



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

**ZARAGOZA**

**DETERMINACION DE LOS ZIMODEMOS DE  
E. histolytica Y SU CORRELACION  
CLINICA EN PACIENTES PSIQUIATRICOS.**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P r e s e n t a :**

**Francisco Rogelio Amador Galicia**



**1984**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## I N D I C E .

Lista de abreviaturas.

### CAPITULO I

Generalidades	1
1.0.- Antecedentes históricos	1
1.1.- Definiciones	3
1.2.- Incidencia	5
1.3.- Morfología, Biología y Ciclo vital	7
1.4.- Cultivos y Enzimas de <u>E. histolytica</u>	10
1.5.- Patogenicidad	11

### CAPITULO II

Fundamentación de la elección del tema	15
Planteamiento del problema	15
Objetivos	16
Hipótesis	16

### CAPITULO III

Parte Experimental	18
3.0.- Material	18
Metodología	
3.1.- Cultivo Monoxénico de <u>E. histolytica</u>	20
Determinaciones enzimáticas	
3.2.- Preparación de los lisados	25
3.3.- Desarrollo de las reacciones enzimáticas	26
3.4.- Corrimiento electroforético	27

3.5.- Determinación enzimática PGI	28
3.6.- Determinación enzimática PGM	29
3.7.- Determinación enzimática HK	31

#### CAPITULO IV

Resultados

#### CAPITULO V

Discusión

#### CAPITULO VI

Conclusiones

#### CAPITULO VII

Bibliografía

-----

LISTA DE ABREVIATURAS.

PGI.- Fosfoglucoisomerasa.

PGM.- Fosfoglucomutasa.

HK.- Hexocinasa.

Medio "R" .- Solución reguladora de sales pH 7.3

Medio "BR" .- Solución reguladora de sales con la cepa "B" de Escherichia coli.

Medio "BRS" .- Solución reguladora de sales con la cepa "B" de E. coli y suero bovino.

EDTA.- Acido etiléndiamino tetracético.

NADP.- Nicotin adenin difosfato.

ATP.- Adenosin trifosfato.

G6PD.- Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

ADP.- Adenosin difosfato.

G1P.- Glucosa 1 fosfato.

F6P.- Fructosa 6 fosfato.

FMS.- Metosulfato de fenazina.

MTT.- Azul de tiazolil.

-----

# CAPITULO I

G E N E R A L I D A D E S .

1.0.- Antecedentes Históricos.

La primera referencia directa a la amiba como probable causa de padecimiento humano fué hecha por Wilhelm Lambi en 1860 (25), quién observó los parásitos en las heces de niños afectados por disentería;— una observación semejante fué publicada cinco años — más tarde por Morris J. Lewis (26), médico inglés — que estudió muchos casos de "cólera" en la India, entre los que encontró y describió a la amiba, atribuyéndole también algunos síntomas.

Pero a pesar de éstas y otras descripciones esporádicas del parásito en relación con trastornos — diarreicos el mérito, no sólo del descubrimiento de la amiba, sino también de haber ofrecido la primera prueba experimental de su papel patógeno, pertenece por completo a Friedrich Lösch, médico ruso que trabajaba en San Petesburgo, y que en 1875 publicó en — Alemania su observación (27). Lösch examinó las materias fecales de uno de sus pacientes bajo el microscopio y observó un gran número de organismos. Intrigado por su presencia los dibujó con detalle, de modo que en sus ilustraciones es posible distinguir — trofozoítos de E. Histolytica y formas adultas de —

E. coli. Al cabo de unas semanas el enfermo falleció; Lösch hizo una necropsia parcial (limitada a la cavidad abdominal), recuperó el intestino, que abrió cuidadosamente, identificó úlceras "más numerosas en la porción terminal" y en raspados de las úlceras volvió a observar microscópicamente la presencia de -- innumerables amibas. Finalmente propone el término de Amoeba coli para el parásito, mismo que siguió usándose hasta que las publicaciones de Schaudinn (36) en 1903 permitieron que se pudiera distinguir definitivamente entre los dos tipos de protozoarios.

Después de Lösch, la historia de la amibiasis se transforma en efemérides; Koch (19), identificó amibas en abscesos hepáticos en 1883 (los casos provenían de Egipto); también con material egipcio, Kartulis (20), en 1886 examinó 150 casos de disentería e identificó amibas iguales a las descritas por -- Lösch en las materias fecales de todos ellos.

Kartulis continuó sus estudios, y en 1887 relató la presencia de amibas en el pus de abscesos amibianos (21), mientras que en 1904 observó los mismos parásitos en lesiones cerebrales (22). Hlava (15), -- en 1887 publicó sus estudios de sesenta casos de disentería examinados en Praga, en los cuales identi-

có amibas en las materias fecales.

W.T. Councilman y H.A. Laflour en 1891 (5), publicaron su monografía Amoebic Dysentery, basada en 14 casos observados clínica y anatómicamente en Estados Unidos. Las principales conclusiones de éstos autores clásicos de la amibiasis son: que el padecimiento actual es una entidad anatomoclínica bien definida y que el agente patógeno es la amiba.

En México, Miguel Jiménez realizó estudios acerca de la amibiasis entre 1842 y 1875 e introdujo a la terapéutica la punción evacuadora, cuya utilidad en el tratamiento quirúrgico del absceso quedó desde entonces establecida.

La primera referencia a la etiología amibiana de la enfermedad se encuentra en México en 1896 en el trabajo de Ismael Prieto, donde los parásitos se mencionan al lado de cristales de hematoïdina y ciertas bacterias, considerados como agentes causales de la amibiasis hepática. En 1899 el doctor José Mesa Gutiérrez, propone una patogenia para la migración de la amiba hasta el hígado (la circulación portal), basándose en sus propias observaciones de amibas en los capilares sinusoides portales.

#### 1.1.- Definiciones.

Bajo el nombre de amibiasis in-

vasora (37), se designan todos los procesos patológicos causados por la penetración de amibas patógenas en los tejidos del hombre. Esta definición es más precisa que el término genérico de amibiasis, el cual incluye los casos de personas que albergan en su intestino E. histolytica, pero no presentan síntomas o lesiones atribuibles al parásito. Estos son los portadores sanos de E. histolytica.

Por largo tiempo se pensó que E. histolytica era un parásito obligatorio del hombre y que su presencia en el intestino significaba necesariamente la existencia de un estado patológico (6,7). Más recientemente, se ha modificado el criterio y la opinión generalmente aceptada es que E. histolytica vive en calidad de comensal en el intestino, bajo la forma denominada minuta, llamada también prequistica o tetrágena (7,8,48), es la forma pequeña no invasora de E. histolytica, es la que forma quistes. En estas condiciones, la amiba se nutre con bacterias y sustancias del contenido intestinal. Por circunstancias todavía desconocidas, la forma minuta aumenta de tamaño, fagocita glóbulos rojos y penetra a los tejidos; es la forma invasora de E. histolytica incapaz de formar los quistes.

De acuerdo con esta interpretación, el parásito tiene probablemente dos ciclos vitales: uno no patógeno con la formación de quistes y otro patógeno sin la formación de estos.

La opinión anteriormente expresada sobre las -- formas comensal e invasora de E. histolytica tiene -- por base una serie de hechos clínicos, epidemiológicos y experimentales (1,8,48), y de acuerdo con ello el protozooario es un parásito facultativo, el cual según las circunstancias puede ser huésped inocuo o tener capacidad para destruir tejidos.

La recopilación hecha por Fournier (12), hasta 1956 describe esta enfermedad en forma completa y minuciosa.

Mucho se ha avanzado desde entonces, particularmente en lo que se refiere al conocimiento del agente patógeno, a los medios de diagnóstico y a la terapéutica del padecimiento; pero la amibiasis sigue siendo grave problema nacional y mucho falta por saber, y -- aún más por hacer para dominarla.

#### 1.2.- Incidencia.

La parasitosis de E. histolytica se encuentra extendida por todo el mundo y puede considerarse endémica por el paralelo 40 norte y el 30 sur -- (8).

La mayor parte de los autores consideran que en promedio el 20% de la población mundial se encuentra infectada por el parásito (16). Sin embargo, sólo una minoría de los parásitos presenta evidencia de invasión tisular o sea de enfermedad amibiana y, además la relación entre el número de personas infectadas por E. histolytica y el número de pacientes -- que sufre realmente la enfermedad amibiana es muy variable en los distintos países. Por lo tanto la tasa de infección, es decir el porcentaje de población que tiene E. histolytica en el intestino, no es índice fiel para juzgar la frecuencia de la amibiasis clínica en una zona geográfica.

