularmente encontrada en todas las células procariontes y eucariontes. El significado de su ausencia en E.histolytica aún no se conoce (Vargas y col, 1986).

### 3. Exoantigenos.

La demostración mediante anticuerpos específicos inducidos en conejo de antígenos producidos por E.histolytica y liberados al medio de cultivo, no ha sido completamente exitoso (Swart y col, 1962). Bos y col (1980a y b) encontraron que una toxina de la membrana citoplásmica que se excreta al medio de cultivo, puede ser inhibida por suero inmune así como por algunos factores presentes en suero normal. Este hallazgo indirectamente muestra que esta

exotoxina es capaz de inducir una respuesta inmune humoral aun cuando no se han demostrado anticuerpos específicos.

Esta exotoxina es de hecho un complejo proteínico con punto isoeléctrico de 4.5 y 5.0 y está relacionada a otras proteínas citoplásmicas con actividad de toxina y peso molecular entre 25 y 35 kDa (Feingold y col, 1985). Una de esas toxinas tiene un peso molecular de 30 kDa y está relacionada con una lectina que induce la producción de anticuerpos específicos y es probablemente la misma enterotoxina descrita por Lushbaugh y col (1979) y Mattern y col (1980).

Por otro lado, hay evidencias de una sustancia ambiana que es excretada al medio y que puede contribuir a la patogenicidad del parásito aunque sus propiedades antigénicas aún no se han establecido. Kretschmer y col (1985) han descrito un factor de peso molecular bajo que inhibe la locomoción de monocitos humanos presente en el líquido sobrenadante de E.histolytica crecida axénicamente.

### 3. HIPOTESIS

### 3. HIPOTESIS

1. No existe correlación entre el título de anticuerpos determinado por Hemaglutinación Indirecta y el tipo de zimodemo de la amiba presente en el intestino de los portadores en estudio
2. Existe una correlación entre el título de anticuerpos determinado por Hemaglutinación Indirecta y el patrón de reconocimiento de antígenos por el suero de portadores en estudio y determinado por inmunoelectrotransferencia (IET)
3. El patrón de reconocimiento de antígenos, determinado por la técnica de IET, es diferente entre portadores de E.histolytica con zimodemo patógeno y aquellos con zimodemo no patógeno

#### **4. OBJETIVOS**

#### 4. OBJETIVOS

1. Determinar si existe correlación entre el título de anticuerpos en sueros analizados por Hemaglutinación Indirecta y Contraímmunoelectroforesis con el tipo de zimodemo de las amibas presentes en el intestino de individuos portadores asintomáticos
2. Estandarizar la técnica de Inmunolectrotransferencia para la determinación de la reactividad de los sueros de individuos portadores asintomáticos
3. Identificar los antígenos amibianos mas frecuentemente reconocidos por individuos portadores asintomáticos provenientes de una comunidad endémica para amibiasis en la República Mexicana, aplicando la técnica de Inmunolectrotransferencia
4. Establecer si existe correlación entre el zimodemo de las amibas de individuos portadores asintomáticos y el patrón de reconocimiento de antígenos valorado por la técnica de Inmunolectrotransferencia

## 5. ESTRATEGIA GENERAL

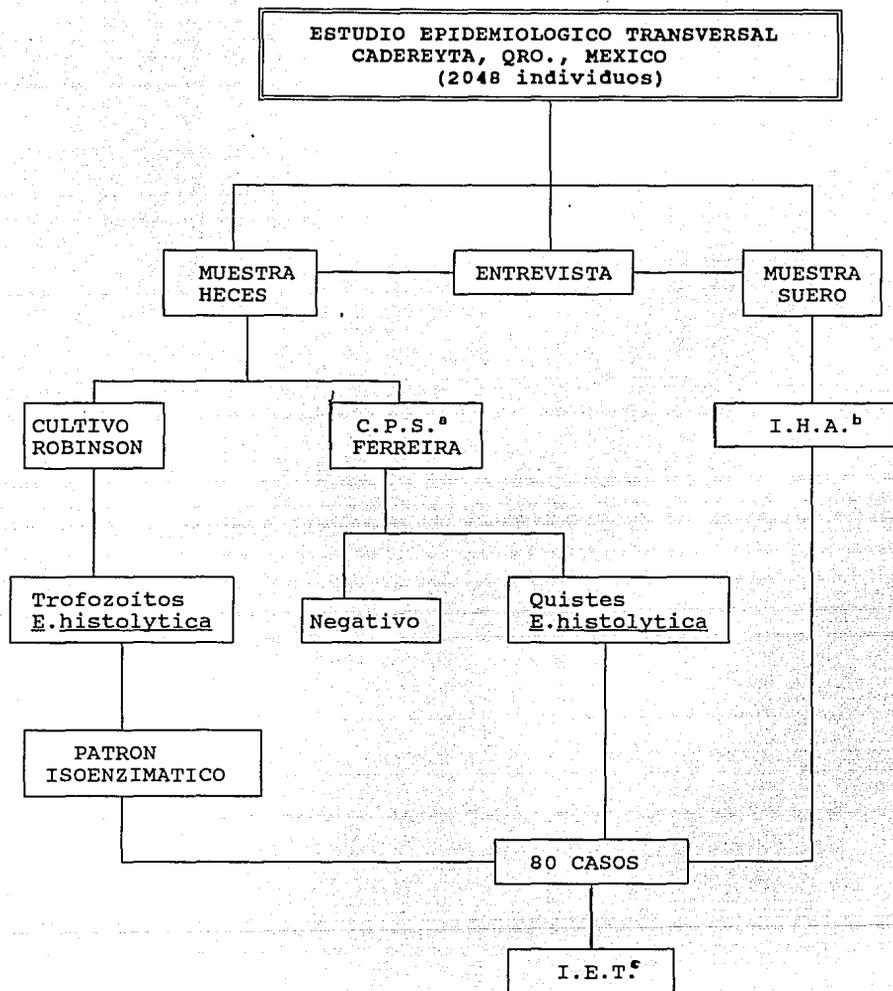
## 5. Estrategia general.

Con el objeto de determinar si existe correlación entre el zimodemo de las amibas presentes en el intestino de individuos asintomáticos, el título de anticuerpos determinado por hemaglutinación indirecta (IHA) y el patrón de antígenos reconocidos por dichos sueros aplicando la técnica de Inmunolectrotransferencia (IET), se aislaron parásitos a partir de heces y se analizaron muestras de sueros de individuos portadores de E.histolytica que habitan en Cadereyta, Querétaro, México.

En heces se detectó la presencia de quistes de E.histolytica mediante el Método Coproparasitológico por Concentración y Flotación de Faust-Ferreira (CPS) y a través de un cultivo en medio bifásico de Robinson, los trofozoítos recuperados se lisaron y se les determinó el patrón isoenzimático o zimodemo de éstos, de acuerdo al método descrito por Sargeant.

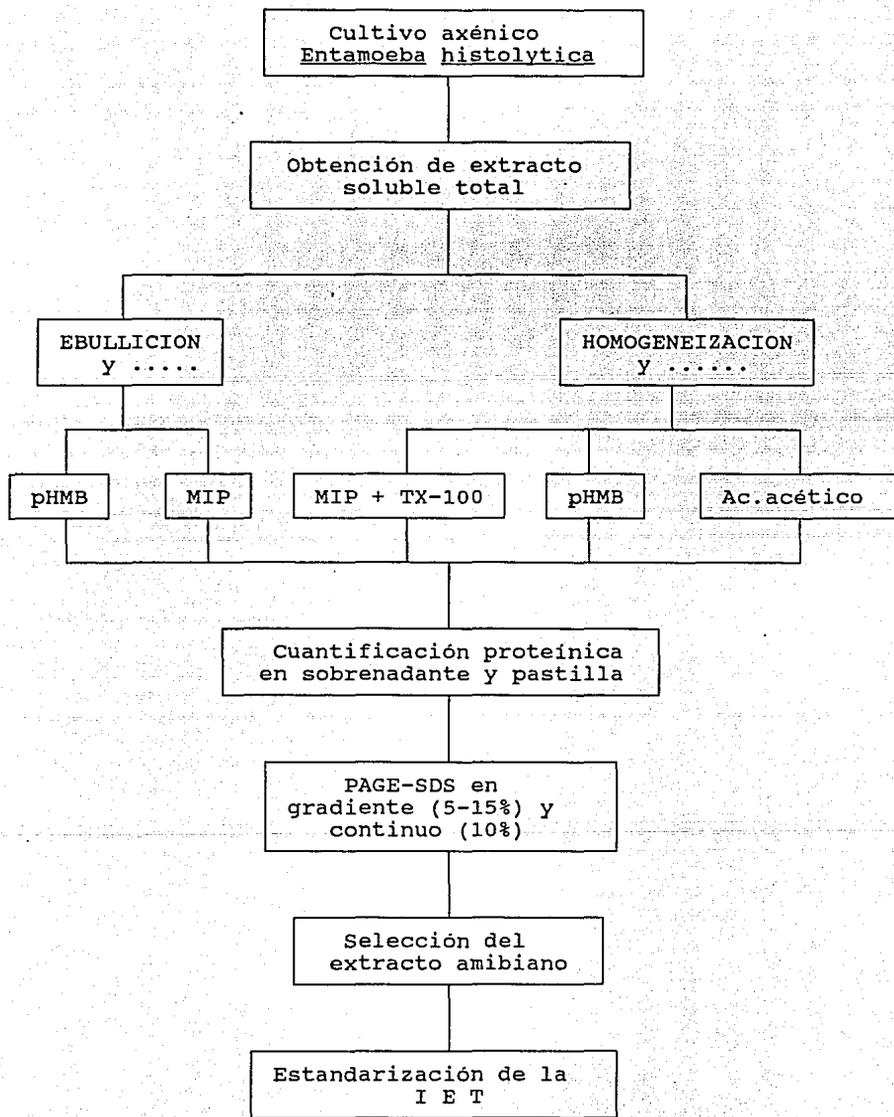
En las muestras séricas se determinaron los títulos de anticuerpos mediante la técnica de IHA, tomando como dilución mínima 1:8. La determinación del patrón de reconocimiento proteínico, se logró aplicando el ensayo de IET estandarizado en este trabajo.

De las muestras colectadas, se seleccionaron 80 de ellas para determinar zimodemo, títulos de hemaglutinación y patrón de reconocimiento antigénico por IET. En la Figura 4 se resume la estrategia que se siguió.



**FIGURA 4. ESTRATEGIA GENERAL.** a. Coproparasitoscópico, b. Hemaglutinación Indirecta, c. Inmunoelctrotransferencia.

Para lograr la estandarización de la técnica de IET utilizada en este trabajo, se emplearon sueros de individuos con amibiasis intestinal y hepática, así como el suero de individuos sin antecedentes clínicos de amibiasis y de aquéllos en cuyas heces se detectó la presencia de otros parásitos intestinales. En la Figura 5 se muestra los pasos que se siguieron para lograr este objetivo. Brevemente, a partir de trofozoitos de E.histolytica cultivados axénicamente se obtuvo el extracto total soluble amibiano empleando 5 procedimientos diferentes que incluyeron tratamiento por congelación/descongelación y homogeneización así como el uso de inhibidores de proteasas o agentes solubilizantes. La selección del extracto antigénico que se empleó en la estandarización de la IET se realizó considerando el rendimiento proteínico determinado por la técnica de Lowry así como la integridad de los componentes analizados por Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (PAGE-SDS). La cantidad de proteína adecuada para transferir al Papel de Nitrocelulosa (PNC), el diluyente para el primer anticuerpo así como las condiciones de dilución de las muestras de suero fueron determinadas después de probar las diversas condiciones experimentales. La especificidad de los ensayos fué evaluada empleando sueros de individuos infectados con otros parásitos intestinales así como con amibiasis hepática, sueros control negativo y suero de individuo con amibiasis intestinal aguda. Los sujetos estudiados fueron individuos asintomáticos provenientes de la comunidad donde se realizó el estudio transversal.



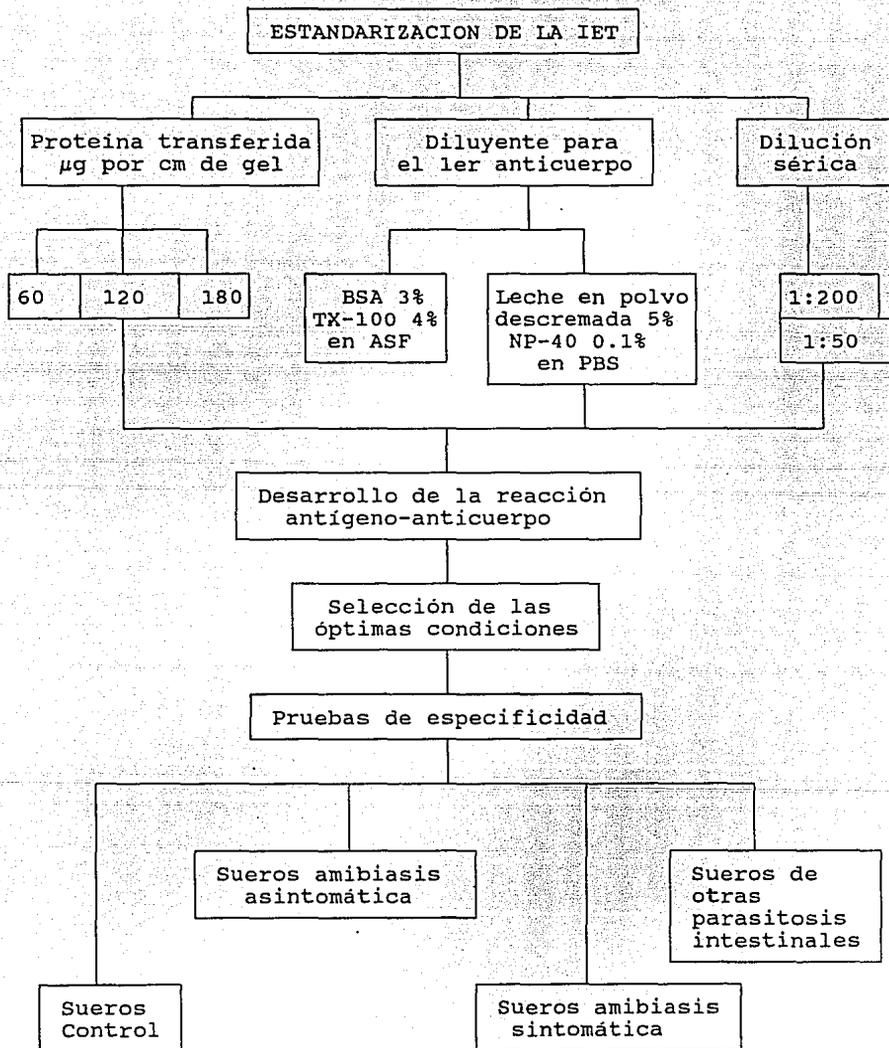


FIGURA 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA LA ESTANDARIZACION DE LA IMMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

## 6. MATERIAL Y METODOS

## 6.1. Origen de los sueros.

a) Sueros testigo. Los sueros testigo fueron obtenidos de individuos sin antecedentes clínicos recientes de amibiasis: 1) Un suero de un individuo de 2 meses de edad proveniente de la comunidad en estudio, 2) el suero de tres individuos recién nacidos del Hospital General de Zona "Los Venados", del Instituto Mexicano del Seguro Social, 3) Ocho sueros de individuos con infección intestinal por otros parásitos diferentes a E.histolytica. Estos individuos acudieron al Hospital Infantil de México por una causa no relacionada con amibiasis. En el laboratorio de rutina se determinó en muestras de heces de pacientes la presencia de huevos o quistes de alguno de los siguientes parásitos: Giardia lamblia, Hymenolepis nana, Enterobius vermicularis o Ascaris lumbricoides y durante un año fueron seguidos con la finalidad de determinar en ellos infecciones por E.histolytica, 4) tres sueros de individuos con antecedentes recientes de amibiasis hepática provenientes del Hospital General de Zona "Los Venados" del IMSS y uno del Instituto Nacional de Pediatría, 5) el suero de un paciente con amibiasis intestinal aguda atendido en consulta particular y del cual se cultivaron amibas en medio de Robinson.

b) Sueros problema. Los 80 sueros incluidos en el estudio fueron de individuos de Cadereyta, un municipio del Estado de Querétaro, los cuales se encontraban infectados por E.histolytica, pero no presentaron sintomatología asociada a ésta.

## 6.2. Obtención de heces.

Las muestras de heces se colectaron de individuos de la comunidad de Caderéyta, con la finalidad de determinar la presencia de quistes o trofozoitos de E.histolytica. Esto se llevó a cabo mediante examen microscópico por el método de Faust-Ferreira, para lo cual, las heces se conservaron hasta su observación en una solución de formol al 5%. Así mismo, la muestra de heces se procesó para cultivo de trofozoitos en medio de Robinson con la finalidad de poder determinar el zimodemo de dichos parásitos.

## 6.3. Cultivo de heces en medio de Robinson.

El cultivo de trofozoitos de E.histolytica a partir de heces se realizó en el medio de Robinson (Martínez y col, 1990). Inicialmente se realizó un cultivo primario y posteriormente subcultivos. Para el cultivo primario se requirieron 50 mg de heces no tratadas que se adicionaron a botellas con medio BR, almidón de arroz y una solución de eritromicina al 5%. Se incubaron por 24 h a 37°C. En los casos donde ocurrió crecimiento de trofozoitos se realizaron subcultivos para lo cual el líquido sobrenadante se eliminó y se adicionó almidón de arroz, eritromicina al 5%, bactopectona al 20%, biftaltato de potasio al 1% y medio BRS; se incubó a 37°C por 24 h. Este paso se puede repetir tantas veces como sea necesario. En este caso, se empleó el primer subcultivo

para la determinación del zimodemo. Para ello, los trofozoitos se cosecharon y se lisaron mediante ciclos de congelación-descongelación en presencia de una mezcla con inhibidores enzimáticos. Los lisados obtenidos se almacenaron a  $-196^{\circ}\text{C}$  (nitrógeno líquido) hasta su uso.

#### 6.4. Determinación del patrón isoenzimático por la técnica de Sargeaunt.

La caracterización por zimodemo ha sido empleada para determinar el carácter patógeno y no patógeno de E.histolytica. Esto se logra con la caracterización de patrones de corrimiento electroforético de 4 enzimas metabólicas en geles horizontales de almidón: Glucosa Fosfato Isomerasa (GPI), Fosfo-glucomutasa (PGM), Enzima Málica (ME) y Hexocinasa (HE). Este método de aislamiento e identificación del parásito es altamente sensible por lo que se le considera muy útil en estudios epidemiológicos. El sistema se caracteriza por dar bandas de corrimiento bien definidas, en donde la mayoría de los sistemas no da más de 2 bandas por enzima, excepto algunos sistemas reportados por Sargeaunt en 1985. La ME produce característicamente una sola banda en la misma posición mientras que la HE muestra siempre 2 posiciones diferentes. La PGM y GPI varían en cada zimodemo, en la mayoría de los casos con una sola banda, en una de las 4 posiciones reconocidas: alfa, beta, gamma y delta.

En este estudio, el procedimiento empleado se hizo de acuerdo a lo recomendado por Sargeaunt y col. (1978, 1979, 1980a y b, 1984, 1987, 1988) por el grupo de investigación del Laboratorio de Parasitología de la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Centro Médico Nacional, IMSS (Martínez y col, 1990) .

## 6.5. Hemaglutinación Indirecta.

Esta prueba es una de las más sensibles y específicas para la detección y/o cuantificación de anticuerpos antiambianos en individuos con amibiasis invasora intestinal o extraintestinal (Healy, 1988).

La técnica se basa en el empleo de eritrocitos sensibilizados con ácido tánico que les confiere la propiedad de adsorber proteínas de E.histolytica cepa HK9.

En este trabajo se empleó un equipo comercial de manufactura mexicana (Laboratorios Interbiol, S.A.) para lo cual se siguieron las recomendaciones especificadas por el proveedor.

## 6.6. Obtención de extractos solubles totales.

a) Cultivo de parásitos. Trofozoitos de E.histolytica cepa HM1:IMSS se cultivaron en condiciones axénicas en el medio de TYI-S-33 (Anexo # XVI) de acuerdo con lo descrito por Diamond y col en 1970, por la Q. Alicia Ramírez. Brevemente, el medio fue descomplementado (30 min en baño María) y suplementado con suero bovino al 15% y una mezcla de vitaminas de Diamond al 3% (North American Biologicals, USA), además se adicionó penicilina (0.25 UI/ml) y estreptomycin (35 µg/ml).

Una vez que los cultivos alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento (72 h), se colocaron los tubos de cultivo en un baño de hielo-agua por 30 min. El contenido de cada tubo se vació a tubos cónicos de plástico (Costar<sup>MR</sup>) de 50 ml de capacidad, se centrifugaron a 150 xg por 5 min. El sobrenadante se eliminó y el paquete celular se lavó en 3 ocasiones con un amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.2. La cuantificación de los trofozoitos se realizó empleando una cámara de Neubauer (Reichert Line Co.).

b) Preparación de los extractos amibianos. En la preparación de extractos amibianos se emplearon 5 tratamientos diferentes con el objeto de determinar el mejor procedimiento de extracción de componentes del parásito en cuanto a rendimiento e integridad de las proteínas. La cantidad empleada para cada ensayo fué de un millón de trofozoitos.

1. TRATAMIENTO CON para-HIDROXIMERCURIBENZOATO SODICO (pHMB) Y EBULLICION. En 1 ml de solución Trizma base 150 mM, pH 9

conteniendo PHMB 10 mM, se suspendieron los trofozoitos y se calentaron en baño María a 93°C por 5 min. Se centrifugó a 15,600 xg por 15 min 2 veces a 4°C. La fracción soluble se colectó y la pastilla se resuspendió en 1 ml de solución Trizma base 150 mM pH 9 sin PHMB. Ambas fracciones se almacenan a -70°C hasta su uso.

2. TRATAMIENTO CON UNA MEZCLA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS Y EBULLICION (Joyce y Ravdin, 1988 modificado). Los trofozoitos se resuspendieron en una solución de Trizma base-HCl 50 mM pH 6.8 con los siguientes inhibidores de proteasas: fluoro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 1mM; ácido (para-cloro-mercuri)-fenil-sulfónico 1 mM; N-etil-maleimida (NEM) 5 mM; ácido etilen- glicol-bis( $\beta$ -aminoetil-eter)-NN'-N'-tetracético (EGTA) 1 mM y PHMB 10 mM. Se empleó el mismo tratamiento por ebullición y separación por centrifugación previamente descrito. El sobrenadante y la pastilla, resuspendida en 1 ml de solución Trizma base 150 mM pH 9, se recuperaron y se almacenaron por separado a -70°C.

