

H - 302827
24



UNIVERSIDAD MOTOLINIA

Escuela de Química Incorporada a la
Universidad Nacional Autónoma de México

CINETICA DE FORMACION DE ANTICUERPOS EN RATAS INMU-
NIZADAS CON TRES CEPAS DE Entamoeba histolytica Y DOS
DE Entamoeba chattoni Y SU RELACION CON LAS ALTERA-
CIONES HISTOLOGICAS PRODUCIDAS.

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

MARTHA GRACIELA ESPARZA NAVARRO

Director de Tesis: Dra. Enedina Jiménez Cardoso

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1986



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.

I N D I C E

CAPITULO I

INTRODUCCION

CAPITULO II

GENERALIDADES

CAPITULO III

ABREVIATURAS

CAPITULO IV

MATERIAL

4.1.- Aparatos y material de vidrio.

4.2.- Instrumental de cirugía.

4.3.- Material biológico.

4.3.1.- Animales de experimentación.

4.3.2.- Cepas de Entamoeba.

CAPITULO V

METODO

5.1.- Cultivo monoaxénico.

5.1.1.- Siembra.

5.1.1.1.- Agar salino.

5.1.1.2.- Almidón en polvo.

5.1.1.3.- Solución de eritromicina.

5.1.1.4.- Medio "R".

5.1.1.5.- Medio "BR".

5.1.2.- Cultivo.

5.1.2.1.- Agar salino.

5.1.2.2.- Almidón en polvo.

5.1.2.3.- Solución de eritromicina.

5.1.2.4.- Bactopeptona al 20%

5.1.2.5.- Ftalato de potasio.

5.1.2.6.- Medio "BRS".

5.1.3.- Subcultivos.

5.1.3.1.- Agar salino

5.1.3.2.- Almidón en polvo.

5.1.3.3.- Solución de eritromicina.

5.1.3.4.- Bactopeptona al 20%.

5.1.3.5.- Ftalato de potasio.

5.1.3.6.- Medio "BRS".

5.1.3.7.- Solución yodoyodurada.

5.2.- Determinación de la cinética de formación de anticuerpos en ratas, como respuesta a la inoculación de las diferentes cepas en estudio.

5.2.1.- Primer grupo.- Con un período de incubación - de 30 días.

5.2.2.- Segundo grupo.- A los 15 días después de inoculadas.

5.2.3.- Tercer grupo.- 8 días posteriores a la inoculación.

- 5.2.4.- Cuarto grupo.- Ratas sin ningún tratamiento.-
- 5.3.- Sacrificio de las ratas después del período de incubación.
 - 5.3.1.- Primer grupo.- Con un período de incubación de 30 días.
 - 5.3.1.- Segundo grupo.- A los 15 días después de inoculadas.
 - 5.3.3.- Tercer grupo.- 8 días posteriores a la inoculación.
 - 5.3.4.- Cuarto grupo.- Ratas sin ningún tratamiento.
- 5.4.- Determinación de los anticuerpos en los diferentes grupos estudiados mediante hemaglutinación pasiva.
 - 5.4.1.- Primer grupo.- Con un período de incubación de 30 días.
 - 5.4.1.1.- Solución de Alsevers.
 - 5.4.1.2.- Suspensión de glóbulos rojos de carnero.
 - 5.4.1.3.- Preparación del antígeno.
 - 5.4.1.4.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 7.2.
 - 5.4.1.4.1.- Solución de fosfato de potasio monobásico 0.15M
 - 5.4.1.4.2.- Solución de fosfato de sodio dibásico 0.15 M

5.4.1.5.- Solución amortiguadora de fosfatos -
salinos pH 6.4.

5.4.1.5.1.- Solución de fosfato de -
potasio monobásico 0.15M

5.4.1.5.2.- Solución de fosfato de -
sodio dibásico 0.15 M.

5.4.1.6.- Solución de ácido tánico al 1%

5.4.1.7.- Suero normal de conejo inactivado a -
56°C.

5.4.1.8.- Adsorción de los glóbulos rojos de -
carnero.

5.4.2.- Segundo grupo.- A los 15 días después de inocu-
ladas.

5.4.3.- Tercer grupo.- 8 días posteriores a la inocula-
ción.

5.4.4.- Cuarto grupo.- Ratas sin ningún tratamiento.

5.5.- Determinación del número total de lesiones encontradas
en intestino, con respecto al número total de lesiones
posibles de acuerdo a lo establecido por Neal.

5.6.- Alteraciones histológicas en los órganos estudiados -
por microscopía de luz.

5.6.1.- Conservación de los tejidos.

5.6.1.1.- Solución de formol en fosfatos.

5.6.2.- Procesado de los tejidos.

5.6.2.1.- Deshidratación, aclaramiento e inclusión .

5.6.3.- Tinción de hematoxilina-eosina.

5.6.4.- Observaciones microscópicas.

5.7.- Alteraciones histológicas en los órganos estudiados --
por microscopía electrónica.

5.7.1.- Conservación de los tejidos.

5.7.1.1.- Solución reguladora de fosfatos - -
0.15 M pH 7.2-7.4.

5.7.1.2.- Glutaraldehído al 2.5%

5.7.1.3.- Cloruro de calcio al 1%

5.7.1.4.- Sacarosa q.p.

5.7.2.- Postfijación.

5.7.3.- Deshidratación e inclusión.

5.7.4.- Polimerización.

5.7.5.- Corte

5.7.6.- Montaje.

5.7.7.- Observación al microscopio electrónico.

CAPITULO VI

RESULTADOS.

CAPITULO VII

COMENTARIOS.

CAPITULO VIII

CONCLUSIONES

CAPITULO IX

BIBLIOGRAFIA

CAPITULO I

INTRODUCCION

El interés por conocer los eventos fisiopatogénicos de la colitis amibiana ha llevado a varios investigadores entre ellos Treviño (22), Chévez (45), Mora (25, 26), etc., a inocular amibas en el colon de animales, con el objeto de hacer una analogía -- experimental de las lesiones que produce Entamoeba histolytica al penetrar a los epitelios en el humano.

Evidentemente la formación de anticuerpos es un índice de la invasividad de Entamoeba histolytica (29), sin embargo ha sido demostrado que la presencia de amibas del intestino no siempre nos indica la presencia de la enfermedad (16, 19, 38, 42), ya que existe la posibilidad de que éstas puedan no ser invasoras.

Los estudios de Ahued (1) y Estrada (11), mostraron que existen antígenos comunes y específicos en las amibas que parasitan diferentes huéspedes de acuerdo a la escala biológica, tal es el caso de Entamoeba chattoni que parasita primates inferiores, demostrada su presencia en las heces de humanos por Burrows (4) y Levine (23).