En México, la tasa de infección se estima en los alrededores del 20% (28), y como es sabido, la frecuencia y gravedad de la amibiasis invasora en nuestro medio representa un verdadero problema. El único índice seguro para juzgar la prevalencia y gravedad de la amibiasis en una área geográfica, es la cantidad de abscesos hepáticos amibianos (8,29).-

De acuerdo con este criterio, se demuestra que ciertos países son más duramente azotados por el padecimiento en vista de lo cual se les ha aplicado el significativo nombre de "patrias de la amibiasis". Indudablemente, México es una de estas "patrias de la amibiasis" (8).

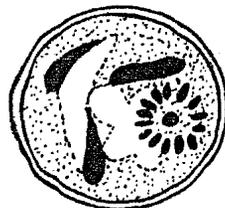
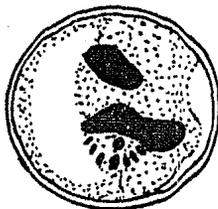
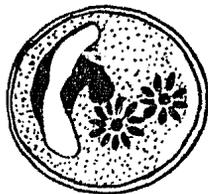
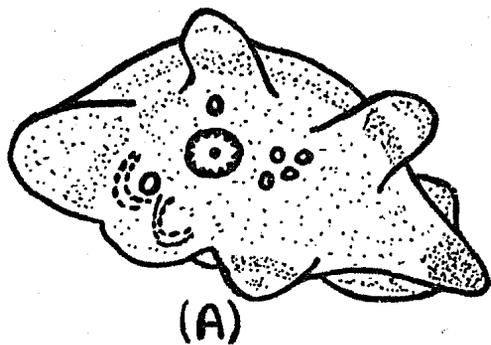
### 1.3.- Morfología, Biología y ciclo vital.

La enfermedad llamada amibiasis es causada por E. histolytica, un protozoario de la clase Rhizopoda y del género Entamoeba. El ciclo de vida de E. histolytica es complejo y en él se producen algunos cambios en la morfología del parásito; los más importantes desde el punto de vista médico son el quiste y el trofozoito o forma móvil (37). Las formas intermedias, el prequiste y el metaquiste son parte del ciclo biológico.

#### T R O F O Z O I T O .

Tiene dimensiones variables — que fluctúan entre 10 y 60 micras de diámetro y en preparaciones teñidas muestra una membrana citoplásmica delgada; el contenido se divide clásicamente en dos porciones: una zona externa o exoplasma, que es más clara y que da lugar a los pseudópodos, y una zona interna o endoplasma, finamente granular y con muchas vacuolas.

El núcleo ocupa aproximadamente una quinta parte del volumen celular y aparece como esfera central rodeada de una membrana delgada, con cromatina granular, dispuesta en masas irregulares. El nucleolo es prominente y con frecuencia está en el centro del núcleo, aunque en ocasiones puede ser excéntrico, como



(B)

FIGURA 1.- MORFOLOGÍA DE E. histolytica: (A) trofozoito, (B) quistes.

puede observarse en la figura 1 (37,38).

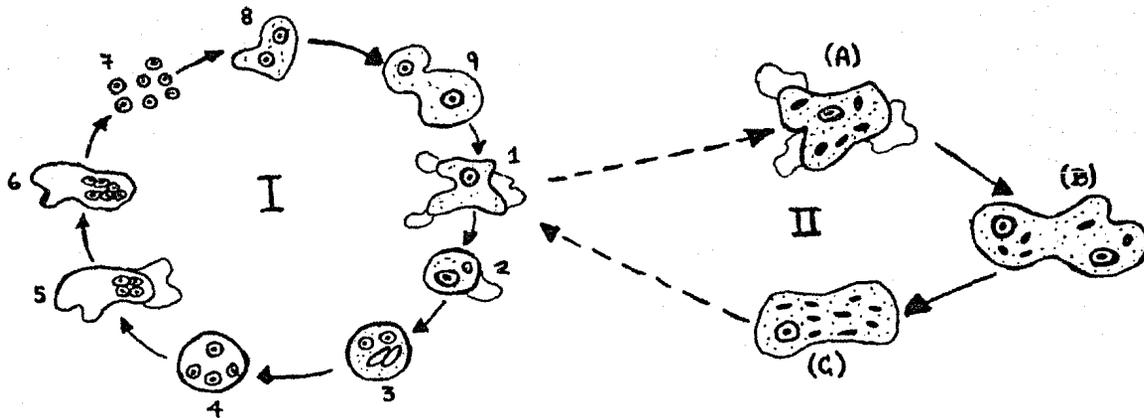
No se ha encontrado ninguna diferencia morfológica, ni antigénica en los trofozoítos de E. histolytica aislados de "portadores asintomáticos" y los obtenidos de lesiones amibianas humanas (23,47).

#### Q U I S T E .

En preparaciones no teñidas, es una estructura redonda u oval que mide de 3.5 a 25 micras de diámetro; cuando se tiñe de manera adecuada muestra de uno a ocho núcleos, pero lo más común es que sean cuatro, con una membrana nuclear delicada con condensaciones de cromatina agregados sobre la superficie interna, con un núcleo central formado por uno o varios gránulos dispuestos en un órgano compacto - (7,37). Figura 1.

#### C I C L O V I T A L .

El parásito tiene probablemente dos ciclos vitales: un ciclo no patógeno durante el cual vive en la superficie de la mucosa o en la luz del intestino, se nutre de otros microorganismos y de restos alimenticios y forma quistes; y el ciclo patógeno, durante el cual vive en el espesor de los tejidos, se alimenta de los productos de la histólisis, adopta únicamente la forma de trofozoíto y se multiplica asimismo por división, pero sin pro-



**I.- CICLO NO PATÓGENO**

- 1.- Trofozoito de E. histolytica (forma minuta).
- 2.- Prequiste.
- 3.- Quiste binucleado.
- 4.- Quiste cuadrinucleado.
- 5.- Amiba metaquistica.
- 6.- Amiba multinucleada.
- 7.- Pequeñas amibas resultantes de la anterior.
- 8.- E. histolytica (minuta) iniciando la división.
- 9.- La misma, terminando la división.

**II.- CICLO PATÓGENO**

- (A) Trofozoito hematófago (invasor de E. histolytica).
- (B) El mismo en proceso de división.
- (C) Trofozoito hematófago e invasor, que da origen a la forma minuta no invasora.

**FIGURA 2.- REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS CICLOS EVOLUTIVOS DE E. histolytica.**

ducir quistes. Aún cuando la existencia de éstos dos ciclos es generalmente aceptada, no está demostrada la transformación de la forma no patógena en patógena y viceversa. Por ello en la figura 2 éstas fases se señalan con flechas interrumpidas.

#### 1.4.- Cultivos y Enzimas de E. histolytica.

Los avances logrados en el cultivo de E. histolytica en medios artificiales están representados -- por tres etapas:

a) Los cultivos del parásito en asociación con flora bacteriana compleja o cultivos mixtos iniciados en 1925 (2).

b) Los cultivos del parásito en asociación con una sola bacteria como el Bacteroides Symbiosus (39) o con otro protozooario como el Tripanosoma cruzi (30)- cultivos llamados monoxénicos realizados entre 1948- y 1950.

c) El cultivo de E. histolytica sin asociación alguna con otros microorganismos, denominado axénico (9, 10), iniciado en el año de 1961.

#### E N Z I M A S .

En diversas investigaciones se ha -- comprobado la múltiple actividad enzimática de E. histolytica. Aún cuando los estudios son todavía in-

completos, se han identificado por métodos bioquímicos enzimas proteolíticas (tripsina), amilasa, hialuronidasa, carboxipeptidasa, maltasa, glutaminasa, esterasa y deshidrogenasa succínica (18), así como la fosfoglucomutasa, deshidrogenasa málica, enzimas llamadas diaforasas (32) y enzimas llamadas glucolíticas como la glucocinasa, fosfoglucoisomeras, 6-fosfofructocinasa, aldolasa, tiosa fosfatoisomerasa, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (31), además por métodos histoquímicos se ha demostrado la presencia de la fosfatasa alcalina y ácida en el protozoario (33).

#### 1.5.- Patogenicidad.

E. histolytica es un protozoario de distribución mundial (16,37), el estudio epidemiológico realizado por Gutiérrez y cols. (14) en México, reveló a esta parasitosis como un padecimiento endémico en todo el país. Este protozoario se puede reconocer, por su tamaño, disposición de la cromatina en el núcleo y la presencia de cuerpos cromatóforos, si se utiliza para ello técnicas de tinción como la de hematoxilina (7) o la de Sargeant (40) para cuerpos cromatóforos.

