



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores  
"CUAUTITLAN"

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA INMUNOGENICIDAD  
DE FRACCIONES DE ENTAMOEBIA HISTOLYTICA  
OBTENIDA EN CULTIVO AXENICO Y SU  
VALORIZACION POR PRUEBA DE  
NEUTRALIZACION EN HAMSTERS  
LACTANTES**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**BETTI HERNANDEZ REYES**



## **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.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA INMUNOGENICIDAD  
DE ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS OBTENIDA EN CUL-  
TIVO AXENICO Y SU VALORIZACION POR PRUEBA  
DE NEUTRALIZACION EN HAMSTERS LACTANTES.

C O N T E N I D O :

Resumen .....	1
Introducción .....	2
Generalidades .....	4
Historia .....	4
Morfología y Ciclo Biológico .....	5
Inmunología .....	10
Obtención de antígenos .....	11
Objetivos .....	15
Plan de Trabajo .....	16
Material y Métodos .....	17
1.- Soluciones .....	17
2.- Obtención del antígeno crudo de <u>Entamoeba histolytica</u> .....	18
3.- Purificación por cromatografía en gel - (Sephadex G-200) del antígeno crudo ....	19
4.- Obtención de la fracción soluble B .....	20
5.- Determinación modificada de proteínas - por medio de la reacción de <u>Folin-Ciocalteu</u> .....	20

6.- Prueba de Inmunodifusión por el método de Ouchterlony .....	21
7.- Inmunización de conejos y obtención de - sueros hiperinmunes.....	24
Prueba de precipitación en capilar .....	28
Prueba de inhibición de la hemaglutinación .....	30
8.- Prueba de Neutralización .....	33
Cuenta de trofozoitos .....	33
Neutralización del suero inmune con trofozoitos de <u>E. histolytica</u> .....	33
Inoculación a hamsters lactantes .....	34
Resultados .....	36
Selección de la fracción soluble A de <u>E. histolytica</u> cepa HM-1 IMSS .....	36
Determinación de proteínas .....	44
Titulación de sueros por precipitación en capilar y por inhibición de la hemaglutinación	48
Prueba de neutralización .....	55
Discusión y Conclusiones .....	59
Bibliografía .....	61

## RESUMEN .

Este trabajo se realizó para ver la diferencia - inmunogénica y protectora entre el antígeno crudo y los antígenos solubles de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS y además para probar la prueba de neutralización en la determinación de potencias de antígenos. Se obtuvieron los antígenos solubles de este trabajo a partir del antígeno crudo de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS, denominándose antígeno soluble A el obtenido por cromatografía en Sephadex - G-200 y antígeno soluble B el que se obtuvo en Sephadex - G-150. Con éstos se inmunizaron conejos y con el suero inmune de los mismos se efectuó la prueba de neutralización en hamsters lactantes. De los antígenos probados, el antígeno soluble A (purificado por Sephadex G-200) fué el antígeno - que presentó mayor inmunogenicidad y protección. Por otro lado la prueba de neutralización en hamsters lactantes, puede ser un buen método para determinar la potencia de antígenos, siendo más económico, más rápido, más fácil y requiere una pequeña cantidad de inóculo.

## INTRODUCCION :

La población de nuestro país es atacado frecuentemente por las enfermedades del aparato digestivo, sobre todo la amibiasis, pues México figura entre las pocas regiones de la tierra que pueden llamarse "patrias de la amibiasis" (1) - por la frecuencia y la gravedad que en ellas reviste el padecimiento. Esta enfermedad no es propia de zonas tropicales y abarca toda la República; presentando especial predilección por dos sectores: el de las clases sociales con pocos recursos económicos, lo cual propicia malas condiciones sanitarias; y el de los varones adultos entre los 20 y los 50 años de edad. (1) Esto último no se ha podido explicar ya que en el primer caso como en tantas otras infecciones, la pobreza e ignorancia favorecen la propagación de la amibiasis.

Un grupo de investigadores preocupados por el curso alarmante de la enfermedad amibiana que constituye uno de los padecimientos más frecuentes y graves en el Servicio de Gastroenterología del Hospital General del Centro Médico, (la amibiasis ocupó en 1968 el 4º lugar en las causas de muerte) (1) al igual que en otros hospitales generales de la ciudad de México y de la República, se unieron para estudiar la enfermedad, iniciando sus estudios en 1967 (1).

Este grupo encabezado por el Dr. Bernardo Sepúlveda, trazó un programa a partir de Enero de 1968 el cual consideraba dos puntos principalmente: el primero eran los estudios orientados hacia el conocimiento de la biología y la morfología de la amiba histolítica; el segundo abarcaba las investigaciones destinadas a precisar las reacciones del hospedero, ya fuera humano o animal de experimentación, así como a estudiar la mejor forma de modificar favorablemente tales reacciones. (1,2) Así, en 1969, con la serie de

investigaciones realizadas se efectuó el primer Seminario sobre Amibiasis. (2) Dicho grupo fué creciendo de tal manera que en 1972 se creó el Centro de Estudios sobre Amibiasis (2) que hasta la fecha continua avanzando en el inmenso campo de la amibiasis.

Actualmente, se desea encontrar un antígeno amibiano inócuo y eficaz que sea capaz de inducir inmunidad protectora anti-amibiana en el hombre y de esta manera se reduzca el número de casos de amibiasis, puesto que hay conocimientos sobre la acción citopatogénica del suero de pacientes con absceso hepático amibiano sobre los trofozoitos de Entamoeba histolytica cultivados en forma axénica, (3,4,5,6,7,8,9,10) así también se sabe de la inmunidad protectora que se induce en hamsters lactantes con antígenos amibianos. (11, 12, 13, 14, 15)

## GENERALIDADES :

### Historia.

La amibiasis es una de las enfermedades que ha atacado desde hace bastante tiempo al hombre de manera constante. Se tiene conocimiento de casos de disentería en los países del antiguo mundo que bien pudieron ser de naturaleza amibiana. Hasta el año de 1875 no se sabía acerca de la existencia de algún parásito que ocasionara esta enfermedad, en cambio se conocían el conjunto de síntomas que la caracterizaban. Por estas fechas el Dr. Fedor Aleksandrevitch Lesh publicó los resultados de las observaciones y la experimentación que hizo en el caso de disentería que padecía un campesino oriundo de la región de Arkangel, describiendo con detalle las amibas encontradas en sus heces, las cuales denominó Amoeba coli.<sup>(2)</sup>

Roberto Koch, en 1887, puso en claro la relación etiológica entre disentería y absceso hepático, que como coincidencia o complicación era ya conocida. Mientras en Checoslovaquia, Hlava reafirmó el poder patógeno de las amibas, también observó que ocurría la enfermedad en un país no tropical. Más adelante, en 1891, en el Hospital Johns Hopkins, en Baltimore, Councilman y Lauffleur efectuaron un trabajo sobre amibiasis intestinal y hepática, creando los términos "disentería amibiana" y "absceso amibiano del hígado". En 1893, Quincke y Roos, en Kiel publicaron un estudio que hizo progresar el conocimiento de la biología de la amiba. Ellos descubrieron el ciclo evolutivo de la amiba con la transformación de sus trofozoitos en quistes, y que ésta era la forma infectante. Diez años más tarde, Schaudinn nombró Entamoeba histolytica a la especie patógena y Entamoeba coli a la especie desprovista de poder patógeno.<sup>(2)</sup>

## Morfología y Ciclo Biológico.

La amiba de este estudio es la denominada por Schaudinn - Entamoeba histolytica, la cual presenta dos eventos críticos en su ciclo de vida llamados enquistamiento y desenquistamiento, dando lugar respectivamente a una forma latente o quiste y a una forma vegetativa o trofozoito. La forma vegetativa permite que la amiba se desarrolle y multiplique en el huésped, y los quistes, que bajo ciertas condiciones se forman a partir de los trofozoitos, permiten que las amibas abandonen a un huésped e infecten a otros. El enquistamiento es esencial para la transmisión del parásito, pues sólo el quiste tiene poder infectante. La figura I muestra el ciclo vital de E. histolytica con las siguientes fases: trofozoito, prequiste, quiste, metaquiste y trofozoito metaquístico.<sup>(16)</sup>

El trofozoito, forma vegetativa de E. histolytica, tiene un tamaño variable, que fluctúa entre 10 y 60 micras de diámetro según el grado de actividad y la cepa del organismo; se encuentra cubierto por una membrana citoplásmica la cual controla la entrada y salida de alimentos, no tiene una forma constante ya que cambia frecuentemente mediante la extensión y retracción de pseudópodos temporales.<sup>(16)</sup>

El protoplasma de E. histolytica se puede diferenciar en el ectoplasma, que es claro y situado en la periferia, y en el endoplasma, central y finamente granuloso. El núcleo es esférico y su diámetro es aproximadamente la quinta o sexta parte del diámetro de la amiba completa. En algunos trofozoitos se observa sobre la región nuclear, finas esférulas que varían en número y tamaño, en general son pequeñas y de 2 a 6, pero en ocasiones suelen ser grandes y de 18 a 20 esférulas; ayudan a la localización del núcleo cuando éste se oculta entre las numerosas vacuolas y grumos del citoplasma.<sup>(17)</sup> Además, posee el trofozoito, retículo endoplásmico escaso y carece de dos importantes -

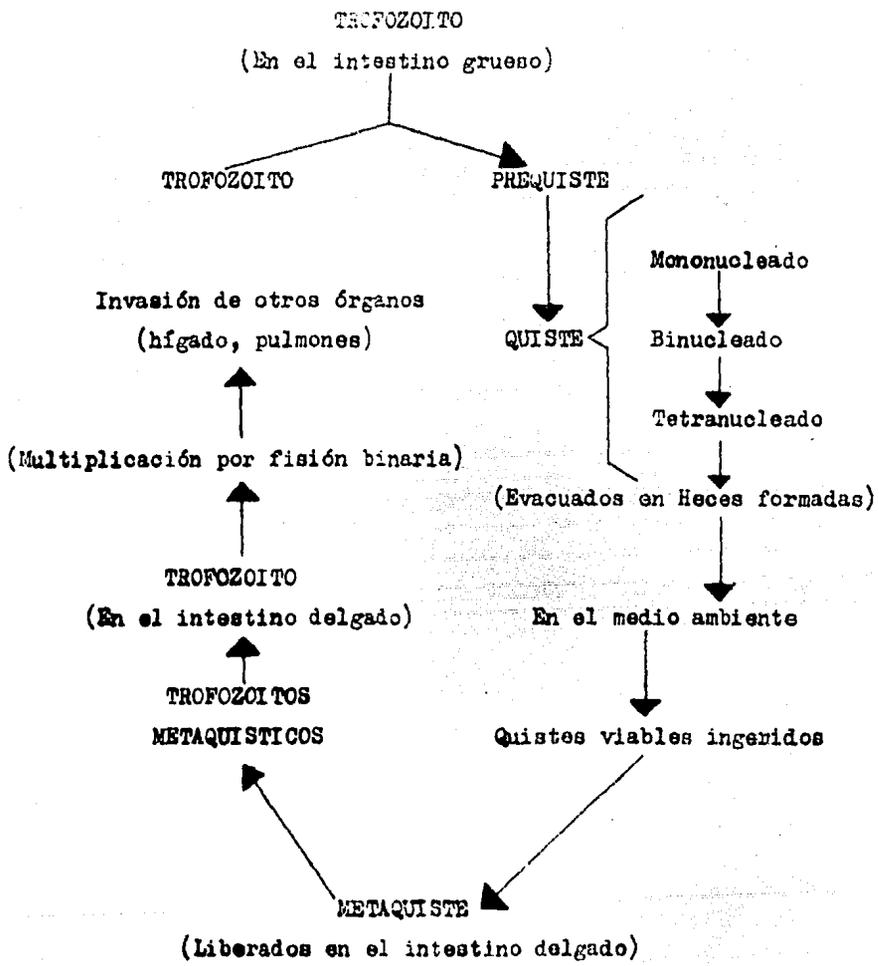


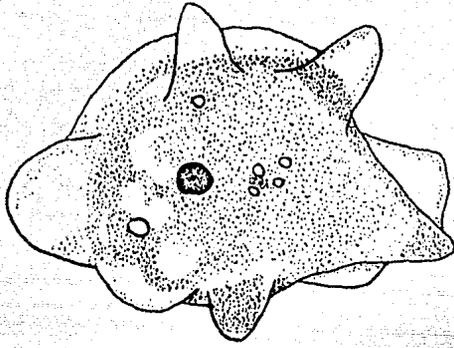
FIG. I. Ciclo Vital de Entamoeba histolytica.