Las alteraciones producidas por la invasión de Entamoeba histolytica a la mucosa del colon han sido estudiadas en cobayos -- (26), así como en hamsters (45, 48, 49), al inocular intracecalmente amibas, y la reacción inmunitaria determinada por diferen

tes métodos demostró que los títulos de anticuerpos después de siete días no fueron muy importantes pero éstos se van incrementando hasta después de 28 días de inoculación utilizando una cepa patógena.

Sin embargo, el hecho de que existan antígenos comunes y específicos en ambas patógenas y no patógenas no se ha evaluado con respecto a las posibilidades potenciales de ambas cepas, así como su correlación con las lesiones histológicas en tejidos.

El objetivo de este trabajo fué investigar si el título de anticuerpos determinado a diferentes períodos de incubación después de la inoculación intracecal de cinco diferentes cepas de amibas, consideradas unas como patógenas, tiene alguna correlación con la especie de la amiba inoculada, así como las lesiones producidas en los epitelios.

CAPITULO II .

GENERALIDADES

La amibiasis es una protozoosis de distribución geográfica mundial (17, 42). México es un país que presenta un elevado porcentaje de amibiasis intestinal y extraintestinal dentro de la población en general (15, 20, 47). Aunque habitualmente se considera como una infección tropical, no hay duda que su frecuencia es más elevada en los países con climas cálidos y húmedos - (3). El diagnóstico de certeza se realiza cuando se encuentran trofozoitos de E. histolytica por técnicas coproparasitoscópicas (21, 32), recientemente se practican reacciones inmunológicas - como coagulación con proteína A (7), contra inmunolectroforesis (43) y ELISA (14).

Se ha sugerido que E. histolytica requiere un medio adecuado para sobrevivir y multiplicarse y este medio aparentemente es proporcionado por la pared y la luz del intestino (15, 20). Sin embargo, hay factores como: la alimentación del huésped (2, 5, 21, 24, 50); la deficiencia de ácido ascórbico (36); así como la - aplicación de medicamentos como la cortisona (10, 30, 51), que favorecen el crecimiento de las amibas, viéndose esto aún más - complicado por factores genéticos (6) desarrollándose lesiones - extensas con manifestaciones clínicas graves que traen como consecuencia el que una buena parte de la población presente tras

tornos gastrointestinales los cuales repercuten en un problema de tipo socioeconómico para el país. Es por ello que el estudio de la amibiasis intestinal constituye una de las prioridades de los problemas de salud para los países en vía de desarrollo entre los cuales se encuentra México.

CAPITULO III

ABREVIATURAS

1.- PM-4	<u>Entamoeba chattoni</u> , Primate mexicano (4)
2.- PM-5	<u>Entamoeba chattoni</u> , Primate mexicano (5)
3.- AHM-1	<u>Entamoeba histolytica</u> , Abceso hepático - mexicano (1)
4.- HM-531	<u>Entamoeba histolytica</u> , Homo-sapiens mexicano (531)
5.- HM-1	<u>Entamoeba histolytica</u> , Homo-sapiens mexicano (1)
6.- gr	gramo
7.- lb	libra
8.- min.	minutos
9.- ml	mililitros
11- mg	miligramos
12- mM	milimolar
13- M	molar
14- nm	nanómetros
15- ug	microgramos
16- pp	precipitado
17- GRC	glóbulos rojos de carnero
18-GRCT	glóbulos rojos de carnero tanizados
19- SNC	suero normal de conejo
20- sn	sobrenadante
21-°C	grados centígrados
23- Ag	antígeno

24.- q.p.	químicamente pura
25.- L	grado de libertad
26.- t	"t de Student"
27.- p	probabilidad
28.- NS	no significativo

CAPITULO IV

MATERIAL

- 4.1.- Aparatos y material de vidrio.
 - 1.- Flujo laminar marca VECO
 - 2.- Incubadora Medi. Lab Mark L No. 415
 - 3.- Balanza analítica P-115 Bosch.
 - 4.- Centrifuga clínica modelo C-I.
 - 5.- Potenciómetro Corning modelo 5 pHmeter.
 - 6.- Refrigerador marca Whirlpool.
 - 7.- Autoclave.
 - 8.- Mechero.
 - 9.- Reloj.
 - 10.- Papel filtro Whatmann No. 1 cualitativo.
 - 11.- Jeringas de insulina desechables.
 - 12.- Micropipetas de 10, 20, 50 y 100 microlitros de "Sigma Chemical Company".
 - 13.- Placas de hemaglutinación "Cooke Microtiter U".
 - 14.- Termómetro
 - 15.- Agitador de vidrio.
 - 16.- Frascos de reactivo (blancos y ámbar)
 - 17.- Pipetas pasteur.
 - 18.- Pipetas volumétricas de 1, 5 y 10 ml.
 - 19.- Matraces aforados de 100 y 1000 ml.
 - 20.- Matraces Erlenmeyer de 125 y 250 ml.

- 21.- Vasos de precipitado de 250 y 500 ml.
- 22.- Probetas Pyrex de 100, 500 y 1000 ml.
- 23.- Tubos Pyrex con tapón de rosca de 15 X 124 mm.
- 24.- Tubos Pyrex de vidrio de 13 X 100.mm.

4.2.- Instrumental de cirugía.

- 1.- Pinzas de disección Adson.
- 2.- Tijeras Metsenbaun.
- 3.- Pinzas porta-aguja
- 4.- Hojas de rasurar.
- 5.- Aplicadores de madera.
- 6.- Isopos.
- 7.- Gasa estéril.
- 8.- Algodón.
- 9.- Tabla para cirugía.
- 10- Guantes de cirujano.
- 11- Cubrebocas.

4.3.- Material biológico.

4.3.1.- Animales de experimentación.

120 ratas de raza Long-Evans, con pesos que oscilaron entre 60 y 110 gr. Se utilizaron números aleatorios y se formaron cuatro grupos: tres de ellos se utilizaron para la parte experimental y uno como control.

4.3.2.- Cepas de Entamoeba.

Se utilizaron cinco cepas de amibas:

E. chattoni cepa PM-4, E. chattoni cepa PM-5, - -
E. histolytica cepa HM-531 y E. histolytica cepa - -
AHM-1, cultivadas monoaxénicamente; y E. histolyti-
ca cepa HM-1 cultivada axénicamente.

CAPITULO V

METODO

5.1.- Cultivo monoaxénico

5.1.1.- Siembra.

5.1.1.1.- Agar salino.- Se prepara el agar al 1.5% con cloruro de sodio al 0.7%, - el cual es distribuido en frascos - de vidrio con tapón de rosca en alícuotas de 2.5 ml cada uno, se este-rilizan a 15 lb durante 15 min. pa- ra después dejarlos enfriar en for- ma inclinada.

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

5.1.1.3.- Solución de eritromicina.- Se prepara una solución de eritromicina a - una concentración de 5 ug/ml, utilizando agua estéril para su prepara- ción, se coloca en frascos de vidrio con tapón de rosca en alícuotas de- 2.5 ml.