3. TRATAMIENTO CON UNA MEZCLA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS, TRITON X-100 Y HOMOGENEIZACION. (Rosales-Encina y col, 1987 modificado). Los organismos se suspendieron en una solución de Trizma-HCl 50 mM con Tritón X-100 al 5% y la mezcla de inhibidores de proteasas empleadas en el procedimiento anterior. La suspensión se sometió a homogeneización durante 1 min en un homogeneizador con punta de teflón (Lab-stir, Eberbach) en baño de agua a 4°C. El lisado de células se centrifugó y el sobrenadante y pastilla, resuspendida en 1 ml de solución Trizma base 150 mM pH 9, se colectaron y almacenaron a -70 °C hasta su uso.

4. TRATAMIENTO CON PHMB Y HOMOGENEIZACION. Los trofozoitos se resuspendieron en una solución de Trizma base 150 mM pH 9 con PHMB 10 mM empleada en el método 1. La homogeneización se realizó de la misma forma que en el procedimiento No.3. Se centrifugó el lisado y el sobrenadante y la pastilla, resuspendida en una solución de Trizma base 150 mM pH9, se colectaron y almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

5. TRATAMIENTO CON ACIDO ACETICO Y HOMOGENEIZACION (Fraenkel-Conrat, 1957 modificado). Los trofozoitos se suspendieron en una solución que contenía una mezcla de 2 volúmenes de ácido acético glacial y 1 volumen de  $\text{MgCl}_2$  1M en una relación de 2 volúmenes de mezcla por millón de trofozoitos. Una vez hecha la mezcla, se homogeneizó estando sumergida en un baño de agua-hielo, después se procedió a incubar en agitación constante durante 1 h en un baño de agua-hielo y finalmente se centrifugó a 15,600 xg por 30 min. El sobrenadante y la pastilla se dializaron secuencialmente en soluciones de ácido acético al 6%, 4.5% y 3%. Ambas fracciones se liofilizaron en un equipo Virtis (Gardiner, NY) durante  $\approx 12$  h y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 6.7. Cuantificación de proteínas de las preparaciones antigénicas obtenidas mediante el micrométodo de Lowry (Folin-Ciocalteu).

El micrométodo utilizado fué descrito por Dulley (1975) como una modificación de la técnica de Lowry (1951). La cuantificación colorimétrica de las proteínas al emplear el reactivo de Folin-Ciocalteu, depende del contenido de tirosina y triptófano de las proteínas, las cuales reducen las sales del fosfomolibdato-fosfotungstato del reactivo.

En tubos a los que se añadieron diferentes cantidades de la solución problema (5, 10 o 15  $\mu$ l), se completó el volumen a 500  $\mu$ l con agua destilada. Se añadió 2.5 ml de la solución E (tartrato de sodio y potasio al 2% y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.5%, diluido en 50 volúmenes de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% y  $\text{NaOH}$  0.1N) y 5  $\mu$ l de Tritón X-100 al 10% en PBS. Cada tubo se mezcló vigorosamente y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se añadió 250  $\mu$ l del Reactivo de Folin-Ciocalteu y 50  $\mu$ l de SDS al 5%, se agitó con vortex y se dejó incubando a temperatura ambiente por 30 min. Transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Beckman, modelo DU7).

El contenido de proteína en la solución problema se calculó por regresión lineal con los datos de la curva estándar de albúmina fracción V.

**6.8. Separación de proteínas totales solubles de E. histolytica por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.**

La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) es útil para la separación y caracterización de proteínas a partir de una mezcla compleja. Esto se logra combinando el empleo de acrilamida como tamiz molecular y la movilidad electroforética de las proteínas en función de su peso molecular. La capacidad de la acrilamida para funcionar como matriz molecular está en función del tamaño del poro que se forma, el cual varía dependiendo de la concentración de la acrilamida y de la extensión del entrecruzamiento dada por N-N'-metilen-bis-acrilamida. Para que la reacción se inicie, se requiere del empleo de un sistema catalizador redox que aporta los radicales libres, como la amina terciaria N,N'-N'N'-tetrametildiamina (TEMED) como catalizador y el persulfato de amonio (APS) como iniciador. Cuando se emplea un agente reductor como beta-mercaptoetanol, se permite que la proteína cambie su estructura tridimensional a tipo lineal. El empleo del detergente SDS, le confiere a la proteína una carga neta negativa uniforme, de donde resulta que la movilidad electroforética sea función del peso molecular.

a) PREPARACION DE GELES A CONCENTRACION CONSTANTE (10%) Y EN GRADIENTE CONTINUO 5-15%. Se han descrito varios sistemas para desarrollar una PAGE-SDS. Uno de ellos, empleado por Laemmli desde 1970, se caracteriza por la discontinuidad en el pH del

amortiguador y en el tamaño del poro del tamiz. Este sistema consta de 2 fases: una llamada concentradora con pH 6.8 y la fase espaciadora cuyo pH es de 8.8 (Anexos # I, II, III). En este estudio la capacidad de separación de este sistema se pudo mejorar al emplear un gel espaciador en gradiente (5-15%) así como un sistema con un gel espaciador a concentración constante de acrilamida al 10% (Anexos # II, III). El sistema a concentración constante de acrilamida se hizo con fines de comparación entre éste y el sistema en gradiente. El sistema se realizó empleando placas de vidrio (140x170x1.5 mm) y separadores de plexiglás de 1.5 mm de grosor así como un sistema formador de gradiente, una bomba peristáltica (Tubing Pump, 375 A, Sage Instruments) y un agitador magnético (Stirrer, PC-353, Corning).

Una vez que los vidrios ensamblados se llenaron con la solución para el gel espaciador al 5-15% (Anexo # IIA) o al 10% (Anexo # IIIA), la polimerización de esta fracción ocurrió en  $\approx 60$  min, después del cual se preparó la fase concentradora en cada uno de los sistemas empleados (en gradiente o a concentración constante) (Anexo # IIB y # IIIB); colocando el peine formador de los carriles necesarios para la colocación de la(s) muestra(s). La polimerización de esta porción ocurrió en  $\approx 30$  min después del cual se preparó la muestra del extracto amibiano, a una concentración de  $120 \mu\text{g}$  por cm de ancho del pozo. Para ello, se calentó durante 5 min a  $93^\circ\text{C}$  mezclándolo con el Buffer Solubilizador de Muestra para Electroforesis (BSME) (Anexo # IV). Después de la ebullición se añadió beta-mercaptoetanol al 5% y se ebulló nuevamente por 1 min.

Con ayuda de una micropipeta se colocaron las muestras ya tratadas, en los pozos formados en la fracción concentradora del gel.

b) ELECTROFORESIS DE EXTRACTOS SOLUBLES TOTALES. Para determinar la concentración necesaria para asegurar una buena cantidad de proteína en el PNC empleado en la transferencia posterior, se probaron 3 diferentes concentraciones de proteínas: 60, 120 y 180 ug/cm, y para el cálculo del peso molecular de cada proteína separada se emplearon como referencia marcadores de peso molecular alto y bajo (5  $\mu$ l c/u) (Pharmacia, cod. 17-0445-01), que incluyó: fosforilasa b, 94,000 daltones; albúmina, 67,000 daltones; catalasa, 60,000 daltones; ovoalbúmina, 43,000 daltones; deshidrogenasa láctica, 36,000; anhidrasa carbónica, 30,000 daltones; inhibidor de tripsina, 20,100 daltones; ferritina, 18,500 daltones y alfa-lactoalbúmina, 14,400 daltones. También se empleó una mezcla de componentes de G.lamblia como estandar de separación. Ambos estándares se colocaron en los pozos extremos del gel. El corrimiento electroforético de las muestras se llevó a cabo durante 12-14 h con el Amortiguador de Electroforesis (AE) a una corriente constante de 60 V en una cámara de electroforesis (BRL modelo V161) a temperatura ambiente (Anexo # V).

c) PROCEDIMIENTO DE TINCION DEL GEL DE POLIACRILAMIDA. Con fines analíticos, se tiñeron los geles con el colorante Azul Brillante de Comassie R-250 (Sigma No.161-0400) como se describe en el Anexo # VI durante  $\approx$ 60 min. Posteriormente se procedió a remover el exceso de colorante por incubación del gel en la solución Alto Metanol (Anexo # VII).

## 6.10. Transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa.

La técnica de inmunoelectrotransferencia (IET) combina el alto poder resolutivo de la PAGE-SDS y la alta sensibilidad de un inmunoensayo enzimático, resultando en una técnica cualitativa extraordinariamente poderosa para el estudio de reacciones antígeno-anticuerpo. Towbin en 1979, describió un procedimiento cuyo fundamento radica en la transferencia de proteínas separadas en un gel de poliacrilamida a una hoja de papel de nitrocelulosa (PNC) de tal forma que se obtiene una réplica exacta del patrón original en el gel. El propósito de esta técnica es demostrar el reconocimiento por anticuerpos de los componentes individuales de una mezcla compleja de los antígenos macromoleculares inmovilizados en el papel, lo cual se logra al tratar el PNC con una solución de anticuerpos o antiseros apropiada, y la presencia de anticuerpos enlazados se detecta mediante una reacción enzimática o por autorradiografía. Este procedimiento tiene la ventaja de permitir comparar la capacidad de reconocimiento antigénico de diferentes sueros con una preparación antigénica única o bien, una preparación pura de anticuerpos (anticuerpo monoclonal) con diversas fuentes de antígenos.

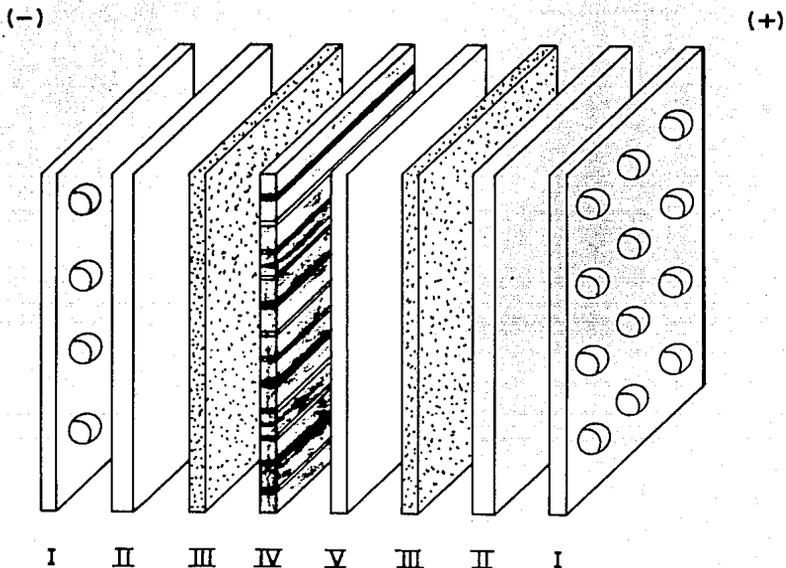
El procedimiento empleado en este trabajo, se basó en el método descrito originalmente por Towbin en 1979 y modificado por Hanff y col (1982) y Pekkala-Flagan y col (1982).

a) ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEINAS A PNC. Para corroborar que el corrimiento se realizó en forma adecuada, previo a la

transferencia de las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida, se procedió a teñir una fracción del mismo con las proteínas separadas de la mezcla compleja de antígenos, solubilizadas en un Amortiguador Solubilizador de Muestra para gel preparativo para IET (Anexo # VIII), con el colorante Azul Brillante de Coomassie R-250, como fué descrito anteriormente.

Asimismo, el gel de poliacrilamida y el PNC (Pure Nitrocellulose Membrane. 45  $\mu$ m de diámetro de poro, Bio-Rad Laboratories No. 162-0115) se incubaron con el Amortiguador para Transferencia (AT) durante 60 min (Anexo # IXa y b), con 1 cambio de AT a los 30 min, con la finalidad de ajustarlos a las condiciones de transferencia. El equipo empleado para la transferencia (Transblot cell, Bio-Rad Laboratories, mod. Protean 16 cm) incluyó el sistema de plexiglás empleado para la formación del sandwich como se ilustra en la Figura 3 de tal manera que permitió un contacto estrecho entre el PNC y el gel de poliacrilamida con ayuda de papel filtro Whatman 3 MM (James River Blotting, 19x24,200M) y fibra Scotch. La transferencia se realizó aplicando 100 V durante 2 h a 4°C.

b) TINCION DE PAPEL DE NITROCELULOSA. Para corroborar que la transferencia de proteínas fue adecuada, se cortaron 2 tiras del PNC transferido, una correspondió a las proteínas separadas a partir de la mezcla compleja y la otra a los marcadores de peso molecular. Para ello, se probaron 2 procedimientos de tinción. Uno de ellos empleó el colorante Azul Negro de Nafftol (Amido Black-



**FIGURA 3. ESQUEMA DEL SISTEMA EMPLEADO PARA LA TRANSFERENCIA DE PROTEINAS AL PAPEL DE NITROCELULOSA.** La transferencia de proteínas de *E. histolytica* separadas por PAGE-SDS empleando geles de poliacrilamida en gradiente del 5-15% a papel de nitrocelulosa se llevó a cabo empleando el dispositivo que se muestra en la figura: I. Soporte de plexiglás, II. Fibra Scotch-Brite, III. Papel filtro Whatman 3 MM, IV. Gel de poliacrilamida plano en gradiente 5-15 %, V. Papel de nitrocelulosa.

10B, Sigma, No. 3005) (Anexo # Xa) y el otro Tinta India (Anexo # Xb).

c) REVELADO DE LA REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO. El PNC transferido se incubó en una solución de albúmina sérica bovina al 3% en PBS (Anexo # XI) toda la noche a 4°C o bien a temperatura ambiente durante 6 h; antes de secar, se cortó en tiras de 4 mm de ancho dejándose secar perfectamente bien antes de almacenarse a temperatura ambiente hasta su uso (dentro de 2 meses siguientes a la transferencia).

Para enfrentar los sueros con las proteínas transferidas al PNC, se procedió a incubar toda la noche dichos sueros diluidos 1:50 y 1:200 en una solución que contienen PBS, Nonidet P-40 al 0.01% y leche descremada en polvo al 5% (Sveltes<sup>MR</sup>) (Anexo # XII) o bien con el Amortiguador de Dilución del 1er. Anticuerpo en Transferencia (ADAT) (Anexo # XIII).

Transcurrido el tiempo de incubación, las tiras se lavaron tres veces por 10 min en agitación constante utilizando una solución de Tritón X-100 al 1% en PBS. Posteriormente, se procedió a incubar las tiras con el conjugado de peroxidasa de rábano acoplado a inmunoglobulinas de cabra anti-inmunoglobulinas humanas totales (Laboratorios Cappel) diluido 1:1000 en PBS y suero bovino de complementado al 10% durante 150 min (Anexo # XIV). Después de esto, se realizaron 3 lavados más con la solución de Tritón X-100 al 1% en PBS. Finalmente, la reacción se reveló con 2 ml de solución recientemente preparada de 4-cloro-naphtol al 0.05%, metanol al 20% y peróxido de hidrógeno al 0.01% (Anexo # XV). La

reacción se detuvo lavando con agua destilada. Posteriormente las tiras se secaron y fotografiaron.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Patrón isoenzimático.

El zimodemo de los trofozoitos de E.histolytica presentes en las heces de los 80 individuos estudiados, se determinó con el cultivo del parásito en el medio de Robinson seguido del análisis electroforético en geles de almidón del patrón de migración isoenzimático según lo descrito por Sargeant y col (1978, 1979, 1980b). De las 80 muestras, 25 tuvieron un patrón de zimodemo patógeno (ZP) y las restantes 55, un patrón no patógeno (ZNP) (Ver Tabla 2). En general, el lisado de los parásitos que mostraron el patrón de zimodemo patógeno correspondieron a la presencia de una banda  $\beta$  en la enzima PGM así como una banda de corrimiento rápido o banda adelantada en la enzima HE, lo cual corresponde a lo descrito por Sargeant. De los 22 zimodemos descritos por Sargeant (1988), 10 corresponden a amibas patógenas y sólo se pudieron identificar 2 de ellos; el zimodemo tipo VII en 3 casos y el zimodemo tipo XII en 2 casos. Los otros 20 patrones que cumplieron con los requisitos antes descritos, se diferencian por presentar una migración particular de las bandas de la enzima GPI así como de mostrar una banda  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\tau$  o bien una combinación de ellas.

En el caso de las muestras con un patrón de zimodemo no patógeno, se reconocieron los tipos I (2 casos), III (8 casos), IV (3 casos), V (4 casos), VIII (25 casos), IX (5 casos), X (2 casos), XVII (5 casos) y XVIII (1 caso) (Ver Figura 6). Resulta de interés que cerca del 50% de las muestras de los individuos con parásitos de ZNP correspondieron al zimodemo tipo VIII.



**TABLA 2. FRECUENCIA Y CARACTERIZACION DEL ZIMODEMO DE PARASITOS OBTENIDOS DE HECES DE INDIVIDUOS CON AMIBIASIS ASINTOMATICA.**

ZIMODEMO	CRITERIOS	TIPO	FRECUENCIA
Patógeno	Ausencia de banda $\alpha$ (PGM)	P	20
	Presencia de banda $\beta$ (PGM)	VII	2
	Banda adelantada (HK)	XII	3
	ME característica Migración variable de GPI		
No Patógeno	Presencia de banda $\alpha$ (PGM)	I	2
	Ausencia de banda $\beta$ (PGM)	III	8
	Sin banda adelantada (HK)	IV	3
	ME característica	V	4
	Migración variable de GPI	VIII	25
		IX	5
		X	2
		XVII	5
	XVIII	1	

P: Zimodemo Patógeno no reportado en la literatura.

## 7.2. Hemaglutinación Indirecta.

La determinación del título de anticuerpos por IHA se realizó después de detectar la presencia de anticuerpos por la técnica de CIEF.

La dilución mínima empleada para la detección del título fue de 1:8. Por abajo de esta dilución, se consideró sero- reactividad negativa. Los títulos de anticuerpos determinados variaron de negativo a 1:256. Respecto a los sueros de individuos que portaron amibas con ZP, se observaron títulos de negativo a 1:128 en tanto que en aquéllos con amibas de ZNP, los títulos variaron de negativos a 1:256.

En la Figura 7 se muestra que el mayor número de casos correspondió a sueros de individuos cuyo título de HAI fué de 1:16. De éstos, 13 casos correspondieron a individuos cuyos parásitos recuperados de sus heces mostraron un ZP y 23 casos a individuos portadores de parásitos con ZNP.

Respecto al número de casos con título negativo, 3 de éstos fueron ZP y 8 de ZNP. Con título 1:8, 1 caso presentó ZP y 1 ZNP; respecto a la dilución 1:32 sólo 3 fueron de ZP y 14 de ZNP. El título 1:64 presentó 2 casos con ZP y 4 con ZNP y finalmente, el título 1:128 incluyó 3 casos con ZP y 2 con ZNP. Sólo en el grupo de individuos con parásitos de ZNP se determinaron 3 casos con título de 1:256.

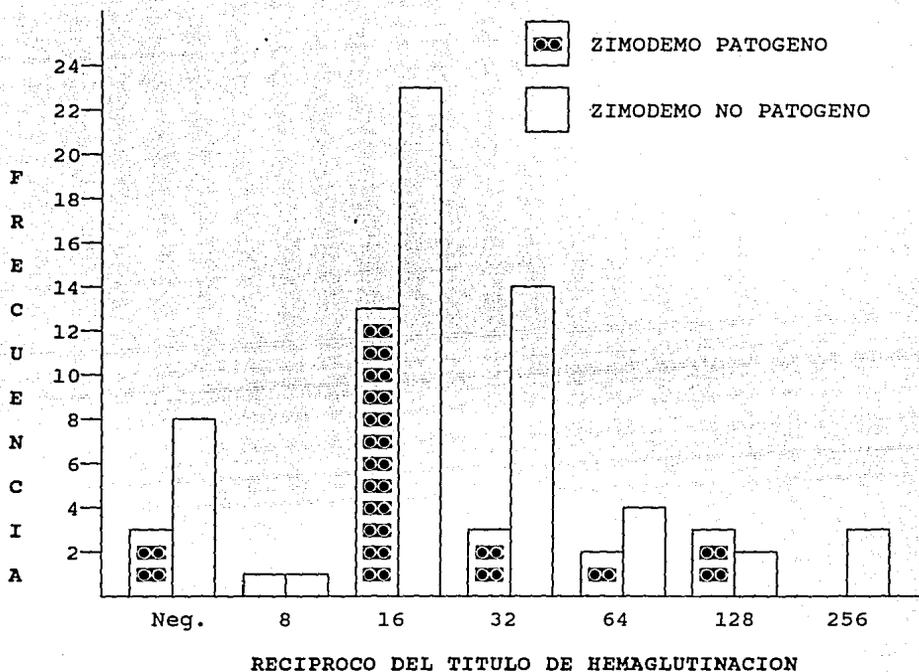


FIGURA 7. FRECUENCIA DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS DETERMINADOS POR IHA EN MUESTRAS SERICAS DE INDIVIDUOS INFECTADOS CON *E. histolytica* DE ZIMODEMO DEFINIDO. El patrón isoenzimático de los trofozoítos obtenidos de heces de individuos asintomáticos se determinó por Electroforesis en geles de almidón de capa delgada. La determinación de los títulos de anticuerpos de las muestras séricas elegidas se probaron por IHA. Los títulos se reportan como la recíproca de la dilución sérica.

### 7.3. Determinación del rendimiento de proteínas en los extractos solubles totales del parásito.

Con el objeto de determinar el mejor procedimiento de extracción de proteínas del parásito en cuanto a rendimiento e integridad, se probaron 5 métodos que se diferenciaron entre sí por emplear diferentes procedimientos de lisis celular (calentamiento u homogeneización), uso ó no de diferentes inhibidores de proteasas y empleo o no de agentes solubilizantes (esto es, detergentes o solventes orgánicos).