Existen diversos factores (37), que influyen para que una amiba se transforme de comensal en pató

gena, estos factores se agrupan en tres categorías:

- 1.- Factores dependientes del parásito.
- 2.- Factores dependientes del huésped y
- 3.- Otros factores asociados.

Sin embargo no se ha comprobado en forma definitiva el hecho de que los factores antes mencionados influyan en la patogenia de la amibiasis invasora. - Ahora bien sí aplicamos el criterio morfológico, es relativamente fácil de reconocer de acuerdo a su tamaño, disposición de la cromatina en el núcleo, etc. Sin embargo, si se juzga solamente con este criterio morfológico, no hay explicación al hecho de que este parásito se pueda presentar tanto en pacientes con la patología descrita para la amibiasis con invasividad a órganos (16,24,37), así como en personas sin patología digestiva (3,11).

Es por ello indispensable utilizar otra metodología que permita distinguir diferentes tipos de amiba (41,42). La clasificación de parásitos mediante isoenzimas utilizando electroforesis fué iniciada -- por Bragster (4) con Tripanosomas, y en el caso de E. histolytica, Reeves y Bischoff en 1968 (32) utilizaron electroforesis en acetato de celulosa de las enzimas: glucocinasa, fosfoglucoisomerasa, fosfoglucomutasa, L-malato oxido reductasa y una diaforasa -

de NADP, diferenciando dos grupos en 10 cepas de E. histolytica.

Años más tarde Sargeant y cols. (41,43) en 1978, utilizando el método de Wraxal y Culliford (49) clasificaron en zimodemos cepas de amibas de la India, México y Sudáfrica, utilizando para ello el esquema electroforético que presentaron 4 enzimas en gel de almidón: la fosfoglucoisomerasa (E.C.5.3.1.9.), la fosfoglucomutasa (E.C.2.7.5.1.), la L-malato oxidoreductasa (E.C.1.1.1.40) y la hexocinasa (E.C.2.7.5.1.)

En México, de acuerdo con los estudios realizados por Sargeant (44), se demostró que hay 13 zimodemos de E. histolytica, un número mayor a los encontrados en la India al hacer un estudio comparativo.

Se ha establecido una correlación clínica de los zimodemos de E. histolytica, de acuerdo a los trabajos realizados por Jiménez (17), en los cuales el zimodemo II parece corresponder al de una amiba invasora.

En el estudio realizado por Sargeant (45), en un grupo de pacientes de hospitales para enfermos mentales se encontró que el 7% tuvieron E. histolytica, el 2.9% E. hartmanni, 11.4% E. coli, 8% E. nana y el 1% giardia intestinal. De los 7 casos de E. histolytica

tolytica, 4 correspondieron al zimodemo tipo I, 2 al zimodemo III y uno al tipo IV (46).

No se encontró ningún zimodemo patógeno de acuerdo a lo descrito anteriormente por Jiménez (17).

-----

C A P I T U L O      I I

### Fundamentación de la Elección del Tema.

Entamoeba histolytica es un protozoario de distribución mundial (16,37), el estudio epidemiológico realizado por Gutiérrez y cols. (27), reveló a esta parasitosis como un padecimiento endémico en todo el país, por lo que consideramos que es un problema de salud muy importante así como por la repercusión socio-económica que ésta representa.

### Planteamiento del problema.

Entamoeba histolytica se le puede reconocer — por su morfología (19,36,37), sin embargo si se aplica este criterio morfológico no existe la explicación a que este parásito se pueda presentar tanto en personas con la patología descrita para la amibiasis (7,20), así como en personas que no presentan patología digestiva.

La determinación del patrón electroforético utilizando tres enzimas, fosfoglucoisomerasa, fosfoglucomutasa y hexocinasa ha llevado a la clasificación de las amibas en zimodemos (32,38).

La correlación entre el patrón electroforético presentado y la historia clínica del paciente determinó que zimodemos debieran ser considerados como de amibas patógenas (17).

### Objetivos.

A) Clasificar cepas de E. histolytica cultivadas en forma monoxénica de acuerdo al método de Robinson (34), a partir de las heces de enfermos mentales.

B) Determinar los zimodemos o patrón electroforético de las amibas mediante electroforesis en gel de almidón de acuerdo al patrón establecido por Sargeaunt (38), utilizando para ello tres enzimas, - fosfoglucoisomerasa, fosfoglucomutasa y hexocinasa.

C) Hacer una correlación de la historia clínica del paciente con los diferentes zimodemos observados, con la finalidad de investigar si existe alguna relación entre la invasividad de la amiba y el zimodemo encontrado en los enfermos mentales.

D) Investigar si es posible el encontrar un patrón electroforético o zimodemo que no se haya descrito y establecer a manera de comparación los resultados obtenidos por Sargeaunt en enfermos mentales de tres hospitales de Londres, Inglaterra.

### Hipótesis.

Los pacientes psiquiátricos generalmente presentan una patología digestiva de origen amibiano que generalmente pasa a segundo término porque su

problema psiquiátrico se hace prioritario.

Como es bien conocido uno de los factores que influyen en esta patogenia ambiental son los malos hábitos de higiene lo cual no puede ser considerado -- por estos pacientes.

El conocer el patrón electroforético o zimodemo de las amibas encontradas en estos pacientes nos llevará de acuerdo a los estudios de Jiménez (17), a determinar si es un zimodemo considerado como patógeno.

- - - - -

C A P I T U L O    I I I

PARTE EXPERIMENTAL.

3.0.- M a t e r i a l .

Autoclave cilindrico Barnstead

Balanza analítica Bosch.

Centrífuga clínica.

Cubreobjetos No. 2 24 x 50 loz. Propper.

Celdas para electroforesis.

Cámara de enfriamiento

Canastilla para tubos de ensayo.

Espátulas de acero inoxidable.

Fuente de poder LKB 2103

Frascos ámbar. cap. 100, 500 y 1000 ml.

Frascos de vidrio con tapón de rosca. cap. 5 ml.

Gradillas para tubos de ensaye.

Incubadora Medi-Lab.

Lápiz marcador resistente al calor.

Cinta testigo (Masking-tape)

Matraces aforados con tapón.

Bechero tirril ajustable.

Manguera de hule.

Matraz Kitasato.

Matraces erlernmeyer graduados.

Ferillas para pipetas

Pipetas Pasteur.

Pipetas graduadas. cap. 1, 2,5 y 10 ml.

Pipetas serológicas desechables 1.0 ml.  
Probetas graduadas. Una escala 50, 100 y 500 ml.  
Portaobjetos para microscopio. 75 x 25 mm.  
Potenciómetro. Corning mod. 5.  
Aplicadores de madera.  
Papel parafilm "M" American Company.  
Papel glassine para pesar.  
Papel milimétrico.  
Refrigerador RCA Whirlpool.  
Reloj marcador. General electric.  
Termómetro de laboratorio de 10° a 110° C.  
Tubos de ensaye. 13 x 100 y 16 x 100 mm.  
Tripié con tela de asbesto.  
Tapones de hule No. 6, 7, 8, 9 y 10.

## M E T O D O L O G I A .

Se colectaron las heces de - pacientes psiquiátricos hospitalizados, un total de - 355 muestras, en las cuales se investigó la presen - cia de E. histolytica mediante el cultivo monoxénico de Robinson (34), para obtener 100 cultivos positi - vos e investigar en ellos el zimodemo correspondien - te.

### 3.1.- Cultivo Monoxénico de E. histolytica.

#### R E A C T I V O S .

Agar salino.- Se prepara agar al 1.5% con NaCl al - 0.7%, el cual es distribuido en frascos de vidrio - con tapón de rosca en alícuotas de 2.5 ml. cada uno - se esterilizan a 15 lb. durante 15 minutos para des - pues dejarlos enfriar en forma inclinada.

Solución de Eritromicina.- Se prepara una solución de eritromicina a una concentración de 5 ug por ml. uti - lizando agua estéril para su preparación. Se coloca - en frascos de vidrio con tapón de rosca en alícuotas de 2.5 ml. cada uno, conservándose en refrigeración - hasta su uso.

Almidón en polvo.- El almidón es surtido por la casa Drug Houses de Inglaterra.

Bactopeptona.- Se preparó una solución de peptona al 20%, después de lo cual se esterilizó a 15 lb. por 15 minutos, colocándose también en frascos de vidrio con tapón de rosca en alícuotas de 2.5ml.