5.1.1.4.- Medio "R".- Se prepara una solución

concentrada de la siguiente manera:
125 gr de cloruro de sodio, 50 gr -
de ácido cítrico monohidratado, --
12.5 gr de fosfato dibásico de so--
dio, 25 gr de sulfato de amonio, -
1.25 gr. de sulfato de magnesio pen
tahidratado, 100 ml de ácido lácti-
co. Todo esto se disuelve para lle
garse a 2500 ml con agua destilada
De esta solución se toman 100 ml y
se adicionan 7.5 ml de hidróxido de
sodio al 40% y 2.5 ml de azul de -
bromotimol al 0.04%, previamente se
ajusta el pH a 7.3 y se afora a -
1000 ml con agua destilada, se este
riliza en autoclave en las condicio
nes señaladas.

5.1.1.5.- Medio "BR".- 100 ml del medio "R" -
se utilizan para sembrar una gota -
del cultivo E. coli cepa "B", se -
deja en la estufa a 37°C durante 48
horas, después de este tiempo puede
ser guardado a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO:

Aproximadamente 50 mg de materia fecal en la que se demostró la presencia de E. histolytica por el método de Faust, es sembrado en el frasco que contiene agar salino en forma inclinada, al cual se le adicionan 5 mg de almidón en polvo, 4 gotas de eritromicina preparada como se mencionó anteriormente y 2.0 ml de medio "BR". Se le deja cultivar durante 24 horas a 37° C.

5.1.2.- Cultivo.

- 5.1.2.1.- Agar salino.- El agar fué preparado de acuerdo al inciso 5.1.1.1.
- 5.1.2.2.- Almidón en polvo.- Surtido por la casa "Drug Houses" de Inglaterra.
- 5.1.2.3.- Solución de eritromicina.- La solución fué preparada de acuerdo al inciso 5.1.1.3.
- 5.1.2.4.- Bactopeptona al 20%. - Se prepara una solución de peptona al 20%, después de lo cual se esteriliza a 15 lb por 15 min, colocándose también en alícuotas de 2.5 ml.
- 5.1.2.5.- Ftalato de potasio.- Se pesan 204 gr de ftalato de potasio, se disuelven con 100 ml de cloruro de sodio al -

40%, se ajusta el pH a 6.3 y se lleva a un volúmen de 2000 ml, esterilizándose posteriormente a 15 lb - por 15 min. La solución de trabajo se utiliza llevando a cabo una dilución 1:10 con agua estéril.

5.1.2.6.- Medio "BRS".- Se utiliza el medio "BR", al cual se le adiciona el mismo volúmen de suero bovino filtrado y calentado a 56°C durante 30 minutos.

PROCEDIMIENTO:

Al frasco que contiene la siembra de la amiba se le descarta el sobrenadante con pipeta pasteur y se le adicionan 5 mg de almidón en polvo, 2 gotas de eritromicina preparada como se mencionó anteriormente, 2 gotas de peptona al 20%, 1.5 ml de ftalato de potasio (solución diluida), 2.0 ml de medio "BRS" y se le dejacultivar por otras 24 horas.

5.1.3.- Subcultivos.

5.1.3.1.- Agar salino.- El agar fué preparado de acuerdo al inciso 5.1.1.1.

- 5.1.3.2.- Almidón en polvo.- Surtido por la casa "Drug Houses" de Inglaterra.
- 5.1.3.3.- Solución de eritromicina.- La solución fué preparada de acuerdo al inciso 5.1.1.3.
- 5.1.3.4.- Bactopeptona al 20%. - La solución fué preparada de acuerdo al inciso 5.1.2.4.
- 5.1.3.5.- Ftalato de potasio.- La solución fué preparada de acuerdo al inciso 5.1.2.5.
- 5.1.3.6.- Medio "BRS".- La solución fué preparada de acuerdo al inciso 5.1.2.6.
- 5.1.3.7.- Solución yodoyodurada.- Se preparó mezclando un gramo de yodo, 2 gr de yoduro de potasio y 300 ml de agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

Con todo cuidado, del fondo del frasco que contiene el cultivo de las amibas, se toma con una pipeta pasteur una gota que se coloca en un portaobjetos y se le adiciona una gota de la solución yodoyodurada, se le pone un cubreobjetos para hacer la observación al microscopio.

pio del crecimiento del cultivo, las amibas - viables deberán verse teñidas por la solución yodoyodurada. También del fondo del frasco se toma una gota como inóculo para hacer el segundo subcultivo, que es preparado en la misma forma como se describe para el primero. Se les deja incubar durante 48 horas a 37°C para hacer luego la segunda observación. En un cultivo positivo empiezan a aparecer las amibas - dentro de las primeras 48 horas, pero se sigue cultivando hasta tener aproximadamente - 50,000 amibas por ml.

5.2.- Determinación de la cinética de formación de anticuerpos en ratas como respuesta a la inoculación de las diferentes cepas en estudio.

5.2.1.- Primer grupo.- Estuvo constituido por 50 ratas, 10 por cada cepa, a las que mediante técnica quirúrgica se les inoculó 500,000 trofozoitos de amibas, contenidas en 1 ml, de las cinco cepas en estudio intracecalmente y se les dejó 30 días de incubación.

5.2.2.- Segundo grupo.- A 35 ratas se les inoculó mediante técnica quirúrgica intracecalmente e -

intestinalmente, 500,000 trofozoítos de amibas contenidas en 1 ml de cada cepa de entamoeba en estudio, 7 ratas por cepa. Se les dejó un período de incubación de 15 días.

5.2.3.- Tercer grupo.- Estuvo constituido por 35 ratas a las que se inoculó mediante técnica quirúrgica intracecalmente e intestinalmente -- 500,000 trofozoítos de amibas contenidos en 1 ml de las cinco cepas de amibas en estudio, 7 ratas por cada cepa y se les dejó durante 8 días.

5.2.4.- Cuarto grupo.- (Grupo control).- Estuvo constituido por 5 ratas a las que mediante técnica quirúrgica se les inoculó con un placervo.

5.3.- Sacrificio de las ratas después de los períodos de incubación.

5.3.1.- A los 30 días de incubación se procedió al sacrificio de los animales, que se llevó a cabo de la siguiente manera: los animales se anestesiaron con éter etílico anhidro, se les rasuró el abdomen donde se les colocó -- un antiséptico cutáneo para llevar a cabo la laparotomía. Se les extrajo 2 ml de sangre por punción cardiaca y se extirparon el intest

tino y el hígado. Se midió la longitud del intestino, contando el número de abcesos presentes y la distancia a la que se encontraron.

5.3.2.- Las ratas con 15 días posteriores a la inoculación de las amibas fueron sometidas al mismo procedimiento que se relató en el inciso 5.3.1

5.3.3.- Después de 8 días de incubación con las amibas se llevó a cabo el mismo procedimiento del inciso 5.3.1.