En todos los casos se empleó el mismo número de trofozoitos (un millón) y para valorar el rendimiento de proteínas se hizo la determinación cuantitativa en las fracciones obtenidas, utilizando la microtécnica de Lowry, según lo descrito en Material y Métodos.

En la Tabla 3 se muestran las diferencias respecto al rendimiento del contenido de proteínas dependiendo del procedimiento empleado. Como pudo observarse, el mayor rendimiento de proteínas obtenidas después del tratamiento de los parásitos se logró con aquellas técnicas en las cuales los trofozoitos se homogeneizaron en presencia de Tritón X-100 o con el inhibidor de proteasas pHMB con un rendimiento de 1.27 ng y 1.28 ng respectivamente.

Un rendimiento menor de proteínas se logró al tratar por ebullición los parásitos contenidos en una solución con pHMB o con la mezcla de inhibidores de proteasas en donde 0.78 ng se recuperaron en el primer caso y sólo 0.73 ng en el segundo.

Cuando las amibas se trataron por homogeneización en presencia de ácido acético y diálisis, se recuperaron sólo 0.20 ng de proteína soluble por  $1 \times 10^6$ , resultando ser éste el procedimiento que mostró el menor rendimiento en proteínas.

**TABLA 3. EFICIENCIA EN LA EXTRACCION DE PROTEINAS DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica EMPLEANDO DIFERENTES METODOS.**

METODO	CONCENTRACION DE PROTEINA (mg/10 <sup>6</sup> trofozoitos) <sup>a</sup>		
	X		S
pHMB <sup>b</sup> -ebullición	0.786	±	0.002
MIP <sup>c</sup> -ebullición	0.738	±	0.057
MIP+TX-100 <sup>d</sup> -homogeneización	1.278	±	0.122
pHMB-homogeneización	1.283	±	0.133
MIP+AA <sup>e</sup> -homogeneización	0.203	±	0.036

- a: Las concentraciones proteínicas de los extractos se determinaron en las fracciones solubles del parásito empleando el método de Lowry. Los datos se refieren a dos experimentos independientes.
- b: para-hidroximercuribenzoato
- c: mezcla de inhibidores de proteasas (Ver Material y Métodos)
- d: Tritón X-100
- e: Acido acético.

#### 7.4. Análisis electroforético de los extractos totales solubles del parásito.

Con la finalidad de determinar la complejidad e integridad físicoquímica de las diferentes preparaciones antigénicas obtenidas por los 5 métodos previamente descritos, se llevó a cabo un análisis electroforético en geles de poliacrilamida preparados a concentración constante del 10% o en gradiente continuo de 5 a 15% de acrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio (SDS) y en condiciones reductoras con beta-mercaptoetanol de acuerdo a lo decrito en Material y Métodos.

En la Figura 8B se muestra el patrón obtenido cuando se separaron los componentes de la mezcla antigénica del parásito en un sistema en gradiente continuo 5 a 15 % de acrilamida. En los carriles 1, 3, 5, 7 y 9 se observan los patrones de las fracciones solubles obtenidas en cada uno de los procedimientos empleados, y en los carriles con los números 2, 4, 6, 8 y 10 se muestran los patrones de las fracciones insolubles o pastillas.

Con respecto a los extractos de la fracción soluble obtenida después de tratar por calentamiento la suspensión de células y en presencia de pHMB (carril 1) o con la solución que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas (carril 3), se observó en forma constante, un número reducido de componentes del parásito al compararlos con los patrones obtenidos con los otros métodos empleados (20 y 13 bandas respectivamente).

El análisis de la fracción insoluble o pastilla obtenida por

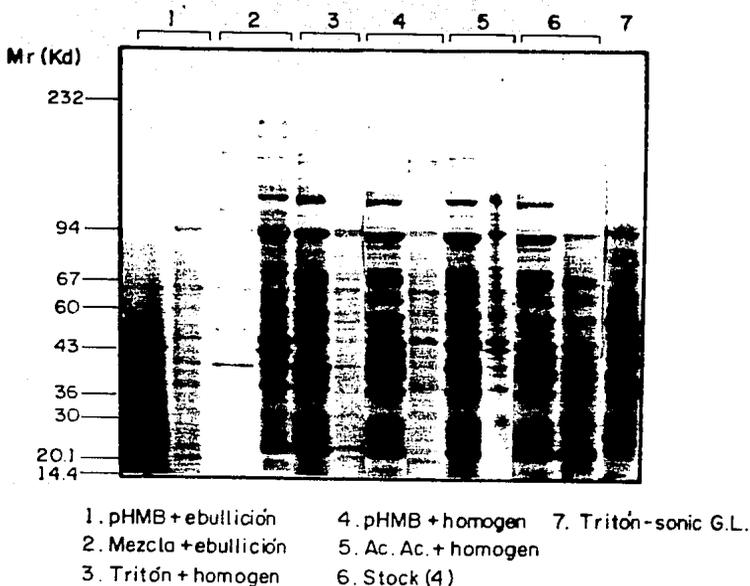
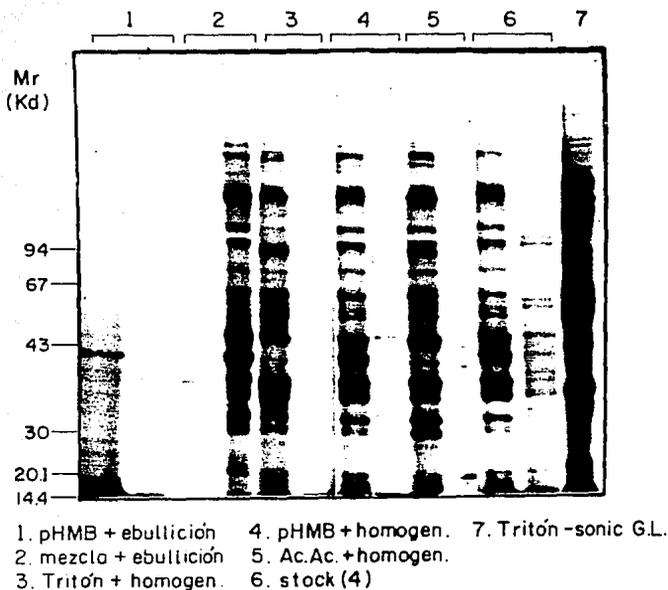


FIGURA 8 A y B. ANALISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS FRACCIONES SOLUBLES E INSOLUBLES DE TROFOZOITOS DE *E. histolytica* TRATADOS BAJO DIFERENTES CONDICIONES. Un total de  $1 \times 10^6$  de trofozoitos de *E. histolytica* se emplearon para obtener las fracciones solubles (carriles 1, 3, 5, 7, 9 y 11) y las pastillas (carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12) del extracto proteínico obtenido usando diferentes tratamientos: ebullición-pHMB (carril 1 y 2), ebullición-mezcla de inhibidores de proteasas (carril 3 y 4), homogeneización-mezcla de inhibidores de proteasas-Tritón X-100 (carril 5 y 6), homogeneización-pHMB (carril 7 y 8), homogeneización-ácido



acético-mezcla de inhibidores de proteasas (carril 9 y 10). Así mismo se analizaron extractos de parásitos empleando  $200 \times 10^6$  trofozoitos y tratamiento por homogeneización-pHMB (carril 11 y 12). Un extracto total soluble de trofozoitos de *Giardia lamblia* tratado por sonicación y Tritón X-100 se analizó y usó como referencia (carril 13). La concentración de proteína empleada en cada caso fue de  $\approx 90 \mu\text{g}$  de proteína por carril. Las fracciones obtenidas se separaron por PAGE-SDS en gradiente 5-15% (Panel A) y a concentración constante al 10% (Panel B). La tinción de proteínas se llevó a cabo con Azul Brillante de Coomassie. Los marcadores de peso molecular se indican en KDa.

los procedimientos antes descritos, mostró también un número reducido de componentes del parásito (carril 2, 21 bandas) en el caso de tratamiento con calentamiento en presencia de pHMB; además, se observó que el patrón es similar al obtenido en la fracción soluble obtenida con el mismo procedimiento.

Cuando se analizó la fracción insoluble que se obtiene de los parásitos tratados por calentamiento y en presencia de una mezcla compleja de inhibidores de proteasas, se observó un gran número de componentes del parásito que sugirió que no todos los antígenos del parásito logran solubilizarse con el procedimiento aplicado (carril 4, 34 bandas).

Cuando se comparó el patrón electroforético mostrado por las fracciones solubles de los extractos amibianos obtenidos por homogeneización en presencia de Tritón X-100, mezcla de inhibidores de proteasas (carril 5) y los extractos del parásito obtenidos homogeneizando la mezcla en presencia de pHMB (carril 7) o con tratamiento con ácido acético (carril 9) se observó que estos patrones son similares entre sí detectándose 35, 38 y 36 bandas en cada uno de ellos, respectivamente.

A pesar de la similitud numérica en proteínas entre esas fracciones, el grado de definición en el patrón proteínico es diferente en cada caso. Una mejor definición se observó cuando los antígenos del parásito se solubulizaron por homogeneización en una solución que contenía pHMB (carril 7). Además, este patrón antigénico fué el mismo cuando se aplicó el mismo tratamiento a un mayor número de parásitos (200 millones de trofozoitos) según se

puede apreciar en la figura 8B, carril 11, lo que parece indicar que hay una alta reproducibilidad en el método para la recuperación de antígenos de E.histolytica.

El patrón electroforético de la fracción insoluble obtenida por homogenización en presencia de Tritón X-100 (carril 6, 22 bandas), en presencia de pHMB (carril 8 y 12, 22 bandas cada uno) o en presencia de ácido acético (carril 10, 26 bandas) confirma claramente una baja recuperación de proteínas a partir de dicha fracción cuando se comparó con la fracción soluble, mostrando un menor número de componentes.

De esta forma, los resultados obtenidos en estos análisis indican que los patrones de los antígenos amibianos son altamente complejos, conteniendo aproximadamente 40 bandas proteicas con un peso molecular que varía entre 10 y 220 kDa. En éstos, las bandas proteínicas más abundantes por tinción con el colorante Azul de Coomassie fueron aquellas de 119, 98, 46, 39, 37 y 22 kDa.

El análisis del patrón electroforético de las proteínas a partir de una mezcla compleja de antígenos amibianos, analizados en el sistema electroforético en geles a concentración constante del 10% de poliacrilamida y en presencia de SDS y en condiciones reductoras (Figura 8A) permitió observar que, cuando la muestra se trató con ebullición en una solución que contiene mezcla de inhibidores de proteasas (carril 3 y 4) o bien en una solución que contiene pHMB (carril 1 y 2), las fracciones solubles mostraron 12 bandas en el primer caso (carril 1) y 7 bandas en el 2do (carril 3). El carril 2 corresponde a la fracción insoluble posterior al

tratamiento con ebullición y pHMB con 11 bandas y la fracción insoluble obtenida al tratar la mezcla antigénica amibiana y en presencia de una mezcla de inhibidores muestra hasta 29 bandas según se aprecia en el carril 4, lo cual parece indicar que un gran número de componentes no se solubiliza en estas condiciones y con este tratamiento.

El patrón electroforético de las fracciones solubles obtenidas al tratar la mezcla de antígenos amibianos con homogeneización y en presencia de Tritón X-100 (carril 5) o bien en presencia de pHMB (carril 7) o en caso de recuperarlos por tratamiento con ácido acético (carril 9) proporcionaron resultados similares. Así se observó que los patrones obtenidos con estos métodos contuvieron 25, 31 y 28 bandas respectivamente. El análisis de estos 3 procedimientos permitió determinar una mejor definición del patrón electroforético cuando los trofozoítos fueron homogeneizados en presencia de pHMB. Estos datos fueron similares a los obtenidos cuando la mezcla antigénica se trató en condiciones similares y se analizó en geles continuos con 5-15% de acrilamida (Figura 8B, carril 11).

La fracción insoluble obtenida al tratar a los trofozoítos por homogeneización y en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas y de Tritón X-100 (carril 6) mostró un total de 10 bandas con un grado de definición muy bajo. Por otro lado, algo similar ocurrió con la fracción insoluble obtenida después de homogeneizar en presencia de pHMB, observándose tenuemente un total de 12 bandas (carril 8).

Finalmente, al analizar la fracción insoluble obtenida al tratar los trofozoitos por homogeneización y en presencia de ácido acético se observó que el carril en el cual se colocó la muestra presenta un corrimiento con deformaciones y con menor definición del patrón de proteínas, compuesto de  $\approx 13$  bandas (carril 10).

Al comparar el grado de definición de los patrones electroforéticos de las proteínas obtenidas después de los diferentes tratamientos empleados, se observó una mejor separación de los componentes proteínicos cuando se empleó el sistema en gradiente continuo (5-15%) en comparación con aquéllos corridos a concentración constante (10%) de acrilamida. Esto se pudo inferir al analizar el número de bandas resueltas en cada caso, el cual siempre resultó inferior en el sistema a concentración constante.

Los datos obtenidos sugieren que el empleo del sistema PAGE-SDS y en presencia de beta-mercaptoetanol en gradiente continuo 5-15% permite una mejor separación de los componentes proteínicos a partir de una mezcla compleja de antígenos amibianos, así como una mayor definición de dicho patrón. Por lo anterior, este sistema electroforético se seleccionó para realizar los ensayos de IET posteriores.

## 7.5. Inmunoelctrotransferencia.

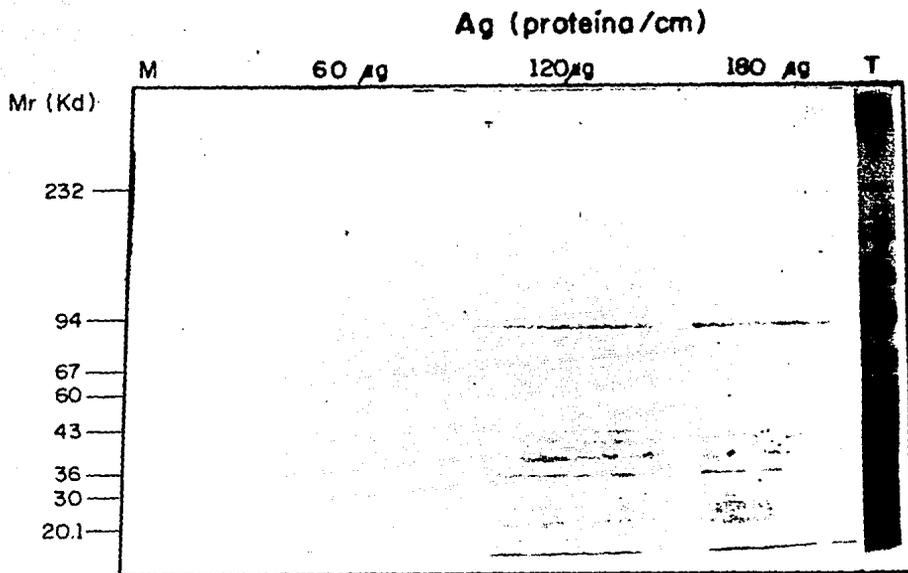
Considerando los resultados descritos anteriormente respecto al procedimiento para la obtención del extracto soluble total como antígeno amibiano, se seleccionaron el tratamiento con homogeneización en presencia de pHMB y la separación electroforética de los componentes de dicha mezcla de antígenos en el sistema de geles de poliacrilamida con SDS en gradiente continuo 5-15% y con beta-mercaptoetanol para establecer las condiciones estandar para el ensayo de IET.

Con el objeto de determinar la cantidad óptima de proteína para transferir al PNC y de esta forma asegurar una buena reactividad con el suero a probar, se emplearon 3 concentraciones diferentes de proteína (60, 120 y 180  $\mu\text{g}$  por cm de amplitud del gel).

Los resultados de este ensayo se pueden observar en la Figura 9, donde se muestra un gel de poliacrilamida teñido con Azul de Coomassie después de la transferencia. En el primer carril de la izquierda marcado con M, se muestran los marcadores de peso molecular empleados y en los 3 siguientes carriles se aprecian las 3 diferentes concentraciones de proteína empleadas (60  $\mu\text{g}/\text{cm}$ , 120  $\mu\text{g}/\text{cm}$  y 180  $\mu\text{g}/\text{cm}$ ).

De esta forma se apreció que cuando se empleó una mayor concentración de proteína, no ocurrió una transferencia total de la misma y una cantidad de ésta permaneció en el gel.

Finalmente, en el carril del extremo derecho aparece un



**FIGURA 9. ANALISIS ELECTROFORÉTICO DE EXTRACTOS SOLUBLES DE *E. histolytica*.** Se emplearon 3 diferentes concentraciones proteicas de extracto soluble de *E. histolytica* (60, 120 y 180  $\mu$ g/cm de proteina antigénica) obtenido por homogeneización en presencia de p-HMB 10 mM. Esta mezcla soluble de antígenos se separó en un sistema de PAGE-SDS en gradiente 5-15% y en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol; una vez transferida a PNC se tiñó el gel con el colorante Azul Brillante de Commassie. Carril M) Marcadores de peso molecular teñidos con Azul Brillante de Comomassie que permanecieron en el gel después de transferidos al PNC. 60, 120 Y 180  $\mu$ g de proteina/cm de gel después de transferido a PNC, retenidas en el gel teñido con el mismo colorante. Carril T) Fragmento del mismo gel teñido con el mismo colorante antes de ser transferido al PNC.

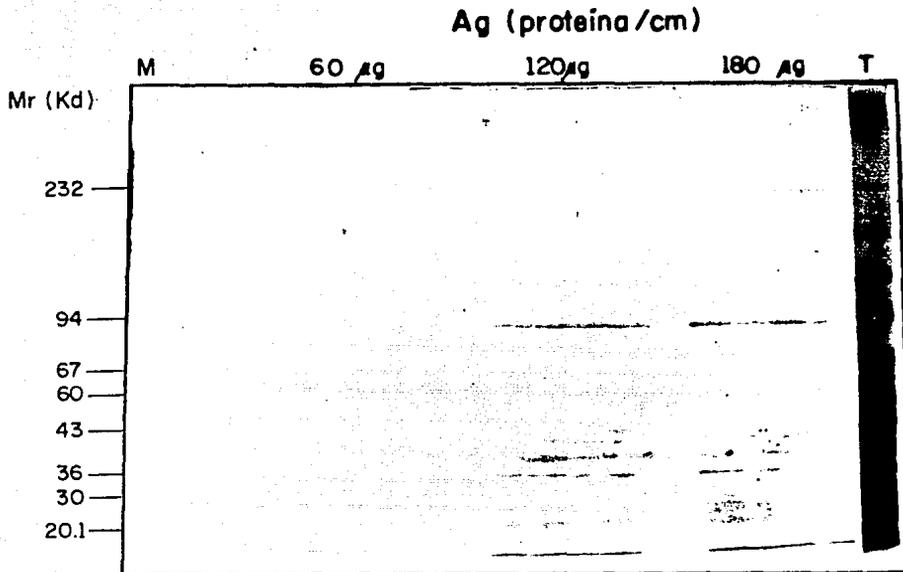


FIGURA 9. ANALISIS ELECTROFORETICO DE EXTRACTOS SOLUBLES DE E. histolytica. Se emplearon 3 diferentes concentraciones proteicas de extracto soluble de E. histolytica (60, 120 y 180 µg/cm de proteina antigenica) obtenido por homogeneización en presencia de p-HMB 10 mM. Esta mezcla soluble de antigenos se separó en un sistema de PAGE-SDS en gradiente 5-15% y en presencia de β-mercaptoetanol; una vez transferida a PNC se tiñó el gel con el colorante Azul Brillante de Comassie. Carril M) Marcadores de peso molecular teñidos con Azul Brillante de Comomassie que permanecieron en el gel después de transferidos a PNC. 60, 120 Y 180 µg de proteina/cm de gel después de transferido a PNC, retenidas en el gel teñido con el mismo colorante. Carril T) Fragmento del mismo gel teñido con el mismo colorante antes de ser transferido al PNC.

fragmento del gel de poliacrilamida teñido con Azul de Coomassie previo a la IET que muestra el mismo patrón observado en los ensayos para la selección del mejor procedimiento de obtención del extracto total soluble.

Otra forma de analizar si la concentración de proteína empleada era suficiente, fué tiñendo fracciones del PNC después de realizar la transferencia. Para ello se emplearon 2 procedimientos: Tinción con Tinta India o con Amido-Black (ver Material y Métodos). La tinción de una tira de PNC permite corroborar que la transferencia fué adecuada, de ahí que resulte necesario elegir el mejor protocolo.

En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos después de teñir una tira de 0.4 mm de ancho de cada una de las 3 diferentes concentraciones empleando por separado ambos protocolos de tinción. Se observó claramente que en la tira con la mayor concentración de proteína transferida (180  $\mu\text{g}/\text{cm}$ ), se logró una menor definición del patrón electroforético, independientemente del procedimiento de tinción empleado.

Al comparar ambos protocolos de tinción, se observó que cuando se empleó Amido-Black para teñir las tiras con los marcadores de peso molecular, se logró una definición adecuada; ésto no ocurrió completamente en las tiras donde se encontraba transferida la mezcla compleja de antígenos amibianos, para lo cual, el teñir con Tinta India resultó adecuado.