organelos: aparato de Golgi y mitocondrias. (18) Su locomoción es bastante notable, resulta de la formación de prolongaciones pseudopódicas del ectoplasma, en el interior de las cuales fluye el endoplasma. (16)

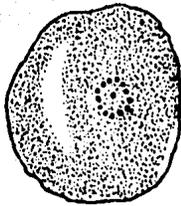
La multiplicación de un trofozoito es mediante fisión binaria, es muy rápida, suele completarse en 20 o 40 segundos, un trofozoito binucleado simplemente se alarga por movimientos polares de separación, se produce un puente estrecho, cada vez más delgado, hasta transformarse en un filamento citoplásmico que termina por romperse. El volumen y contenido celular aparentemente se distribuye en partes iguales y se forman dos nuevos trofozoitos. Puede suceder que se desprendan porciones citoplásmicas anucleadas que se destruyen después de algún tiempo o son incorporadas por la propia amiba, otras veces una amiba vecina entra en contacto con ellas y las incorpora a su masa citoplásmica. (18)

Los trofozoitos por lo menos durante algún tiempo, viven y se multiplican en las criptas del intestino grueso, probablemente utilizando las secreciones mucosas como alimento y mediante procesos metabólicos anaerobios en simbiosis con ciertas bacterias entéricas. Una vez que se efectúa la invasión de los tejidos, la amiba ya no depende de las bacterias, pues obtiene de ellos el sustrato metabólico necesario. (16)

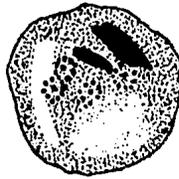
En condiciones naturales no se produce el enquistamiento en los tejidos. A medida que la materia fecal que contiene los trofozoitos se empieza a deshidratar en la luz del colon, éstos se desprenden de los alimentos no digeridos y se condensan en una masa esférica, formando así el prequiste. Entonces secreta una cubierta resistente y relativamente delgada y formado el quiste inmaduro. En este estado el organismo sólo tiene un núcleo, como sucede en el trofozoito y en el prequiste, (16, 19)



A



B



C

FIG. II.- Morfología de algunas fases de Entamoeba histolytica. A, trofozoito activo; B, estadio prequístico; C, quiste tetranucleado. (tomado de Parasitología Clínica de Faust, Russell y Jung, pag. 137, 1977).

Los quistes son esféricos, su diámetro varía entre 5 y 20 micras, aproximadamente, maduran por dos mitosis consecutivas del núcleo mediante las cuales se producen 4 núcleos. En raras ocasiones se encuentran hasta 8 núcleos en los quistes maduros de ciertas cepas de esta misma especie. Son muy sensibles a la putrefacción, desecación y temperaturas superiores a 40°C e inferior a 5°C. (16,19)

Una vez que el quiste llega a la boca y es deglutido pasa por el estómago y penetra en el intestino delgado. El quiste no experimenta cambios aparentes mientras se encuentra en lugares en donde la reacción del medio es ácida, pero tan pronto como el medio en que se encuentra es neutro o ligeramente alcalino entra en gran actividad. Esto, combinado con la acción de los jugos digestivos, debilita la pared del quiste y permite que la ameba multinucleada (metaquiste) salga al exterior por una pequeña hendidura de la pared que la envuelve. Inmediatamente, el citoplasma se divide en tantas partes como núcleos tiene, de tal manera que cada núcleo pasa a ser el centro de un pequeño trofozoito metaquistico. Así, del proceso de desenquistamiento aparecen 4 pequeñas amebas. En condiciones desfavorables para el desenquistamiento en el intestino delgado, los quistes son transportados con la materia fecal hacia el intestino grueso y después son evacuados con las heces sin haberse desenquistado. Los trofozoitos metaquisticos son llevados con el contenido del intestino delgado hacia el ciego, lugar donde llegan a establecerse si son en número suficiente para que uno o más de ellos se pongan en contacto con la mucosa o se alojen en las criptas glandulares. Una vez que las pequeñas amebas comienzan a alimentarse y crecer, llegan a convertirse en trofozoitos normales y se completa el ciclo de desarrollo. (16,19)

Los trofozoitos ya establecidos empiezan a multiplicarse por fisión binaria y a invadir tejidos extraintestinales

tinales ya que al ir penetrando a zonas profundas de la mucosa o de las glándulas se ponen en contacto con vasos linfáticos y vasos sanguíneos, los cuales los transportan al hígado, pulmones y aunque poco frecuente, pero no considerado raro, llegan a invadir hasta el encéfalo. (16,19)

### Inmunología.

La infección producida por Entamoeba histolytica responde a las reacciones de inmunidad que se presentan en cualquier otra infección; participando tanto los fenómenos de inmunidad humoral, dependientes de los linfocitos B, como los de inmunidad celular, dependientes de los linfocitos T. (19)

La inmunidad humoral se caracteriza por la presencia de anticuerpos antiambianos circulantes que son - identificados por medio de diversas técnicas para reacciones serológicas: inmunodifusión en gel de agar, fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia, aglutinación del látex y contraimmunoelectroforesis. Estas reacciones son de gran utilidad en el diagnóstico serológico de la amibiasis invasora, particularmente en el absceso hepático amibiano y en otras formas graves - de la enfermedad en las que la respuesta inmunológica es - más intensa. (20)

La inmunidad celular se observa en aquellos pa--cientes que han sanado de absceso hepático amibiano, cuando al someterlos a las pruebas de intradermorreacción con antígeno amibico, dan un resultado positivo. (21)

Un hecho de gran interés en la inmunidad humoral es que los anticuerpos específicos persisten años después de curada la amibiasis invasora y que, con toda probabilidad, aparecen también, después de infecciones subclínicas como ocurre en otras muchas enfermedades infecciosas. Se - considera que dichos anticuerpos están localizados en la - inmunoglobulina G y seguramente correspondan a la subclase

Ig G<sub>2</sub>. (20,22)

De acuerdo con algunas investigaciones se determina que los anticuerpos antiambianos no son únicamente testigos de la reacción inmunitaria sino que tienen además efecto nocivo sobre los trofozoitos de Entamoeba histolytica, lo cual da bases para suponer que son anticuerpos protectores. (3,4,5,7,10)

#### Obtención de antígenos.

En base a los conocimientos que se tienen sobre separación y purificación de organelos de algunas células y microorganismos, se ha obtenido fracciones antigénicas ambianas cada vez más puras, así, la fracción ribosómica y la fracción lisosómica se ha podido obtener aplicando ultracentrifugación a diferentes velocidades a un homogenizado de amibas. (13)

Otro método que se ha utilizado en la obtención y purificación de fracciones de E. histolytica es la cromatografía de columna de exclusión molecular, (23) en la cual la muestra a purificar se encuentra disuelta en una solución reguladora, y se deja fluir por gravedad a lo largo de una columna empaquetada con gránulos, o perlas, de un polímero inerte, de elevado grado de hidratación, que ha sido previamente lavado y equilibrado con la solución reguladora. En la columna empaquetada, las moléculas de tamaño más pequeño que los gránulos penetran en los poros internos de los mismos y descienden a lo largo de la columna a velocidades distintas de acuerdo al peso molecular. Las moléculas más grandes que los poros internos de las perlas no son atrapadas y son eliminadas con la solución reguladora, es decir, son excluidas y permanecen por ello en el volumen de exclusión de la columna, definido como volumen de la fase acuosa en el exterior de los gránulos. El Sephadex, es el material que se emplea para dicha cromatografía, y es el nombre comercial de un derivado polisacárido formado

por residuos de glucosa; como hay de diferente tamaño de -  
poro interno ayuda muy bien en la separación de diversas -  
fracciones de la amiba, dependiendo del peso molecular de  
la partícula. (24)

La cromatografía ha sido de gran ayuda en la in-  
vestigación de las fracciones antigénicas amibianas, -  
Meerovitch (1970) efectuó un estudio sobre la purificación  
de antígenos de un cultivo monoxénico de Entamoeba histoly  
tica por filtración en gel, utilizando Sephadex G-200 y -  
Sephadex G-100 (25). López Osuna y Kretschner (1971) (21)  
emplearon Sephadex G-200 para fraccionar extractos de la -  
cepa HK-9. Shu Mei Chang (1979) (26) comparó las fracciones  
de dos cepas, HT-31 y HK-9, obtenidas a través de Sephadex  
G-200, encontrando que la fracción II de ambas cepas te-  
nían antígenos comunes. Sawhney y cols. (1980) (27) al -  
fraccionar con Sephadex G-200 un extracto amibiano cepa -  
NIH:200, identificó a la fracción I como la única fracción  
potencialmente inmunogénica. Otro estudio cromatográfico -  
es el realizado con Sephadex G-150 en el cual se empleó un  
cultivo axénico sonicado de E. histolytica cepa IP-106, de  
terminando que la fracción I proporciona mayor protección  
contra una inoculación intrahepática de trofozoitos en -  
hamsters de 75 a 80 gr. de peso. (14).

Por medio de la combinación de éstas técnicas -  
(cromatografía, centrifugación, diálisis), se han logrado  
fracciones de la amiba con diferentes grados de pureza. La  
identificación de dichas fracciones, se logra por pruebas  
de precipitación utilizando un suero inmune. Se hacen prue-  
bas en tubos de ensaye, en capilares o en placas por difu-  
sión de agar, pueden ser cualitativas o cuantitativas de-  
pendiendo de la información que se tenga. En el proceso de  
purificación, los métodos de difusión en agar son emplea-  
dos como control de los materiales del extracto crudo.

Una vez que se cuenta con las fracciones del microorganismo purificadas es necesario saber si estas fracciones pueden dar protección al ser humano, ya que éste es el objetivo que se persigue, "proteger al hombre". Para cumplir dicho fin se determina la potencia de las fracciones purificadas mediante análisis biológicos, debido a que no se dispone de pruebas químicas o físicas válidas. De los análisis biológicos se pide que nos digan si un preparado es capaz de producir una reacción predecible en un ser humano al administrarse en una dosis prescrita. En el caso de Entamoeba histolytica, para conocer la protección que dan sus fracciones purificadas se hacen pruebas en animales de experimentación, los cuales son sometidos a inoculaciones con dichas fracciones y más tarde son desafiados con amibas vivas; dentro de los animales de experimentación que se utilizan se encuentran: el hamster dorado y el cobayo. En el trabajo realizado por Krupp (1974)<sup>(28)</sup> se purificó un lisado de E. histolytica por filtración en una columna de Sephadex G-150, y demostró que las fracciones purificadas proporcionaban protección contra la infección amibiana a cobayos. Por otro lado, el hamster dorado más empleado es el lactante, ya que es de fácil manejo y se le puede inducir una amibiasis hepática como lo demostró Mattern y Keister (1977)<sup>(15)</sup>, este mismo modelo fue empleado por el Dr. Sepulveda y cols. (1978)<sup>(13)</sup> para comparar la protección de diferentes fracciones purificadas de E. histolytica considerando dosis y grados de pureza. Otra manera con la que se podría conocer la protección que proporcionan las fracciones purificadas de E. histolytica sería la prueba de neutralización, ya que se ha visto que el suero humano inmune, mezclado en distintas proporciones con cultivos de E. histolytica, produce alteraciones de gravedad variable en los trofozoitos; y no solo eso, sino también neutraliza totalmente su virulencia (3,4,5,7,10). Así sustituyendo el suero humano inmune con suero inmuniza

do con fracciones purificadas de E. histolytica, se determinaría la protección que brindan tales fracciones.

De acuerdo a lo que se ha descrito, es necesario que las pruebas de actividad biológica se realicen juntamente con las pruebas de identificación (pruebas de precipitación), ya que proporcionan datos de gran valor en el estudio de los inmunógenos de la amiba, haciendo posible explicar y seguir los varios constituyentes que se obtienen en un fraccionamiento, y establecer la relación que hay de uno con otro, para que más adelante se defina por un inmunógeno óptimo contra la amibiasis.