5.3.4.- Las ratas del grupo control se sacrificaron por el mismo procedimiento del inciso 5.3.1

5.4.- Determinación de los anticuerpos en los diferentes grupos estudiados por hemaglutinación pasiva.

5.4.1.- Primer grupo.- La sangre extraída por punción cardíaca de ratas con el período de incubación de 30 días, fué centrifugada a 1000 X g por 15 min y al suero así obtenido se le determinó el título de anticuerpos.

5.4.1.1.- Solución de Alsevers.- Se pesaron 2.05 gr de glucosa, 0.8 gr de citrato de sodio, 0.085 gr de ácido cítrico y 0.42 gr de cloruro de sodio, -- los cuales fueron disueltos y se lle

varon a un volúmen de 100 ml con --
agua destilada. Se esterilizó duran-
te 10 minutos.

5.4.1.2.- Suspensión de glóbulos rojos de car-
nero.- Se tomó un volúmen igual de -
glóbulos rojos de carnero a la solu-
ción de alsevers ya preparada, y se
guardó en refrigeración a 4°C duran-
te 10 días para su maduración.

5.4.1.3.- Preparación del antígeno.- Se tomó --
1 ml de todas y cada una de las ce-
pas de amibas y se homogeneizaron, -
el sobrenadante constituyó el antígeno,
la cantidad de proteínas fué de
más de 2 mg/ml.

5.4.1.4.- Solución amortiguadora de fosfatos -
salinos pH 7.2.

5.4.1.4.1.- Solución de fosfato de -
potasio monobásico 0.15M.
Se pesaron 10.20 gr de -
fosfato de potasio mono-
básico y se disolvieron
en 500 ml de agua desti-
lada.

5.4.1.4.2.- Solución de fosfato de - sodio dibásico.- Se pesaron 20.15 gr de fosfato de sodio dibásico y se disolvieron en 500 ml de agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

Se mezclaron 24 ml de la solución de fosfato de potasio monobásico con 76 ml de la solución de fosfato de sodio dibásico y 100 ml de solución salina isotónica al 0.085%

5.4.1.5.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4.

5.4.1.5.1.- Solución de fosfato de potasio monobásico 0.15M
La solución fué preparada de acuerdo al inciso 5.4.1.4.1

5.4.1.5.2.- Solución de fosfato de sodio dibásico 0.15 M - la solución fué preparada de acuerdo al inciso 5.4.1.4.2.

PROCEDIMIENTO:

Se mezclaron 67.8 ml de la solución de fosfato monobásico con 32.2 ml de la solución de fosfato de sodio dibásico y 100 ml de la solución salina isotónica al 0.085%.

5.4.1.6.- Solución de ácido tánico al 1%. - Se pesó 1 gr de ácido tánico y se le - adicionó 99 ml de solución salina - isotónica al 0.085%, se guardó en refrigeración a 4°C. De esta solución se hizo una dilución 1:200, para tener la solución final de trabajo de ácido tánico - -- 1:20,000.

5.4.1.7.- Suero normal de conejo inactivado a 56° C.- Por punción cardíaca se extrajo la sangre - de un conejo de la raza Hueva Zelanda con - un peso aproximado de 3 Kg y se centrifugó a 500 X g durante 15 min y se separó el suero almacenándolo en un frasco para ser inactivado a 56°C durante 30 minutos.

5.4.1.8.- Adsorción de los glóbulos rojos de carnero.- Se tomaron 3 ml de los glóbulos rojos de - carnero almacenados en solución de alsevers

estéril, se lavaron 3 veces con solución salina y se preparó una suspensión al 2% de glóbulos rojos de carnero. Después se le añadió 3 ml de suero normal de conejo inactivado y se les dejó reposar durante toda una noche en refrigeración a 4°C. Al día siguiente se centrifugó a 500 X g durante 15 min y se separó el suero de conejo absorbido y se diluyó 1:100.

Se tomó el paquete de glóbulos rojos de carnero y se le añadió 3 ml de ácido tánico diluido 1:20,000, el cual se incubó a 37°C en la estufa durante 10 minutos.

Posteriormente se centrifugó a 500 X g durante 15 min y se descartó el sobrenadante, se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 7.2 y se centrifugó a 500 X g en donde se descartó el sobrenadante y se volvió a lavar con solución amortiguadora de fosfatos salinos

pH 6.4.

A los glóbulos rojos de carnero tanizados se les adicionó 4 ml de solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4 y 1 ml del antígeno, se - centrifugó a 500 X g durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y - se le añadió 2 ml de suero normal de conejo diluido 1:100.

El sedimento se volvió a centrifu--gar y se le agregó nuevamente 5 ml - de suero normal de conejo diluido - 1:100.

Se preparó un control positivo con 1 ml de glóbulos rojos de carnero tanizados al 2% con 4 ml de solución -- amortiguadora de fosfatos salinos - pH 6.4 y 1 ml de la cepa HM-1 homoge nizada y el suero fué de un paciente con absceso hepático amibiano y/o co litis amibiana. El control negativo fué preparado con 1 ml de glóbulos - rojos de carnero tanizados al 2% más 4 ml de solución amortiguadora de -

fosfatos salinos pH 6.4 en ausencia de antígeno amibiano.

PROCEDIMIENTO:

Utilizando placas de limbro se llevaron a cabo diluciones de los sueros-
obtenidos de las ratas en proporción
logarítmica, es decir, 1:2, 1:4, --
1:8, 1:16, 1:32, etc., teniendo como
diluyente el suero normal de conejo-
absorbido diluido 1:100.

Posteriormente se les añadió 50 lambdas
de glóbulos rojos de carnero ta-
nizados al 2% forrados con las dife-
rentes cepas amibianas y se les dejó
reposar durante 24 horas.

5.4.2.- Segundo grupo.- Se llevó a cabo la -
misma metodología enunciada del inciso
5.4.1.1 al inciso 5.4.1.8.

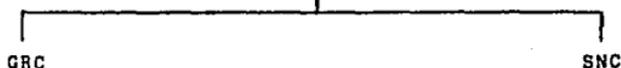
5.4.3.- Tercer grupo.- Se llevó a cabo la --
misma metodología enunciada del inciso
5.4.1.1 al inciso 5.4.1.8.

5.4.4.- Cuarto grupo.-Se llevó a cabo la mis
ma metodología enunciada del inciso-
5.4.1.1 al inciso 5.4.1.8.

ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO:

GRC + SNC
CENTRIFUGACION

(10 minutos)



+

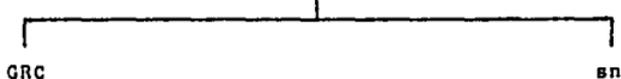
Acido Tánico 1:200

Incubar 10 min a 37°C

(diluyente para -
los sueros pro--
blema)

CENTRIFUGACION

(5 minutos)



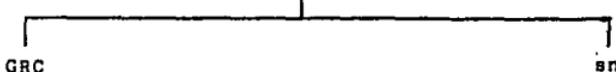
resuspender con amorti

guador fosfato salino

pH 7.2

CENTRIFUGACION

(5 minutos)



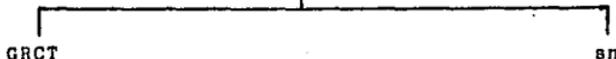
resuspender con amorti

guador fosfato salino

pH 6.4

CENTRIFUGACION

(5 minutos)



PREPARACION DEL ANTIGENO:

Ag. "A"

4 ml amortiguador
fosfato salino
pH 6.4

1 ml glóbulos rojos
de carnero
tanizados

1 ml solución suero
problema

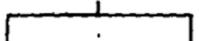
Ag. "B"

5 ml amortiguador
fosfato salino
pH 6.4

1 ml glóbulos rojos
de carnero
tanizados

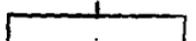
SE DEJAN REPOSAR 10 MINUTOS A TEMPERATURA AMBIENTE

CENTRIFUGACION "A"



Glóbulos rojos de
carnero tanizados
+ Ag (resuspender
en el volúmen ne-
cesario con suero
normal de conejo)

CENTRIFUGACION "B"



Glóbulos rojos de
carnero tanizados
(resuspender con
1 ml de suero nor-
mal de conejo)

5.5.- Determinación del número de lesiones encontradas en intestino con respecto al número total de lesiones posibles de acuerdo a lo establecido por Neal. (27, 28)

El intestino de las ratas fué sacado entero, colocado sobre una superficie plana y medido a las diferentes - distancias donde se encontró los abscesos así como con - tado el número de ellos presentes para determinar el - índice de virulencia de acuerdo a la fórmula de Neal - (27, 28)

		Número total de lesiones presentes - en el intestino de los animales estu- diados.
Determinación del índice de virulencia	=	----- Número máximo posible de lesiones -- presentes en el intestino de los ani- males estudiados.

Para ello fué necesario determinar la frecuencia del - número de lesiones clasificándolos en grupos de la siguiente manera:

Grupo "1" .-	Presencia de 4 a 7 lesiones.
Grupo "2" .-	Presencia de 8 a 10 lesiones.
Grupo "3" .-	Presencia de 11 a 13 lesiones.

Por ejemplo:

En un estudio de cinco animales, uno de ellos se situó en el grupo "1", tres animales se si

taron dentro del grupo "2", y un animal se situó dentro del grupo "3". El número posible de lesiones en los cinco animales se considera dentro del grupo "3", por lo que el índice de virulencia se calcula de la siguiente forma:

$$\frac{(1 \times "1") + (3 \times "2") + (1 \times "3")}{5 \times "3"} \times 100 =$$

$$\frac{10}{15} \times 100 = 66.66\%$$

5.6.- Alteraciones histopatológicas en los órganos estudiados por microscopía de luz.

5.6.1.- Conservación de los tejidos.

5.6.1.1.- Solución de formol en fosfatos.- Se toma la densidad del formol para hacer una solución al 10% con agua.- Se toman 100 ml de la solución de formol al 10% y se le agregan 900 ml de agua destilada, 4 gr de fosfato de sodio monobásico y 6.5 gr de fosfato de sodio dibásico.

PROCEDIMIENTO:

Los intestinos y los hígados de las ratas inoculadas fueron colocados en formol al 10% para llevarse a cabo el estudio histopatológico por el Dr. Juan Manuel Jiménez, Jefe del Departamento de Microscopía -- Electrónica del Hospital 20 de Noviembre.

5.6.2.- Procesado de los tejidos.- Se sometieron a deshidratación en el procesador de tejidos "American Optical" No. 8000.

5.6.2.1.- Deshidratación, aclaramiento e inclusión .- Se deshidrataron con tres alcoholes al 96%, tres alcoholes absolutos, tres agentes aclarantes como el xilol-xileno, tres parafinas y una parafina más para hacer la inclusión del tejido y formar el cubo para su corte.

La inclusión se llevó a cabo en parafina y el corte realizado se hizo en un microtomo Modelo 820 "American Optical", a un espesor de 3 mi

cras. Posteriormente se tendió el -
corte en un baño de flotación a una
temperatura de 46°C marca "Voekel".
Aquí se tomó el corte en el portaobj
jetos y se llevó a una estufa mode-
lo HDT-27 a una temperatura de 50°C

5.6.3.- Tinción de hematoxilina-eosina.- Después de -
llevar a cabo el proceso de desparafinización
e hidratación se tiñó con la hematoxilina-eo-
sina. Posteriormente se deshidrató con tres
alcoholes al 96%, tres alcoholes absolutos y -
un alcohol-Xilol en partes iguales (1:1) y -
tres agentes aclarantes (xilol) cubiertos con
resina sintética y añadiendo un cubreobjetos-
de 24 X 40 mm, para su estudio al microscopio
de luz.

5.6.4.- Observaciones microscópicas.- El estudio de -
microscopía de luz se llevó a cabo tomando en
cuenta los siguientes parámetros:

- a) Presencia de abscesos
- b) amibas
- c) necrosis
- d) actividad en bordes
- e) inflamación

- f) linfocitos
- g) polimorfonucleares
- h) macrófagos
- i) células plasmáticas
- j) fibroblastos
- k) microorganismos
- l) esférulas
- m) granulomas

Así como la apreciación cuantitativa:

- (+) presencia
- (++) cantidad moderada
- (+++) abundantes o extensa

5.7.- Alteraciones histopatológicas en los órganos estudiados por microscopía electrónica.

5.7.1.- Conservación de los tejidos.

5.7.1.1.- Solución reguladora de fosfatos --
0.15 M pH 7.2-7.4.

Solución A.- Fosfato de sodio dibásico.-Se pesaron 2.84 gr y se disolvieron en 100 ml de agua destilada.

Solución B.- Fosfato de sodio monobásico.-Se pesaron 2.76 gr y se le

disolvieron en 100 ml de agua destilada. Para hacer la solución se tomaron 40.5 ml de la solución A, -- 9.5 ml de la solución B y 50 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.4

5.7.1.2.- Glutaraldehído al 2.5% en solución reguladora de fosfatos.- Se tomaron 2.5 ml de glutaraldehído y se disolvió en 97.5 ml de solución reguladora de fosfatos.

5.7.1.3.- Cloruro de calcio al 1%.-- Se pesó 1 gr de cloruro de calcio y se disolvió en 99 ml de agua destilada

5.7.1.4.- Sacarosa q.p.- Se pesaron 10 gramos.

Metodología:

Se hizo una solución de glutaraldehído al 2.5% en solución reguladora de fosfatos 0.15 M pH 7.2-7.4, y se le agregó 10 gotas de cloruro de calcio al 1 %.