Otro procedimiento para evaluar la concentración óptima de proteína por transferir consistió en probar la reactividad de los

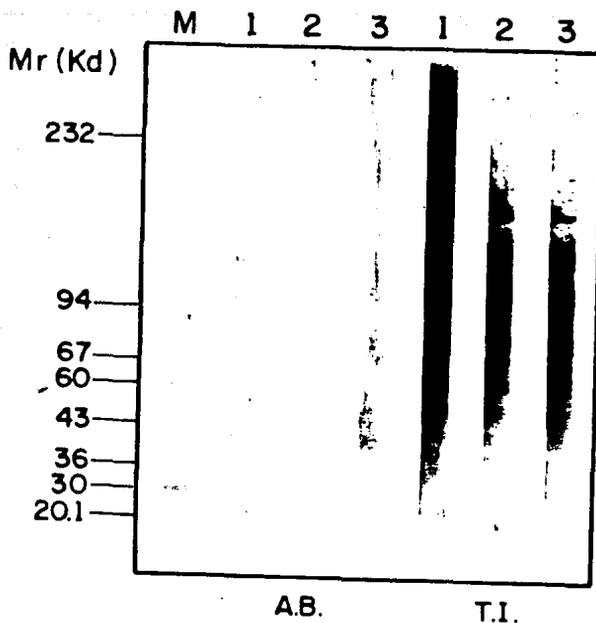


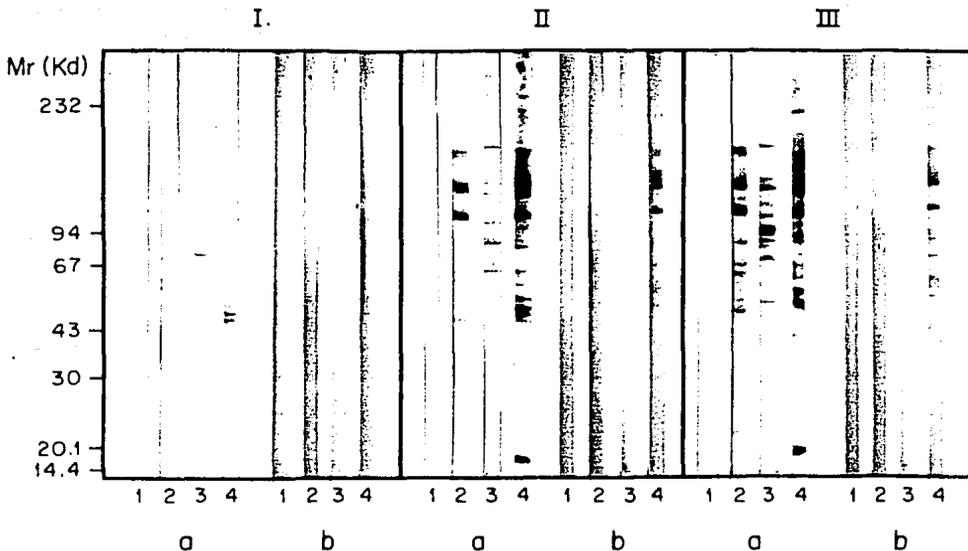
FIGURA 10. TINCIÓN DEL PAPEL DE NITROCELULOSA TRANSFERIDO CON EXTRACTO TOTAL SOLUBLE DE E.histolytica. Se probaron 2 protocolos para tinción del PNC después de transferir diferentes concentraciones del extracto total soluble amibiano a partir de un gel de poliacrilamida. 1) 180  $\mu\text{g}$  de proteína/cm de gel. 2) 120  $\mu\text{g}$  de prot./cm de gel. 3) 60  $\mu\text{g}$  de prot./cm de gel. A.B.) Protocolo de tinción que emplea Amido-Blanck. T.I.) Protocolo de tinción que emplea Tinta India. M) Marcadores de Peso Molecular teñidos con Amido-Black y expresados en kDa.

antígenos transferidos a tiras de PNC con sueros de humanos que presentaron diferentes condiciones clínicas de amibiasis: Asintomático (carril 2), Amibiasis Intestinal (carril 3) y Amibiasis Hepática (carril 4) así como el suero de un individuo recién nacido (carril 1) (Ver Figura 11). Estos sueros se emplearon en dos condiciones de dilución frente a cada concentración: 1:50 (panel a) y 1:200 (panel b).

En la Figura 11 en los paneles Ia, IIa y IIIa se muestran los resultados al emplear estos sueros a una dilución 1:50. Se puede observar una relación directamente proporcional entre el número de bandas que reaccionaron con los sueros y la concentración de proteína transferida en cada caso. De esta forma, la concentración óptima parece ser de 120  $\mu\text{g}/\text{cm}$  ya que a una menor concentración (60  $\mu\text{g}/\text{cm}$ ) un menor número de bandas logró reconocerse. En el caso en que se empleó una mayor concentración de proteína (180  $\mu\text{g}/\text{cm}$ ) el número de bandas fué comparable al de la concentración media (120  $\mu\text{g}/\text{cm}$ ) sin embargo se observó un fondo de reacción alto, lo cual resultó en mala definición de las proteínas separadas (Ver panel I, carril 4a; panel II, carril 4a y panel II, carril 4a).

El análisis del patrón de reconocimiento de antígenos por sueros diluidos 1:200 (ver Ib, IIb y IIIb) permitió observar una menor reactividad frente a los antígenos amibianos cuando se compara con la reactividad de los sueros diluidos 1:50.

Respecto a la reactividad mostrada por los diferentes sueros analizados, se pudo observar que el suero proveniente de un individuo con amibiasis hepática mostró mayor reactividad al



**FIGURA 11. IDENTIFICACION DE ANTIGENOS DE *E. HISTOLYTICA* RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS DE PACIENTES ASINTOMATICOS DETERMINADOS POR IET.** El extracto soluble total de trofozoitos del parásito se obtuvo por homogeneización en presencia de PHMB. Los componentes de la mezcla de proteínas se separaron por PAGE-SDS en gradiente 5-15% con  $\beta$ -mercaptoetanol. La transferencia se realizó a PNC en tiras de 4 mm de ancho en concentraciones de 60  $\mu\text{g}/\text{cm}$  de gel (Panel I), 120  $\mu\text{g}/\text{cm}$  de gel (Panel II) y 180  $\mu\text{g}/\text{cm}$  de gel (Panel III). Cada tira se expuso a los sueros diluidos 1:50 (Panel a) y 1:200 (Panel b). Los sueros empleados fueron: individuo de 2 meses de edad (carril 1), individuo con amibiasis asintomática (carril 2), paciente con amibiasis intestinal (carril 3) y un paciente con amibiasis hepática (carril 4). En todos los casos, la reacción se reveló con el conjugado de inmunoglobulinas de cabra anti-inmunoglobulinas totales humanas acopladas a peroxidasa de rábano. Los marcadores de peso molecular se indican en kDa.

compararlo con cualquiera de los otros 2 estados clínicos de amibiasis, así como con el suero del individuo control. Al analizar los sueros de pacientes con amibiasis intestinal, se observó una baja reactividad respecto a la detectada por el suero del paciente con amibiasis asintomática. Por otro lado, en ninguno de los casos se observó reactividad con el suero del individuo recién nacido.

En relación a las condiciones de transferencia, un voltaje constante de 100 V (entré 200 y 500 mA) durante 2 h, permitió una movilización adecuada de las proteínas hacia el PNC, según se pudo constatar al compararlo con otros protocolos de transferencia probados (datos no mostrados). En uno de estos protocolos, se sugiere el empleo de voltaje más bajo durante periodos mas largos, como ejemplo: 65 V durante 6 h o 30 V durante toda la noche resultando en una transferencia muy similar a cuando se realiza en las condiciones propuestas en este trabajo.

Finalmente, se probaron 2 protocolos en relación a la reactividad del suero inmune. En el primer caso, se empleó una solución que contiene albúmina sérica bovina al 3% con Tritón X-100 al 4% en PBS (Figura 12, panel A) y en el segundo caso una solución que contiene leche descremada en polvo (Sveltes<sup>MR</sup>) al 5% y Nonidet P-40 al 0.1% en ASF (Figura 12, panel B). Cuando las muestras se diluyeron en albúmina sérica bovina se observó una alta reactividad hacia varios componentes de E.histolytica. Por el contrario, cuando los sueros de humanos infectados con otros parásitos se diluyeron en leche descremada en polvo al 5%-Nonidet P-40 en PBS, se observó una marcada reducción de reactividad no específica hacia

componentes de E.histolytica.

El suero de individuos infectados con G.lamblia mostraron un reconocimiento débil de 4 bandas de proteínas (carriles 5 y 6), en tanto que el suero de un infectado con E.vermicularis (carril 10) reaccionó con otros 4 componentes de E.histolytica. El suero de un individuo infectado con A.lumbricoides (carril 11) reconoció hasta 9 componentes del parásito uno de los cuales ( $\approx 70$  kDa) fué fuertemente reconocido. En el caso de los sueros de individuos infectados con H.nana, uno mostró una reacción débil (carril 7), no observándose ninguna reactividad en los sueros restantes (carril 8 y 9). Con respecto a los sueros control de un individuos no infectado (carril 1), de un paciente portador asintomático (carril 2), de un paciente con amibiasis intestinal aguda (carril 3) y de un paciente con amibiasis hepática (carril 4) no se mostró fondo de reactividad y los antígenos del parásito fueron específicamente reconocidos al emplear leche en polvo descremada/Nonidet P-40 en PBS.

Los resultados observados sugieren que el uso de leche descremada se traduce en una reducción importante de reacciones inespecíficas, así como del fondo de reactividad sin que se afecte la actividad de los sueros control previamente empleados.

7.6. Análisis del patrón de reconocimiento de antígenos de E.histolytica por los anticuerpos presentes en el suero de pacientes con infección intestinal por otros parásitos.

Varios estudios han sugerido que la amibiasis en México se presenta en las áreas que son también endémicas para otras enfermedades parasitarias del intestino. De esta forma, resulta importante probar la reactividad que muestran los sueros de individuos infectados con otros parásitos diferentes a E.histolytica, frente a los antígenos de éste último.

En estos ensayos, los patrones de reactividad de los sueros de individuos con amibiasis sintomática o asintomática, ya mostrados previamente en los ensayos de estandarización de la técnica de IET se compararon con el patrón de reactividad de los sueros de individuos no infectados (suero de individuos recién nacido o niño de 2 meses de edad), así como con el patrón de reactividad de los sueros de individuos infectados con otros parásitos.

En la Figura 12, panel A se muestran dichos patrones de reactividad cuando los sueros se diluyen 1:50 en PBS con albúmina sérica bovina al 3% con Tritón X-100 al 4%; y en el panel B, el patrón de reactividad frente a los atígenos de E.histolytica cuando los sueros se diluyeron 1:50 en una solución de PBS con leche descremada en polvo al 5% y Nonidet P-40 al 0.1%. Se observó una diferencia muy marcada en el patrón de reactividad hacia los antígenos de E.histolytica dependiendo del diluyente empleado para el suero.

Cuando las muestras se diluyeron en PBS al 3% más Tritón X-100 al 4%, se observó una mayor reactividad hacia varios componentes antigénicos del parásito (panel A). Por el contrario cuando los sueros de humanos infectados con otros parásitos intestinales se diluyeron con leche descremada en polvo al 5% con NP-40 en PBS se observó una marcada reducción en las reacciones de tipo inespecífico (panel B, carril 5-12). Esto no ocurrió con los sueros de individuos que presentaron algún tipo clínico de amibiasis (Panel B tiras 2-4). El análisis individual de cada par de sueros de individuos infectados con un tipo dado de parásito intestinal, mostró que en el caso de los sueros de individuos infectados con el parásito intestinal G.lamblia, el reconocimiento de componentes del parásito E.histolytica se redujo a 4 bandas (Ver panel B, carril 5 y 6). En uno de los sueros de individuos infectados con E.vermicularis (panel B, carril 9 y 10) también se observó reacción con sólo 4 antígenos amibianos.

En el caso de los individuos infectados con el parásito A.lumbricoides (panel B, carril 11 y 12), se llegaron a reconocer hasta 9 componentes del parásito, de los cuales, un componente cuyo peso molecular es de  $\approx 70$  kDa, fué mas intensamente reconocido.

De los sueros de individuos infectados con H.nana sólo uno de ellos mostró una ligera reactividad con componentes de E.histolytica (panel B, carril 7 y 8).

La reactividad del suero del individuo no infectado, considerado como control negativo (carril 1) prácticamente fué nula al diluir este suero en la solución de leche descremada y Nonidet

P-40 en PBS (panel B).

En el caso de la reactividad mostrada por el suero de los individuos con algún tipo clínico de amibiasis, el tratamiento del suero con esta solución, no produjo disminución en el reconocimiento de los componentes del parásito, aunque si hubo mejoría en la definición del patrón por la disminución del fondo en las tiras de PNC.

A

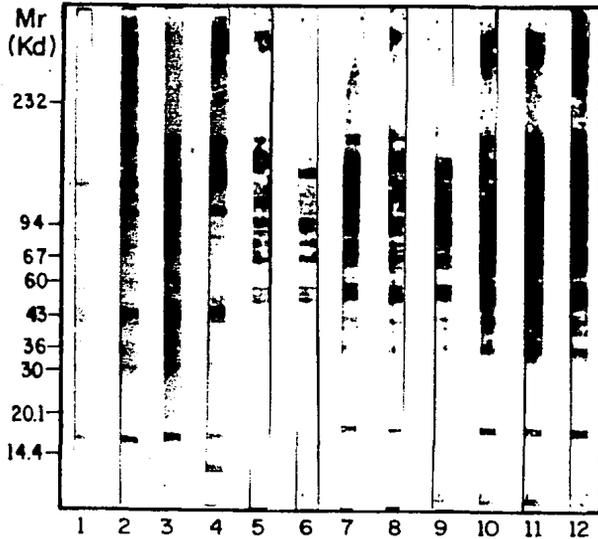
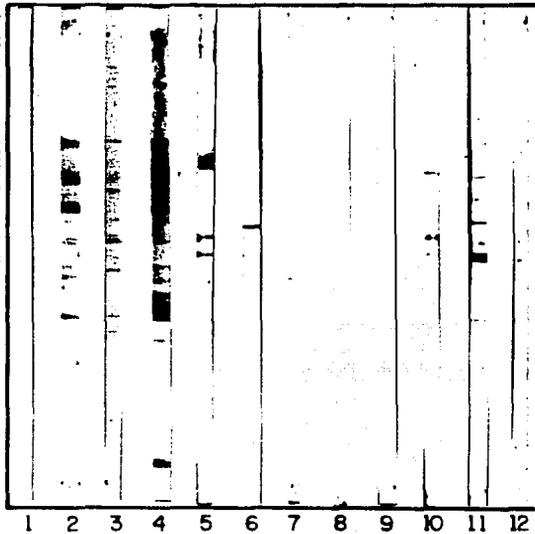


FIGURA 12 A y B. RECONOCIMIENTO DE ANTIGENOS DE *E.histolytica* POR SUEROS DE INDIVIDUOS CON INFECCION POR OTROS PARASITOS INTESTINALES. Los antigenos solubles de *E.histolytica* se obtuvieron por homogeneización en presencia de PHMB 10 mM y se separaron por PAGE-SDS y se transfirieron a PNC en una concentración de 120  $\mu$ g/cm de gel. Las tiras se expusieron a muestras séricas diluidas 1:50. Los sueros probados incluyeron suero de individuo de 2 meses de edad sano (carril 1), individuo con amibiasis asintomática (carril 2), paciente con amibiasis intestinal (carril 3), paciente con

B



amibiasis hepática (carril 4), sueros de individuos infectados con diferentes parásitos intestinales: Giardia lamblia (carril 5 y 6), Enterobius vermicularis (carril 7 y 8), Hymenolepis nana (carril 9 y 10) y Ascaris lumbricoides (carril 11 y 12). En el panel A se muestran las tiras cuando los sueros se diluyeron en BSA-3% y NP-40 al 0.1% en ASF. En el panel B, los sueros se diluyeron en ASF con leche descremada en polvo al 5% y NP-40 al 0.1%. Los marcadores de peso molecular se indican en kDa.

### 7.7. Análisis de los patrones de reconocimiento antigénico por los sueros de pacientes con parásitos de diferente zimodemo.

Una vez estandarizada la técnica de IET se procedió a analizar los sueros de individuos cuyos parásitos recuperados de heces mostraron un zimodemo definido como patógeno o no patógeno. Inicialmente se determinó el título de anticuerpos a cada suero individual mediante la técnica de IHA de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos. De esta forma, se separaron los sueros en dos grupos, uno que correspondió a individuos con parásitos de ZP y otro que correspondió a sueros de individuos con parásitos de ZNP. Estos se organizaron en función del título de IHA en el cual resultaron positivos. El ordenamiento se hizo en forma ascendente en función del título.

En la Figura 13 se muestran los patrones de reconocimiento de antígenos de E. histolytica por los sueros de pacientes cuyas amibas en heces mostraron un ZP y en las Figuras 14 A y 14 B se muestran los patrones de los sueros de pacientes cuyos parásitos aislados de heces mostraron un ZNP. Los resultados del ensayo de IHA mostraron que un porcentaje muy alto de sueros en cada grupo presentaron un título de dilución 1:16 con un 52 % en los ZP y 42 % en los ZNP. Respecto al patrón de reconocimiento de antígenos por IET se observó que en una gran cantidad de antígenos son reconocidos por estos sueros y se incluyen antígenos cuyos pesos moleculares van de 10 hasta 165 kDa, en ambos tipos de zimodemo.

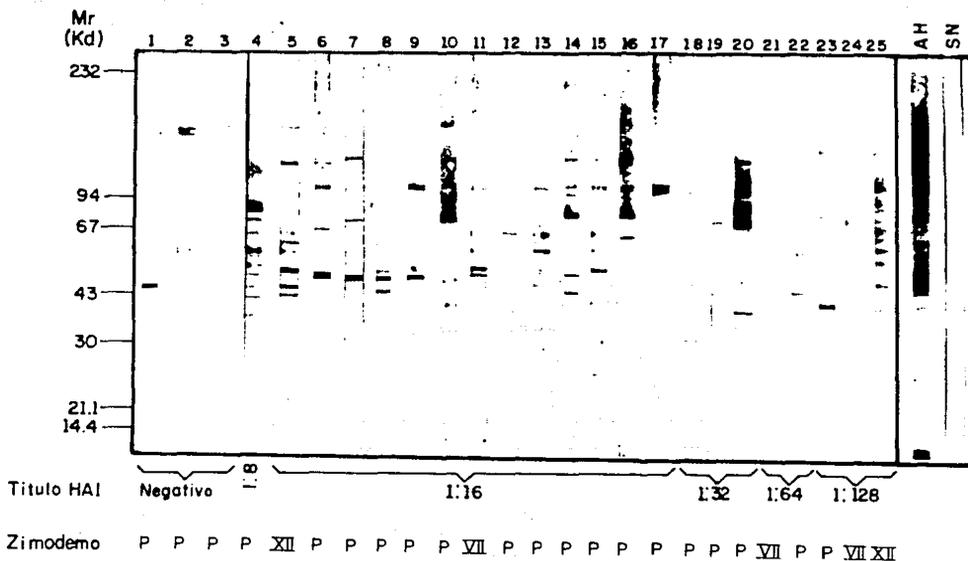


FIGURA 13. ANALISIS POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE MUESTRAS SERICAS DE INDIVIDUOS ASINTOMATICOS INFECTADOS CON *E. histolytica* DE ZIMODEMO PATOGENO. Las muestras séricas de individuos que portaron amibas cuyo zimodemo fué patógeno (ZP) y con titulos de anticuerpo determinados por IHA que van de negativo a 1:128 se probaron por IET como se describió en Material y Métodos. Las diluciones séricas empleadas fueron de 1:25 para sueros con titulos de  $\leq 1:32$  y 1:50 para titulos de IHA  $\geq 1:32$ . P) ZP no descrito. Los controles fueron sueros de pacientes con AH y de un individuos sin historia previa de amibiasis. Los marcadores de peso molecular se indican en kDa.

A

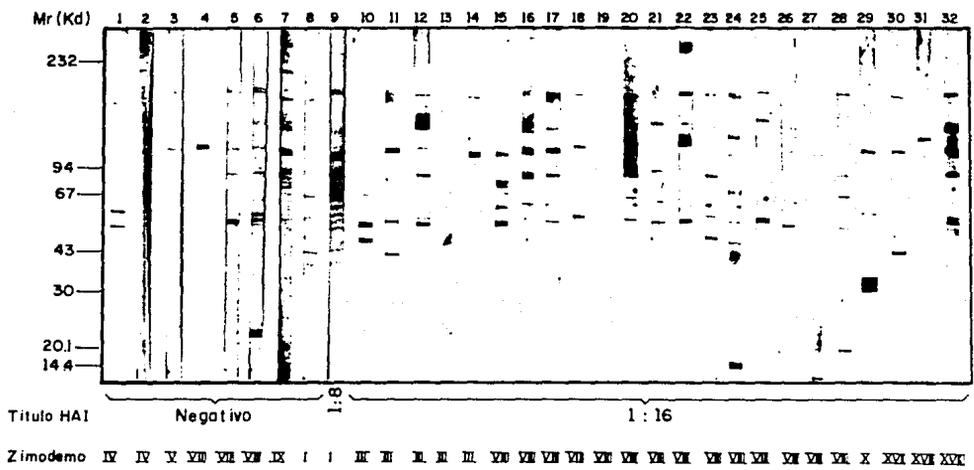
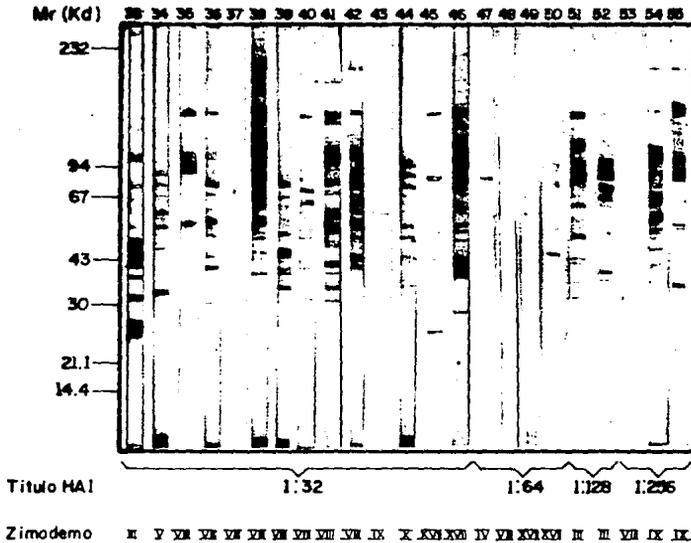


FIGURA 14 A y B. ANALISIS POR IMMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE MUESTRAS SERICAS DE INDIVIDUOS ASINTOMATICOS INFECTADOS CON E.histolytica DE ZIMODEMO NO PATOGENO. Las muestras séricas de individuos que portan amibas con zimodemo no patógeno (ZNP) con titulos de anticuerpo determinados por IHA con titulos de dilución que van de negativo a 1:256 se probaron por IET como se describió en Material y Métodos. Las diluciones séricas empleadas

B



fueron de 1:25 para los sueros con titulos de IHA  $\leq$  1:32 y 1:50 para titulos de IHA  $\geq$  1:32. En el panel A se muestran los antigenos de *E. histolytica* reconocidos por sueros con titulos de HAI  $\geq$  1:16 y el panel B incluye los antigenos reconocidos por sueros con titulos de HAI  $\geq$  1:32. Los marcadores de peso molecular se indican en kDa.