## **O B J E T I V O S :**

Los objetivos de este trabajo son:

- 1.- **Obtener un antígeno soluble amibiano mediante la cromatografía de un homogenizado de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS, cultivada en forma axénica.**
  
- 2.- **Determinar la inmunogenicidad de los antígenos solubles obtenidos por cromatografía y del antígeno crudo de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS.**
  
- 3.- **Valorar los antígenos antes mencionados mediante la prueba de neutralización en hamsters lactantes.**

## PLAN DE TRABAJO :

En base a lo antes mencionado se tiene el siguiente plan de trabajo:

- I.- Cosechar los trofozoitos de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS cultivados axenicamente en el medio TYI-S-33 (tripticasea, extracto de levadura, fierro suero), y obtener el antígeno crudo de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS.
- II.- Obtener por Cromatografía en gel (Sephadex G-200) el antígeno soluble de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS.
- III.- Inmunizar conejos con cada fracción obtenida con adyuvante completo de Freund, de acuerdo a los cuadros: 1, 2 y 3.
- IV.- Obtener el suero inmune mediante la sangría de los conejos.
- V.- Realizar la prueba de neutralización del suero inmune con trofozoitos de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS e inocular esta mezcla por vía intrahepática a hamsters lactantes.
- VI.- Sacrificar a los 8 días, los hamsters con el fin de observar si hay formación de abscesos hepáticos.
- VII.- Determinar el grado de protección obtenida con cada fracción antigénica y comparar entre ellas.

# MATERIAL Y METODOS .

## 1.- SOLUCIONES.

Preparación de la Solución Reguladora de Fosfatos  
pH 7.2, 0.15 M.

Todos los reactivos utilizados fueron J.T.Baker y se usó agua destilada.

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
Cloruro de Sodio -----	114.75 gr.
Fosfato monobásico de sodio -----	11.25 gr.
Fosfato dibásico de potasio -----	3.0 gr.
Agua destilada -----	15.0 lts.

Se ajustó el pH a 7.2 con hidróxido de sodio al 40%.

Preparación de la soluciones usadas en la determinación de proteínas por medio de la reacción de Folin - Ciocalteu.

### Solución A:

50 partes de solución de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1N.

0.5partes de solución de sulfato de cobre pentahidratado al 0.5% en citrato de sodio al 1%.

0.5partes de solución de tartrato de sodio y potasio al 1.0%.

### Solución B:

1.0 parte de Reactivo de Folin - Ciocalteu

1.0 parte de agua destilada

## 2.- OBTENCION DEL ANTIGENO CRUDO DE E. histolytica.

Se utilizaron cultivos de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS, cultivada en forma axénica en el medio TYI-S-33 (tripticasa, extracto de levadura, fierro-suero)<sup>(29)</sup>, y se seleccionaron aquellas botellas que por observación macroscópica y microscópica tuvieran crecimiento abundante y en buen estado. Las botellas se colocaron en un recipiente que contenía hielo, durante 15 minutos aproximadamente. Al cabo del cual, el contenido de las botellas se vació en recipientes cerrados de plástico, los cuales se centrifugaron en una Centrifuga Refrigerada Automática Sorvall, (modelo RC2-B, cabezal GSA), a 95 G por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante (medio de cultivo) y se resuspendió el sedimento celular con un volumen igual al del medio decantado, de solución reguladora de fosfatos pH 7.2. Se centrifugó a 95G durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular con nueva solución reguladora de fosfatos pH 7.2. Este lavado se repitió dos veces más.

Se recuperó el paquete celular de la última lava da, aproximadamente 95 ml, se depositó en el vaso del Triturador Sorval (omni-mixer), donde se fragmentó. La fragmentación del paquete celular fué satisfactoria cuando el 90% o más de las células que se observaron al microscopio de contraste de fases (objetivo 40x) se encontraban fragmentadas. Después se centrifugó el homogenado a 2850 durante 20 minutos. Al sobrenadante así obtenido se le llamó Antígeno Crudo de Entamoeba histolytica, se le determinó la cantidad de proteínas por el Método de Folin-Ciocalteu<sup>(30)</sup> y se conservó en un Congelador Imperial, (modelo CV-123 A), a -20°C, hasta que fué usado. El sedimento celular se eliminó.

### 3.- PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA EN GEL (SEPHADEX G-200) DEL ANTIGENO CRUDO.

Se pesó 25 gr. de Sephadex G-200 (Farmacia) y se depositó lentamente en un garrafón de vidrio de 5 lt de capacidad que contenía en agitación 2 lt. de agua destilada con 2 ml de merthiolate al 0.1% (dilución final 1:10 000). Efectuada la mezcla se conservó en refrigeración por 48 - horas agitándose de vez en cuando y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

Se empleó una columna [ (Farmacia Fine Chemicals), (modelo K-26/100) ] a la cual se le agregó ya agitada la suspensión de Sephadex y se llenó lentamente y sin burbujas a su capacidad (45cm de largo x 2.5 cm de diámetro)<sup>(25)</sup>. Ya empacada la columna se conectó la manguera de entrada a un garrafón de vidrio de 5 lt. que contenía solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con merthiolate 0.1% y se abrió la llave de salida de la columna a una velocidad de flujo de 9 ml/hora <sup>(25)</sup>. Con el fin de estabilizar el lecho, se mantuvo esta entrada de solución por 24 horas, al cabo de las cuales, se eliminó toda la solución reguladora almacenada en el lecho del Sephadex y se depositó 10 ml del antígeno crudo de E. histolytica, a partir de ese momento se fueron recolectando 3 ml cada 20 min., recolectándose 70 tubos - previamente numerados. Cuando los 10 ml de antígeno crudo de Entamoeba histolytica penetraron en el gel se conectó - la manguera de entrada a la solución reguladora de fosfatos pH 7.2. Inmediatamente después, se reguló el flujo de entrada de tal manera que en la superficie del gel hubiera un volumen constante de 10 ml de solución. Así, se conservó la columna hasta la recolección de los 70 tubos que fueron mantenidos en refrigeración hasta su identificación. - Es importante hacer notar que el empaque de la columna y - su uso se efectuó en cuarto frío (5°C).

#### Selección de la fracción soluble A.

Para seleccionar la fracción soluble A se efectuaron dos análisis a las 70 muestras recolectadas: 10. - lecturas de absorbancias en un espectrofotómetro marca Seizz (modelo PMQ-2) a 280 nm. usando como blanco la solución reguladora de fosfatos pH 7.2, y 20. prueba de inmunodifusión por el método de Ouchterlony. Esta última prueba se efectuó porque se deseaba que la fracción soluble seleccionada, fuera antigénica. Seleccionada la fracción soluble A se pasó a través de un filtro de vaso Millipore para tenerla estéril. Se le determinó la cantidad de proteínas por el método de Folin-Ciocalteu (lowry)<sup>(30)</sup> y se conservó en congelación hasta su uso.

#### 4.- OBTENCION DE LA FRACCION SOLUBLE B.

La fracción soluble B fué proporcionada por el Laboratorio de Ultracentrifugas del Hospital General del Centro Médico, se obtuvo de la purificación por cromatografía del antígeno crudo de E. histolytica en Sephadex G-150 de acuerdo al trabajo efectuado por Krupp en 1974<sup>(28)</sup>.

El objetivo por el cual se trabajó con la fracción soluble B fué tener con que comparar la antigenicidad de la fracción soluble A obtenida a través de Sephadex G-200 y de esta manera se conociera cómo influye la purificación de un antígeno amibiano en su poder antigénico.

#### 5.- DETERMINACION MODIFICADA DE PROTEINAS POR MEDIO DE LA REACCION DE FOLIN-CIOCALTEU<sup>(30)</sup>.

Se depositó en un tubo de ensaye 0.5 ml de la muestra y se llevó a 1 ml con agua destilada. Se agregó 3 ml de Solución A, agitándose vigorosamente y se dejó en reposo durante 10 min. Después se agregó 0.3 ml de Solución B, agitando vigorosamente y dejándose reposar 30 min. Se leyó el color en un Espectrofotómetro marca Seizz (modelo PMQ-2) a 590 nm y se determinó la cantidad de proteínas de la muestra en la curva de calibración efectuada con albúmina bovina.

## 6.- PRUEBA DE INMUNODIFUSION POR EL METODO DE OUCHTERLONY.

Portaobjetos limpios fueron introducidos en un vaso de precipitados que contenía ión agar al 0.5% (en solución salina fisiológica + merthiolate 1:10 000, marca - oxid), se sacaron y se colocaron sobre una superficie lisa. Inmediatamente se cubrieron cada uno con el ión agar al 1.5% (en solución salina fisiológica + merthiolate - 1:10 000, marca oxid) para formar una capa de 3 mm. Se de jaron solidificar y después se perforó el agar haciendo 7 perforaciones: 1 al centro y 6 en forma equidistante. Se hicieron 2 juegos por cada portaobjeto. De acuerdo al dibujo de la figura 1.

Se seleccionaron las fracciones, tomando el tubo No. 1 y todos los tubos que fueran múltiplos de cinco (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, hasta el 70), para tener una - correlación con la curva de adsorción de las fracciones - antigénicas. Se tomó con un tubo capilar suero de conejo - antihomogenizado de título 1:128 y se colocó en el pozo - central de cada conjunto de perforaciones hasta cubrirlo - totalmente. A los 15 minutos se repitió la operación (2 ve ces). Con otro tubo capilar se tomó antígeno crudo de E. histolytica y se colocó en uno de los pozos laterales has- ta cubrirlo totalmente. A los 15 minutos se repitió la ope ración (2 veces). Con cada una de las fracciones selec- nadas se hizo lo mismo; con un tubo capilar limpio se tomó muestra y se colocó en otro pozo lateral, hasta que fué ou bierto totalmente. A los 15 minutos se repitió la ope ración (2 veces). Fué un pozo lateral para cada fracción. La lectura se efectuó a las 24 horas manteniéndolos a tempera tura ambiente y a las 48 horas si fueron conservados en re frigeración; si a las 24 horas no hubo lectura se conserva ron hasta por 5 días en el cuarto frío. La lectura positi- va consistió en descubrir una banda de precipitación entre

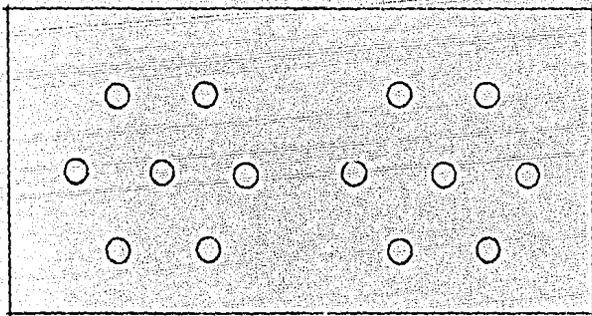


Fig. 1.- Ejemplo de las perforaciones que se hicieron sobre el agar de los portaobjetos para efectuar la Prueba de Inmunodifusión. Se efectuaron 2 juegos de 7 perforaciones en cada extremo del portaobjeto, quedando distribuidas en la siguiente forma, 1 al centro y 6 en forma equidistante.

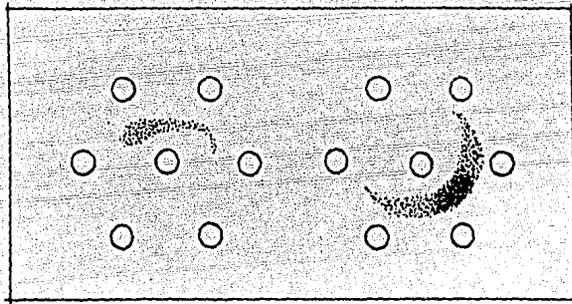


Fig. 2.- Ejemplo de bandas de precipitación que se forman en una prueba positiva de inmunodifusión. Como estas bandas son las que se esperaban tener cuando algunas de las fracciones depositadas en cualquier pozo lateral fuera antigénica y por lo tanto diera una respuesta positiva al reaccionar con el suero antihomogenizado de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS.

el pozo central y uno de los laterales (como aparece en el dibujo de la fig. 2). La presencia de la banda de precipitación significa que la muestra seleccionada era antigénica al suero de conejo antihomogenizado.