Se preparó también una solución lavadora de la siguiente manera: a 100 ml de la solución reguladora de

fosfatos se le agregaron los 10 gramos de sacarosa q.p. y 10 gotas de calcio al 1%.

PROCEDIMIENTO:

Para conservar las muestras de tejido se toma una porción del mismo y se deja máximo 2 horas en glutaraldehído, después de este tiempo, el tejido se pasa a la solución lavadora donde se conserva en refrigeración hasta se estudie.

- 5.7.2.- Postfijación.- Se usó el fijador de Palade - modificado a base de tetraóxido de osmio a un pH de 7.4. (El tiempo transcurrido entre la toma de la biopsia y su inmersión en el fijador, debe ser lo más breve posible y mantenerse en un recipiente con hielo fundente).
- 5.7.3.- Deshidratación e inclusión.- La inclusión se hizo en cápsulas de gelatina, se empleó el Epon 812 mezclado con: DMP-30; Anhídrido dodecénico succínico; anhídrido metil nádic.
- 5.7.4.- Polimerización.- La polimerización se llevó a cabo en una estufa a 70°C en un lapso que pueda variar de 5 a 10 días.

5.7.5.- Corte.- Una vez que la polimerización fué adecuada, se talló una pirámide de la cápsula en el polo donde se encontró el tejido. Se prepararon cuchillas de recortes de vidrio y se colocó en el ultramicrotomo y se hicieron cortes de 600 a 900 Amstrongs de espesor.

5.7.6.- Montaje.- Se hizo en rejillas de cobre para que los electrones actuaran directamente sobre el tejido.

5.7.7.- Observación al microscopio electrónico.- Para hacer la observación microscópica, no hubo necesidad de hacer tinción cromática, esto se debe a que en microscopía electrónica se usa un haz de electrones y no de luz. No puede darse un límite de tiempo para hacer las observaciones, ya que éste puede variar desde horas, días o meses de acuerdo a la complejidad del problema. Una vez localizados los campos adecuados, se les tomaron fotografías y su interpretación se hizo en las copias fotostáticas.

CAPITULO VI

RESULTADOS

La sobrevivencia de los animales inoculados con las cinco diferentes cepas estudiadas se presenta en el cuadro 1, en donde se determinó además el porcentaje de ésto, con el objeto de hacer diferencias en la patogenicidad de estas cepas

CUADRO 1
SOPREVIVENCIA DE ANIMALES INOCULADOS

DÍAS DE INOCULACIÓN	D. 11. C.			D. 11. E.			F. H. I.			H. 531			H. 1		
	30	15	6	8'	17'	2	30	17	8	30	15	8	30	15	8
SOPREVIVENCIA DE ANIMALES INOCULADOS	5/10	5/7	6/7	10/10	7/7	7/7	11/10	5/7	5/7	5/10	6/7	4/7	5/10	7/7	4/7
PORCENTAJE	50%	71.42%	85.71%	100%	100%	100%	80%	65.71%	71.42%	50%	65.71%	57.14%	83%	100%	71.42%

El cuadro 2, muestra los resultados obtenidos de medir el número de lesiones causadas en el intestino de las ratas por cada una de las cepas estudiadas en los tres diferentes periodos de incubación.

ABSCESOS EN INTESTINO

30 DIAS

CUADRO 2

CEPA PM 4		CEPA PM 5		CEPA AHMI		CEPA HM53I		CEPA HMI	
No.	Abscesos	No.	Abscesos	No.	Abscesos	No.	Abscesos	No.	Abscesos
53	8	38	9	21	13	58	11	1	9
54	11	39	7	22	9	59	6	2	11
55	9	40	7	23	6	60	8	3	11
56	7	41	5	24	12	61	6	4	10
56	9	42	8	25	0	62	10	5	11
		43	7	26	6	63	5	6	8
		44	10					7	11
		45	11					8	10
		46	6						
		47	11						

ABSCESOS EN INTESTINO

15 DIAS

CEPA PM 4		CEPA PM 5		CEPA AHMI		CEPA HM53I		CEPA HMI	
No.	Abscesos	No.	Abscesos	No.	Abscesos	No.	Abscesos	No.	Abscesos
85	10	48	7	27	5	64	8	9	9
86	7	49	10	28	5	65	10	10	5
87	6	50	8	29	13	66	7	11	6
88	7	51	9	30	10	67	10	12	8
89	6	52	7	31	11	68	6	13	12
		76	9	32	8	69	10	14	11
		77	12					15	10

ABSCESOS EN INTESTINO

8 DIAS

CEPA PM 4		CEPA PM 5		CEPA AHMI		CEPA HM53I		CEPA HMI	
No.	Abscesos	No.	Abscesos	No.	Abscesos	No.	Abscesos	No.	Abscesos
90	7	78	7	33	9	70	7	16	12
91	7	79	4	34	10	71	9	17	8
92	10	80	6	35	8	72	3	18	8
93	7	81	9	36	9	73	6	19	8
94	7	82	9	37	10	74	6	20	10
95	9	83	9			75	8		
		84	10						

El contar por frecuencia el número de lesiones presentes en las ratas sometidas a este estudio, dió los resultados contrados en el cuadro 3.

GRADOS DE LESION

30 DIAS

CUADRO 3

CEPA PM4		CEPA PM5		CEPA AHMI		CEPA HM531		CEPA HMI	
No.	*Lesion	No.	*Lesion	No.	*Lesion	No.	*Lesion	No.	*Lesion
53	II	38	II	21	III	58	III	1	II
54	III	39	I	22	II	59	I	2	I
55	II	40	I	23	I	60	II	3	III
56	I	41	I	24	III	61	I	4	II
57	II	42	II	25	I	62	II	5	III
		43	I	26	I	63	I	6	II
		44	II					7	III
		45	III					8	II
		46	I						
		47	III						

GRADOS DE LESION

15 DIAS

CEPA PM4		CEPA PM5		CEPA AHMI		CEPA HM531		CEPA HMI	
No.	*Lesion	No.	*Lesion	No.	*Lesion	No.	*Lesion	No.	*Lesion
85	II	48	I	27	I	64	II	9	II
86	I	49	II	28	I	65	II	10	I
87	I	50	II	29	III	66	I	11	I
88	I	51	II	30	II	67	II	12	II
89	I	52	I	31	III	68	I	13	III
		76	II	32	II	69	II	14	III
		77	III					15	II

GRADOS DE LESION

8 DIAS

CEPA PM4		CEPA PM5		CEPA AHMI		CEPA HM531		CEPA HMI	
No.	*Lesion	No.	*Lesion	No.	*Lesion	No.	*Lesion	No.	*Lesion
90	I	78	I	33	II	70	I	16	III
91	I	79	I	34	II	71	II	17	II
92	II	80	I	35	II	72	I	18	II
93	I	81	II	36	II	73	I	19	II
94	I	82	II	37	II	74	I	20	II
95	II	83	II			75	II		
		84	II						

La determinación del índice de virulencia fué llevada a cabo - de acuerdo a lo establecido por Neal (27, 28), donde se toman los valores obtenidos en las dos tablas anteriores y los porcentajes resultantes se representan en el cuadro 4.