Estos patrones de reconocimiento variaron tanto en el número de componentes reconocidos como en el tipo de proteína reconocida por cada suero en particular, además que no mostraron diferencias particulares relacionadas con el zimodemo o con el título de IHA.

Aunque los patrones de reactividad variaron entre las diferentes muestras séricas probadas, hubo algunos componentes reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros de estos individuos independientemente del zimodemo.

Los sueros de los individuos cuyos parásitos en heces presentan el ZP reconocieron los siguientes componentes del parásito mas frecuentemente: 119 (56%), el doblete 98-100 (52%), el doblete 50-52 (36%) y en igual porcentaje el antígeno identificado como de 65 kDa (36%).

Respecto a los componentes del parásito reconocidos más frecuentemente por los sueros de individuos cuyos parásitos en heces mostraron un ZNP, los antígenos de 165 (73%), el doblete 98-100 (62%), el de 65 (56%) y el de 50 (60%) kDa fueron los mas frecuentemente reconocidos.

Un análisis general de los componentes del parásito reconocidos en estos ensayos independientemente del zimodemo mostrado por los parásitos recuperados de heces, indicó que los antígenos cuyos pesos moleculares corresponden a 165 (61%), el doblete 98-100 (59%) y el antígeno de 65 (50%) fueron los más frecuentemente reconocidos. En la Tabla 4 se muestran estos datos. En ambos casos, las muestras séricas consideradas como negativas por la técnica de IHA a diluciones mayores a 1:8 debido a que no se

presentó reacción con los antígenos de E.histolytica, mostraron reactividad hacia varios componentes del parásito en este ensayo de IET.

**TABLA 4. FRECUENCIA EN EL RECONOCIMIENTO DE ANTIGENOS DE E.histolytica EN ENSAYOS DE IET POR SUEROS DE PACIENTES CON PARASITOS DE ZIMODEMO DETERMINADO.**

Mr (KDa)*	Frecuencia <sup>a</sup> en ZNP (%)	Frecuencia <sup>b</sup> en ZP (%)	Frecuencia <sup>c</sup> total (%)
165	73	36	61
98(d)	62	52	59
50(d)	60	36	51
65	56	36	50
119	36	56	42
78	35	24	31
43	25	20	24

- \*: Pesos moleculares de los componentes antigénicos de E.histolytica mas frecuentemente reconocidos.
- a: Porcentajes de los antígenos reconocidos por los sueros de individuos cuyas amibas en heces muestran un ZNP.
- b: Porcentaje de los antígenos reconocidos por los sueros de individuos cuyas amibas en heces muestran un ZP.
- c: Porcentaje de los antígenos reconocidos por los sueros de individuos portadores asintomáticos sin considerar el Zimodemo de la amiba que portan en intestino.

## 8. DISCUSSION

## DISCUSION.

La amibiasis se ha reconocido como factor importante de elevadas tasas de mortalidad y morbilidad en el mundo, como lo demuestran los datos que Walsh reporta en 1986. Sus estimaciones sugieren la existencia de al menos 500 millones de enfermos en el mundo, 40 de los cuales desarrollan una colitis incapacitante o abscesos extraintestinales; cuando menos 40 mil muertes fueron atribuidas a la amibiasis.

En nuestro país, en una encuesta serológica en niños de la Ciudad de México Gutiérrez-Trujillo y col (1972) determinaron una prevalencia del 3.9%. Landa y col (1972, 1974) en adultos determinaron una frecuencia de 5-6% en una población urbana y 20% en una población semirural de la costa del Golfo de México.

Por algún tiempo se ha sabido que una gran proporción de individuos infectados con el parásito presentan amibiasis asintomática. Las causas de que no se desarrolle la enfermedad aún cuando el parásito se detecta en grandes cantidades en el huésped no se conocen con detalle. Estas involucrarían tanto factores del huésped como del parásito incluyendo en este último caso la patogenicidad de los organismos infectantes. En relación con este aspecto, el estudio de la respuesta inmune en el huésped infectado y su relación con el estado clínico del paciente y el Zimodemo de las amibas presentes en heces de individuos portadores asintomáticos puede aportar información respecto a la evolución y comportamiento de tales individuos. Estos aspectos se abordaron en

este estudio considerando que el Zimodemo de los parásitos infectantes se toma en la actualidad, como un marcador de patogenicidad de acuerdo a lo propuesto por Sargeant (1978, 1979, 1980b).

Así, en el trabajo realizado en esta tesis, de 2048 individuos encuestados se seleccionaron 80, considerando que se pudo determinar a) la presencia de quistes de Entamoeba histolytica por el método de Ferreira, b) el título de anticuerpos por IHA, c) el cultivo de heces en medio de Robinson para la recuperación de los trofozoitos y realizar la determinación del patrón isoenzimático para caracterización de patogenicidad de las amibas que portaban en el intestino en base a los criterios propuestos por Sargeant (1978, 1979, 1980b). Los datos obtenidos en estos ensayos se compararon con aquellos observados en la determinación del patrón de antígenos de E. histolytica reconocido por los sueros de estos pacientes con la técnica de Inmunolectrotransferencia.

La determinación del Zimodemo fué la base que estableció el número total de muestras por estudiar. Esto se debió a que en una proporción de las mismas, en las cuales se lograron cultivar trofozoitos, el patrón isoenzimático no pudo clasificarse considerando los criterios propuestos por Sargeant (Ver Tabla 2) y otra proporción de casos (370, 21%) a pesar de que se demostró la presencia del parásito en heces, no se logró su cultivo en el medio de Robinson (270, 65.4%) (Martínez-García y col, 1990a y b). En relación a estas observaciones, se han reportado datos similares en otros estudios donde el rendimiento del cultivo de heces para la

recuperación de trofozoitos es bajo. Así, Jackson y col (1985) reportan que de 291 casos, en el 71% no se recuperaron trofozoitos de las heces cultivadas.

Respecto a la frecuencia del tipo de amiba recuperada de las heces de los individuos en este estudio, se encontró que el 31% (25 casos) correspondieron a ZP y el 69% (55 casos) a ZNP (Tabla 2). Por su parte Jackson y col (1985), reportan que en 88 muestras de la población de Sud-Africa, se logró el cultivo de trofozoitos en medio de Robinson, siendo 37.5% (33 casos) ZNP y 62.5% (55 casos) ZP, datos que resultan diferentes a lo encontrado para nuestra población. En un estudio en niños de la Ciudad de México, hecho por Jiménez y col (1982) se mostró que de 100 muestras de heces analizadas, 80 (80%) fueron ZNP y 20 (20%) ZP, estos últimos correspondieron a individuos con sintomatología sugestiva de amibiasis intestinal aguda. Por otro lado, Sargeaunt y col (1982b) a partir de 115 muestras de heces con quistes de E. histolytica obtenidas de 3 áreas de México (seleccionadas por la facilidad de obtención), encontraron que 99 muestras (86%) fueron ZNP y 16 (14%) ZP, relacionadas estas con sintomatología intestinal. En otro trabajo de los mismos autores (1984) que incluyó 54 individuos de diferentes ciudades de la India se encontró que 26 casos (48%) fueron ZNP y 28 (52%) ZP, correspondiente al tipo XIV.

Estas diferencias de comportamiento en la frecuencia de Zimodemo podría encontrar explicación en lo propuesto por Sargeaunt respecto a la distribución por región geográfica de los diferentes tipos de zimodemo (1984).

Respecto al tipo de zimodemo identificado en las amibas cultivadas de las heces de individuos en este estudio, el Zimodemo mas frecuentemente identificado fue el VIII (25 casos, 69%) que aunque Jiménez y col lo reportan en 1982 y Sargeaunt y col en 1982b, en una revisión del tema el mismo Sargeaunt no lo menciona para nuestro país (1984 y 1988). Posteriormente se identificó al Zimodemo III (8 casos, 14.54%) que está reportado como el mas frecuentemente reconocido junto con el I en nuestro país (Sargeaunt, 1988). Los zimodemos IX y XVII (5 casos cada uno, 9.09%) le siguen en frecuencia al zimodemo III; el segundo zimodemo no ha sido reportado en nuestro país, hasta ahora. El zimodemo V (4 casos, 7.29%) y los zimodemos XII y IV (3 casos cada uno, 5.45%) ya han sido reportados en nuestro país por otros autores. Con 2 casos cada uno, están los zimodemos VII, I y X (3.63%) y finalmente el zimodemo XVIII. Este último no había sido reportado para México. De manera interesante se observó que la mayoría de las muestras de ZP (20 de 25, 80%) son consideradas de ZP porque cumple con los criterios establecidos por Sargeaunt, aunque no presentan similitud con ninguno de los zimodemos descritos hasta ahora (Ver Tabla 1).

Una posible explicación a este hecho se basaría en las variaciones observadas en el patrón de las enzimas GPI y PGM por la migración de las bandas  $r$  y  $\delta$ , lo cual como propone Blanc y col (1991) depende de la concentración de almidón empleado en el cultivo de Robinson.

En un estudio Sargeaunt y col (1982b) reportan para México los Zimodemos II-XI en tanto que Jiménez y col (1982) reportan el

hallazgo en nuestro país de los Zimodemos I-III, V, VII, VIII y X. En otro trabajo de Sargeaunt (1984) se analizó la distribución geográfica de los zimodemos en el Mundo y reporta los siguientes para México: I-VII, IX, X, XII y XIII. En un trabajo de recopilación el mismo autor (1988), los zimodemos considerados propios de nuestro país son: I, II, II  $\alpha$ -, III  $\delta$ -, IV-VII, IX, X, XII y XIII. De esto resulta que los zimodemos que no han sido reportados para nuestro país son los tipos XVII, XVIII y el tipo VIII que aunque fué reportado por Jiménez y col (1982) para nuestro país, en el trabajo de revisión de Sargeaunt (1988), no lo refiere.

En el análisis respecto a los Zimodemos, se debe considerar que la población estudiada es de individuos portadores asintomáticos y de manera sobresaliente se observó que el 31% portaba amibas de ZP. Estos datos no muestran relación con lo reportado por Gathiram y col (1985) que muestran que el 90% de portadores asintomáticos presentan amibas no patógenas y sólo un 10% presenta características de corrimiento electroforético de isoenzimas correspondiente a ZP. Esto puede deberse a que se presenta multiformidad en los zimodemos determinados en los trofozoitos recuperados de heces de individuos de nuestro país como lo propone Sargeaunt; o bien la existencia de cepas mixtas en un mismo individuo, sin dejar fuera la posibilidad de intercambio genético que explica el origen del zimodemo XX (Sargeaunt, 1985). Otra explicación se basaría en la posibilidad de que nuestros casos hubieran sido detectados en el inicio de la enfermedad puesto que el estudio es transversal, o bien que el patrón isoenzimático

determinado para las amibas recuperadas de sus heces no sea representativo del carácter patógeno de la amiba (Sargeant, 1987, 1988) pues como se conoce, las enzimas que se valoran no participan en mecanismos de patogenicidad. Por otro lado, existen trabajos de Mirelman (1986a y 1986b) y Andrews y col (1990) donde reportan la inestabilidad de este patrón de caracterización de patogenicidad de amibas consideradas no patógenas ante el reto con microbiota proveniente de amibas patógenas.

En nuestro estudio, la respuesta inmunológica se valoró mediante la técnica de IHA, la cual se seleccionó por su alta estabilidad y reproducibilidad (Sepúlveda, 1971, 1972). En este, 11 casos (13.75%) de los 80 estudiados, no mostraron ninguna reactividad al emplear diluciones mayor o igual a 1:8. De estos casos seronegativos, 3 correspondieron a individuos con ZP. De los 69 sueros restantes (86.25%), en 8 (10%) de estos se detectaron anticuerpos con títulos iguales o mayores a 1:128, título considerado para determinar existencia de amibiasis invasora reciente o activa (Kessel y col, 1965; García-Rosales y col, 1986). El estado clínico de todos los individuos estudiados en este trabajo fué de portadores asintomáticos al momento de recuperar muestras y por antecedentes clínico-epidemiológicos, lo cual nos sugiere la necesidad de un seguimiento de los mismos en un estudio longitudinal. Datos similares a los nuestros fueron reportados por Gathiram y col (1985) quienes demostraron en un estudio hecho en una población rural de Africa que el 10% de los individuos portadores asintomáticos presentan anticuerpos antiamibianos

circulantes, aunque las amibas recuperadas de estos individuos portadores asintomáticos fueron en un 10% de características patógenas y en un 21% de estos individuos con amibas de ZP hubo positividad serológica, datos que difieren de los nuestros.

El comportamiento serológico de los individuos estudiados podría ser explicado por la presencia de anticuerpos de memoria como resultado de una infección amibiana pasada; los reportes de Healy (1970), Juniper (1972) y Patterson (1980) mostraron que los anticuerpos de memoria contra E. histolytica perduran hasta 11 años después de iniciada la infección.

Por otro lado, se ha demostrado que los sueros inmunes son capaces de causar la muerte a los trofozoitos mediante la activación del complemento, sin embargo, no hay evidencia de que el título de anticuerpos tenga correlación con el curso clínico de la enfermedad (Krupp y col, 1971b, Trissl, 1982; Muñoz y col, 1986). Además, existen evidencias in vitro de que las amibas pueden evadir la acción de los anticuerpos mediante su redistribución en membrana (Aust-Kettis, 1978; Calderón, 1980, 1986). De esta forma se cuestiona si este tipo de respuesta inmune puede contribuir a limitar la invasión del parásito o si es responsable de algún tipo de resistencia adquirida evitando que se presente recurrencia de la enfermedad. A la fecha no se han presentado datos que permitan aclarar estos hechos.

Para entender la relevancia de la respuesta imune en amibiasis se requiere de una clara definición de los antígenos que son reconocidos durante la interacción del parásito con su huésped

durante la infección. Los primeros estudios resultan de difícil interpretación debido al cultivo no axénico de los parásitos empleados para la elaboración de tales antígenos, por la presencia de material contaminante de bacterias o parásitos (Shaffer y col, 1956; Goldman y col, 1962; Kessel y col, 1965; Maddison y col, 1965, 1968; Krupp, 1966; Ali-Khan y col, 1968; Neal y col, 1968). La mayoría de los antígenos para serodiagnóstico en los últimos años se han hecho de trofozoitos cosechados en medio axénico de Diamond, metodología que se sugirió para el cultivo de la cepa HM-1:IMSS que fué empleada en este trabajo.

Numerosos autores han reportado varios procedimientos para la preparación de antígenos que incluye tratamiento de la muestra por sonicación (Thompson y col, 1968; Krupp, 1974, 1977; Chang y col, 1979; Sánchez-Nereida y col, 1978; Sawhney y col, 1980) o por homogeneización (Ali-Khan y col, 1970a y b; Aust-Kettis y col, 1983).

La decisión de emplear un antígeno de extracto total soluble se basa en lo reportado por Aust-Kettis y col (1983) respecto a la presencia de un gran número de componentes en el extracto soluble total de diversos pesos moleculares con actividad inmunogénica. Por otro lado, para minimizar la actividad endógena de proteasas se incluyó el empleo de diferentes inhibidores de proteasas, por lo cual se aplicaron 5 métodos diferentes. Los procedimientos empleados en este estudio se basaron en lo reportado por otros autores difiriendo sustancialmente en el tipo de inhibidores empleados y en el tratamiento de los trofozoitos. De acuerdo a lo

reportado por Parkhouse y col (1978) y Mathews y col (1986), el empleo de los inhibidores de proteasas es necesario para conservar la integridad de los componentes antigénicos del parásito y al parecer es la mezcla de varios de ellos la que con mas frecuencia emplean otros autores (Meza y col, 1986; Petri y col, 1987; Rosales-Encina y col, 1987; Joyce y col, 1988).

El sitio de acción del inhibidor dependiendo del tipo de proteína ha sido reportado por otros autores (Neal, 1960; Mc Laughlin y col, 1977; McGowan y col, 1982; Lushbaugh y col, 1984; Avila y col, 1985). Así, en un estudio sobre proteinasas de E. histolytica, Pérez-Montfort y col (1987) emplearon diversos inhibidores de endopeptidasas para determinar las principales familias de proteinasas presentes en extracto total amibiano. En este trabajo, el empleo de pHMB (Inhibidor de protein-cisteinasa) resultó en un 92% de inhibición del efecto catalítico del extracto total de amibas. Esta observación puede explicar el hecho de que el pHMB resultó suficiente para impedir la lisis del extracto total soluble obtenido de cultivo axénico. Como antecedente, Calderón y col (1986) reportaron el empleo de únicamente pHMB como inhibidor de proteinasas para E. histolytica en sustitución al PMSF empleado en otros estudios. Por otro lado, el empleo de este inhibidor de proteinasas de serina pudo no haber tenido un efecto marcado puesto que como lo reporta Pérez-Monfort (1987) éste es útil solamente cuando se emplea a concentración de 2 mM y no a menos como en nuestro caso (1 mM).

Respecto al tipo de tratamiento aplicado al extracto amibiano,

esto es homogeneización o ebullición, se compararon los patrones antigénicos de las fracciones solubles e insolubles obtenidas en cada caso. Independientemente del sistema de PAGE-SDS empleado (concentración constante al 10% o en gradiente 5-15%), se pudo observar en términos generales que la homogeneización fué mejor ya que no se observó degradación de los componentes protéicos según se aprecia en el análisis electroforético de las fracciones obtenidas (Fig 8 y 9); además de que por el número de componentes recuperados, se obtuvo un mayor número de bandas de proteínas después de aplicar el tratamiento por homogeneización. Así, por ejemplo, se contaron 38 bandas en la fracción soluble obtenida después de tratamiento por homogeneización y PHMB, en tanto que sólo se contaron 20 bandas cuando se trató la fracción soluble obtenida después del tratamiento en presencia del mismo inhibidor, pero por ebullición.

El tratamiento por calentamiento o ebullición de la suspensión celular dió como resultado un rendimiento particularmente bajo en las proteínas recuperadas, ésto se debe probablemente, a la precipitación de material desnaturalizado y quizá al incremento en la actividad proteolítica en los extractos sometidos a este tratamiento como ya ha sido reportado en la literatura (Kobiler y col, 1980).

Respecto al procedimiento de extracción de proteínas con ácido acético, se decidió probar el procedimiento descrito por Fraenkel-Conrat (1957), aplicado en nuestro laboratorio para la obtención de componentes del parásito Giardia sp. El extracto soluble total

obtenido se comparó con los otros patrones que difirieron en el tratamiento aplicado y se observó un patrón similar tanto en el número de bandas como en la definición del mismo. La decisión de no emplearlo se basó en el bajo rendimiento neto de proteína por millón de parásitos (0.2 ng de proteína por millón de amibas). Este hecho puede explicarse por la precipitación de proteínas que se desnaturalizan, las cuales parecen localizarse en la fracción insoluble recuperada después del tratamiento. Por otro lado, este procedimiento empleó un tiempo mayor ya que después de obtenidos los extractos se requiere dializar y liofilizar la muestra.

En todos los casos, las fracciones insolubles resultaron con una cantidad mínima de proteínas a excepción del extracto soluble obtenido al tratar los antígenos por ebullición frente a una mezcla de inhibidores de proteasas. Este procedimiento empleó como parte de la solución de tratamiento Tritón X-100 al 5%. Esto resulta importante ya que Tritón X-100 cuando sobrepasa su concentración micelar de 0.24 mM, como en nuestro caso que se emplea al 5% (7.74 mM), impide o altera el desplazamiento libre de las proteínas del complejo de antígenos por solubilizar (Helenius y col, 1975). Una desventaja más del empleo del Tritón X-100 a dicha concentración es la alteración en el patrón electroforético observado por una distorsión en la base del carril (datos no mostrados).

El análisis de los extractos totales solubles obtenidos de los trofozoitos tratados se hizo con dos sistemas de electroforesis empleando poliacrilamida con SDS y beta-mercaptoetanol (condiciones reductoras) tanto a una concentración constante del 10% o bien en

gradiente 5-15%.

En este trabajo los resultados obtenidos sugieren que el sistema en gradiente ofrece mas ventajas para analizar el número de componentes antigénicos de E.histolytica ya que la resolución observada fué mayor en todos los casos independientemente del tratamiento aplicado a la mezcla de antígenos de las amibas. Por ejemplo si se analiza el número de componentes que se aprecian en el caso de emplear PHMB' y homogeneización en ambos sistemas, se tiene que en el primero (a concentración constante) se cuentan 28 bandas en tanto que en gradiente se pueden contar hasta 38 bandas y este mismo fenómeno se aprecia en todos los casos.

Respecto al número de bandas determinadas, ésto podría ser explicado considerando que el tamiz molecular en gradiente tiene una mayor diversidad de poros que permiten diferenciar más moléculas por su tamaño y peso, y en el caso a concentración constante, ésto constituye una limitante.

En la literatura, se reporta el empleo de sistemas PAGE-SDS a concentración constante (Petri y col, 1987; Rosales-Encina y col, 1987; Joyce y col, 1988), para el estudio de la composición proteica de E.histolytica. Por su parte Aley y col (1980) y Mathews y col (1986) emplean sistemas en gradiente (5-15% y 3-25% respectivamente) con la finalidad de obtener componentes de membrana y fracciones solubles de peso molecular bajo. A pesar de que ambos autores emplearon gradientes, no podemos establecer una comparación con nuestros resultados ya que en estos trabajos se obtienen extractos de antígenos amibianos diferentes a los de

nosotros.

Joyce y col (1988) emplearon poliacrilamida al 12% a concentración constante y reportaron un total de 30 bandas; lo cual al compararlo con lo obtenido en este estudio con el mejor método, esto es PHMB y homogeneización, y sistema de PAGE-SDS en gradiente, se obtuvieron hasta 38 bandas en la fracción soluble, lo cual apoya la decisión de utilizar este método y estas condiciones de separación. La definición observada de las bandas de proteínas separadas en este sistema de gradiente presenta ventajas comparado con la resolución observada en el sistema a concentración constante, como también observaron Parkhouse y col (1978) al comparar un sistema a concentración constante (10%) con uno en gradiente (8-18%).

Los resultados obtenidos en su conjunto, enfatizan la necesidad de seleccionar un procedimiento estándar para la preparación de extractos de antígenos de amiba que tengan como objetivo ser empleados en pruebas o procedimientos serológicos. Observaciones similares respecto a la variación del rendimiento de proteínas y el perfil antigénico de extractos del parásito, se obtuvo al emplear diferentes metodologías en la obtención y análisis de antígenos de Trichinella spiralis (Barriga, 1981) y en el análisis de antígenos de superficie de Trypanosoma cruzi (Schechter y col, 1988).