#### 7.- INMUNIZACION DE CONEJOS Y OBTENCION DE SUEROS. HIPER- INMUNES.

Se inocularon dos conejos de 2.5 - 3.5 Kg. de peso por cada antígeno de Entamoeba histolytica obtenido (antígeno crudo, antígeno soluble A, antígeno soluble B). La inoculación se realizó en el cojinete plantar de los conejos. El programa de inmunización de cada antígeno se describe en los cuadros 1, 2, y 3.

La sangría de los conejos se hizo de la siguiente manera: se colocó al conejo boca arriba sujetándole fuertemente las extremidades, se limpió con un algodón impregnado de alcohol y se puncionó el corazón mediante la aguja No. 18, extrayéndole 10 ml de sangre. La sangre fué depositada en tubos y se dejó en reposo a temperatura ambiente, alrededor de 1 hora. Con una varilla de vidrio se removió de la pared del tubo el coágulo contraído y se almacenaron los tubos en refrigeración por 24 horas.

Se eliminó el coágulo de los tubos y el suero - formado fué extraído por medio de una pipeta y fué depositado en otros tubos para someterlo a 156G en una Centrifuga Refrigerada Beckman (modelo T-J-6) durante 10 minutos, - con el objeto de obtener un suero claro libre de eritrocitos contaminantes. Se recuperó el suero de los tubos y el sedimento se eliminó.

SEMANAS	D O S I S
1a.	0.5 ml de antígeno crudo + 0.5 ml de Adyuvante Completo de Freund.
2a.	0.5 ml de antígeno crudo + 0.5 ml de Adyuvante Completo de Freund.
3a.	0.5 ml de antígeno crudo.
4a.	0.5 ml de antígeno crudo.
5a.	0.5 ml de antígeno crudo.
6a.	Descanso.
7a.	Sangría (Obtención del suero).
8a.	Descanso.
9a.	Sangría (Obtención del suero).
10a.	Descanso.
11a.	1 ml de antígeno crudo + 1 ml de Adyuvante Completo de Freund.
12a.	1 ml de antígeno crudo + 1 ml de Adyuvante Completo de Freund.
13a.	Sangría (Obtención del suero).

Cuadro 1.- Esquema de Inmunización con Antígeno Crudo de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS, con una concentración de proteínas de 0.670 mg/ml. Siguiendo este esquema se inocularon 2 conejos en el cojinete plantar.

SEMANAS	D O S I S
1a.	1 ml de antígeno soluble A + 1 ml de Adyu vante Completo de Freund.
2a.	1 ml de antígeno soluble A + 1 ml de Adyu vante Completo de Freund.
3a.	1 ml de antígeno soluble A.
4a.	1 ml de antígeno soluble A.
5a.	1 ml de antígenoc soluble A.
6a.	Descanso.
7a.	Sangría (Obtención del suero).
8a.	Descanso.
9a.	Sangría (Obtención del suero).
10a.	Descanso.
11a.	Descanso
12a.	1 ml de antígeno soluble A + 1 ml de Adyu vante Completo de Freund.
13a.	1 ml de antígeno soluble A + 1 ml de Adyu vante Completo de Freund.
14a.	Sangría (Obtención del suero).

**Cuadro 2.- Esquema de Inmunización con Antígeno Soluble A (antígeno obtenido a través de Sephadex G-200) de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS, con una concentración de proteínas de - 0.210 mg/ml. Se inocularon 2 conejos en el cojinetes plantar bajo este esquema.**

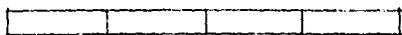
SEMANAS	D O S I S
1a.	0.5 ml de antígeno soluble B + 0.5 ml de Adyuvante Completo de Freund.
2a.	0.5 ml de antígeno soluble B + 0.5 ml de Adyuvante Completo de Freund.
3a.	0.5 ml de antígeno soluble B.
4a.	0.5 ml de antígeno soluble B.
5a.	0.5 ml de antígeno soluble B.
6a.	Descanso.
7a.	Sangría (Obtención del suero).
8a.	Descanso.
9a.	Sangría (Obtención del suero).

Cuadro 3.- Esquema de Inmunización con Antígeno Soluble B (antígeno obtenido a través de Sephadex G-150. Proporcionado por el Depto. de Ultra centrifugas del Hospital General del Centro Médico) con una concentración de proteínas de 4.8 mg/ml. Fueron 2 conejos los que siguiendo este esquema se inocularon en el cojinete plantar.

Se determinó a cada suero obtenido el título de anticuerpos por medio de la prueba de precipitación en capilar y la prueba de inhibición de la hemaglutinación, y fueron conservados en congelador ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) hasta su uso.

Prueba de precipitación en capilar.

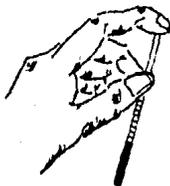
Se usaron tubos capilares marcados como indica el dibujo.



El antígeno crudo de E. histolytica fué diluido con solución salina fisiológica de acuerdo al cuadro No. 4. El suero al cual se le determinó su título de anticuerpos no se diluyó, se empleó como se tenía. Teniendo preparado lo anterior, por uno de los extremos del tubo capilar se tomó la solución de antígeno hasta la primera marca señalada del tubo capilar y se retuvo la muestra tapando el otro extremo.



Se dejó correr la solución de antígeno hasta el otro extremo sin llegar a gotear y por ese lado se tomó el suero hasta la primera marca señalada en el tubo capilar.



DILUCION	PREPARACION
1:2	1 ml de antígeno sin diluir + 1 ml de solución salina fisiológica.
1:4	1 ml de antígeno diluido 1:2 + 1 ml de solución salina fisiológica.
1:8	1 ml de antígeno diluido 1:4 + 1 ml de solución salina fisiológica.
1:16	1 ml de antígeno diluido 1:8 + 1 ml de solución salina fisiológica.
1:32	1 ml de antígeno diluido 1:16 + 1 ml de solución salina fisiológica.
1:64	1 ml de antígeno diluido 1:32 + 1 ml de solución salina fisiológica.
1:128	1 ml de antígeno diluido 1:64 + 1 ml de solución salina fisiológica.
1:256	1 ml de antígeno diluido 1:128 + 1 ml de solución salina fisiológica.
1:512	1 ml de antígeno diluido 1:256 + 1 ml de solución salina fisiológica.

**Cuadro 4.- Dilución del Antígeno Crudo de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS (concentración de proteínas 0.670 mg/ml) con solución salina fisiológica. Estas diluciones se efectuaron para determinar el título de anticuerpos a los sueros extraídos de los conejos inmunizados con los antígenos ambianos.**

Se mezclaron y se colocó el tubo capilar sobre una base de plastilina, tratando que la mezcla quedara en el centro del capilar; todo esto se hizo con cada una de las diluciones del antígeno y con el antígeno sin diluir. Para cada suero que se le determinó su título de anticuerpos se corrieron dos blancos, uno que era el tubo capilar conteniendo unicamente el antígeno sin diluir y el otro, que era el tubo capilar con suero solamente. La lectura se efectuó a las 48 horas en refrigeración y se apreció un precipitado en los tubos, el cual fué señalado con una cruz si la cantidad de precipitado apenas era apreciable, dos cruces cuando era un poco mayor, tres cruces cuando era más la cantidad de precipitado y cuatro cruces si era abundante.

#### Prueba de Inhibición de la hemaglutinación.

Esta prueba se desarrolló con el equipo de Cellognost Amibiasis, marca Behring, efectuando la técnica de la microtitulación en placa.

Se rotuló una placa como se indica en la figura 3. Mediante una micropipeta Socorex se colocó 0.05 ml. de solución tampón-tris pH 8.0 en cada una de las 8 filas de cavidades, dejando vacía la primera cavidad de cada fila. Inmediatamente después, se colocó 0.1 ml. de una dilución 1:8 del suero control positivo de amibiasis (suero inmune de título conocido, obtenido en cabras) en la primera cavidad de la segunda fila. Se repitió el mismo procedimiento con el suero control negativo (1:8) en la tercera fila, así como con los sueros problema (1:8) en las filas restantes. Mediante microdilutores de 0.05 ml., previamente controlados por la prueba GO-NO-GO, se tomó esa cantidad de las primeras cavidades de las filas 2 a 8 y se preparó así

diluciones del suero

1:8  
1:16  
1:32  
1:64  
1:128  
1:256  
1:512  
1:1024  
1:2048  
1:4096  
1:8192  
1:16384

Fila No. 1	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	A
No. 2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	B
No. 3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	C
4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	D
5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
6	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
8	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

- A = control del reactivo HAI
- B = control del suero positivo
- C = control del suero negativo
- D = suero desconocido

Fig. 3.- Rotulación de una placa para efectuar la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación con el equipo de Cellognost Amibiasis. Esta prueba fué aplicada a los sueros obtenidos de conejos inmunizados con antígenos amibianos con el fin de conocer su título de anticuerpos.

series de diluciones con factor de 2, mezclando y pasando 0.05 ml. a la siguiente cavidad, desechando la última.

Se agregaron 0.025 ml. del Reactivo de Amibiasis HAI a todas las diluciones de los sueros y a todas las cavidades de la fila 1 (control del Reactivo de Amibiasis - HAI) y se mezcló perfectamente. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas. Efectuando la lectura a las dos horas de haberse iniciado la prueba en base al siguiente criterio: positiva: si había aglutinación completa de las células. positiva débil: si había aglutinación con indicios de formación de acúmulo. negativa: si había sedimentación de las células, formación de acúmulo.

## 8.- PRUEBA DE NEUTRALIZACION.

### Cuenta de trofozoitos.

Se depositó en una accuvette II 19 ml. de Isotón II y 1 ml. de cultivo axénico de Entamoeba histolytica cepa HM-1 DMSS de 72 horas de crecimiento perfectamente bien agitadas, obteniéndose una dilución 1:20. Fué colocada en el Coulter Counter (modelo ZB<sub>1</sub>) agitándose previamente y se efectuó la lectura, para tal efecto tomó el aparato 0.5 ml. de la dilución 1:20, por lo cual la lectura obtenida -- fué el número de trofozoitos en 0.5 ml. de una dilución -- 1:20. Se tomaron tres lecturas, las cuales se promediaron y el promedio obtenido se multiplicó por dos para tener el número de trofozoitos en 1 ml. de la dilución 1:20. Para conocer el número de trofozoitos reales se multiplicó la -- cantidad anterior por la dilución (20) y se obtuvo el número de trofozoitos/ml de cultivo.

### Neutralización del suero inmune con trofozoitos de E. histolytica.

Por un lado el suero inmune fué inactivado en un Baño María Precision Scientific Co. a 56°C durante 30 minutos y después se diluyó con solución salina fisiológica a 1:2 y 1:4 y por otro los trofozoitos fueron diluidos con -- solución salina fisiológica de tal manera que se tuvieran 20 000 trofozoitos/0.03 ml., que es la ID<sub>100</sub>, la cual fué determinada en este mismo laboratorio.

Fueron puestos en contacto la solución de trofozoitos de 20 000 en 0.03 ml. con el suero inmune inactivado sin diluir, en volúmenes iguales; se mezclaron y se dejaron en contacto por una hora a temperatura ambiente, mezclando de vez en cuando. Esto mismo se hizo para el suero inmune inactivado dilución 1:2 y 1:4. Inmediatamente después se efectuó la inoculación a hamsters lactantes.

### Inoculación a hamsters lactantes.

Colocados los guantes y frotadas las manos con el aserrín para que perdieran su olor, se procedió arreglar las cajas, en las que se depositarían las camadas de hamsters ya inoculadas, colocando un pedazo de algodón (para que fuera usado como nido) y una mitad de manzana.