Solución de NaOH al 40%. - Se pesan 200 g. de hidróxido de sodio y se disuelven en 500 ml. de agua destilada estéril.

Solución de Azul de Bromotimol al 0.04%. - Se pesan 0.04 gramos de azul de bromotimol y se disuelven con una pequeña cantidad de alcohol, llevando a un volumen de 100 ml. con agua destilada estéril.

Solución de Ftalato de potasio.- Se pesan 204 g. de ftalato de potasio, se disuelven con 100 ml. de NaOH al 40%, se ajusta el pH a 6.3 y se lleva a un volumen de 2000 ml., esterilizándose posteriormente a 15 lb. durante 15 minutos. La solución de trabajo se utiliza llevando a cabo una dilución de 1:10 con agua destilada estéril.

Medio de cultivo "R".- Se prepara una solución concentrada de la siguiente manera: 125 g. de NaCl, 50g. de ác. cítrico monohidratado, 12.5 g. de fosfato dibásico, 25 g. de sulfato de amonio, 1.25 g. de sulfato de magnesio heptahidratado, 100 ml. de ác. láctico,- todo esto se disuelve para llevarse a un volumen de-

2500 ml. con agua destilada. De esta solución se toman 100 ml. a los cuales se les adicionan 7.5 ml. de NaOH al 40% y 2.5 ml. de azul de bromotimol al 0.04 por ciento, se ajusta previamente el pH a 7.3 y se afora a 1000 ml. con agua destilada. Se esteriliza a 15 lb. por 15 min.

Solución de peptona al 10%.-- Este es el medio de cultivo que se utiliza para hacer crecer la cepa "B" de E. coli.

Medio de cultivo "BR" .-- A 100 ml. de medio de cultivo "R" se le agrega una gota del cultivo de la cepa "B" de E. coli, se deja incubar en la estufa a una temperatura de 37°C durante 48 horas. Después de este tiempo puede ser guardado a temperatura ambiente durante dos meses.

Medio de cultivo "BRS".-- Se utiliza el medio "BR", al cual se le adiciona el mismo volumen de suero bovino filtrado e inactivado a 56°C durante 30 minutos.

Solución yodoyodurada.-- Se prepara mezclando 1 g. de yodo con 2 g. de yoduro de potasio y disolviéndolos con 300 ml. de agua destilada.

### 3.1.1.- S I E M B R A .

Al frasco que contiene el agar salino se le adicionan 4 gotas de solución de --

eritromicina, 5 mg. de almidón en polvo, 2 ml. del medio de cultivo "BR" y aproximadamente 50 mg. de la materia fecal en estudio, observando las características de la misma tales como, la presencia o ausencia de diarrea, moco, sangre y si su consistencia es seca o dura. Se le deja cultivar en la estufa durante 24 hrs. a una temperatura de 37°C.

### 3.1.2.- C U L T I V O .

Al frasco que contiene la siembra de la materia fecal, se le elimina el sobrenadante con una pipeta pasteur teniendo precaución de no eliminar el sedimento y se le adicionan 2 gotas de eritromicina, 5 mg. de almidón en polvo, 2 gotas de peptona al 20%, 1.5 ml. de ftalato de potasio, y 1.5 ml. del medio de cultivo "BRS". Se le deja cultivar durante 24 horas más a la temperatura de 37°C.

### 3.1.3.- S U B C U L T I V O .

Con todo cuidado del fondo del frasco que contiene el cultivo de la materia fecal, se toma con una pipeta pasteur, una gota que se coloca en un portaobjetos y se le adiciona una gota de lugol y se cubre con un cubreobjeto para hacer la observación al microscopio del crecimiento del cultivo, las amibas viables se observan teñidas

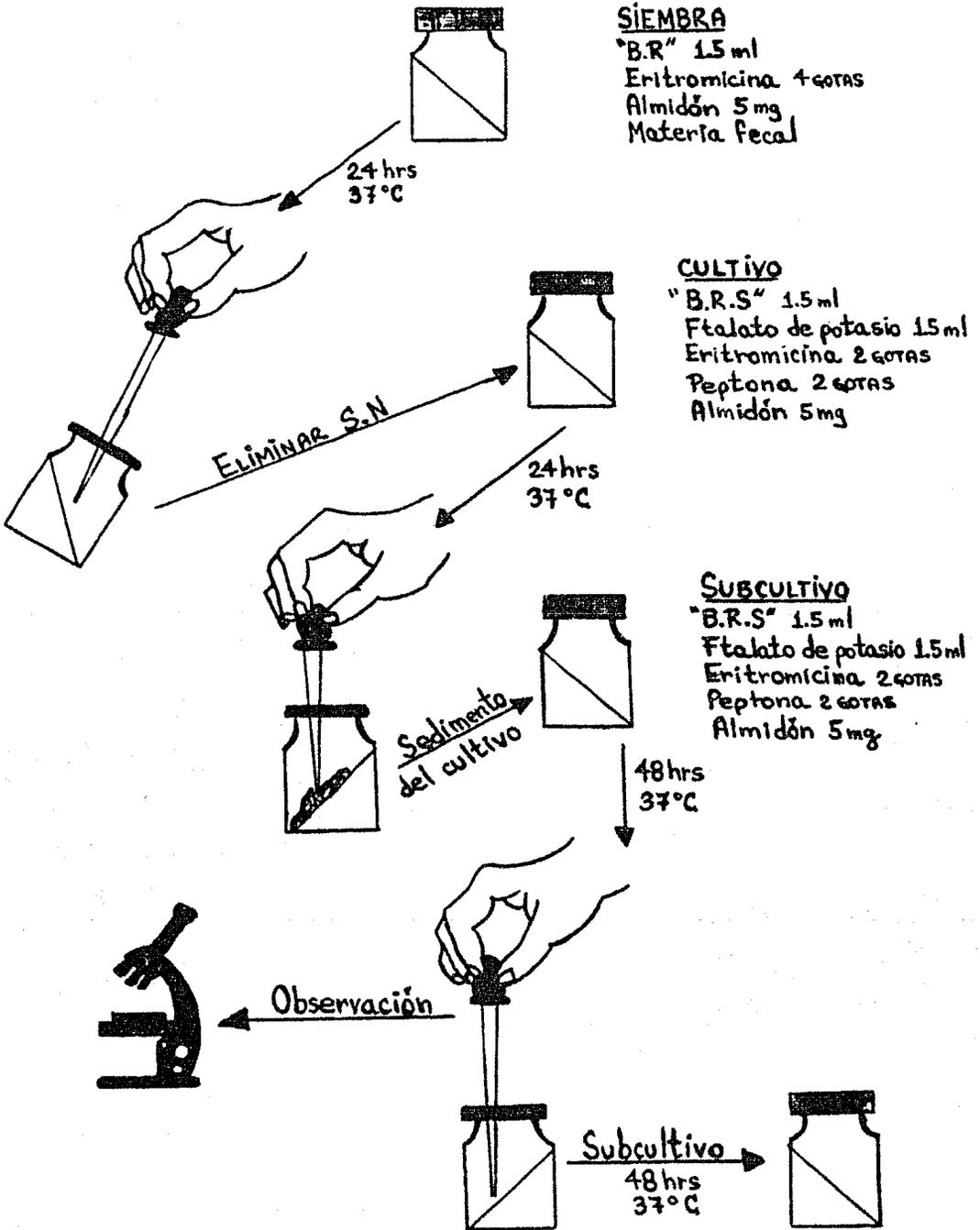


FIGURA 3.- CULTIVO MONOXÉNICO DE E. histolytica.

por el lugol.

También del fondo del mismo frasco se toma una gota como inóculo para hacer el segundo subcultivo, - que es preparado en la misma forma que se describe - para el primero. Se le deja incubar durante 48 horas a 37°C para hacer luego la segunda observación. Se - sigue el mismo procedimiento para los subcultivos - posteriores.

- - - -

DETERMINACIONES ENZIMATICAS.

3.2.- Preparación de los lisados.

R E A C T I V O S .

Solución de EDTA 200 mM.- se pesaron 2.92 g. de EDTA y se diluyeron con 50 ml. de agua destilada.

Solución de ácido caproico 200 mM.- Se tomaron 1.16 ml. de ácido caproico y se diluyeron con 50 ml. de agua destilada.

Solución de ditioeritritol 200 mM.- Se pesaron 1.54g. de ditioeritritol y se diluyeron con 50 ml. de agua destilada.

P R O C E D I M I E N T O .