Otro aspecto por considerar fué la estabilidad de la preparación antigénica al almacenarse a temperaturas de congelación. Básicamente todos los extractos del parásito empleados

en este estudio fueron estables dentro de un periodo de 2 o 3 meses cuando se probó por análisis electroforético (datos que no se muestran).

En base al rendimiento de proteína, al patrón electroforético observado y a la facilidad de desarrollar el procedimiento, así como a la estabilidad de los extractos totales solubles obtenidos al tratar por homogeneización a los trofozoitos de E. histolytica en soluciones que contenían pHMB 10 mM, se decidió emplearlos en los ensayos para estandarización de la técnica de Inmuno-electrotransferencia. El primer punto fué establecer la cantidad adecuada de proteína por transferir al papel de nitrocelulosa empleado. Para ello se consideró una cantidad promedio de 80  $\mu$ g de proteína por pozo, sabiendo que el pozo mide 0.65 cm, de ahí que resultó 60  $\mu$ g por cm de ancho del pozo y se tomaron valores múltiples por arriba y abajo de dicha cantidad. La decisión de usar 60  $\mu$ g por cm se basó en la experiencia con otros modelos de parásitos como es G. lamblia (Argüello y col, comunicación personal) y Trichomonas vaginalis (Garber y col, 1986).

Las condiciones óptimas para la transferencia se encontraron al aplicar 100 V durante 2 horas a 4°C y el empleo de un agitador magnético en el sistema de transferencia. El empleo de estas condiciones redujo el tiempo para la transferencia de las proteínas en comparación con otros protocolos donde se emplean periodos de tiempo mayores de hasta 6 horas o toda la noche, aplicando 30 V (Rosales-Encina y col, 1987).

Con respecto al bloqueo de la reacción inespecífica o reacción

cruzada, el empleo de leche descremada en polvo (Sveltes<sup>MR</sup>) en el diluyente del primer anticuerpo, dió mejores resultados al compararlo con la solución que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 3%, pues se pudo apreciar una gran reducción en el fondo de reactividad inespecífica (fig. 13). En forma similar Petri y col (1987) emplearon leche descremada en polvo y aunque otros autores (Rosales-Encinas y col, 1987; Joyce y col, 1988) utilizan BSA al 3% para diluir el primer anticuerpo en los ensayos de IET, no aportan información respecto a la selectividad de los anticuerpos para reaccionar con los antígenos de E. histolytica. Coral-Vázquez (1990) empleó leche descremada en el ensayo de IET para antígenos de G. lamblia y observó una marcada reducción en el fondo de reactividad inespecífica. Un factor importante a considerar sobre todo cuando se piensa en estudios a gran escala, es el bajo costo de la leche descremada en comparación con el de la BSA.

Otro aspecto que debe tomarse en cuenta, es el hecho de que en áreas endémicas, los individuos se encuentran parasitados por más de un parásito intestinal. Por lo cual se decidió probar la reactividad que los sueros de pacientes con otros parásitos intestinales presentaban hacia los antígenos amibianos empleados en el ensayo de Inmunolectrotransferencia. Para ello se hicieron reaccionar con tales antígenos en dos condiciones: diluyendo el suero con BSA al 3% o con la leche descremada en polvo (Fig. 13). En estos ensayos se observó una reacción débil hacia componentes del parásito así como una clara reducción de la reactividad inespecífica con el empleo del segundo diluyente al reaccionar los

sueros de pacientes con un parásito en intestino diferente a E.histolytica: 4 bandas en el caso de G.lambliia y Enterobius vermicularis, 9 bandas en el caso de Ascaris lumbricoides y un reconocimiento muy débil en el caso de Hymenolepis nana. Esto podría ser explicado por la existencia de epitopes de reacción cruzada reconocidos por esos pacientes los cuales son altamente inmunogénicos en pacientes infectados con tales organismos o bien los individuos pudieron haber estado infectados con E.histolytica previo al seguimiento y por lo tanto, los resultados obtenidos podrían explicarse como una respuesta inmune de memoria.

Con este ensayo, resultó evidente que el empleo de leche descremada en polvo en la solución para diluir el primer anticuerpo fué un ingrediente crítico para disminuir el fondo y la reactividad inespecífica en estos ensayos de IET así como la reactividad cruzada.

Para establecer el patrón de reconocimiento antigénico por los suero de los individuos portadores asintomáticos, se analizaron primeramente sueros de individuos con diferentes manifestaciones clínicas de amibiasis. La reactividad observada fué mayor en intensidad y número en los casos de individuos con amibiasis hepática. Las muestras séricas de individuos con amibiasis asintomática o intestinal, sin embargo, también reaccionaron con varios antígenos del parásito, resultando patrones de reconocimiento cualitativa y cuantitativamente distintos, aunque estas diferencias no permitieron establecer un patrón propio para cada forma clínica de enfermedad.

Al analizar los 80 sueros de los individuos incluidos en este estudio, el análisis de la reactividad de las muestras séricas hacia los antígenos de E.histolytica mostró reconocimiento hacia varios componentes del parásito aún en los casos con títulos de IHA considerados negativos por abajo de la dilución 1:8. Los patrones observados no tuvieron correlación con el título de anticuerpos determinado por IHA ni con el zimodemo determinado en los parásitos recuperados de las heces de estos individuos.

Aunque hubo variabilidad en estos patrones de reconocimiento entre cada muestra sérica en particular, algunos componentes del parásito fueron reconocidos más frecuentemente por los anticuerpos inducidos en los individuos analizados en este estudio. En estos se incluyen los antígenos de 165, 119, 98-100, 65 y 50-52 kDa. Aunque no se observan diferencias importantes entre el número de individuos que reconoce cada uno de estos antígenos, en forma general se puede apreciar que el antígeno de 165 kDa (Ver Tabla 4) fué reconocido en una proporción alta de los sueros analizados (61%). Este antígeno puede ser similar a la lectina de adherencia inhibible con Gal/GalNAc de E.histolytica previamente reportada por Petri (1987) como una proteína de 170 kDa, siendo la más frecuentemente reconocida por una mezcla de sueros de pacientes con amibiasis hepática. Asimismo, Calderón y col (1986) reportan una reactividad semejante hacia la proteína de 165 kDa por suero de conejos inmunizados con trofozoitos vivos de E.histolytica. Por su parte Ravdin (1988) en un seguimiento a individuos que cursaban con amibiasis hepática demostró que entre los antígenos más frecuente

y constantemente reconocidos se encontraba la proteína de 170 kDa.

Por otro lado, el grupo de Torian y col (1987, 1990) identificaron un antígeno de superficie de 96 kDa el cual fue específico para E.histolytica pero no para otras especies de protozoos o amibas, además de que parece ser específicamente reconocido por sueros de pacientes con amibiasis hepática. Además, se identificó esta proteína en el líquido de absceso hepático con la técnica de ELISA y por inmunoprecipitación, por lo que parece resultar útil como diagnóstico para la búsqueda de este antígeno o de anticuerpos dirigidos contra esta proteína. Esta proteína podría corresponder a la proteína de 98-100 kDa identificada en este trabajo. Otra molécula que ha sido reportada por su participación en los fenómenos de adherencia, al igual que la proteína de 170 kDa, es la proteína de 112 kDa por Arroyo y col (1986) y Orozco y col (1987) cuyo anticuerpo monoclonal inhibe en más del 50% la adherencia del parásito. Esta proteína podría corresponder al antígeno de 119 kDa reconocida mas frecuentemente por el grupo de individuos cuyas amibas son de ZNP.

Finalmente, el hecho de que individuos portadores asintomáticos provenientes de una comunidad endémica para amibiasis reconozcan proteínas que participan ya sea como lectinas de adhesión o bien sean antígenos de memoria específicos determinados en individuos con amibiasis clínica, resulta interesante pues ello podría significar que estas proteínas inducen una memoria prolongada en el huésped, por lo que serían buenos candidatos para la elaboración de un procedimiento de protección contra la

enfermedad.

Los datos aquí obtenidos, aportan en primer lugar un procedimiento inmunológico para valoración de la respuesta inmune con reconocimiento específico de componentes antigénicos del parásito, colaborando con los métodos dirigidos a la producción de una vacuna o antígenos purificados para procedimientos de diagnóstico; por otro lado, la identificación de componentes del parásito que participan en fenómenos tan importantes como lo es la adhesión a la célula del huésped por un grupo de individuos identificados como portadores asintomáticos en base a su estado clínico, abre un capítulo más respecto a la participación de tales antígenos como de memoria o bien predominantemente antigénicos.

Esto nos conduce a la necesidad de sugerir, el desarrollar otros estudios donde se comparen los diferentes parámetros de evaluación de la relación huésped-E.histolytica aquí empleados, pero en forma longitudinal, para así determinar si el parásito de ZP recuperado de las heces de portadores asintomáticos es de reciente adquisición y si los individuos estudiados desarrollarán el cuadro clínico correspondiente.

## 9. CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. Los títulos de anticuerpos determinados por Hemaglutinación Indirecta en individuos portadores asintomáticos no tuvieron relación con el tipo de Zimodemo determinado en los parásitos recuperados de sus heces
2. En el grupo de portadores asintomáticos estudiados, los patrones de reconocimiento de antígenos de Entamoeba histolytica determinados por Inmunolectrotransferencia, no tuvieron relación con el título de Hemaglutinación ni con el Zimodemo identificado
3. No se observó un patrón de reconocimiento antigénico característico determinado por Inmunolectrotransferencia por sueros de individuos cuyos parásitos tuvieron Zimodemo patógeno y no patógeno, por lo que la reactividad inmunológica detectada en los portadores asintomáticos puede estar mas en relación con la experiencia previa del sujeto con el parásito que con el estado de portador

4. Los antígenos de 165, 98-100, 65 y 50-52 kDa fueron reconocidos con alta frecuencia independientemente del Zimodemo de los parásitos analizados. El antígeno de 165 kDa fue reconocido con mas frecuencia en individuos con parásitos de Zimodemo no patógeno en tanto que el de 119 kDa lo reconocieron los individuos con parásitos de Zimodemo patógeno.

## 10. ANEXO

## ANEXO # I

### SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO Y BETA-MERCAPTOETANOL.

#### A) BUFFER PARA EL GEL CONCENTRADOR 8X (BGC 8X)

Trizma base 2 M pH 6.8 .....	50 ml
SDS al 20% .....	4 ml
Agua bidestilada estéril c.b.p. ....	100 ml

#### B) BUFFER PARA EL GEL ESPACIADOR 5X (BGE 5X)

Trizma base 2 M Ph 8.8 .....	187.5 ml
SDS AL 20% .....	5.0 ml
Agua bidestilada estéril c.b.p. ....	200.0 ml

#### C) SOLUCION DE ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA 0.8%

Acrilamida .....	60.0 g
N-N'-metilen-bis-acrilamida .....	1.6 g
Agua bidestilada estéril c.b.p. ....	80.0 ml
Glicerol .....	60.0 ml
Agua bidestilada estéril c.b.p. ....	200.0 ml

#### D) INICIADOR DE LA POLIMERIZACION ACRILAMIDA/BIS-ACRILAMIDA

Persulfato de amonio (PAS).....	10%
Agua bidestilada estéril c.b.p. ....	100 ml

#### NOTA:

- La acrilamida y bis-acrilamida son neurotóxicas. Evitar el contacto con la piel así como la inhalación del polvo. Usar guantes y nunca pipetear con la boca.
- El SDS al 20% no debe guardarse a 4°C porque precipita.
- El beta-mercaptoetanol puede añadirse o no en una proporción de 1.25 ml para este caso. Nosotros se lo añadimos justo antes de cargar la muestra en el carril.
- Una mezcla de azul de bromofenol, como colorante con glicerol puede ir incluida en la preparación del buffer. Nosotros la tenemos aparte y se añade al preparar la muestra por analizar.

ANEXO # II A

PREPARACION DE PAGE-SDS EN GRADIENTE DEL 5-15%  
GEL ESPACIADOR

Para un gel plano	5%	15%
VOL.TOTAL	30.00 ml	30.00 ml
BGE 5X	3.40 ml	3.40 ml
AGUA BID.EST.	10.85 ml	5.15 ml
ACRIL-BISACRIL	2.85 ml	8.55 ml
TEMED	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
PAS 10%	17 $\mu$ l	17 $\mu$ l

ANEXO # II B

PREPARACION DE PAGE-SDS EN GRADIENTE DEL 5-15%  
GEL CONCENTRADOR

Para un gel plano	5%
VOL.TOTAL	10.00 ml
BGC 8X	1.25 ml
AGUA BID.EST.	7.08 ml
ACRIL-BISACRIL.	1.66 ml
TEMED	5 $\mu$ l
PAS 10%	50 $\mu$ l

NOTA: La mezcla se hace con ayuda de un sistema formador de gradiente cuando se trata del gel espaciador y para el gel concentrador sólo se prepara la cantidad deseada según el número de geles por preparar y se añade con ayuda de un embudo con punta.

ANEXO # III A

PREPARACION DE PAGE-SDS AL 10%  
GEL ESPACIADOR

Para un gel plano	
Vol. total	30.00 ml
Acrilamida 30%	10.00 ml
Bisacrilamida 2%	4.00 ml
Tris-base pH 8.8 1M	11.25 ml
SDS 20%	150.00 $\mu$ l
Agua bidestilada estéril	4.40 ml
TEMED	13.00 $\mu$ l
PAS 10%	90.00 $\mu$ l

ANEXO # III B

PREPARACION DE PAGE-SDS AL 10%  
GEL CONCENTRADOR

Para un gel plano	
Vol. total	10.00 ml
Acrilamida 30%	1.70 ml
Bisacrilamida 2%	0.70 ml
Tris-base pH 6.8 1M	1.25 ml
SDS 20%	50.00 $\mu$ l
Agua bidestilada estéril	6.80 ml
TEMED	10.00 $\mu$ l
PAS 10%	50.00 $\mu$ l

#### ANEXO # IV

##### BUFFER SOLUBILIZADOR DE MUESTRA 5X (Para PAGE-SDS)

Trizma base 2M ph 6.8 .....	0.78 ml
SDS al 20% .....	2.50 ml
Glicerol .....	0.97 ml
Agua bidestilada estéril c.b.p. ....	5.00 ml

#### ANEXO # V

##### AMORTIGUADOR DE ELECTROFORESIS STOCK 10X

Trizma base .....	30.20 g
Glicina .....	144.10 g
Agua bidestilada estéril c.b.p. ....	800.00 ml
Ajustar pH 8.3	
SDS al 20% .....	50.00 ml
Agua bidestilada estéril c.b.p. ....	1000.00 ml

NOTA: Para correr la electroforesis se usa como stock 1X

#### ANEXO # VI

##### SOLUCION DE TINCION PARA GELES DE POLIACRILAMIDA (AZUL DE COOMASSIE)

Metanol .....	50% (v/v)
Acido acético .....	10% (v/v)
Azul de Coomassie R-250 .....	125% (p/v)
Agua bidestilada estéril c.b.p. ....	100 ml

NOTA: Se debe filtrarla solución antes de usarla y se reutiliza hasta 8-10 veces.

#### ANEXO # VII

##### SOLUCION DE DESTINCION (ALTO METANOL)

Metanol .....	50% v/v
Acido acético .....	10% v/v
Agua bidestilada estéril c.b.p. ....	aforo

NOTA: Esta solución para poder reutilizarse se filtra en carbón activado

ANEXO # VIII

PREPARACION DEL AMORTIGUADOR SOLUBILIZADOR DE MUESTRA 2X  
PARA UN GEL PREPARATIVO PARA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Trizma base .....	1.512 g
Glicerol .....	20.00 ml
Rojo de fenol o pironina .....	2.00 mg
Agua destilada c.b.p. ....	60.00 ml
Ajustar el pH a 6.8	
SDS al 20% .....	2.00 ml
Agua destilada c.b.p. ....	100.00 ml

NOTA: Este amortiguador se emplea a 1X para ello se diluye volumen a volumen con la muestra por separar en el sistema de PAGE

ANEXO # IX A

AMORTIGUADOR PARA TRANSFERENCIA DE PROTEINAS 8X

Trizma base .....	0.200 M	12.110 g
Glicina .....	1.536 M	57.680 g
Agua c.b.p. ....		500.000 ml

ANEXO # IX B

AMORTIGUADOR PARA TRANSFERENCIA DE PROTEINAS 1X  
(solución de trabajo)

Amortiguador 8X .....	500 ml
Metanol .....	800 ml
agua bidestilada .....	2700 ml

NOTA: Se puede reutilizar hasta 4 veces. Se recomienda almacenar a -20°C una noche antes de emplearlo para así evitar grandes variaciones de voltaje. El gel por transferir se equilibra por una hora con un cambio en este amortiguador.

## PROTOCOLO PARA TINCION DEL PAPEL DE NITROCELULOSA

A) Con Negro Amido (Amido Black) ó Negro de Azul de Naftol

Solución Negro de Amido

Negro de amido .....	0.1 % (p/v)
Metanol .....	45.0 % (v/v)
Acido acético .....	10.0 % (v/v)
Agua destilada c.b.p. ....	aforo

Solución de destinción

Metanol .....	45.0 % (v/v)
Acido acético .....	10.0 % (v/v)
Agua bidestilada c.b.p. ....	aforo

Procedimiento

1. Teñir el papel de nitrocelulosa durante 5 min en agitación constante
2. Desteñir con la solución de destinción durante 15 min en agitación constante
3. Lavar con agua destilada en agitación tantas veces como sea necesario

B) Con Tinta India

1. Lavar el papel de nitrocelulosa por 10 min con una solución de PBS-Tween-20 al 0.3% en 2 ocasiones en agitación constante
2. Teñir por una hora en agitación constante con una solución de PBS-Tween 20 al 0.3% y tinta india (1  $\mu$ l por ml de solución)
3. Lavar en agitación constante con agua bidestilada en tantas ocasiones como sea necesario

## SOLUCION DE BLOQUEO DEL PAPEL DE NITROCELULOSA

Albúmina sérica bovina (BSA) .....	3.0 %
PBS pH 7.4 c.b.p. ....	aforo

NOTA: Con esta solución se cubre el papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas durante 6 h (temperatura ambiente) o durante toda la noche (4°C).

**ANEXO # XII**

**SOLUCION DE DILUCION PARA 1er. ANTICUERPO (SUERO)**

**PREPARACION DEL STOCK 5X**

Albúmina sérica bovina .....	2.0 g
Tritón X-100 al 10% .....	2.0 ml
SDS al 20% .....	1.0 ml
Agua bidestilada c.b.p. ....	10.0 ml

**PREPARACION DE LA SOLUCIÓN DE DILUCION 1X (para 1 ml)**

Stock 5X .....	200 $\mu$ l
Suero bovino de complementado .....	100 $\mu$ l
PBS 1X .....	700 $\mu$ l

NOTA: Se empleó en una dilución de 1:50 del suero problema y para ello se dejó incubado toda la noche a temperatura ambiente y en agitación constante

**ANEXO # XIII**

**SOLUCION DE DILUCION DEL 1er. ANTICUERPO CON LECHE DESCREMADA AL 5%**

Nonidet P-40 al 0.1% .....	0.02 ml
Leche descremada en polvo (Sveltes) 5% .....	1.00 g
PBS 1X .....	20.00 ml

Se mezcla perfectamente y se filtra previo a su uso.

**ANEXO # XIV**

**SOLUCION DE DILUCION PARA 2do. ANTICUERPO (CONJUGADO)**

PBS 1X .....	899 $\mu$ l
Suero bovino de complementado 10% .....	100 $\mu$ l
Conjugado 1:1000 .....	1 $\mu$ l

NOTA: Este volumen se preparó por cada tira a incubar. Se incuba la tira de PNC a 37°C por 2 h 30 min en agitación constante y protegido de la luz con papel aluminio.

ANEXO # XV

SOLUCION DE REVELADO 6X (stock)

4-Cl-1-naftol .....	3 mg
metanol .....	1 ml

SOLUCION DE REVELADO 1X (de trabajo)

Stock 6X .....	1 ml
PBS 1X .....	5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) .....	2 µl

ANEXO # XVI

MEDIO TYI-S-33

Biosate .....	30.00	g
D-glucosa .....	10.00	g
NaCl .....	2.00	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.60	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.00	g
L-cisteina.HCl .....	1.25	g
L-ácido ascórbico .....	0.25	g
Citrato férrico de amonio .....	0.025	g

Se ajusta a pH 6.8 con NaOH 0.1 N y se afora a 870 ml con agua bidestilada. Se esteriliza por autoclave a 15 lb/in<sup>2</sup>, durante 20 min.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

Ackers, J.P. (1982): Immunology of amibas, giardia and richomonads. Compr. Immunol. 9, 403.

Acosta, G.; Barranco, C.; Isibasi, A.; Campos, R.; Kumate, J. (1982): Excreción de anticuerpos de clase IgA específicos anti-amiba en bilis de ratas inmunizadas con trofozoitos de Entamoeba histolytica cultivados en medio axénico. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl.3): 255.

Adams, E.B.; MacLeod, I.N. (1977a): Invasive amebiasis I. Amebic dysentery and its complications. Medicine. 56: 315.

Adams, E.B.; MacLeod, I.N. (1977b): Amebic liver abscess and its complications. Medicine. 56: 325.

Aley, S.B.; Scott, W.A.; Cohn, A.Z. (1980): Plasma membrane of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 152: 391.

Ali-Khan, Z.; Meerovitch, E. (1968): Serological characterization of gamma M (19s) and G (7s) rabbit antibodies in response to Entamoeba histolytica antigens. Can. J. Microbiol. 14: 1317.

Ali-Khan, Z.; Meerovitch, E. (1970a): Studies on the purification of Entamoeba histolytica antigen by gel filtration I. Some physicochemical properties of the isolated fractions. Can. J. Microbiol. 16: 485.

Ali-Khan, Z.; Meerovitch, E. (1970b): Studies on the purification of Entamoeba histolytica antigen by gel filtration. II. The antigenic properties of the isolated fractions. Can. J. Microbiol. 16: 493.

Ali-Khan, Z. (1974): Glutaraldehyde fixed antigen sensitized stable cells in indirect hemagglutination test for rapid diagnosis of hydatid disease, trichinosis, and amoebiasis. Int. J. Parasitol. 4: 549.