Se tomó la caja que contenía la camada de hamsters dorados (recién nacidos hasta de dos días de edad) y se sacó a la madre depositándola en una caja provisional; nuevamente se frotaron las manos con el aserrín de la camada y la manzana, con el objeto de evitar el canibalismo, ya que si la madre percibía otro olor que no fuera el de ellos, los devoraría. Con la mano izquierda fué tomado el hamster del dorso y se le estiró su piel del vientre de tal manera que se podía apreciar el hígado, se limpió su piel mediante un algodón impregnado de alcohol y se efectuó la inoculación percutánea al parénquima hepático de 0.03 ml. de la mezcla del suero y trofozoitos previamente agitada (era importante que dicha agitación se hiciera entre cada hamster). Fué extraída la aguja del hamster lactante y se corrieron los planos; se limpió la zona afectada con algodón limpio hasta que esa zona quedara seca y se depositó sobre el algodón de la caja limpia. Todo eso se hizo con cada hamster.

Terminada la inoculación de todos los hamsters de la camada, la madre se reunió con ellos. Se metió una camada por cada mezcla de suero inmune y trofozoitos, además, una camada de hamsters fué inoculada exclusivamente con trofozoitos y esta se consideró el blanco de la prueba.

A los 8 días de haber efectuada la inoculación, cada camada de hamsters fué sacrificada. Se colocaron a todos los animalitos de una camada en un frasco que contenía un algodón impregnado con éter para sacrificarlos. Una vez muertos se fueron colocando sobre una área lisa, boca

arriba sosteniéndolos de su patas con alfileres y mediante un bisturí se les hizo una incisión en el abdomen y con una pinza se levantó su piel dejando al descubierto su aparato digestivo. Se revisó el hígado y sus alrededores con el fin de hallar abscesos, los cuales se podían identificar por presentarse como un tejido anexo de color blanco - grisáceo. La lectura que se hizo fué presencia o ausencia de abscesos y contó el número de hamsters que presentaron abscesos por cada camada.

## R E S U L T A D O S .

### Selección de la fracción soluble A de *Entamoeba histolytica* cepa HM-1 IMSS.

Para seleccionar la fracción soluble A se trabajó con cuatro muestras de un mismo lote de antígeno crudo; cada muestra se hizo pasar a través de una columna de Sephadex G-200 y se recolectaron 70 tubos con 3 ml cada uno por muestra, los cuales se leyeron a 280 nm. y se graficaron, obteniéndose como resultado en las gráficas de las cuatro muestras varios picos de proteínas como se aprecia en la Tabla 1 y en las gráficas 1, 2, 3 y 4.

De la gráfica 1 a la 4 se presenta la variación de las absorbancias en función del No. de fracciones recolectadas. El gráfico presenta un perfil semejante a las cromatografías instrumentales modernas o recientes (de gases o de líquidos). El aumento de la absorbancia y su posterior disminución corresponde a las proteínas que tienen peso molecular semejante esto en cromatografía se denomina "PICO".

Con estos resultados se hizo una selección entre las cuatro muestras, se eligieron aquellas en que el pico predominante estuviera mejor definido y más bien separado, por lo que se decidió elegir la muestra I y la muestra II, pues la primera tiene un pico bien definido de la fracción 22 a la fracción 34, y la II lo tiene de la fracción 17 a la fracción 34, así que con estas muestras se continuó el trabajo.

Como lo que se desea obtener es una fracción soluble antigénica, se procedió aplicar la prueba de inmunodifusión por el método de Ouchterlony a las fracciones de las muestras seleccionadas como se describió en materiales y métodos; los resultados nos indican que las fracciones -

L e c t u r a s d e A b s o r b a n c i a s

Fracción	Muestra I	Muestra II	Muestra III	Muestra IV
1	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0
3	0.005	0.0	0.0	0.0
4	0.004	0.0	0.0	0.0
5	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.0	0.0	0.0	0.0
7	0.020	0.0	0.0	0.050
8	0.024	0.0	0.0	0.070
9	0.0	0.0	0.041	0.004
10	0.004	0.0	0.058	0.052
11	0.002	0.0	0.058	0.058
12	0.0	0.0	0.026	0.040
13	0.0	0.0	0.026	0.120
14	0.006	0.0	0.023	0.020
15	0.0	0.0	0.016	0.046
16	0.0	0.0	0.028	0.188
17	0.0	0.0	0.022	0.080
18	0.0	0.003	0.031	0.198
19	0.0	0.048	0.021	0.190
20	0.0	0.150	0.015	0.335
21	0.0	0.200	0.025	0.375
22	0.0	0.249	0.052	0.365
23	0.012	0.303	0.028	0.335
24	0.030	0.317	0.085	0.250
25	0.036	0.325	0.140	0.105
26	0.093	0.213	0.120	0.260
27	0.185	0.122	0.193	0.094
28	0.280	0.062	0.202	0.096
29	0.320	0.088	0.228	0.058
30	0.305	0.074	0.271	0.068
31	0.285	0.044	0.269	0.062
32	0.188	0.027	0.197	0.072

L e c t u r a s d e A b s o r b a n c i a s

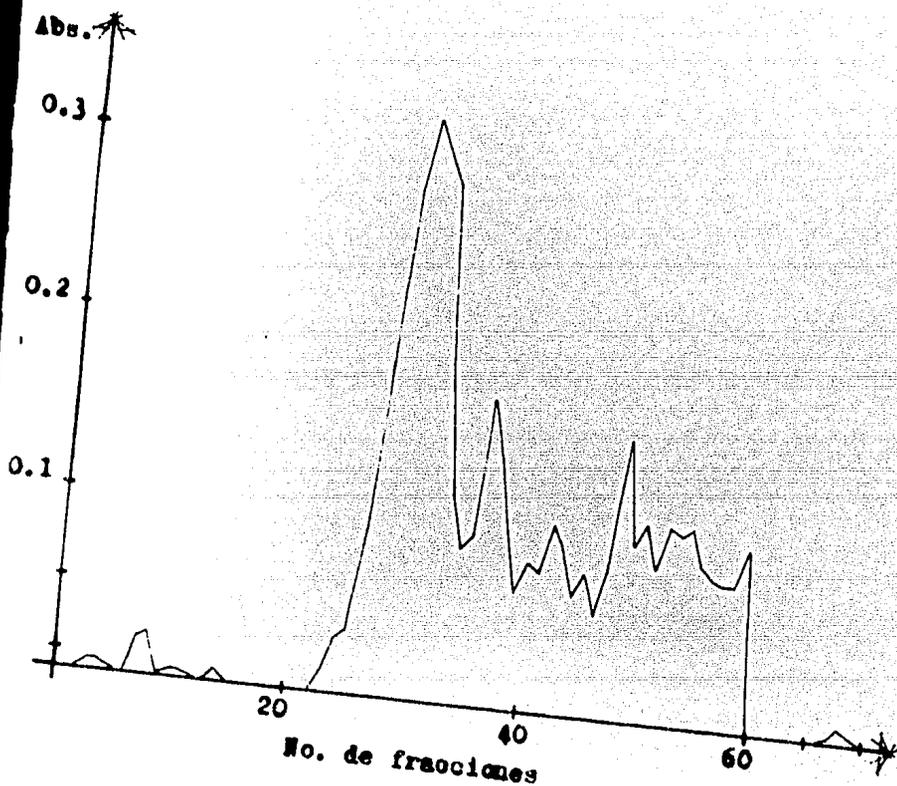
Fracción Muestra I Muestra II Muestra III Muestra IV

33	0.115	0.027	0.150	0.054
34	0.086	0.020	0.089	0.060
35	0.094	0.044	0.056	0.190
36	0.170	0.028	0.097	0.170
37	0.139	0.046	0.090	0.110
38	0.098	0.046	0.069	0.110
39	0.066	0.052	0.115	0.125
40	0.082	0.080	0.080	0.066
41	0.078	0.070	0.057	0.105
42	0.105	0.057	0.055	0.082
43	0.091	0.055	0.054	0.095
44	0.066	0.041	0.037	0.125
45	0.079	0.150	0.055	0.115
46	0.057	0.062	0.099	0.095
47	0.082	0.017	0.090	0.125
48	0.157	0.008	0.049	0.0
49	0.098	0.005	0.125	0.0
50	0.110	0.031	0.124	0.0
51	0.085	0.004	0.134	0.0
52	0.110	0.016	0.103	0.0
53	0.105	0.028	0.066	0.0
54	0.110	0.023	0.070	0.0
55	0.091	0.037	0.071	0.0
56	0.084	0.010	0.076	0.0
57	0.080	0.0	0.092	0.0
58	0.080	0.0	0.126	0.0
59	0.100	0.0	0.149	0.0
60	0.0	0.0	0.196	0.0
61	0.0	0.120	0.183	0.0
62	0.0	0.043	0.209	0.0
63	0.0	0.011	0.170	0.0

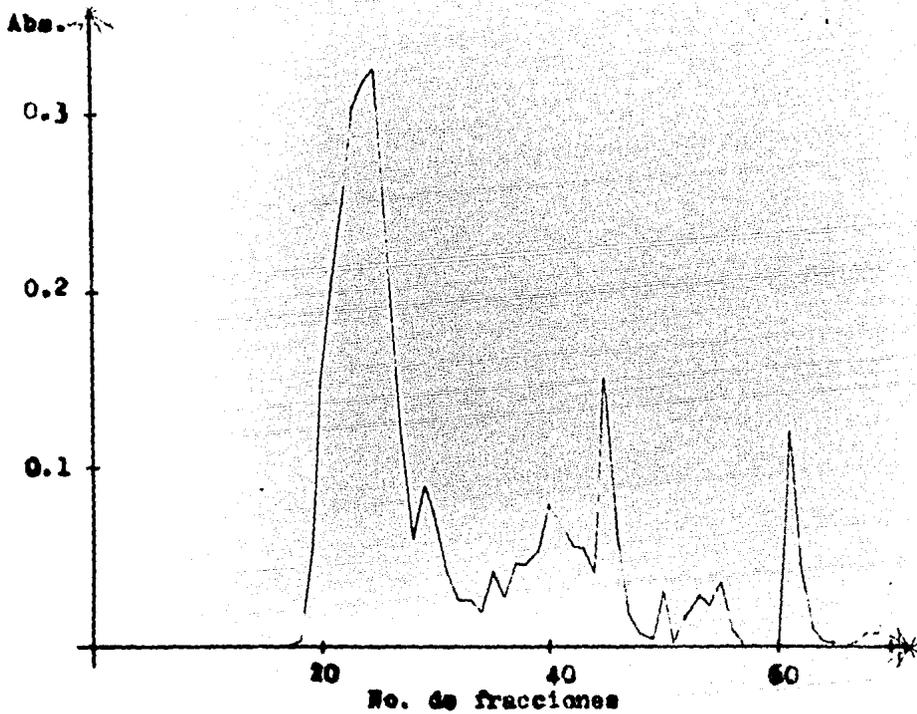
L e c t u r a s d e A b s o r b a n c i a s

Fracción	Muestra I	Muestra II	Muestra III	Muestra IV
64	0.0	0.003	0.215	0.0
65	0.0	0.0	0.190	0.0
66	0.0	0.0	0.220	0.0
67	0.002	0.003	0.275	0.0
68	0.008	0.007	0.215	0.0
69	0.004	0.009	0.249	0.0
70	0.0	0.038	0.230	0.0

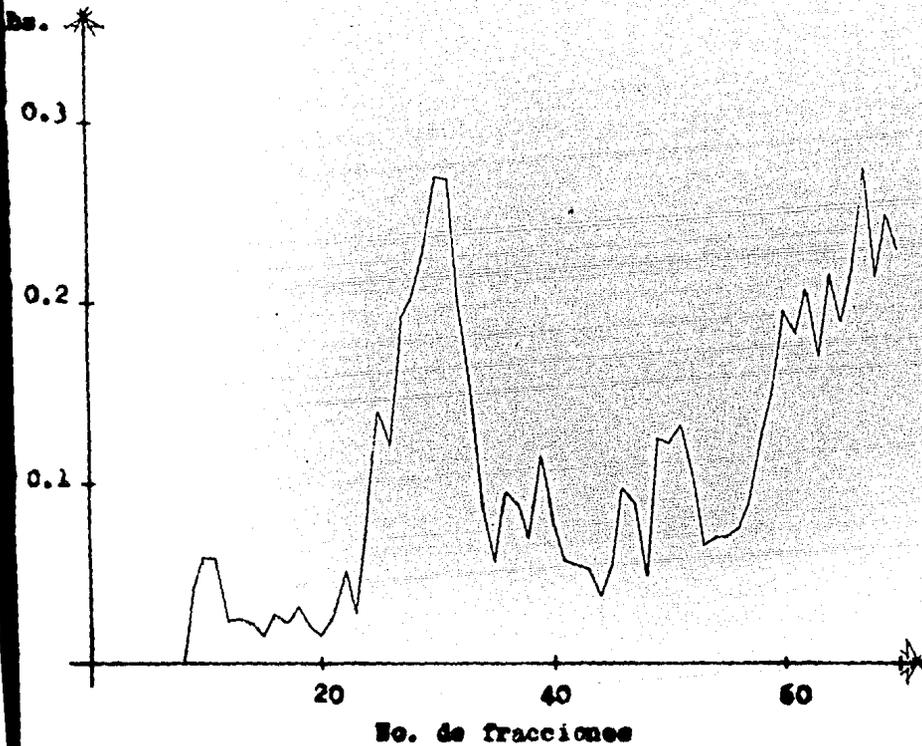
Tabla 1.- Absorbancias de las 70 fracciones recolectadas en la cromatografía de 4 muestras de un mismo lote de antígeno crudo de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS, leídas a 280 nm. Son fracciones de 3 ml. recolectadas cada 20 min.