Las amibas cultivadas se colocaron en un tubo de plástico de forma cónica; éste fué centrifugado a 350 x g durante 15 minutos, se desecho el sobrenadante y al sedimento se le adicionó una mezcla estabilizadora constituida por partes iguales de EDTA, ác. caproico y ditioeritritol, todos a una concentración de 200 mM, dejándose en el congelador durante 24 horas . Después de este tiempo se centrifugó a 3000 x g. durante 30 minutos y el sobrenadante se utilizó para llevar a cabo las determinaciones enzimáticas.

### 3.3.- Desarrollo de las reacciones enzimáticas.

Para el desarrollo de las reacciones enzimáticas, se utilizaron diferentes mezclas de incubación en las que la producción del formazán (compuesto decolor), reveló la posición de las enzimas.

#### R E A C T I V O S .

Solución Tris: clorhídrico 0.3 M pH 8.0.- Se pesaron 3.03 g. de tris y se diluyeron con 50 ml. de agua -- destilada, ajustando el pH a 8.0 con ácido clorhídrico.

Cloruro de Magnesio 1 M.- Se pesaron 20.32 g. de  $MgCl_2$  y se diluyeron con 100 ml. de agua destilada, conservándose en refrigeración a 4°C.

NADP (10 mg/ml).- Se pesaron 500 mg. de NADP y se -- disolvieron en 50 ml. de agua destilada conservándose en refrigeración a 4°C.

Fructosa- 6- fosfato (10 mg/ml).- Se pesaron 50 mg.- de F6P y se disolvieron con 5 ml. de agua destilada y conservándose en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Glucosa-6--fosfato deshidrogenasa (100 UI/ml).- De la enzima G6PD contenida en el frasco, a una concentración de 10 UI/ml., se pasó a concentración de 100UI/ml conservandose la enzima a una temperatura de 4°C.

Azul de Tiazolil (5 mg/ml).-- Se pesaron 15 mg. de azul de tiazolil (LTT), y se diluyeron con 10 ml. de agua destilada, conservándose en refrigeración a 4°C.

Metosulfato de Fenazina (1 mg/ml).-- Se pesaron 10 mg. de metosulfato de fenazina (FMS), y se diluyeron con 10 ml. de agua destilada, conservándose en refrigeración a 4°C.

Dextrosa (40mg/ml).-- Se pesaron 400 mg. y se diluyeron con 10 ml. de agua destilada.

ATP (15 mg/ml).-- Se pesaron 150 mg. y se diluyeron con 10 ml. de agua destilada.

Glucosa-1-fosfato (12.15 mg/ml).-- Se pesaron 625 mg. de glucosa-1-fosfato (G1P), y se diluyeron con 50 ml. de agua destilada, conservándose en refrigeración a 4°C.

Agar al 1.2%.-- Se pesaron 1.2 g. de agar bacteriológico y se diluyeron con 100 ml. de agua destilada, la mezcla se calentó hasta ebullición y se conservó en tubos de ensayo en alícuotas de 10 ml. cada uno hasta su uso.

#### 3.4.- Corrimiento electroforético.

Para las electrofóresis se emplearon placas de vidrio con gel de almidón, empleándose celdas con cámaras de enfriamiento para conservar la temperatura constante a 8°C y ha -

ciendo el corrimiento durante 3 horas a 240 mV y 140 mA.

#### REACTIVOS.

Solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH 7.0.- Se pesaron 17.4 g. de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — anhidro y 12.1 g. de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , se ajustó el pH a 7.0— y se llevó a un litro con agua destilada.

Solución amortiguadora de Tris-Maleato 0.1 M pH 7.4.-

Se pesaron 12.14 g. de tris, 11.61 g. de ác. — maleico, 2.03 g. de  $\text{MgCl}_2$ , 3.72 g. de EDTA y 12.8 ml. de NaOH 10 N. Se ajustó el pH a 7.4 y se llevó a un litro con agua destilada.

Gel de Almidón.- Se pesan 2.3 g. de almidón hidrolizado y se disuelven con 25 ml. de la solución amortiguadora correspondiente. Se calienta hasta ebullición y se desgasifica al vacío para posteriormente colocarse en laminas de vidrio de 15 x 25 cm.

#### 3.5.- Determinación enzimática Fosfoglucoisomerasa.

La electroforesis se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura mencionadas anteriormente en el inciso 3.4.

El gel se preparó con almidón hidrolizado y se diluyó con solución amortiguadora de fosfatos 0.015M, pH 7.0, calentándose a ebullición, desgasificándose-

al vacío y colocándose en placas de vidrio de 15 x - 25 cm.

Para el desarrollo de la reacción enzimática - se utilizó la mezcla de incubación siguiente:

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

Después de llevar a cabo el corrimiento electroforético y el revelado de la reacción enzimática - la reacción que se propone se observa en la figura - número 4.

### 3.6.- Determinación enzimática Fosfoglucomutasa.

La electroforesis se realizó en las mismas condiciones de tiempo, voltaje y temperatura descritos - anteriormente en el inciso 3.4.

El gel se preparó con almidón hidrolizado y se diluyó con solución amortiguadora de Tris-Malato - 0.1 M pH 7.4, calentándose hasta ebullición, desgasí

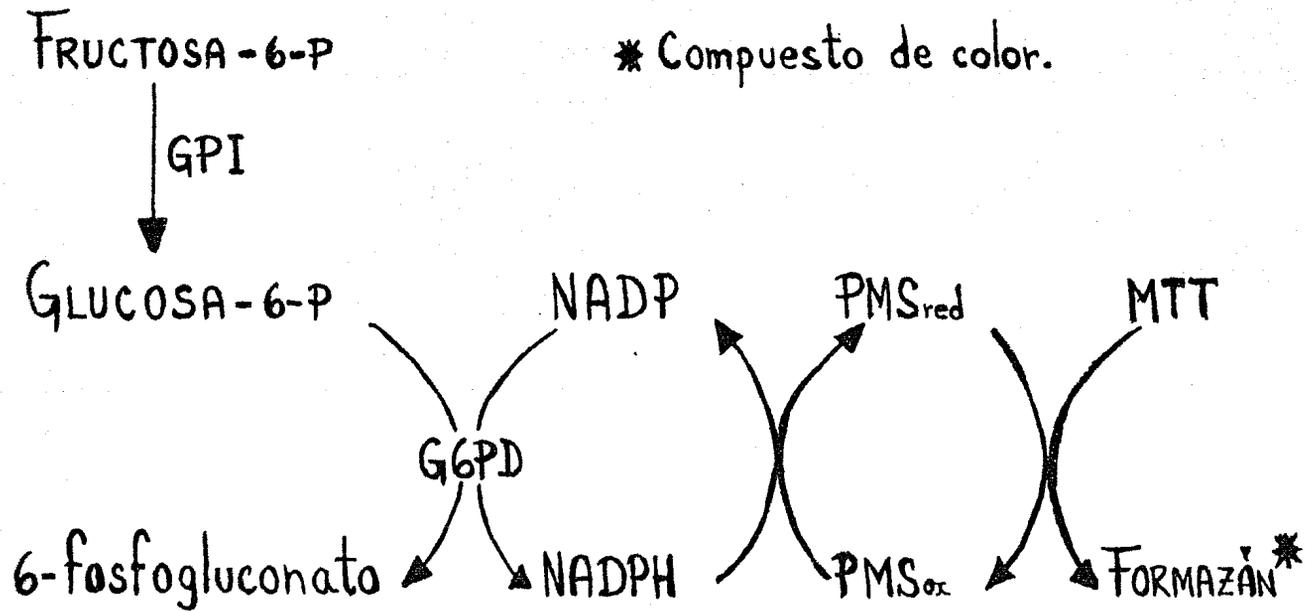


FIGURA 4.- Reacción enzimática Fosfoglucoisomerasa GPI

ficando al vacío y colocándose en placas de vidrio - de 15 x 25 cm.

Para el desarrollo de la reacción enzimática - se utilizó la mezcla de incubación siguiente:

Tris:clorhídrico 0.3 M pH 8.0	7.0 ml.
Cloruro de Magnesio 1 M	0.2 ml.
NALP (10 mg/ml)	0.5 ml.
Glucosa-1-fosfato (12.15 mg/ml)	1.0 ml.
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (100 UI/ml)	0.5 ml.
Metosulfato de Fenazina (FMS) (1 mg/ml)	1.0 ml.
Azul de tiazolil (LTT) (5 mg/ml)	1.0 ml.
Agar al 1.2 %	10.0 ml.

La reacción que se propone para ésta enzima se observa en la figura número 5.

### 3.7.- Determinación enzimática hexocinasa.

La electroforesis se llevó a cabo en las mismas condiciones de tiempo, voltaje y temperatura que para las enzimas mencionadas anteriormente.