Andrews, B.J.; Mentzoni, L.; Bjorvatn, B. (1990): Zymodeme conversion of isolates of Entamoeba histolytica. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84: 63.

Arroyo, R.; Orozco E. (1986): Localización e identificación de adhemiba I. Una proteína que participa en la adhesión de Entamoeba histolytica a eritrocitos humanos y células epiteliales. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 17 (Supl. 1): 135.

Atakpa, T.O.U.; Damisah, M.; Whittle, H.C.; Greenwood B.M. (1978): Amoebiasis in Northern Nigeria: an evaluation of the gel diffusion test. Ann. Trop. Med. Parasitol. 72: 123.

Atchley, F.O.; Aurnheimer, A.H.; Wasley M.A. (1963): Precipitate patterns in agar gel with sera from human amebiasis with Entamoeba histolytica antigen. J. Parasitol. 49: 313.

Aust-Kettis, A.; Sundqvist, K.G. (1978): Dynamics of the interaction between Entamoeba histolytica and components of the immune response I. Capping and accelerating factors: variation of the expression of surface antigens. Scand. J. Immunol. 7: 35.

Aust-Kettis, A.; Thorstensson, R.; Utter, G. (1983): Antigenicity of Entamoeba histolytica strain NIH 200: A survey of clinically relevant antigenic components. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32: 512.

Avila, E.E.; Sánchez-Garza, M.; Calderón, J. (1985): Entamoeba histolytica and E. invadens: Sulfhydryl-dependent proteolytic activity. J. Protozool. 32(1): 163.

Bailey, C.F.; Bowers, B. (1981): Localization of lipo-phosphoglycan in membranes of Acanthamoeba by using specific antibodies. Cell. Biol. 1: 358.

Bailey, G.B. (1982): Preliminary studies of chemotaxis by Entamoeba. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl.3): 265.

Barriga, O.: Influence of routine extraction procedures in the composition of Trichinella spiralis extracts. J. Parasitol. 1981; 67: 120.

Barker, D.C.; Swales, L.S. (1972): Characteristics of ribosomes during differentiation from trophozoite to cyst in axenic Entamoeba sp. Cell. Difer. 1: 297.

Beaver, P.C.; Jung, R.C.; Sherma, H.G.; Read, T.R. Jr.; Robinson, T.A. (1956): Experimental Entamoeba histolytica infections in man. Am. J. Trop. Med. Hyg. 5: 1015.

Beltrán, H.H.; Biagi, F.F.; Ortega, P.S.; Rivas, C. (1965): Observaciones sobre la reacción de inmunofluorescencia y la reacción de inmovilización con Entamoeba histolytica. Rev. Gastroenterol. México, 30: 491.

Biagi, F.F.; Buentello, L. (1961): Immobilization reaction for diagnosis of amebiasis. Exp. Parasitol. 11: 188.

Biagi, F.F.; Robledo, E.; Servín, H.; Martuscelli, A. (1962): The effect of cholesterol on the pathogenicity of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 11: 333.

Bilgees, F.M.; Khan, A. (1979): Studies on skin test for amoebiasis. J. Egypt Public Health Assoc. 54: 425.

Blanc, D.; Sargeant, P.G. (1991): Entamoeba histolytica zymodemes: exhibition of  $\tau$  and  $\delta$  bands only of glucose phosphate isomerase and phosphoglucomutase may be influenced by starch content in the medium. Exp. Parasitol. 72: 87.

Boonpucknavig, S.; Lynraven, G.S.; Nairn, R.C.; Ward, H.A. (1967): Subcellular localization of Entamoeba histolytica antigen. Nature. 216: 1232.

Bos, H.J.; van del Eijk, A.A. (1976a): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of amebiasis. In: Sepúlveda, B., Diamond, L.S. (eds.): Proceedings of the International Conference on Amebiasis. Mexico City, Instituto Mexicano del Seguro Social. 21.

Bos, H.J.; van den Eijk, A.A.; Steerenberg, P.A. (1976b): Application of ELISA -enzyme linked immunosorbent assay- in the serodiagnosis of amoebiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 6: 440.

Bos, H.J. (1977): Fractionation and serological characterization of Entamoeba histolytica antigen. Acta Leidensia. 45: 105.

Bos, H.J.; Leijendekker, W.J.; van den Eijk, A.A. (1980a): Entamoeba histolytica: citopathogenicity including serum effects on contact-dependent and toxin-induced lysis of hamster kidney cell monolayers. Exp. Parasitol. 50: 342.

Bos, H.J.; van den Eijk, A.A. (1980b): Serum inhibited toxicity of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méz.) 11 (Supl.1): 135.

Bracha, R.; Mirelman, D. (1984): Virulence of Entamoeba histolytica trophozoites: Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. J. Exp. Med. 160: 353.

Brown, J.A.H.; Whitby, J.L. (1955): An immobilization test for amoebiasis. J. Clin. Pathol. 8: 245.

Brumpt, E. (1925): Étude sommaire de l'Entamoeba dispar n.sp. Amibe à kystes quadrinucléés, parasite de l'homme. Bull. Acad. Méd. (Paris) 94: 943.

Bundensen, H.N.; Connolly, J.I.; Rawlings, I.D.; Gorman, A.E.; Mc Coy, G.W.; Hardy, A.V. (1936): Epidemic amebic dysentery: The Chicago outbreak of 1933. National Institutes of Health Bulletin No. 166.

Calderón, J.; Muñoz, M.L.; Acosta, H.M. (1980a): Surface redistribution and release of antibody-induced caps in Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 151: 184.

Calderón, J.; Tovar-Gallegos, R. (1980): Loss to susceptibility to antibody and complement mediated lysis in Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méz.) 11 (Supl.1): 241.

Calderón, J.; Avila, E.E. (1986): Antibody-induced caps in Entamoeba histolytica: isolation and electrophoretic analysis. J. Infect. Dis. 153(5): 927.

Calderón, J. (1988): The role of complement in host defense against Entamoeba histolytica. In: Ravdin, J. (ed). Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica. New York, John Wiley and Sons, 471.

Chadee, K.; Petri, W.A.Jr.; Innes, D.J.; Ravdin, J.I. (1987): Rat and human colonic mucins bind to and inhibit the adherence lectin of Entamoeba histolytica. J. Clin. Invest. 80: 1245.

Chang, S.M.; Lin, C.M.; Dusanic, D.G.; Cropss, J.H. (1979): Antigenic analysis of 'by two axenized strains of Entamoeba histolytica two-dimensional immunoelectrophoresis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 28: 845.

Coral-Vázquez, R.M. (1990): Identificación y caracterización de clonas de una biblioteca de expresión que codifican para antígenos de superficie de Giardia lamblia relevantes en la relación hospedero-parásito. Tesis Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

Cosgrove, W.B.; Hanson, W.L. (1962): Partial characterization of polysaccharide from the trypanosomids flagellate, Crithidia fasciculata. Am. Zool. 2: 401.

Craig, C.F. (1917): The occurrence of endamebic dysentery in the troops serving in the El Paso district from July, 1969 to December, 1916. Military Surgeon. 40: 286, 423.

Cruz, M.S. (1988): Inmunoquímica de un antígeno de naturaleza polisacárida de la superficie de Entamoeba histolytica. Tesis Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

Cuarón, A.; Gordon, F.; Landa, L. (1972): La evolución de la centelleografía en el diagnóstico del absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 3(Supl.2): 403.

Dearborn, D.G.; Smith, S.; Korn, E.D. (1976): Lipophosphoglycan of the plasma membrane of Acanthamoeba catellani. J. Biol. Chem. 251: 2976.

Diamond, L.S. (1961): Axenic cultivation of Entamoeba histolytica. Science. 134: 336.

Diamond, L.S. (1968): Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 and Entamoeba histolytica-like amebae. J. Parasitol. 54: 1047.

Diamond, L.S. (1970): Serum requirements of axenically cultivated Entamoeba histolytica. J. Parasitol. 56: 79.

Diamond, L.S.; Harlow, D.P.; Cunick, C.C. (1978): A new medium for axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 431.

Dobell, C. (1928): On the cultivation of Entamoeba histolytica and some other entozoic amoebae. Parasitol. 18: 283.

Donta, S.T.; Wallace, R.B.; Whipp, S.C.; Olarte, J. (1977): Enterotoxigenic Escherichia coli and diarrheal disease in Mexican children. J. Infect. Dis. 135: 482.

Dulley, J.R.; Grieve, P.A. (1975): A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. Anal. Biochem. 64: 136.

Elsdon-Dew, R. (1968): The epidemiology of amoebiasis. Adv. Parasitol. 6: 1.

Elsdon-Dew, R. (1970): The serology of amoebiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 64: 18.

Elsdon-Dew, R. (1976): The epidemiology of amoebiasis -an hypothesis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 70: 265.

Elwing, H.; Nilsson, L.A.; Ouchterlony, O. (1976): Visualization principles in thin-layer immunoassays (TIA) on plastic surface. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 51: 757.

Engvall, E.; Perlmann, P. (1971): Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) quantitative assay for immunoglobulin G. Immunochemistry. 8: 871.

Engvall, E.; Perlmann, P. (1972): ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. J. Immunol. 109: 129.

Feachem, R.G.; Bradley, D.J.; Garelick, H.; Mara, D.D. (1983): Sanitation and Disease. Health aspects of excreta and wastewater management. Wiley/World Bank, Chichester. 337.

Feingold, C.; Bracha, R.; Wexler, A.; Mirelman, D. (1985): Isolation, purification and partial characterization of an enterotoxin from extracts of Entamoeba histolytica trophozoites. Infect. Immun. 48: 211.

Felgner, P.; Mohr, W.; Mannweiler, E. (1973): Immunodiagnostische untersuchungen an Amöbiasis bei Tropenrückkehrern. Dtsch. Med. Wschr. 98: 2127.

Fraenkel-Conrat, M. (1957): Degradation of tobacco mosaic virus with acetic acid. Virology. 4: 1.

- Gandhi, B.M.; Irshad, M.; Acharya, S.K.; Tandom, B.N. (1988): Amebic liver abscess and circulating immune complexes of Entamoeba histolytica proteins. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39(5): 440.
- Garber, G.E.; Proctor, E.M.; Bowie, W.R. (1986): Immunogenic proteins of Trichomonas vaginalis as demonstrated by the immunoblot technique. Infect. Immun. 5: 250.
- García-Rosales, J.J.; Alvarez-Chacón, R. (1986): Contra-inmunolectroforesis y hemaglutinación indirecta en amibirosis. Rev. Mex. Patol. Clin. 33(1-2): 11.
- Gargouri, M. (1967): L'utilisation du cholesterol dans l'amibiase expérimentale du cobaye. Annales de Parasitologie (Paris). 42: 399.
- Gathiram, V.; Jackson, T.F. (1985): Frequency distribution of Entamoeba histolytica zymodemes in a rural South African populations. Lancet. 1: 719.
- Gillin, F.D.; Reiner, D.S.; Wang, C.S. (1983): Human milk kills parasitic intestinal protozoa. Science. 221: 1290.
- Gillin, F.D.; Reiner, D.S.; Gault, M.J. (1985): Cholate-dependent killing of Giardia lamblia by human milk. Infect. Immun. 47: 619.
- Gillin, F.D.; Reiner, D.S.; Zenian, A. (1988): Interaction of Entamoeba histolytica with nonimmune and immune intestinal defenses. In: Ravdin, J.I. (ed.) Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica. New York, John Wiley and Sons. 438.
- Gitler, G.; Claf, E.; Rosenberg, I. (1984): Citopathogenicity of Entamoeba histolytica. Phil. Trans. R. Soc. (London). 307: 73.
- Goldman, M.; Gleason, N.N. (1962): Antigenic analysis of Entamoeba histolytica by means of fluorescent antibody IV. Relationships of two strains of Entamoeba histolytica and one of E.hartmanni demonstrated by cross absorption techniques. J. Parasitol. 48: 778.
- Goldman, M.; Cannon, L.T. (1967): Antigenic analysis of Entamoeba histolytica by means of fluorescent antibody. V. Comparison of 15 strains of Entamoeba with information of their pathogenicity to guinea pigs. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 16: 245.
- Gottlieb, M.; Lanzeta, P.; Berech, J. (1976): Crithidia fasciculata characterization of polysaccharide. Exp. Parasitol. 32: 206.
- Gottlieb, M. (1977): A carbohydrate containing antigen from Trypanosoma cruzi and its detection in the circulation of infected mice. J. Immunol. 119: 465.
- Griffin, J.L.; Juniper, K. (1971): Ultrastructure of Entamoeba histolytica from human amebic dysentery. Archiv. Pathol. 21: 271.

Guerrant, R.L.; Brush, J.; Ravdin J.I.; Sullivan, J.A.; Mandell, G.L. (1981): Interaction between Entamoeba histolytica and human polymorphonuclear neutrophils. J. Infect. Dis. 143: 83.

Guerrant, R.L. (1986): Amebiasis: Introduction, current status and research questions. Rev. Infect. Dis. 8(2): 218.

Guerrero, M.; Rios, D.; Landa, L. (1976): Interaction between trophozoites of Entamoeba histolytica and lymphocytes of patients with invasive amebiasis. In: Sepúlveda, B.; Diamond, L.S. (eds.) Proceedings of the International Conference on Amebiasis, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F. 529.

Guirges, S.Y.; Sant, M.V.; Nimbkar, Y.S. (1978): Evaluation of the indirect hemagglutination test in the diagnosis of amoebiasis. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 22(2): 208.

Gutiérrez-Trujillo, G.; Aubanel, M. (1972): Encuesta serológica en niños de la ciudad de México. VII. Investigación de anticuerpos contra Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 3 (Supl.2): 371.

Gutiérrez, G.; Ludlow, A.; Espinosa, G.; Herrera, S.; Muñoz, O.; Rattoni, N.; Sepúlveda, B. (1976): National serologic survey. II. Search for antibodies against Entamoeba histolytica in México. In: Sepúlveda, B.; Diamond, L.S. (eds.) Proceedings of the International Conference on Amebiasis. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D.F. 609.

Gutiérrez-Trujillo, G. (1979): Acute infectious gastroenteritis. Etiology and its correlation with clinical manifestations and fecal mucus. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 10: 135.

Halpern, B.; Young, J.J.; Dolkart, J.; Armour, P.D. III; Dolkart, R.E. (1967): The serologic response of patients with amebiasis compared by gel diffusion, hemagglutination, and phagocytosis techniques with a common Entamoeba histolytica antigen preparation. J. Lab. Clin. Med. 69: 467.

Hanff, P.A.; Feihniger, T.E.; Miller, J.N.; Lovett, M.A. (1982): Humoral immune response in human syphilis to polypeptides of Treponema pallidum. J. Immunol. 129: 1287.

Healy, G.R. (1968): Use of and limitations to the indirect hemagglutination test in the diagnosis of intestinal amebiasis. Health Lab. Sci. 5: 174.

Healy, G.R.; Kagan, I.G.; Gleason, N.N. (1970): Use of the indirect hemagglutination test in some studies of seroepidemiology of amebiasis in the western hemisphere. Health Laboratory Science. 7: 109.

Healy, G.R.; Visvesvara, G.S.; Kagan, I.G. (1974): Observations on the persistence of antibodies to Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 5 (Suppl.2): 495.

Healy, G.R. (1986): Immunologic tools in the diagnosis of amebiasis: epidemiology in the United States. Rev. Infect. Dis. 8: 239.

Healy, G.R. (1988): Serology. In: Ravdin J. (ed.) Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica. New York, John Wiley and Sons, 650.

Helenius, A.; Simon, K. (1975): Solubilisation of membranes by detergents. Biochem. Biophys. Acta. 415: 29.

Huldt, G.; Davies, P.; Allison, A.C.; Schorlemmer, H.U. (1979): Interactions between Entamoeba histolytica and complement. Nature (London). 277: 214.

Isibasi, A.; García-Tamayo, F.; Kumate, J. (1975): Polisacáridos obtenidos de Entamoeba histolytica en cultivo axénico. Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiasis. México, D.F.

Isibasi, A.; Sánchez, N.; García-Tamayo, F.; Kumate, J. (1978): Serología con polisacáridos de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl.1): 285.

Isibasi, A.; Cruz, M.S.; Ramirez, A.; Kumate, J. (1982a): Immunochemistry of lipopeptido phosphoglycan extracted from trophozoites of Entamoeba histolytica strain HK-9. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl.3): 51.

Isibasi, A.; Cruz, M.S.; Soto-Montano, X.; Ramirez, A.; Kumate, J. (1982b): Localization of the lipopeptido phosphoglycan extracted by phenol-water from trophozoites of HK-9 strain of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl.3): 57.

Isibasi, A.; Cruz, M.S.; Gottlieb, M.; Kumate, J. (1986): Purification the polysaccharide portion of the lipopeptido phosphoglycan extracted from trophozoites of HK-9 strain of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 17 (Supl.1): 73.

Jackson, T.F.H.G.; Gathiram, V.; Simjee, A.E. (1985): Seroepidemiological study of antibody responses to the zymodemes of Entamoeba histolytica. Lancet. 1: 716.

Jatinandana, V.; Savanat T. (1975): Antigenicity of subcellular components of Entamoeba histolytica. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health 6: 40.

Jiménez, E.; Kumate, J. (1982): Correlación clínica de zimodemos de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl.3): 77.

Joyce, M.P.; Ravdin, J.I. (1986): Antigens of Entamoeba histolytica recognized by immune sera from liver abscess patients (Abstract). Clin. Res. 34: 222A.

Joyce, M.P.; Radvin, J.I. (1988): Antigens of Entamoeba histolytica recognized by immune sera from liver abscess patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 38: 74.

Juniper, K. Jr.; Minshew, M.C. (1968): The indirect hamagglutination test in amebiasis. Gastroenterology. 54: 1248.

Juniper, K. Jr.; Worrell, C.L.; Minshew, M.C., Roth, L.S.; Cypert, H.; Lloyd, R.E. (1972): Serologic diagnosis of amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21: 157.

Kagan, I.G. (1973): The immunology of amebiasis. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 4 (Supl.1): 169.

Katzenstein, D.; Rickerson, V., Braude, A. (1982): New concepts of amebic liver abscess derived from hepatic imaging, serodiagnosis, and hepatic enzymes in 67 consecutive cases in San Diego. Medicine. 61: 237.

Kessel, J.F.; Lewis, W.P.; Molina-Pasquel, C.; Turner, J.A. (1965): Indirect hemagglutination and complement fixation tests in amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 14: 540.

Ketteridge, D.S. (1978): Lipopolysaccharide from Trypanosoma cruzi. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 101.

Kettis, A.A.; Lidman, K.; Fagraeus, A. (1977): Actin in Entamoeba histolytica trophozoites revealed by human actin antibodies. J. Parasitol. 63: 581.

Kobiler, D.; Mirelman, D. (1980): Lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites. Infect. Immun. 29: 221.

Korn, E.D.; Dearborn, D.G.; Wright, P. (1974): Lipophosphono-glycan of plasma membrane of Acanthamoeba castellanii. Isolation from whole amoeba and identification of water-soluble products of acid hydrolysis. J. Biol. Chem. 249: 3335.

Kotcher, E.; Miranda, G.M.; Garcia De Salgado, V. (1970): Correlation of clinical, parasitological, and serological data of individuals infected with Entamoeba histolytica. Gastroenterol. 58(3): 388.

Kretschmer, R.R. (1984): Immunophenomena in amebiasis. Surv. Immunol. Res. 3: 1.

Kretschmer, R.; Collado, M.L.; Pacheco, M.G.; Salinas, M.C.; López-Osuna, M.; Lecuona, M.; Castro, E.M.; Arellano, J. (1985): Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown Entamoeba histolytica. Parasite Immunol. 7: 527.

Kretschmer, R.R. (1986): Immunology of amoebiasis. In: Martínez-Palomo, A. (ed.) Amibiiasis, vol. 2. Elsevier, Amsterdam. Chap. 4

Krupp, I.M. (1966): Immuno-electrophoretic analysis of several strains of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 15: 849.

Krupp, I.M. (1970): Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 57.

Krupp, I.M.; Powell, S.J. (1971a): Antibody response to invasive amebiasis in Durban, South Africa. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20: 414.

Krupp, I.M.; Powell, S.J. (1971b): Comparative study of the antibody response in amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20: 421.

Krupp, I.M. (1974): Protective immunity to amebic infection demonstrated in guinea pigs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23(3): 355.

Krupp, I.M. (1977): Definition of the antigenic pattern of Entamoeba histolytica and immuno-electrophoretic analysis of the variation of patient response to amebic disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 387.

Laemmlí, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature (London) 227: 680.

Landa, L.; Aubanel, M.; Segovia, E.; Sepúlveda, B. (1972): Seroepidemiología de la amibiiasis en adultos. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 3 (Supl.2): 377.

Landa, L.; Capin, R.; Guerrero, M. (1976): Estudios sobre inmunidad celular en la amibiiasis invasora. In: Sepúlveda, B.; Diamond, L.S. (eds.) Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiiasis. Mexico City: Instituto Mexicano del Seguro Social, 654.

Lewis, W.P.; Kessel, J.F. (1961): Hemagglutination in the diagnosis of toxoplasmosis and amebiasis. Arch. Ophthalmology 66: 171.

Lin, T.M.; Halbert, S.P.; Chiu, C.T.; Zarco, R. (1981): Simple standardized enzyme-linked immunosorbent assay for human antibodies to Entamoeba histolytica. J. Clin. Microbiol. 13: 646.

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265.

Lundblad, G.; Huldt, G.; Elander, M.; Lind, S.; Slettengren, K. (1981):  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from Entamoeba histolytica. Comp. Biochem. Physiol. [B]. 68: 71.

Lushbaugh, W.B.; Miller, J.H. (1974): Fine structural topochemistry of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903. J. Parasitol. 60: 421.

Lushbaugh, W.B.; Kairalla, A.; Canteley, J.R.; Hofbauer, F.; Pittmann, F. (1979): Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 139: 9.

Lushbaugh, W.B.; Hofbauer, A.F.; Kairalla, A.; Canteley, J.R.; Pittmann, F. (1984): Relationship of cytotoxins of axenically cultivated Entamoeba histolytica to virulence. Gastroenterol. 86: 1488.

Maddison, S.E.; Powell S.J.; Elsdon-Deww, R. (1965): Comparison of hemagglutinins and precipitins in amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 14: 551.