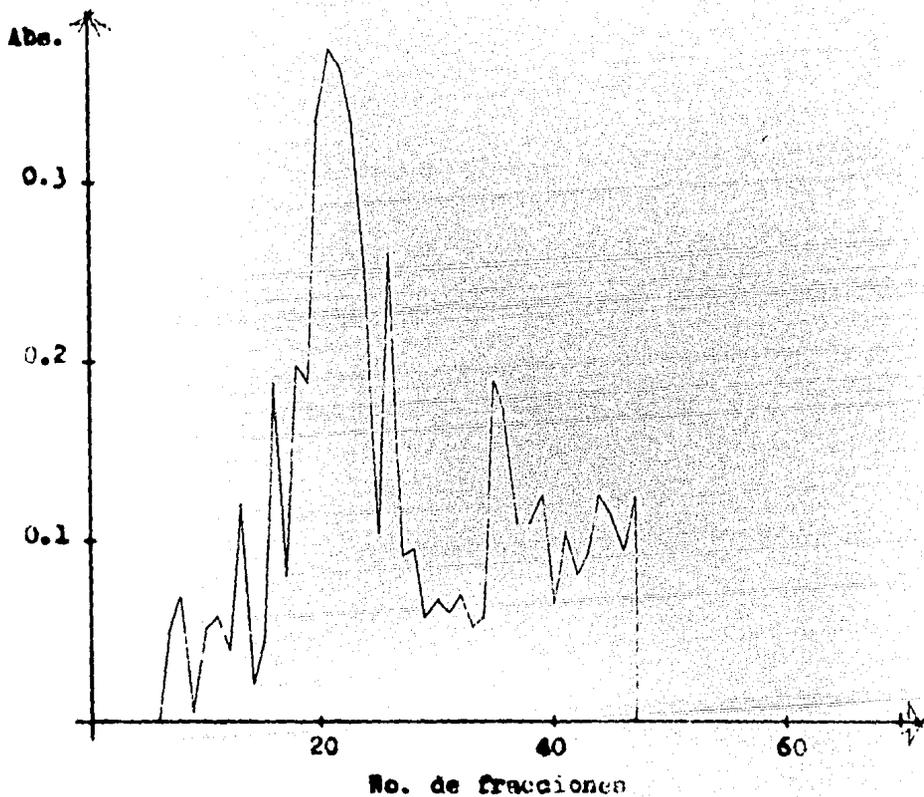
Gráfica 1.- Relación de absorbancias de las fracciones reselectadas y del No. de las mismas, en la cromatografía de la muestra I de antiguo no crudo de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS (datos obtenidos de la tabla 1).



**Gráfico 2.-** Relación de absorbancias de las fracciones recolectadas y del No. de las mismas, en la cromatografía de la muestra II de antígeno crudo de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS (datos obtenidos de la tabla 1).



Gráfica 3.- Relación de absorbancias de las fracciones recolectadas y del No. de las mismas, en la cromatografía de la muestra III de antígeno crudo de Entamoeba histolytica cepa - HM-1 IMSS (datos obtenidos de la tabla I).



**Gráfica 4.-** Relación de absorbancias de las fracciones recolectadas y del No. de las mismas, en la cromatografía de la muestra IV de antígeno crudo de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS (datos obtenidos de la tabla I).

de la muestra I que presentan reacción antigénica son a partir de la fracción 5 hasta la fracción 55; esto implicaría que la parte soluble antigénica no sería solo una sino varias, ya que este grupo de fracciones abarca proteínas de diferente peso molecular (hay varios picos) y por lo tanto se tendría que agrupar las que fueran del mismo peso molecular. En la muestra II, la reacción antigénica se presentó de la fracción 15 a la fracción 35 lo cual corresponde a proteínas de igual peso molecular, pues hay un solo pico en ese grupo de fracciones. De acuerdo a estos datos era preferible trabajar con un solo grupo de fracciones que con varios, en el último caso cada grupo tendría la posibilidad de ser inmunogénico y se emplearía más equipo (conejos) para continuar el trabajo. De esta manera se decidió por agrupar todas las fracciones a partir de la 15 a la 35 de la muestra II y a esta solución de la denominó "fracción soluble A de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS"

#### Determinación de proteínas.

Se determinó la concentración de proteínas por el método de Folin-Ciocalteu. La curva patrón de albúmina bovina aparece en la gráfica 5.

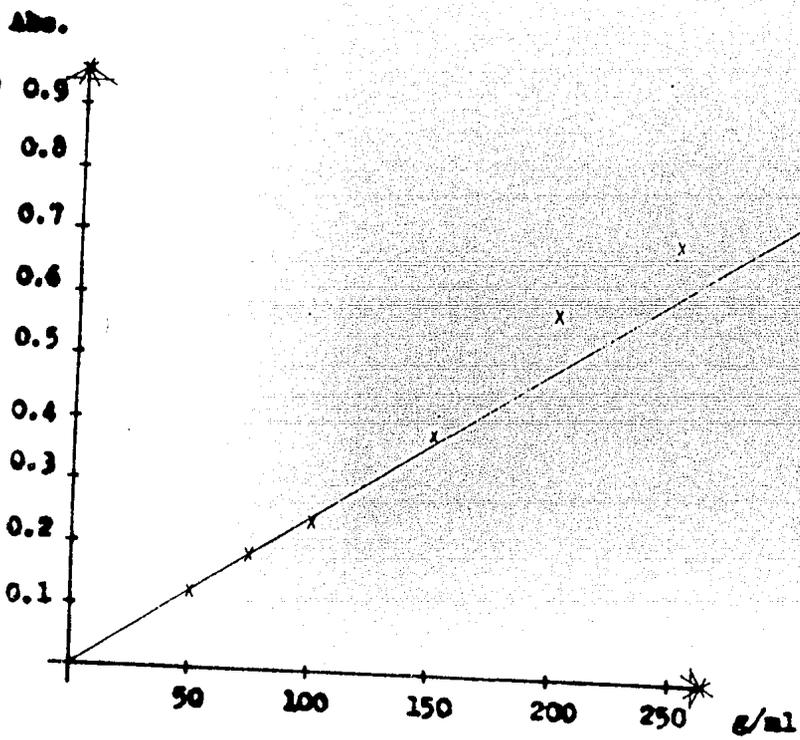
Para determinar la concentración de proteínas al antígeno crudo de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS, se efectuaron varias diluciones; inicialmente se tomó 10 ml del antígeno crudo y se agregó 20 ml de solución salina fisiológica estéril (1:2), después, de esta dilución se tomó 1 ml y se añadió 4 ml de solución salina fisiológica estéril (1:4) y a partir de esta nueva dilución se trabajó con 0.5 ml y se llevó a 1 ml con agua destilada y se continuó la técnica. El resultado fué de 0.165 de absorbancia que al interpolar en la curva patrón se obtuvo 67.0  $\mu$ g los cuales son multiplicados por las diluciones efectuadas

No. de la fracción	Reacción de Inmunodifusión
1	No hay reacción
5	+
10	+
15	++
20	+++
25	+++
30	+++
35	+++
40	+++
45	++
50	++
55	++
60	No hay reacción
65	No hay reacción
70	No hay reacción

Cuadro 1.- Resultados de la Prueba de Inmunodifusión por el método de Ouchterlony, efectuada a las fracciones recolectadas en la cromatografía de la muestra I de antígeno crudo de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS.

No. de la fracción	Reacción de Inmunodifusión
1	No hay reacción
5	No hay reacción
10	No hay reacción
15	+
20	++
25	+++
30	++
35	++
40	No hay reacción
45	No hay reacción
50	No hay reacción
55	No hay reacción
60	No hay reacción
65	No hay reacción
70	No hay reacción

**Cuadro 2.- Resultados de la Prueba de Inmunodifusión por el método de Ouchterlony, efectuada a las fracciones recolectadas en la cromatografía de la muestra II de antígeno crudo de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS.**



Gráfica 5.- Curva estándar de proteínas. Para determinar dicha curva se partió de una solución de albúmina bovina (500 g/ml) y se aplicó el método de Polin Ciocalteu.

(67.0 x 2 x 5 x 3) y se tuvo 2010  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteínas.

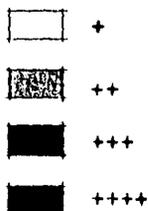
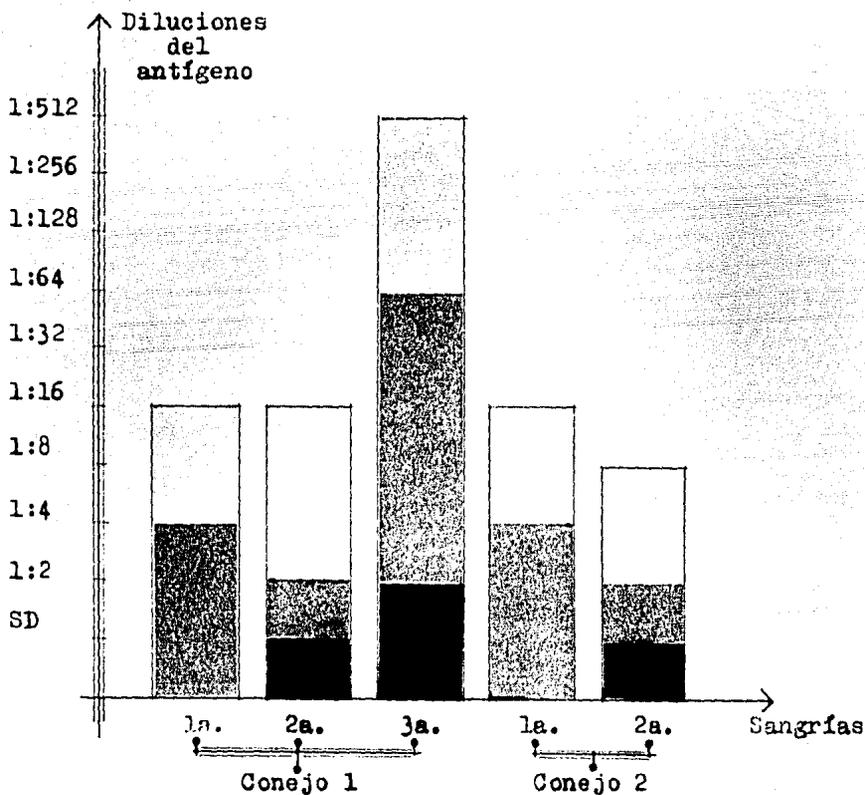
En el caso del antígeno soluble A (fracción soluble obtenida a través de Sephadex G-200) se efectuó una so la dilución, 0.5 ml del antígeno soluble se llevó a 1 ml - con agua destilada y se prosiguió con la técnica de Folin. El resultado fué de 0.250 de absorbancia, que correspondió a 105  $\mu\text{E}$  los cuales se multiplicaron por la dilución hecha (105 x 2) y se obtuvo 210  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteínas.