CUADRO 4

Porcentaje del No. de Lesiones Encontradas con Respecto al No. Total de Lesiones Posibles

No. de Días	P M 4	P M 5	A H H I	H I 531	H U I
30	66,66%	56,66%	61,11%	55,55%	83,33%
15	33,33%	11,90%	66,66%	37,5%	66,66%
8	44,44%	82,38%	66,66%	44,44%	70,37%

La cinética del título de anticuerpos medidos por hemaglutinación pasiva en los tres periodos de incubación y en las cinco cepas estudiadas se presenta en el cuadro 5.

TITULOS DE HEMAGLUTINACION

30 DIAS

CUADRO 5

CEPA PM 4		CEPA PM 5		CEPA AHM 1		CEPA HM 531		CEPA HMI	
No.	Título	No.	Título	No.	Título	No.	Título	No.	Título
53	1:40	38	1:80	21	1:1280	58	1:1	1	1:160
54	1:80	39	1:160	22	1:160	59	1:1	2	1:160
55	1:80	40	1:320	23	1:160	60	1:1	3	1:80
56	1:40	41	1:160	24	1:1280	61	1:1	4	1:80
57	1:80	42	1:320	25	1:160	62	1:1	5	1:40
		43	1:80	26	1:40	63	1:1	6	1:80
		44	1:40					7	1:40
		45	1:80					8	1:160
		46	1:80						
		47	1:40						

TITULOS DE HEMAGLUTINACION

15 DIAS

CEPA PM 4		CEPA PM 5		CEPA AHM 1		CEPA HM 531		CEPA HMI	
No.	Título	No.	Título	No.	Título	No.	Título	No.	Título
85	1:40	48	1:80	27	1:80	64	1:1	9	1:160
86	1:40	49	1:160	28	1:160	65	1:1	10	1:160
87	1:40	50	1:320	29	1:160	66	1:1280	11	1:40
88	1:20	51	1:80	30	1:160	67	1:2560	12	1:80
89	1:80	52	1:160	31	1:160	68	1:1280	13	1:40
		76	1:80	32	1:80	69	1:1280	14	1:80
		77	1:160					15	1:40

TITULOS DE HEMAGLUTINACION

8 DIAS

CEPA PM 4		CEPA PM 5		CEPA AHM 1		CEPA HM 531		CEPA HMI	
No.	Título	No.	Título	No.	Título	No.	Título	No.	Título
90	1:80	78	1:160	33	1:160	70	1:160	16	1:160
91	1:80	79	1:320	34	1:80	71	1:160	17	1:160
92	1:80	80	1:80	35	1:80	72	1:320	18	1:80
93	1:160	81	1:80	36	1:80	73	1:320	19	1:160
94	1:80	82	1:1	37	1:160	74	1:80	20	1:160
95	1:40	83	1:1			75	1:640		
		84	1:1						

El tratamiento estadístico de comparar el número de lesiones presentes después de 30 días de incubación fué llevado a cabo mediante la prueba estadística "t de Student" no pareada, así como los títulos de hemaglutinación los cuales se presentan en el cuadro 6

CUADRO 6

		NUMERO DE LESIONES 30 DIAS.				
		PM-4	PM-5	AM-1	HM-531	HM-1
PM-4	t		0.687	0.508	0.509	1.834
	*L		13	9	9	11
	p		N.S.	N.S.	N.S.	0.10
PM-5	t	1.486		0.254	0.580	2.471
	*L	13		14	14	16
	p	0.10		N.S.	N.S.	0.025
AM-1	t	1.010	1.007		0.000	1.426
	*L	9	14		10	12
	p	0.10	0.05		N.S.	0.10
HM-531	t	7.123	3.006	2.107		2.551
	*L	9	14	10		12
	p	<0.001	0.005	0.05		0.025
HM-1	t	1.441	0.880	1.900	4.583	
	*L	11	10	12	12	
	p	0.10	N.S.	0.05	<0.001	

HEMAGLUTINACIONES 30 DIAS.

Este mismo tratamiento estadístico se utilizó para ver si había diferencia entre las cinco cepas estudiadas después de - 15 días de incubación. El cuadro 7 nos muestra los resultados obtenidos del número de lesiones así como el título de anticuerpos.

CUADRO 7

		NUMERO DE LESIONES 15 DIAS				
		PM-4	PM-5	AMM-1	NM-531	NM-1
PM-4	t		1.643	0.907	1.258	1.154
	*L		10	9	9	10
	p		0.20	N.S.	0.20	N.S.
PM-5	t	2.639		0.134	0.383	0.121
	*L	10		11	11	12
	p	0.025		N.S.	N.S.	N.S.
AMM-1	t	4.329	0.397		0.110	0.029
	*L	10	11		10	11
	p	<0.001	N.S.		N.S.	N.S.
NM-531	t	2.353	2.530	2.372		0.172
	*L	9	11	10		11
	p	0.025	0.025	0.025		N.S.
NM-1	t	1.622	1.646	1.764	2.711	
	*L	10	12	11	11	
	p	0.10	0.10	0.10	0.02	

HEMAGLUTINACIONES 15 DIAS

El cuadro 8 nos muestra el número de lesiones después de 8 días de incubación así como los títulos de hemaglutinación tratadas estadísticamente en la forma antes mencionada.

CUADRO 8

		NUMERO DE LESIONES, 0 DIAS				
		PM-4	PM-8	AHM-1	HM-831	HM-1
PM-4	t		0.118	1.985	1.326	1.456
	*L		11	9	10	9
	p		N.S.	0.05	0.20	0.20
PM-8	t	0.103		1.459	1.035	1.205
	*L	11		10	11	10
	p	N.S.		0.20	N.S.	0.20
AHM-1	t	1.011	0.364		2.714	0.000
	*L	9	10		9	8
	p	N.S.	N.S.		0.02	N.S.
HM-831	t	2.314	2.107	1.819		2.284
	*L	10	11	9		9
	p	0.025	0.10	0.08		0.05
HM-1	t	2.505	0.956	1.265	1.482	
	*L	9	10	8	9	
	p	0.025	N.S.	0.20	0.10	

HEMAGLUTINACIONES 8 DIAS

Con el objeto de investigar si había un incremento entre el número de lesiones producidas y el tiempo de incubación de las cepas inoculadas en este estudio, se llevó a cabo el tratamiento estadístico el cual se presenta en el cuadro 9, en donde también se analizó el título de anticuerpos obtenidos de la vacuna estudiada.