Maddison, S.E.; Kagan, I.G.; Norman, L. (1968): Reactivity of human immunoglobulins in amebiasis. J. Immunol. 100: 217.

Mahajan, R.C.; Agarwal, S.C.; Chhuttani, P.N.; Chitkara, N.L. (1972): Coproantibodies in intestinal amebiasis. Indian J. Med. Res. 60: 547.

Martinez-Cairo, S.; Gorab, A.; Muñoz, O.; Reyes M. (1979): Coproanticuerpos en amebiasis intestinal invasora. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 10: 121.

Martinez-Garcia, M.C.; Muñoz, O.; Sánchez-Parés, M.E.; Palacios-Berinstáin, O.; Valadez-Salazar, A.; Isibasi, A.A.; Gutiérrez, G. (1990a): Efficacy of zymodemes of Entamoeba histolytica technique in an epidemiologic study and report of new zymodemes in Mexico. Arch. Invest. Méd. (Méx.) en prensa.

Martinez-García, M.C.; Muñoz, O.; Sánchez-Parés, M.E.; Valadez-Salazar, A.; Palacios-Beristáin, O.; Garduño, G.; Calderón, M.; Isibasi, A.A.; Gutiérrez, G. (1990b): Pathogenic and non-pathogenic zymodemes of Entamoeba histolytica in a rural area of Mexico. Concordance with serology. Arch. Invest. Méd. (Méx.) en prensa.

Martínez-Palomo, A.; González-Robles, A.; de la Torre, M. (1973): Selective agglutination of pathogenic strains of Entamoeba histolytica induced by Concanavalina A. Nature New Biol. 245: 186.

Martínez-Palomo, A.; González-Robles, A.; de la Torre, M.; de la Hoz, R. (1974): Fijación e inclusión in situ de Entamoeba histolytica: aplicaciones en estudios de morfología y citoquímica ultramicroscópica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 5(Supl.2): 283-292.

Martínez-Palomo, A. (1982): The biology of Entamoeba histolytica. In: Brown K.N. (ed.) Tropical Medicine Research Studies. Chichester, England: Research Studies Press, John Wiley and Sons.

Martínez-Palomo, A. (1987): The pathogenesis of amoebiasis. Parasitol. Today 3(4): 111.

Mathews, H. M.; Moss, D.M.; Visvesvara, G.S. (1986): Analysis of antigens from membrane and soluble fractions of Entamoeba histolytica. J. Protozool. 33: 328.

Mattern, C.F.T.; Caspar-Natovitz, P.; Keister, D.B. (1980): Detection of antibodies against lectin-like "toxin" of Entamoeba histolytica in sera of patients with amoebiasis. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11 (Supl.1): 143.

McGowan, K.; Deneke, C.F.; Thorne, G.M.; Gorbach, S.L. (1982): Entamoeba histolytica cytotoxin: purification, characterization, strain virulence, and protease activity. J. Infect. Dis. 46: 616.

Mc Laughlin, J.; Faubert, G. (1977): Partial purification and some properties of a neutral sulfhydryl and acid proteinase from Entamoeba histolytica. Can. J. Microbiol. 23: 420.

Meerovitch, E.; Hartman, D.P.; Ghadirian, E. (1978): Protective immunity and possible autoimmune regulation in amoebiasis. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9(Supl.1): 247.

Meza, I.; Cázares, F.; Rosales-Encina, J.L.; Talamás-Rohana, P.; Rojkind, M. (1987): Use of antibodies to characterize a 220 kilodalton surface protein from Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 156(5): 798.

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

Mirelman, D.; Bracha, R.; Wexler, A.; Chayen, A. (1986b): Changes in isoenzyme patterns of a cloned cultured of nonpathogenic Entamoeba histolytica during axenization. Infect. Immun. 54: 827.

Morris, M.N.; Powell, S.J.; Elsdon-Dew, R. (1970): Latex agglutination test for invasive amoebiasis. Lancet i: 1362.

Morris, M.N.; Powell, S.J.; Elsdon-Dew, R. (1971): Invasive amoebiasis: Circulating antibody levels by latex agglutination test. S. Afr. Med. J. 45: 1206.

Muñoz, M.L.; Acosta-Valle, H.; Calderón, J. (1978): Redistribución de antígenos superficiales de Entamoeba y su caracterización inmunoquímica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl.1): 183.

Muñoz, O.; Hernández-Velarde, R.; Cruz-Mejía, E.; Martínez, M.C. (1986): Es posible distinguir entre infección hepática antigua y reciente mediante el análisis inmunoenzimático? Arch. Invest. Méd. (Méx.) 17 (Supl.): 327.

Murray, H.W.; Aley, S.B.; Scott, W.A. (1981): Susceptibility of Entamoeba histolytica to oxygen intermediates. Mol. Biochem. Parasitol. 3: 381.

Murray, H.W.; Rubin, B.Y.; Rotherme, K.D. (1983): Killing of intracellular Leishmania donovani by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. J. Clin. Invest. 72: 1506.

Neal, R.A (1960): Enzymic proteolysis by Entamoeba histolytica: biochemical characteristic and relationship with invasiveness. Parasitology. 50: 531.

Neal, R.A.; Robinson, G.R.; Lewis, W.P.; Kessel, J.F. (1968): Comparison of clinical observations on patients infected with Entamoeba histolytica with serological titres and virulence of their amoebas to rats. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 17: 540.

Nilsson, L.A.; Petchclai, B.; Elwing, H. (1980): Application of thin layer immunoassay (TIA) for demonstration of antibodies against Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29: 524.

Orozco, E.; Arroyo, R.; Rodríguez, M.A.; García-Rivera, G. (1987): Identification of an Entamoeba histolytic adhesin using adhesion deficient-mutants and monoclonal antibodies. In: Agabian, N.; Goodman, H.; Nogueira, N.A. (eds.) Molecular Strategies of Parasitic Invasion. Alan R. Liss, New York.

Orozco, E; de la Cruz, H.F.; Rodríguez, M.A. (1988): Virulence-related properties in Entamoeba histolytica. In: Ravdin, J. (ed.) Amibiasis: human infection by Entamoeba histolytica. New York. John Wiley and Sons. 314.

Ortiz-Ortiz, L.; Capin, R.; Capin, N.R.; Sepúlveda, B.; Zamacona, G. (1978a): Activation of the alternative pathway of complement by Entamoeba histolytica. Clin. Exp. Immunol. 34: 10.

Ortiz-Ortiz, L. (1978): Inducción de inmunidad protectora amibiana con nuevos antígenos en el hámster lactante. E. Reacción inmunológica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl.1): 325.

Ortiz-Ortiz, L.; Ximénez, C.; Mendoza, F.; Michalak, C.; Melendro, E.I.; Oliva, A. (1986): Entamoeba histolytica: specific antigen recognized by monoclonal antibody. Exp. Parasitol. 61: 390.

O'Shea, M.S.; Feria-Velazco, A. (1974): Demostración ultramicroscópica de antígenos de superficie en trofozoitos de Entamoeba histolytica. I. Por inmunofluorescencia con IgG humana específica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 5 (Supl.2): 307.

Parkhouse, M.; Cid, M.E.; Calderón, J. (1978): Identificación de antígenos de membrana de Entamoeba histolytica con anticuerpos de pacientes con amebiasis. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9(Supl.1): 211.

Patterson, M.; Healy, G.R.; Shabot, J.M. (1980): Serologic testing for amoebiasis. Gastroenterology. 78: 136.

Pekkala-Flagan, A.; Rouslathi, E. (1982): Unfolded transferrin polypeptide chain is immunologically cross-reactive with similar derivatives of serum albumin and alpha-fetoprotein. J. Immunol. 128: 1163.

Pérez-Montfort, R.; Ostoa-Saloma, P.; Velázquez-Medina, L.; Montfort, I.; Becker, I. (1987): Catalytic classes of proteinases of Entamoeba histolytica. Mol. Bioch. Parasitol. 26: 87.

Petri, W.A.; Joyce, M.P.; Broman, J.; Smith, R.D.; Murphy, C.F.; Radvin, J.I. (1987): Recognition of the galactose- or N-Acetyl galactosamine-binding lectin of Entamoeba histolytica by human immune sera. Infect. Immun. 55: 2327.

Pfefferkorn, E.R.; Guyre, P.M. (1984): Inhibition of growth of Toxoplasma gondii in cultured fibroblast by human recombinant gamma interferon. Infect. Immun. 44: 211.

Pinto da Silva, P.; Martínez-Palomo, A.; Gómez-Robles, A. (1975): Topochemistry and dynamics of the cell surface: cap formation and microexudate. J. Cell. Biol. 64: 538.

Powell, S.J.; Maddison, S.E.; Wilmot, A.J.; Elsdon-Dew, R. (1964): Clinical evaluation in amoebic liver abscess. Lancet. 2: 602.

Powell, S.J. (1968): The capillary-tube precipitin test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 17: 840.

Prakash, O.; Tandon, B.N.; Vinayak, V.K.; Phalla, I.; Ray, A.K.; Fhujwala, R.A. (1969): Evaluation of diagnostic methods in amoebiasis. Indian J. Pathol. Bacteriol. 12: 84.

Prathap, K.; Gilman, R. (1970): The histopatology of acute intestinal amebiasis. A rectal biopsy study. Am. J. Pathol. 60: 229.

Ravdin, J.I.; John, J.E.; Johnston, L.I.; Innes, D.J.; Guerrant, R.L. (1985b): Adherence of Entamoeba histolytica trophozoites to rat and human colonic mucosa. Infect. Immun. 48: 292.

Ravdin, J.I. (1988): Pathogenesis of amebiasis: an overview. In: Ravdin J. (ed.) Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica. New York, John Wiley and Sons. 166.

Ravdin, J.I. (1989): Amibiasis now. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41(3): 40.

Reed, S.L.; Sargeant, P.G.; Braude, A.I. (1983): Resistance to lysis by human serum pathogenic Entamoeba histolytica. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77: 248.

Reeves, R.E.; Bischoff, J.M. (1968): Classification of Entamoeba species by means of electrophoretic properties of amoebal enzymes. J. Parasitol. 54: 594.

Robinson, L. (1972): The preparation of amoebic extracts and their testing by complement fixation against clinically proved sera. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 66: 435.

Roediger, W.E.W. (1982): The effect of bacterial metabolites on nutrition and function of the colonic mucosa. Symbiosis between man and bacteria. In: Kasper, H. and Goebell, H. (eds.): Colon and Nutrition. Lancaster, M.T.P. Press. 11.

Romer, H.; Pérez-de-Suárez, E.; de-Lares, A.; de-Dávila, D.; Gómez, M.A.; de-Galindo, M.; de-Fermin, G.; Yasmin, Y.; de-Torres, B.; Esparza, J.; Alvarez, N.; Torres, P. (1978): La amibiasis intestinal en el niño. I. Estudio etiológico de las lesiones de colon rectosigmoideo. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 375.

Rosales-Encina, J.L.; Meza, I.; López-De-León, A.; Talamás-Rohana, P.; Rojkind, M. (1987): Isolation of a 220 Kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 156: 790.

Ruiz-Castañeda, M. (1976): Surface fixation test for the diagnosis of invasive amebiasis. In: Sepúlveda, B., Diamond, L.S. (eds.): Proceedings of the International Conference on Amebiasis, Mexico City, Instituto Mexicano del Seguro Social. 708.

Salata, R.A.; Cox, J.G.; Ravdin, J.I. (1984): The killing of virulent Entamoeba histolytica trophozoites by phytohemagglutinin-elicited cytotoxic T-lymphocytes. Clin. Res. 32: 365A.

Salata, R.A.; Ravdin, J.I. (1985a): The N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of Entamoeba histolytica. II. Mitogenic activity for human lymphocytes. J. Infect. Dis. 151: 816.

Salata, R.A.; Ravdin, J.I. (1986): Review of the human immune mechanisms directed against Entamoeba histolytica. Rev. Infect. Dis. 8: 261.

Salata, R.A.; Murray, H.W.; Rubin, R.Y.; Ravdin, J.I. (1987): The role of gamma interferon in the generation of human macrophages cytotoxic for Entamoeba histolytica trophozoites. Am.J. Trop. Med. Hyg. 37: 72-78.

Salata, R.A.; Ravdin, J.I. (1988a): Review of the human immune mechanisms directed against Entamoeba histolytica. Rev. Infect. Dis. 8: 261.

Salata, R.A. (1988b): The role of antibody in the host defense against Entamoeba histolytica. In: Ravdin, J. (ed.) Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica. John Wiley and Sons. New York. 446.

Sánchez, M.E.; Martínez-Palomo, A. (1980): Inducción de inmunidad antiamebiásica en primates subhumanos con antígenos lisosomales de Entamoeba histolytica. II. Aislamiento y caracterización del antígeno lisosomal. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11 (Supl.1): 247.

Sánchez-Nereida, M.; García-Tamayo, F.; Kumate, J. (1978): Inmunquímica de proteínas inmunogénicas de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl.1): 149.

Sargeant, P.G.; Williams, J.E.; Grege, J.D. (1978): The differentiation of invasive and non invasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 519.

Sargeant, P.G.; Williams, J.E. (1979): Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 73: 225.

Sargeant, P.G.; Williams, J.E.; Kumate, J.; Jiménez, E. (1980a): The epidemiology of Entamoeba histolytica in Mexico City. A pilot survey I. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74(5): 653.

Sargeant, P.G.; Williams, J.E.; Neal, R.A. (1980b): A comparative study of Entamoeba histolytica (NIH:200, HK-9, etc.), Entamoeba histolytica-like and other morphologically identical amoebae using isoenzyme electrophoresis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74: 469.

Sargeant, P.G.; Williams, J.E.; Bhojnani, R.; Campos, J.E.; Gómez, A. (1982a): The epidemiology of Entamoeba histolytica in rural and an urban area of Mexico. A pilot survey II. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76: 208.

Sargeant, P.G.; Williams, J.E.; Bhojnani, R.; Kumate, J.; Jiménez, E. (1982b): A review of isoenzyme characterization of Entamoeba histolytica with particular reference to pathogenic and non-pathogenic stocks isolated in Mexico. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl.3): 89.

Sargeant, P.G.; Baveja, U.K.; Nanda, R.; Anand, B.S. (1984): Influence of geographical factors in the distribution of pathogenic zymodemes of Entamoeba histolytica: Identification of zymodeme XIV in India. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 78: 96.

Sargeant, P.G. (1985): Zymodemes expressing possible genetic exchange in Entamoeba histolytica. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 79: 86.

Sargeant, P.G. (1987): The reliability of Entamoeba histolytica zymodemes in clinical diagnosis. Parasitol. Today. 3: 40.

Sargeant, P.G. (1988): Zymodemes of Entamoeba histolytica. In: Ravdin, J. (ed.) Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica. John Wiley and Sons, New York. 370.

Savanat, T.; Chaicumpa, W. (1969): Immunoelectrophoresis test for amoebiasis. Bull. World Health Organization. 40: 343.

Savanat, T.; Viriyanond, P.; Nimitn. ngkol, N. (1973): Blast transformation of lymphocytes in amoebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 22: 705.

Sawhney, S.; Chakravarti, R.N.; Jain, P.; Vinayak, V.K. (1980): Immunogenicity of axenic Entamoeba histolytica antigen and its fractions. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74(1): 26.

Scharfstein, J.; Martins-Rodrigues, M.; Andrade-Alves, C.; De Souza, W.; Osvaldo-Previato, J. Mendoca-Previato, L. (1983): Trypanosoma cruzi: Description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. J. Immunol. 131: 972.

Schechter, M.; Nogueira, N. (1988): Variations induced by different methodologies in Trypanosoma cruzi surface antigen profiles. Mol. Biochem. Parasitol. 29: 37.

Sepúlveda, B.; Lee, E.; de la Torre, M.; Landa, L. (1971): El diagnóstico serológico de la amibiasis invasora con la técnica de la inmunoelectroforesis cruzada. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 2 (Supl.1): 263.

Sepúlveda, B.; Aubanel, M.; Landa, L.; Velázquez, G. (1972): Avances en la técnica de contraimmunoelectroforesis para el estudio serológico de la amibiasis. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 3 (Supl.2): 363.

Sepúlveda, B.; Chévez, A.; Iturbide-Alesio, I.; Ortiz-Ortiz, L. (1973): Efecto de la gammaglobulina inmune antiamebiana sobre el trofozoito de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 4 (Supl.1): 79.

Sepúlveda, B. (1976): Inmunología de la amebiasis. En: Sepúlveda, B.; Diamond L.S. (eds.) Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amebiasis, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F. 668.

Sepúlveda, B. (1982): Amebiasis: host-pathogen biology. Rev. Infect. Dis. 4(4): 836.

Shaalán, M.; Baker, R.P. (1970): Detection of coproantibodies in amoebiasis of the colon: a preliminary report. Am. J. Clin. Pathol. 54: 615.

Shaffer, J.G.; Ausfield, I. (1956): The effect of rabbit antisera on the ability of Entamoeba histolytica to phagocytize red blood cells. Am. J. Trop. Med. Hyg. 5: 53.

Sharma, R. (1959): Effect of cholesterol on the growth and virulence of Entamoeba histolytica. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 53: 278.

Sharma, P.; Krishna-Prasad, B.N.; Dutta, G.P. (1978): Coproantibodies in intestinal amebiasis using axenic Entamoeba histolytica antigen. Indian J. Med. Res. 68: 423.

Sharma, P.; Chandra, A.; Singh, A.; Dutta, G.P. (1980): Indirect hemagglutination test for intestinal and extraintestinal amoebiasis. Ind. J. Parasitol. 4: 13.

Sharma, P.; Das, P.; Dutta, G.P. (1981): Use of glutaraldehyde-treated sheep erythrocytes in indirect haemagglutination test for amoebic coproantibody. Indian J. Med. Res. 74: 215.

Sharma, S.D.; Mullenax, J.; Araujo, F.G.; Erlich, H.A.; Remington, J.S. (1983): Western blot analysis of the antigens of Toxoplasma gondii recognized by human IgM and IgG antibodies. J. Immunol. 131: 977.

Sodeman, W.A.; Dowda, M.C.; (1973): Rapid serological methods for the demonstration of Entamoeba histolytica activity. Gastroenterology. 65: 604.

Stamm, W.P.; Phillips, E.A. (1977): A cellulose acetate membrane precipitin (CAP) test for amoebiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 490.

Stein, J.; Stein, B.; Steinitz, H.; Talis, B. (1971): The indirect hemagglutination test as an aid in the diagnosis of amebiasis. Israel J. Med. Sci. 7: 1.

Stemberger, H. (1978): Zytolytische Immunreaktionen in vitro gegen trophozoiten von Entamoeba histolytica. Immune Infekt. 6: 71.

Stern J.L.; Graybill, J.R.; Drutz, D.J. (1984): Murine amebiasis: the role of the macrophage in host defense. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33: 372.

Swart, D.L.; Warren, L.G. (1962): The origin of antigenic substances in Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 and serologic manifestations of their antibody-inducig preperities. J. Parasitol. 48: 124.

Tanimoto-Weki, M.; Cortés, A.; Vázquez-Saavedra, J.A.; Calderón-Lara, P.; Aguirre-García, J. (1973): Inmunidad consecutiva la inyección de antígeno axénico en el hámster. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 4 (Supl.1): 147.

Thammapalerd, N.; Savanat, T. (1980): Purification of the antigen specific for amoebiasis. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 11: 378.

Thompson, P.E.; Graedel, S.K.; Schneider, C.R.; Stucki, W.P.; Gordon, R.M. (1968): Preparation and evaluation of standardized amoeba antigen from axenic cultures of Entamoeba histolytica. Bull. World Health Organization. 39: 349.

Torian, B.E.; Lukehart, S.A.; Stamm, W.E. (1987): Use of monoclonal antibodies to identify, characterize, and purify a 96,000 dalton surface antigen of pathogenic Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 156(2): 334.

Torian, B.E.; Reed, S.L.; Flores, B.M.; Creely, C.M.; Coward, J.E.; Vial, K.; Stamm, W.E. (1990): The 96-kilodalton antigen as an integral membrane protein in pathogenic Entamoeba histolytica: Potential differences in pathogenic and nonpathogenic isolates. Infect. Immun. 58(3): 753.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 1979; 76: 4350.

Treviño-García, N.; Feria-Velasco, A.; Ruiz-de-Chávez, I.; de la Torre, M. (1980): Lisosomas en Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11 (Supl.1): 179.

Trissl, D. (1982): Immunology of Entamoeba histolytica in human and animals hosts. Rev. Infect. Dis. 4: 1154.

Tupasi, T.E.; Healy, G.R. (1970): Adaptation of the Bozicevich Trichinella bentonite flocculation test for the diagnosis for amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 43.

Vargas, A.M.; Zinker, S.; Orozo, E. (1986): Caracterización de las proteínas ribosomales de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 17 (Supl.1): 81.

Vinayak, V.K.; Prakash, O.; Talwar, G.P.; Tandom, B.N.; Mohapatra, L.N. (1974): Evaluation of gel diffusion precipitin test for amoebiasis. Indian J. Med. Res. 62: 1317.

Von Brand, T.; Mc Mahon, P.; Tobie, E.J.; Thompson, M.J.; Moseetting, E. (1959): Chemical composition of the culture from Trypanosoma cruzi. Exp. Parasitol. 8: 171.

Walker, E.L.; Sellards, A.W. (1913): Experimental entamoebic dysentery. Philippine J. Sci. B. Trop. Méd. 8: 253.

Walsh, J.A. (1986): Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8: 228.

Weinbach, E.C.; Diamond, L.S.; Clagget, C.E.; Kon, H. (1976): Iron-sulfur proteins of Entamoeba histolytica. J. Parasitol. 62: 127.

Wirth, J.J.; Kierszenbaum, F.; Sonnenfeld, G. et al (1985): Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association with and killing of Trypanosoma cruzi. Infect. Immun. 219: 61.

W.H.O. Report of a WHO Expert Committee. Amoebiasis. (1969): WHO. Tech. Rep. Ser. No. 421: 1.

W.H.O. Report of a WHO Scientific group. Intestinal Protozoan and helminthic infections (1981): WHO. Tech. Rep. Ser. No. 666.

Yap, E.H.; Aw, S.E.; Zaman, V. (1969): IgG as the main immobilization factor in rabbit antisera against Entamoeba. Experientia. 25: 401.