Titulación de sueros por precipitación en capilar y por inhibición de la hemaglutinación.

Los conejos que se inocularon con antígeno crudo de Entamoeba histolytica, en la primera sangría que se les hizo, al suero se le determinó el título de anticuerpos - por precipitación en capilar y el resultado que se obtuvo fué que cuando dicho suero estuvo en contacto con antígeno sin diluir, antígeno diluido 1:2 y antígeno diluido 1:4 - presentaron los tubos capilares poca precipitación, lo - cual en la gráfica 6 se marca con cierta intensidad de sombra que equivale a dos cruces (++) ; con el antígeno diluido 1:8 y 1:16 los tubos presentaron mucho menor precipitación y esto aparece en la gráfica con una sombra mucho muy clara para denotar una sola cruz (+), ésto nos indica que el título de anticuerpos de esos sueros fué de 1:16 ya que a diluciones mayores del antígeno no hay reacción.

Para la segunda sangría efectuada a los conejos inmunizados con el antígeno crudo, se presentó lo siguiente: el suero del conejo 1 con antígeno sin diluir tuvo una buna precipitación, lo cual se indica en la gráfica 6 con - cierta intensidad de sombra que señala tres cruces (+++); con antígeno diluido 1:2 presentó poca precipitación (++) y con antígeno diluido 1:4, 1:8 y 1:16, tuvo escasa preci

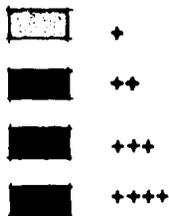
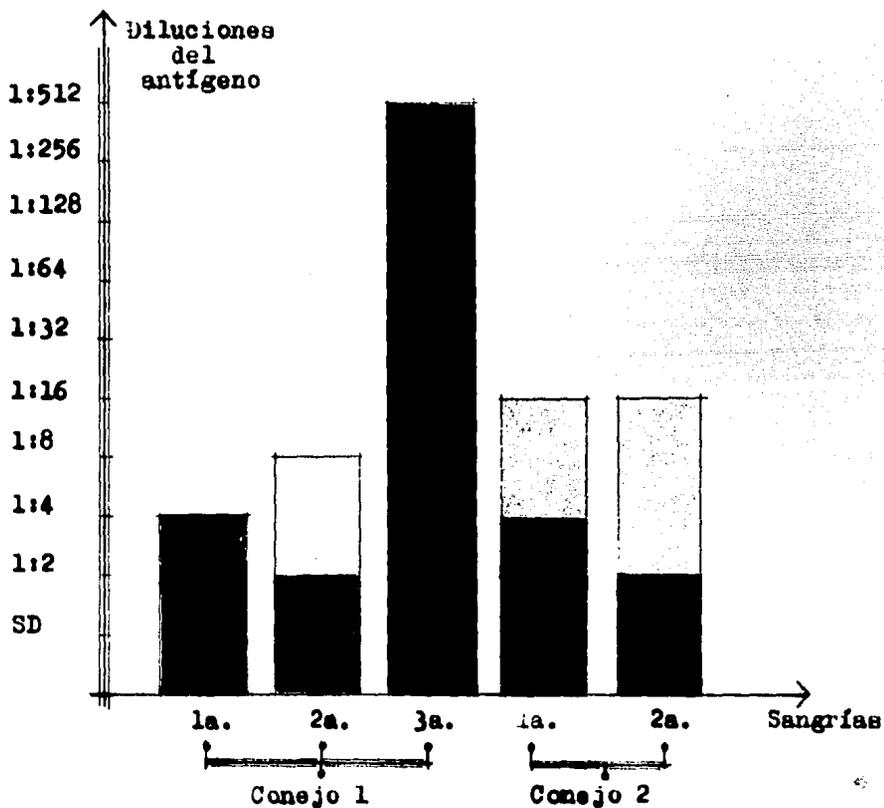
Gráfica 6.- Título de anticuerpos por precipitación en capilar de sueros obtenidos con antígeno crudo de Entamoeba histolytica. Conejo 1 y Conejo 2.



pitación (+), su título de anticuerpos fué de 1:16; en el caso del suero del conejo 2, hubo una buena precipitación (+++) con el antígeno sin diluir, poca precipitación (++) con el antígeno diluido 1:2 y escasa precipitación con el antígeno diluido 1:4, 1:8, su título de anticuerpos fué de 1:8. En la tercera y última sangría, únicamente se le determinó el título al suero del conejo 1, pues el conejo 2 tuvo que ser eliminado por infectarse sus patas; el suero del conejo 1 presentó buena precipitación (+++) con antígeno sin diluir y antígeno diluido 1:2, poca precipitación (++) con antígeno diluido 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64; escasa precipitación (+) con antígeno diluido 1:128, 1:256 y 1:512, su título de anticuerpos fué mayor de 1:512.

Los conejos que fueron inmunizados con antígeno soluble A, en la primera sangría, el suero del conejo 1 tuvo poca precipitación (++) con el antígeno sin diluir, antígeno diluido 1:2 y antígeno diluido 1:4, su título fué de 1:4; el suero del conejo 2 presentó poca precipitación (++) con el antígeno sin diluir, antígeno diluido 1:2 y 1:4, escasa precipitación (+) con antígeno diluido 1:8 y 1:16, su título fué 1:16. En la segunda sangría, con el suero del conejo 1 hubo buena precipitación (+++) con el antígeno sin diluir, poca (++) con el antígeno diluido 1:2 y escasa (+) con el antígeno diluido 1:4 y 1:8, su título fué de 1:8; para el conejo 2 fué buena precipitación (+++) con el antígeno sin diluir, poca (++) con antígeno diluido 1:2 y escasa precipitación (+) con el antígeno diluido 1:4, 1:8 y 1:16, su título fué de 1:16. Para la tercera sangría solamente se trabajó con el conejo 1, el conejo 2 se eliminó por infectarse sus patas; el suero del conejo 1 presentó una excelente precipitación con todas las diluciones del antígeno lo cual en la gráfica 7 se describe con una área sombreada más intensa que sobresale a las otras y

Gráfica 7.- Título de anticuerpos por precipitación en capilar de sueros obtenidos con antígeno soluble A. Conejo 1 y Conejo 2.

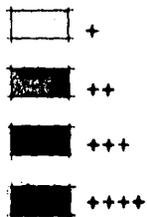
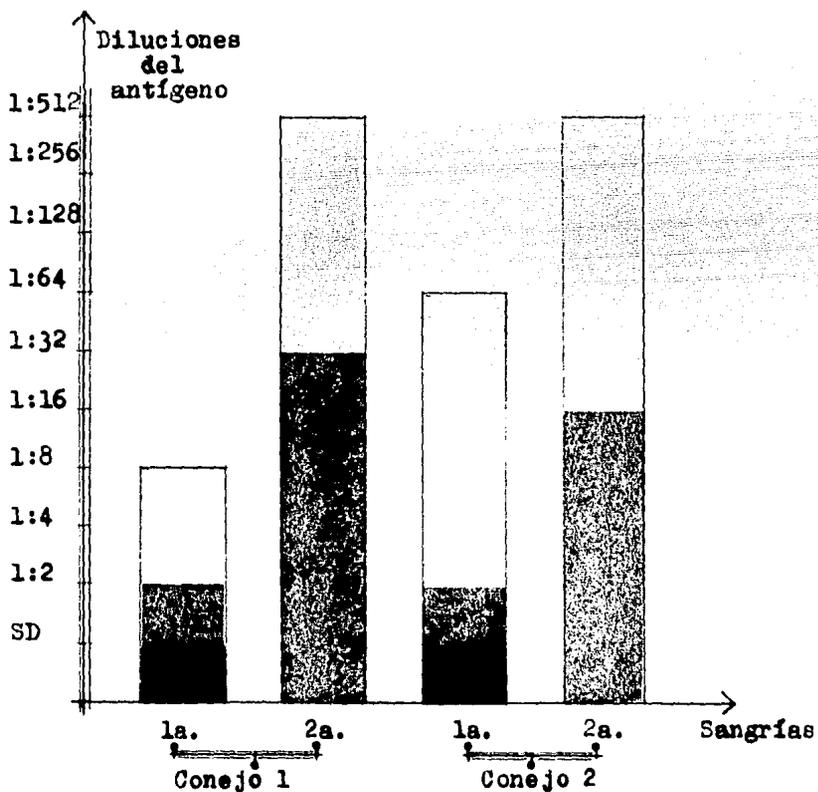


que corresponde a cuatro cruces, en este caso el título -  
fué mayor de 1:512.

En los conejos inmunizados con antígeno soluble B, el suero de los conejos 1 y 2 de la primera sangría tuvieron una buena precipitación (+++) con el antígeno sin diluir, poca precipitación (++) con el antígeno diluido 1:2 y escasa (+) con el antígeno diluido 1:4 y 1:8, esto último para el conejo 1 cuyo título correspondió 1:8, mientras que para el conejo 2 hubo escasa precipitación (+) con el antígeno diluido 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64 teniendo como título 1:64. El suero en la segunda sangría para el conejo 1 fué de poca precipitación (++) con el antígeno sin diluir, antígeno diluido 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32, escasa (+) con el antígeno diluido 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512, su título fué mayor a 1:512; para el suero del conejo 2 fué de poca precipitación (++) con el antígeno sin diluir, antígeno diluido 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16, escasa precipitación con el antígeno diluido 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512, su título fué mayor a 1:512. Con estos conejos no hubo una tercera sangría por no haber material antigénico para inmunizarlos. (ver gráfica 8).

Con estos datos se seleccionó los sueros de la última sangría de cada conejo para determinarles su título de anticuerpos por inhibición de la hemaglutinación y los resultados aparecen en el cuadro 3. De acuerdo a esta prueba, se escogió para el antígeno homogenizado, el suero del conejo 1 con el cual se efectuaría la prueba de neutralización, ya que tuvo un título de 1:256, mucho mayor que el suero del conejo 2 cuyo título fué de 1:32. Para el antígeno soluble A fué el suero del conejo 1 con título de 1/512 el seleccionado, el suero del conejo 2 no era tan bajo su título (1/256) y no se trabajó también porque para la prueba de neutralización se requería de varias camadas

Gráfica 8.- Título de anticuerpos por precipitación en capilar de sueros obtenidos con antígeno soluble B. Conejo 1 y Conejo 2.



**Cuadro 3.- Título de anticuerpos por inhibición de la hemaglutinación de sueros obtenidos en la última sangría de cada conejo.**

Sueros	Conejos	Título
antihomogenizado de <i>E. histolytica</i>	1	1/256
antihomogenizado de <i>E. histolytica</i>	2	1/32
antisoluble A	1	1/512
antisoluble A	2	1/256
antisoluble B	1	1/128
antisoluble B	2	1/32

de hamsters y no se contaba con ellas. En el caso del antígeno soluble B se trabajó con el suero del conejo 1, los sueros de ambos conejos dió bajo título de anticuerpos con respecto al de los otros conejos, sin embargo el suero más indicado para continuar el trabajo fué el del conejo 1 con un título de 1/128.

#### Prueba de neutralización.

Con los sueros seleccionados se efectuó la prueba de neutralización en hamsters lactantes (material y métodos 7) con la que se valoró potencialmente a los antígenos obtenidos, lo cual se logró, ya que se vió que los sueros inmunes en contacto con los trofozoitos vivos, no ocasionan un 100% de daño en el hígado de los hamsters. Así, se tiene que con el antígeno crudo de Entamoeba histolytica hay una protección del 48.33 % trabajando con el suero inmune sin diluir, éste cuando se diluye disminuye su protección, lo mismo sucede con el antígeno soluble A cuya protección fué del 46.67 %. Con el antígeno soluble B hay una mayor protección (58.63 %), solo que no se presenta en la dilución 1:4 del suero inmune; todo esto se puede ver en los cuadros 4, 5 y 6.

Inóculo	Total	A	B	(B-x)
Testigo (Trofozoitos vivos)	22/24	91.66	8.34=x	
Trofozoitos vivos + suero sin diluir	13/30	43/33	56.67	48.33
Trofozoitos vivos + suero diluido 1:2	16/28	57.14	42.86	34.52
Trofozoitos vivos + suero diluido 1:4	16/22	72.72	27.28	18.94
A = % de infectividad B = % de protección x = % de animales no infectados en el testigo				

Cuadro 4.- Determinación de la protección por neutralización en hamsters lactantes del suero antihomogenizado de E. histolytica cepa HM-1 IMSS.