El gel de almidón se preparó de la misma forma que para la enzima fosfoglucomutasa, mencionada anteriormente.

Para el desarrollo de la reacción enzimática - se utilizó la mezcla de incubación siguiente:

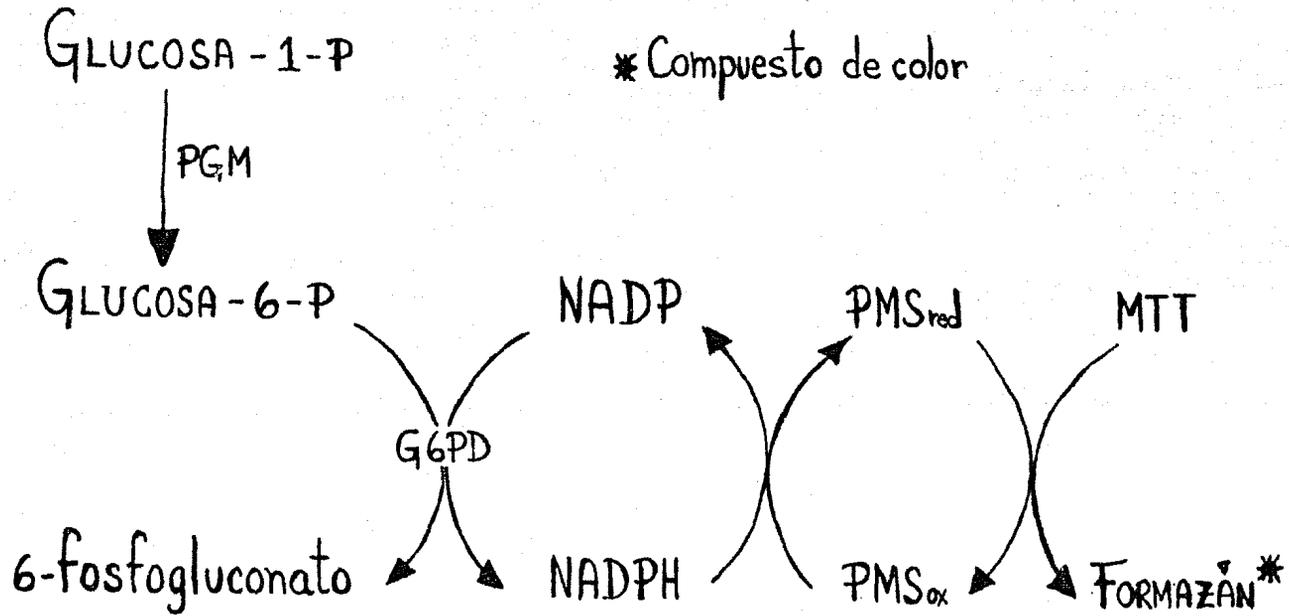


FIGURA 5.- Reacción enzimática Fosfoglucomutasa PGM.

Tris:clorhídrico 0.3 M pH 8.0	7.0 ml.
Cloruro de Magnesio 1 M	0.2 ml.
NADP (10 mg/ml)	0.5 ml.
Dextrosa (40 mg/ml)	1.0 ml.
ATP (15 mg/ml)	1.0 ml.
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa(100UI/ml)	0.5 ml.
Metosulfato de Fenazina (PMS) (1 mg/ml)	1.0 ml.
Azul de tiazolil (MTT) (5 mg/ml)	1.0 ml.
Agar al 1.2 %	10.0 ml.

La reacción que se propone después de llevar a cabo el corrimiento electroforético de ésta enzima - se observa en la figura número 6.

-----

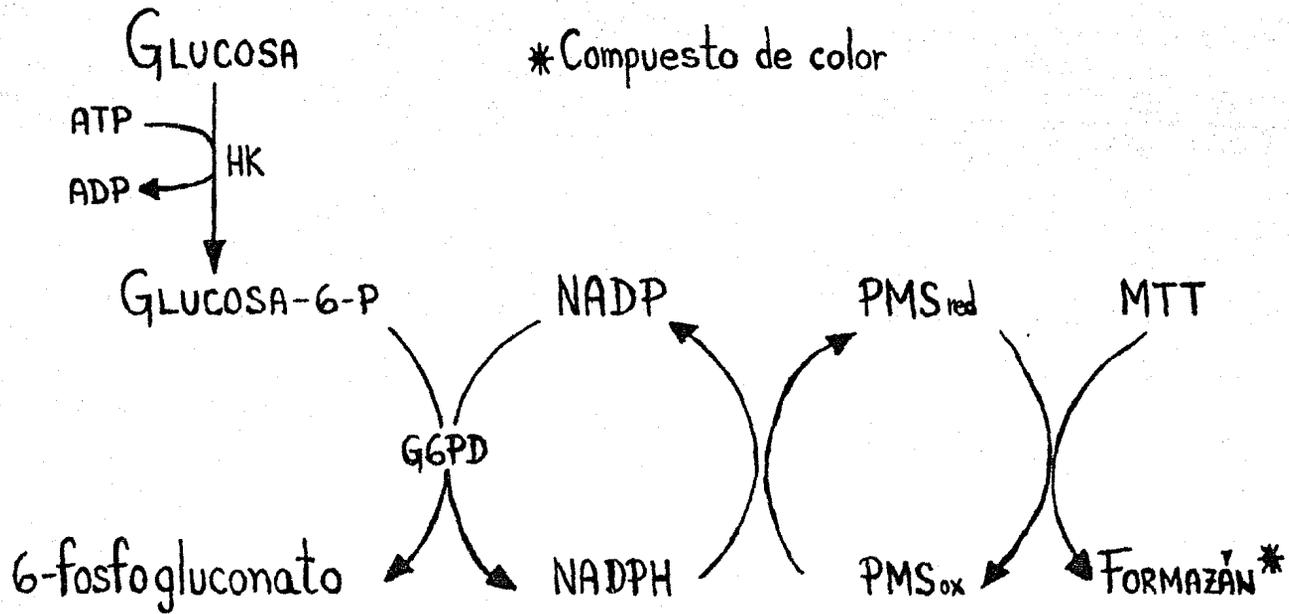


FIGURA 6.- Reacción enzimática Hexocinasa HK.

C A P I T U L O    I V

## RESULTADOS.

Se estudiaron 355 pacientes en los cuales, se investigó la patología digestiva, el sexo y la edad.

Se tomaron las heces de estos pacientes y se cultivaron en medio monoácido (34), con el objeto de obtener un cultivo positivo para amibas, obteniéndose como resultado el 28.17 %.

La figura número 7 muestra el esquema del patrón electroforético de las tres enzimas estudiadas: PGI, PGM y HK, utilizadas para clasificar a las amibas en grupos (ZIMODEMOS).

Al llevar a cabo el estudio de la distribución de las amibas comensales, así como de E. histolytica se obtuvieron los resultados representados en la tabla número I.

Los resultados obtenidos de acuerdo a la clasificación por zimodemos de E. histolytica y el porcentaje correspondiente a las 100 muestras positivas estudiadas se observan en la tabla número II.

En el caso de las amibas comensales E. coli y E. hartmanni, la tabla número III nos muestra los resultados obtenidos.

La distribución por sexo de los pacientes con cultivo positivo se muestra en la tabla número IV.

Asimismo en relación a la edad de los pacientes la tabla número V muestra la frecuencia obtenida en porcentaje.

En relación a la sintomatología presentada por estos pacientes, la correlación entre el zimodemo encontrado y la patología digestiva se muestran en la tabla número VI los resultados obtenidos.