Inóculo	Total	A	B	(B-x)
Testigo (trofozoitos vivos)	27/30	90.0	10.0	
Trofozoitos + suero vivos sin diluir	13/30	43.33	56.67	46.67
Trofozoitos + suero vivos diluido 1:2	28/41	68.29	31.71	21.71
Trofozoitos + suero vivos diluido 1:4	25/35	71.42	28.58	18.58
A = % de infectividad B = % de protección x = % de animales no infectados en el testigo				

Cuadro 5.- Determinación de la protección por neutralización en hamsters lactantes del suero antisoluble A (Sephadex G-200) de E.histo  
lytica cepa HM-1 IMSS.

Inóculo	Total	A	B
Testigo (Trofozoitos vivos)	23/23	100.0	0.0
Trofozoitos vivos + suero sin diluir	12/29	41.37	58.63
Trofozoitos vivos + suero diluido 1:2	22/28	78.57	21.43
Trofozoitos vivos + suero diluido 1:4	29/29	100.0	0.0
A = % de infectividad B = % de protección			

Cuadro 6.- Determinación de la protección por neutralización en hamsters lactantes del suero antisoluble B (Sephadex G-150) de E. histolytica cepa HM-1 IMSS.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES.

- 1.- A partir de un homogenizado de Entamoeba histolytica cepa HM-1 IMSS se logró obtener una fracción antigénica soluble por cromatografía de filtración en gel, similar a la que se indica en la literatura<sup>(25)</sup>; esto queda demostrado en las gráficas 1, 2, 3 y 4, donde se observa una serie de picos que están denotando que hay una separación de los componentes del homogenizado. La prueba de inmunodifusión por el método de Ouchterlony permitió determinar el pico que correspondía a la fracción antigénica.
- 2.- La fracción antigénica soluble obtenida por cromatografía en Sephadex G-200 presentó inmunogenicidad, así como la obtenida en Sephadex G-150, lo cual queda probado cuando estas fracciones se inocularon a conejos y hubo una respuesta que fué determinada con la titulación de los sueros de dichos conejos por precipitación en capilar y por inhibición de la hemaglutinación.
- 3.- Hubo diferencia en la inmunogenicidad que presentaron los antígenos solubles y el antígeno crudo. Revisando los resultados obtenidos en la titulación de anticuerpos de estos tres antígenos, el que mostró mayor inmunogenicidad de acuerdo a la concentración proteica empleada fué el antígeno soluble A (Sephadex G-200), después el antígeno crudo y finalmente el antígeno soluble B (Sephadex G-150). Se podría esperar que teniendo un esquema de inmunización similar, el antígeno con mayor inmunogenicidad debiera ser el soluble B ya que la cantidad de proteínas inoculadas a los conejos con este antígeno fué 11 veces mayor que la inocu-

lada del soluble A y 7 veces más que la del antígeno crudo, esto implica que dicha fracción es debilmente inmunogénica.

4.- La protección que brindan los antígenos solubles y el antígeno crudo aparentemente en los cuadros de determinación de protección 4, 5, y 6, es similar, pero considerando la cantidad de antígeno inoculada a los conejos es el soluble A y el crudo los que proporcionan mayor protección puesto que los inóculos fueron menores con respecto al soluble B; y entre el soluble A y el antígeno crudo, el primero brindó mayor protección debido a que de este antígeno fué del que menos cantidad se inoculó.

5.- La prueba de neutralización en hamsters lactantes aquí presentada puede ser empleada como método de valoración de antígenos. Esta presenta varias ventajas como son: fácil manejo, la cantidad de inóculo que se requiere es pequeña, es un método económico y además rápido.

Se propone efectuar un estudio comparativo entre la prueba de neutralización en hamsters lactantes y la prueba de protección en hamsters adultos y ver si hay una correlación entre ambas; para más tarde poder sustituir la prueba de protección por la prueba de neutralización, ya que la primera ofrece cierta dificultad para su realización que consiste en inocular en el hígado por cirugía de hamsters adultos previamente inmunizados, las amibas para retar y conocer la protección.

B I B L I O G R A F I A .

- 1) RUY PEREZ - TAMAYO; BRANDT, H.  
Amebiasis. The Williams & Wilkins Company/Baltimore.  
145 - 180. (1970).
- 2) SEPULVEDA, B; DIAMOND, L. G.  
Memorias de la Conferencia Internacional sobre amebiasis.  
IMSS, 27 - 29. (1975).
- 3) GUERRERO, A. M.; RAMIREZ, M. E.; GONZALEZ, M. S.;  
SEPULVEDA, B.  
Acción a corto plazo del suero humano hiperinmune inac-  
tivado sobre el trofozoito de Entamoeba histolytica.  
Arch. Inv. Med. Mex. 3, Supl 2, 311 - 318. (1972).
- 4) TORRE, M.; ORTIZ, O. L.; HOZ, R.; SEPULVEDA, B.  
Acción del suero humano inmune y de la gamaglobulina -  
antiamibiana sobre cultivos de Entamoeba histolytica.  
Arch. Inv. Med. Mex. 4, Supl 1, 67 - 70. (1973).
- 5) CHEVEZ, A.; ITURBE, I.; SEPULVEDA, B.; SEGURA, M.;  
ORTIZ, O. L.  
Respuesta morfodinámica de los trofozoitos de Entamoeba  
histolytica a la acción del suero humano inmune corres-  
pondiente.  
Arch. Inv. Med. Mex. 4, Supl 1, 71 - 78. (1973).
- 6) SEPULVEDA, B.; CHEVEZ, A.; ITURBE, I.; ORTIZ, O. L.  
Efecto de la gamaglobulina inmune antiamibiana sobre -  
el trofozoito de Entamoeba histolytica.  
Arch. Inv. Med. Mex. 4, Supl 1, 79 - 86. (1973).

- 7) ORTIZ, O. L.; SEPULVEDA, B.; CHEVEZ, A.  
Nuevos estudios acerca de la acción de sueros humanos normales e inmunes sobre el trofozoito de Entamoeba histolytica.  
Arch. Inv. Med. Mex. 5, Supl 2, 337 - 342, (1974).
- 8) SEPULVEDA, B.; ORTIZ, O. L.; CHEVEZ, A.; SEGURA, M.  
Comprobación de la naturaleza inmunológica del efecto del suero y de la gamaglobulina inmunes sobre el trofozoito de Entamoeba histolytica.  
Arch. Inv. Med. Mex. 5, Supl 2, 343 - 346, (1974).
- 9) CHEVEZ, A.; SEPULVEDA, B.; SEGURA, M.; ORTIZ, O. L.  
Aspectos morfofisiológicos de la agonía y muerte de los trofozoitos de Entamoeba histolytica sometidos a la acción citopatogénica del suero inmune.  
Arch. Inv. Med. Mex. 5, Supl 2, 347 - 356, (1974).
- 10) SEPULVEDA, B.; TANIMOTO, W. M.; CALDERON, P.; TORRE, M.  
Neutralización de la virulencia en cultivos de Entamoeba histolytica con suero inmune.  
Arch. Inv. Med. Mex. 5, Supl 2, 447 - 450, (1974).
- 11) SEPULVEDA, B.; TANIMOTO, W. M.; VAZQUEZ, J. A.; LANDA, L.  
Inducción de Inmunidad antiambiobiana en el hamster con antígeno obtenido de cultivos axénicos de Entamoeba histolytica.  
Arch. Inv. Med. Mex. Supl 1, 289 - 294, (1971).
- 12) TANIMOTO, W. M.; VAZQUEZ, S. A.; CALDERON, P.; AGUIRRE, J.  
Inmunidad consecutiva a la inyección de antígeno ambiobiano axénico en el hamster.  
Arch. Inv. Med. Mex. 4, Supl 1, 87 - 96, (1973).

- 13) SEPULVEDA, B.; ARROYO, B. A.; TANIMOTO, W. M.;  
MARTINEZ, P. A.; ORTIZ, O. L.  
Simposio: Inducción de Inmunidad Protectora antiame-  
biana con "nuevos" antigenos en el hamster lactante.  
Arch. Inv. Med. Mex. 9, Supl 1, 309 - 328, (1978).
- 14) GHADIRIAN, E.; MEEROVITCH, E.; HARTMANN, D. P.  
Protection against amebic liver abscess in hamsters -  
by means of immunization with amebic antigen and some  
of its fractions.  
Am. J. Trop. Med. Hyg., 29, (5), 779 - 784, (1980).
- 15) MATTERN, C. F. T.; KEISTER, D. B.  
Experimental amebiasis. II. Hepatic amebiasis in the  
new-born hamster.  
Am. J. Trop. Med. Hyg., 26, 402 - 411, (1977).
- 16) FAUST, E. C.; RUSSEL, P. F.; JUNG, R. C.  
Parasitología Clínica.  
Ed. Salvat, S. A. 136 - 139, (1974).
- 17) CHEVEZ, A.; SEGURA, M.; ITURBE, I.; AUBANEL, M.  
Aspectos morfológicos en la biología del trofozoito  
de E. histolytica desde el punto de vista de la citolo-  
gía dinámica.  
Arch. Inv. Med. Mex. 2, Supl 1, 229 - 244, (1971).
- 18) TREVIÑO, N.; GARCIA, M.; TORRE, M.; RUIZ, I. CH.  
Morfología de E. histolytica en medios de cultivo.  
Arch. Inv. Med. 1, Supl, 51 - 60, (1970).
- 19) BURROWS, W.  
Tratado de Microbiología.  
19a. Edición, 752 - 754, (1969).

- 20) SEPULVEDA, B.; LEE, E.; TORRE, M.; LANDA, L.  
El diagnóstico serológico de la amibiasis invasora con la técnica de inmunoelectroforesis cruzada.  
Arch. Inv. Med. Supl 1, 263 - 268, (1971).
- 21) KRETSCHMER, R.; LOPEZ, O.M.  
Estudios sobre inmunidad celular con antígeno amibiano axénico y sus fracciones.  
Arch. Inv. Med. Mex. 2, Supl 1, 269 - 274, (1971).
- 22) ARELLANO, M. T.; ORTIZ, O. L.  
Algunas propiedades de la globulina específica del suero de pacientes con absceso hepático amibiano.  
Arch. Inv. Med. Mex. 5, Supl 2, 487 - 490, (1974).
- 23) LEHNINGER, A. L.  
Bioquímica.  
Ed. Omega, S. A. 162 - 165, (1978).
- 24) FISCHER, L.  
An introduction to gel chromatography.  
North-Holland Publishing Company, 180 - 181, (1969).
- 25) KHAN, Z. A.; MEEROVITCH, E.  
Studies on the purification of Entamoeba histolytica antigens by gel filtration. I. Some physicochemical properties of the isolated fractions.  
Can. J. Microbiol., 16, 485 - 492, (1970).
- 26) SHU MEI CHANG; CHUN YEI LIN; DUSANIC, D. G.; CROSS, H. J.  
Antigenic analyses of two axenized strains of E. histolytica by two-dimensional immunoelectrophoresis.  
Am. J. Trop. Med. Hyg., 28, (5), 845 - 853, (1979).

- 27) SAWHNEY, S.; CHAKRAVARTI, R. N.; JAIN, P.; VINAYAK, V.K.  
Immunogenicity of axenic Entamoeba histolytica antigen  
and its fractions.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 74, (1), 26 - 29,  
(1980).
- 28) KRUPP, M. I.  
Experimental induction of protective immunity to  
amebic infection.  
Arch. Inv. Med. Mex. 5, Supl 2, 415 - 422, (1974).
- 29) DIAMOND, L. S.; HARLOW, D. R.; CUNNICK, C. C.  
A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba  
histolytica and other Entamoeba.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 72, (4), 431 - 432,  
(1978).
- 30) CURTIS, A. W.; MERRILL, W. CH.  
Methods in immunology and immunochemistry.  
Academic Press, Inc. 2, 273 - 275, (1968).