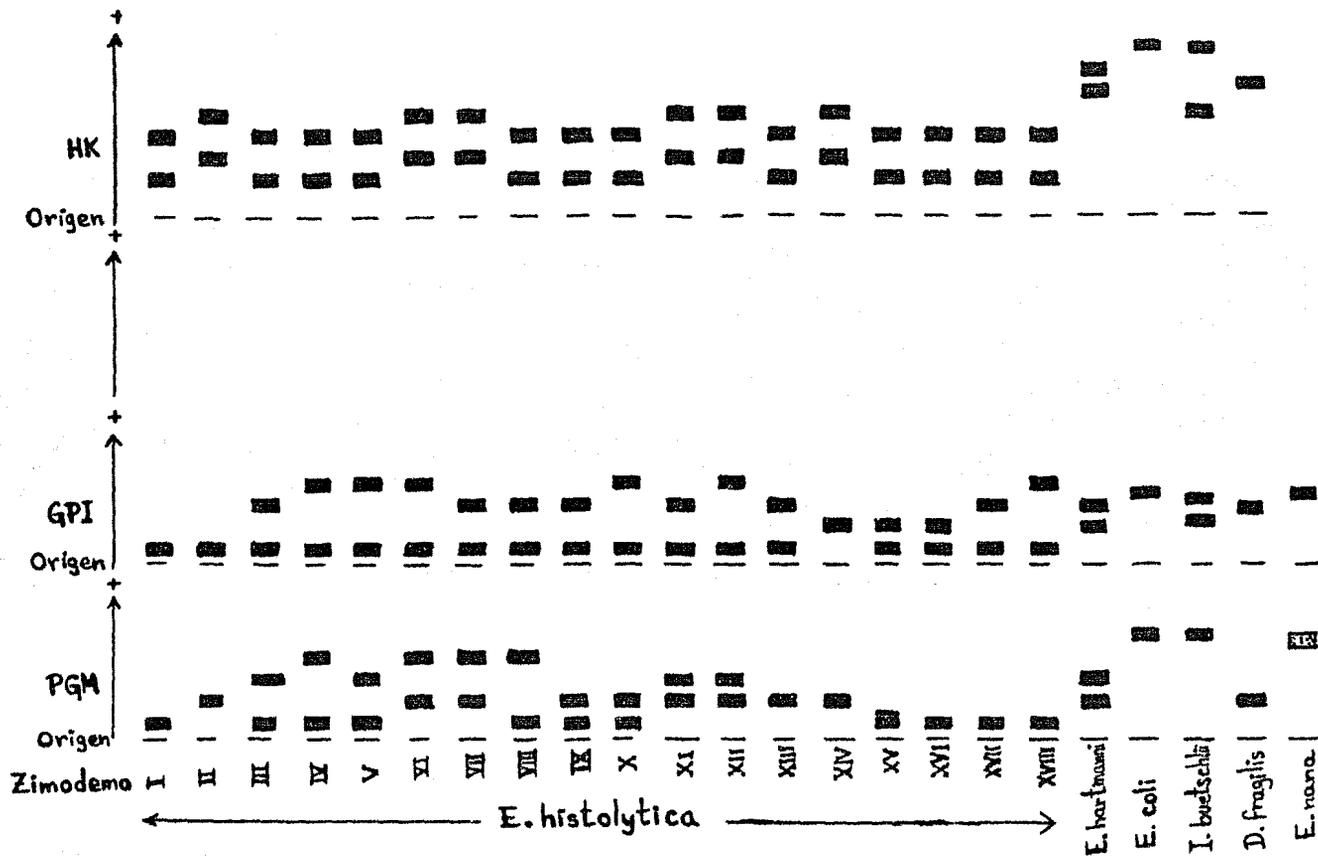


Fig. 7.- REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS ZIMODEMOS DE *E. histolytica* Y OTRAS AMIBAS INTESTINALES DEL HOMBRE.

Zimodemo	I	II	III	IV	E. coli	Hartmanni
No. total	13 / /100	5 / /100	59 / /100	17 / /100	1 / /100	5 / /100

Tabla I.- Distribución por zimodemos de E. histolytica.

Zimodemo				
Total	I	II	III	IV
94	13	5	59	17
%	13.86	5.34	62.8	18.0

Tabla II.- Por ciento de zimodemos de *E. histolytica*.

Total	E.hartmanni	E. coli
6	5	1
%	84	16

Tabla III.- Porcentaje de amibas comensales

Sexo	Numero
Femenino	40
Masculino	60

Tabla IV.- Distribución por sexo de los pacientes

---

Edad	Frecuencia %
15-20	8
20-30	42
30-40	28
40-50	12
50 ó mas	10

**Tabla V.- Distribucion por edad de los pacientes**

Zimodemo	I	II	III	IV	E. hartmanni	E. coli
Diarrea	11 13	5 5	46 59	13 17	3 5	1 1
Moco	3 13	2 5	33 59	10 17	2 5	1 1
Sangre	0 13	0 5	0 59	1 17	0 5	0 1
Pujo	3 13	0 5	18 59	8 17	2 5	0 1
Tenesmo	2 13	0 5	13 59	3 17	2 5	0 1

Tabla VI.- Correlación clínica entre zimodemos y patología digestiva de *E. histolytica* y ambas comensales.

CAPITULO V

### DISCUSION.

De acuerdo a los resultados obtenidos en relación al porcentaje de cultivos positivos para amibas con respecto a estudios similares como los realizados por Sargeaunt, en tres hospitales psiquiátricos de Londres, muestran un porcentaje similar ya que nosotros encontramos el 28.17 % en 355 muestras y Sargeaunt para 174 muestras estudiadas encontró el 25 %

Sin embargo no todas correspondieron a E. histolytica ya que se encontraron también amibas comensales (tabla I), todo esto demostrable morfológica y enzimáticamente.

En cuanto a la caracterización de los grupos isoenzimáticos de E. histolytica se encontró que el zimodemo III fué el de mayor frecuencia, siguiendo en orden de importancia el zimodemo IV y el I. Lo cual es muy semejante a los resultados obtenidos cuando se ha investigado la frecuencia de estos zimodemos (18), todos estos considerados por Sargeaunt como zimodemos no patógenos. Cabe mencionar que el 5.34 % se encontró de E. histolytica zimodemo II, considerado como patógeno.

Los estudios realizados por Sargeaunt, Jiménez y Kumate (18,31,41), muestran porcentajes semejantes a los resultados obtenidos por nosotros.

Al estudiar los cultivos positivos en relación con el sexo, pudimos observar un porcentaje mayor en el sexo masculino y en relación a la edad fué notablemente más importante entre la edad de 20 y 30 años.

De acuerdo a la historia clínica del paciente y al estudiar las alteraciones de la motilidad gastrointestinal relacionado con el grupo isoenzimático encontrados se demostró que la diarrea y el moco estuvieron presentes en la mayoría de estos. Cabe mencionar que este tipo de pacientes, no presentaron el diagnóstico de amibiasis a su llegada al hospital ya que el problema principal del paciente era psiquiátrico.

Sin embargo creemos que de acuerdo a las estadísticas reportadas por Sargeant, y por nuestros resultados, la amibiasis intestinal en el paciente psiquiátrico presenta una tasa de infección mayor que para la demás población, lo cual a la fecha no se le había dado importancia aunque este es un problema real. Pensamos que aunque la mayor parte de estos pacientes presentaron amibas no patógenas el 5.3 % correspondieron a zimodemo II de E. histolytica, lo cual nos indica que está presente una amiba considerada patógena y consecuentemente la posi-

bilidad de aumentar el problema digestivo y tener -  
mayores consecuencias en el paciente psiquiátrico.

-----

CAPITULO VI

## C O N C L U S I O N E S

La identificación de E. histolytica por los procedimientos de rutina, es difícil ya que morfológicamente no presenta características bien definidas, a menos que se utilice una técnica de tinción especial para demostrar la presencia de núcleos, cromatina etc.

La metodología del cultivo monoaxénico, es útil ya que mediante este se pueden efectuar posteriormente las determinaciones isoenzimáticas (ZIMODEMOS) correspondiente a las amibas encontradas, por lo que es importante conocer de manera definitiva la correlación que existe entre la patología digestiva que presenta una persona y el tipo de amiba del que se trate.

En cuanto a la tasa de infección presentada por los pacientes psiquiátricos, se encontró que el 5.3% correspondió al zimodemo II considerado como patógeno y fué mayor en ellos, ya que el problema mental que presentan les impide tener las medidas de higiene necesarias para disminuir ésta tasa de infección.

El determinar el patrón isoenzimático (ZIMODEMO)

de ciertas enzimas con un patrón previamente establecido en estos pacientes, nos indicará el camino correcto a seguir en el diagnóstico y tratamiento de la amibiasis.

Sería conveniente el continuar con este tipo de estudios para determinar la relación que existe en cuanto a las amibas comensales, Entamoeba coli y Entamoeba hartmanni en la patología digestiva que presente algún paciente.

Por lo tanto consideramos de suma importancia el uso de esta metodología en todas aquellas personas en las cuales se sospeche la presencia de amibas para poder establecer el diagnóstico diferencial entre una amiba patógena y una no patógena.

Sugerimos el empleo de esta metodología como una aportación al cuerpo médico para el mejor manejo del paciente

**C A P I T U L O    V I I**

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- Beaver, P.C.; Jung, R.C.; Sherman, H.J.; Read, T.R., y Robinson, T.A.: Experimental Entamoeba histolytica infection in man. Am. J. Trop. Med. and Hyg. 5:1000, 1956.
- 2.- Becerra, E.; Minvielle, L., y Colorado, F. : -- consideraciones sobre mil casos de enfermos con amibiasis intestinal. Rev. Invest. Clin. 4;193-201, 1952.
- 3.- Boeck, W.C., y Drbohlav, J. : The cultivation - of Endamoeba histolytica. Proc. Nat. Acad. Sci. 11:235, 1925.
- 4.- Bragster, I.A., y Parr, C.W.: Trypanosome identification by electrophoresis of soluble enzymes. Nature 244:364-66 1973.
- 5.- Councilman, W.T., y Lafleur, H.A. : Amebic dysentery. Johns Hopkins Hosp. Rep. 2:395, 1891.
- 6.- Craig, C.F. : The etiology, diagnosis and treatment of amebiasis. Baltimbre, Williams and Wilkins. 1944.
- 7.- Deschiens, R. : L'Amibiase et l'Amibe Disentérique. Paris, Masson et Cie. p-29-127, 1965.
- 8.- Craig, C.F., y Faust, E.C. : Clinical Parasitology. 5a. Ed. Lea and Febiger. p-25,30, 1978.

- 9.- De la Torre, M.; Tanimoto-Weki, y Cárvez, B. --  
: Aislamiento y caracterización de cepas de E. histolytica obtenidas de portadores. VIII Seminario de Amibiasis. México, D. F. p-25, 1979.
- 10.- Diamond, L.S. : Axenic cultivation of Entamoeba histolytica. Science. 134:336, 1961.
- 11.- Diamond, L.S. : Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 - and E. histolytica like amebae. J. Parasit. 54: 1047, 1968.
- 12.- Faust, E.C. : A critical study of chemical laboratory technics for the diagnosis of protozoa - cyst and heminith eggs infeces. Am. J. Trop. -- Med. 18:169-72, 1938.
- 13.- Fournier Villada, R. : Bibliografía mexicana -- del absceso hepático. Ed. La Prensa Médica Mexicana, 1956.
- 14.- Gutierrez, G. : Manual de Infectología. 6a. Ed. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. México, p-56,65 1978.
- 15.- Hlava, J. : O.Uplavici. : Predbezne sdeleni, Ca sopsi leskaruv ceskych, 26: No. 5, 1887.
- 16.- Hoare, C.A. : Parasitological reviews. The co-- mmensal phase of Entamoeba histolytica. Exp. Pa rasit. 1:411, 1952.

- 17.- Jarumilinta, R., y Macgraith, B.G. : Enzymes of Entamoeba histolytica. World Health Organization Expert Committees of amebiasis. Teheran, — 1968.
- 18.- Jiménez, Cardoso, E. y Kumate, J. : Correlación clínica de zimodemos de E. histolytica. Arch. — Méd. (Méx.), 13 (Supl. 3): 77-81, 1982.
- 19.- Kartulis, S. : Zur Aetiologie der Dysenteriae — in Aegypten. Virchow's Arch. f. Path. Anat. 105 :521, 1886.
- 20.- Kartulis, S.: Zur Aetiologie der Leberabscesse; — Lebende Dysenterie-Amoeben in Eiter der dysente — rischen Leberabscesse. Zentral bl.f. Bakt. 1:745 1887.
- 21.- Kartulis, S. : Gehirnabscesse nach dysenterischen Leberabscessen. Zentralbl. f. Bakt. 37:527, 1904.
- 22.- Kawashima-Hashimoto, K.R.; Tanimoto-Weki, M., y — De la Torre, M.: Estudio comparativo de cepas — patógenas y no patógenas de E. histolytica con — microscopia de luz y reacciones de inmunofluore — scencia. Arch. Invest. Méd.(Méx.) 5 Supl. 1:11, 1973.
- 23.- Koch, R.: arb. kaiserl. Gesun dheitsamte, 3:1, — 1883.

- 24.- Kumate, J.; Aranda, E.: Enfermedades diarreicas en el niño. 8a. Ed. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. México, p 251-63. 1983.
- 25.- Lambl, W.D.: Beobachtungen un Studien aus dem.- Franz-Joseph Kinderspital. Teil I, 1860.
- 26.- Lewis, M.J.: Ann. Rep. San. Comm. Gov't India.- Calcuta, 1870.
- 27.- Losch, F.: Massenhafte Entwicklung von Amoben- in Dick-darm Virchow's Archiv.f. Path. Anat., - 65:196, 1875.
- 28.- Martínez, Báez, M.: Manual de Parasitología Médica 2a. Ed. México. Ed. La Prensa Médica Mexicana. p110, 1967.
- 29.- Marsden, P.D. y Schulz, M.G. : Intestinal Parasites. Gastroenterology. 57:724, 1969.
- 30.-, Philips, B.P. : Cultivation of Entamoeba histolytica with trypanosoma cruzi. Science. 111:8, - 1950.
- 31.- Reeves, R.E.; Montalvo, F. and Sillero, A. : -- Glucokinase from Entamoeba histolytica and related organism. Bioch. 6:1752, 1967.
- 32.- Reeves, R.E. y Bischoff, J.M. : Classification- of Entamoeba species by means of electrophoretic properties of amebal enzymes. J. Parasit. 54: - 594, 1968.

- 33.- Reeves, R.E.: Glycolytic enzymes in E. histolytica. Arch. Invest. Méd.(Méx.) 5: Supl. 2:411-1974.
- 34.- Robinson, G.L. : The laboratory diagnosis of - human parasitic amoebae. Tran. of the Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg. 62:285-294, 1968.
- 35.- Rodriguez Díaz, E.: Enfermedades diarreicas en el niño 8a. Ed. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. p-33,43. 1983.
- 36.- Sargeaunt, P. G. and Williams, J. E. : The morphology in culture of the intestinal amoebae - of man. Trans. of the Roy. Society of Trop. Med. and Hyg. Vol 76, No. 4, 1982.
- 37.- Sargeaunt, P. G. : Confirmation of amoebic cyst chromatoids by stain after Ridley's faecal concentration. Tran. of the Roy. Soc. of Trop. Med and Hyg. 56:12-14, 1962.
- 38.- Sargeaunt, P.G. and Williams, J.E. : The diferentiation of invasive and non invasive E. histolytica by izoenzyme electrophoresis. Trans. of the Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg. 72:519-21, 1978.

- 39.- Sargeaunt, P.G. and Williams, J.E.: Electrophoretic isoenzyme patterns of E. histolytica and E. coli. Trans. of the Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg. 72:164-66 1978.
- 40.- Sargeaunt, P.G. and Williams, J.E.: Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and — non pathogenic intestinal amoebae of man. Trans. of the Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg. 73(2): 225-27, 1979.
- 41.- Sargeaunt, P.G., Williams, Kumate, J. y Jiménez - E. : The Epidemiology of Entamoeba histolytica in México City. A pilot survey I, Trans. of — the Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg. 74:653-56, — 1980.
- 42.- Sargeaunt, P.G. and Williams, E.J. : A study of — intestinal protozoa including non-pathogenic — E. histolytica from patients in a group of Mental Hospitals. Am. J. Public Health 72:178-80, — 1982.
- 43.- Sargeaunt, P.G., Williams, J.E., Bhojnanf, R. et. al.: The epidemiology of E. histolytica in a rural and an urban area of México. A pilot survey - II. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg. in — press. 1981.
- 44.- Schaudinn, F.: Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. Arb. Gesundheitsamt., 19:

547 1902-3.

- 45.- Schaffer, J.G. y Frye, W.W.: Studies on the growth requirements of E. histolytica. I. Maintenance of a strain of E. histolytica through one hundred transplants in the absence of an actively multiplying bacterial flora. Am. J. Hyg. - 56:119 1948.
- 46.- Sepulveda, Bernardo.: La amebiasis invasora por E. histolytica. Gaceta Médica de México. 100(3) 101-253 1970.
- 47.- Treviño-García, M.N.; Castañeda, M. y Gonzalez; Angulo, A. Comparación entre los trofozoítos de E. histolytica procedentes de "portadores asintomáticos" y los obtenidos de pacientes con lesiones amebianas. Arch. Invest. Méd. (Méx.) r.5 Supl. 1:17, 1973.
- 48.- Wilmot, A.J.: Clinical Amoebiasis. Philadelphia-F.A. Davis. p-11 1962.
- 49.- Wrxal, B.G.D., y Culliford, B.J.: Athin layer - starch gel method for enzyme typing of blood stains. Journal of the Forensic Sci. 8:81-84, 1968.

- - - - -