CUADRO 9

		NUMERO DE LESIONES		
		8 DIAS	15 DIAS	30 DIAS
PM-4	8 DIAS	F	1.708	1.140
		L	9	9
		P	N.S.	N.S.
15 DIAS	F	2.181	1.810	
	L	9	9	
	P	0.05	0.10	
30 DIAS	F	1.143	1.443	
	L	9	9	
	P	N.S.	0.20	
HEMAGLUTINACION				
		NUMERO DE LESIONES		
		8 DIAS	15 DIAS	30 DIAS
PM-5	8 DIAS	F	1.089	0.372
		L	12	18
		P	N.S.	N.S.
15 DIAS	F	1.037	0.788	
	L	12	18	
	P	N.S.	N.S.	
30 DIAS	F	0.814	0.261	
	L	18	18	
	P	N.S.	N.S.	
HEMAGLUTINACION				
		NUMERO DE LESIONES		
		8 DIAS	15 DIAS	30 DIAS
AHM-1	8 DIAS	F	0.383	0.705
		L	9	10
		P	N.S.	N.S.
15 DIAS	F	0.630	0.424	
	L	9	10	
	P	N.S.	N.S.	
30 DIAS	F	1.490	1.989	
	L	9	10	
	P	0.10	0.10	
HEMAGLUTINACION				
		NUMERO DE LESIONES		
		8 DIAS	15 DIAS	30 DIAS
HM-531	8 DIAS	F	1.801	0.888
		L	10	10
		P	0.10	N.S.
15 DIAS	F	1.668	0.882	
	L	10	10	
	P	0.08	N.S.	
30 DIAS	F	3.403	2.711	
	L	10	10	
	P	0.008	0.07	
HEMAGLUTINACION				
		NUMERO DE LESIONES		
		8 DIAS	15 DIAS	30 DIAS
HM-1	8 DIAS	F	0.365	1.186
		L	10	11
		P	N.S.	N.S.
15 DIAS	F	2.089	1.614	
	L	10	18	
	P	0.20	0.08	
30 DIAS	F	1.841	0.820	
	L	11	18	
	P	0.10	N.S.	
HEMAGLUTINACION				



Figura 1.- Inflamación granulomatosa constituida por linfocitos, células - plasmáticas, en el intestino de las ratas inoculadas con Entamoeba chattoni cepa PM 4, con un período de incubación de 30 días, vistas al microscopio de luz. G) Granuloma.

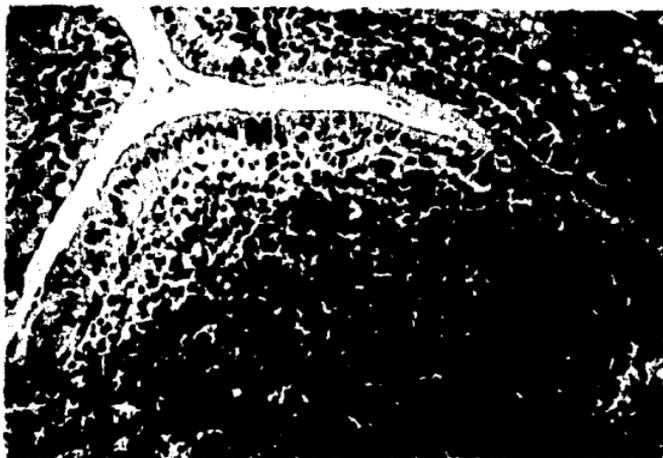


Figura 2.- Inflamación granulomatosa y alteraciones en las microvellosidades del intestino de ratas inoculadas con Entamoeba chattoni - cepa PM 5 a los 30 días de incubación, observadas al microscopio de luz. G) Granuloma. M) Microvellosidades.

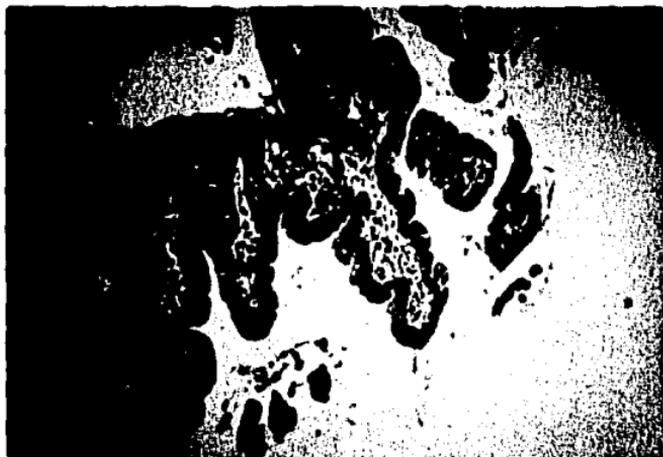


Figura 3.- Microvellosidades de células intestinales de las ratas inoculadas con Entamoeba histolytica cepa AHM 1, con un tiempo de incubación de 30 días, vistas al microscopio de luz. M) Microvellosidades.

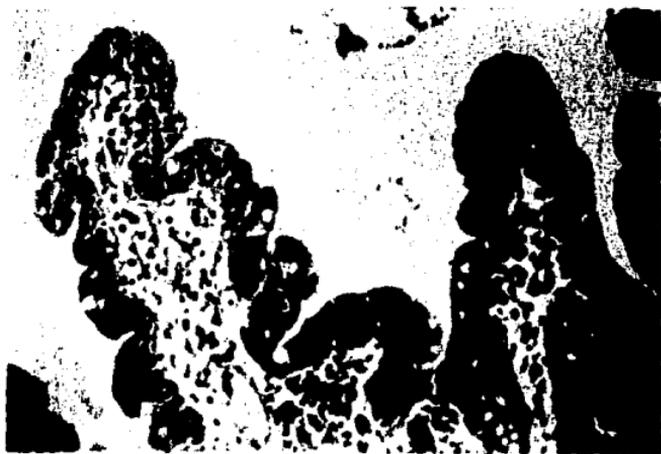


Figura 4.- Presencia de inflamación por linfocitos en las células intestinales de ratas inculadas con Entamoeba histolytica cepa HM 531, - con un período de incubación de 30 días, observadas al microscopio de luz. M)Microvellosidades. L)Linfocitos.



Figura 5.- Granuloma y alteraciones en las microvellosidades de las células intestinales en las ratas inoculadas con Entamoeba histolytica cepa HM 1, a los 30 días de incubación, vistas al microscopio de luz. G)Granuloma, M)Microvellosidades.



Figura 6.- Microfotografía electrónica del intestino que muestra las microvelosidades de las células intestinales de las ratas control - (normales). 9,600 X.



Figura 7.- En la microfotografía electrónica (A) se ve el intestino de la ratona inoculada con Entamoeba chatmani (ca. 15 d.), con un tiempo de incubación de 30 días, se observan alteraciones en las formas y disposición de las células intestinales. (A) y (B) Microvellosidades normales. B) Microvellosidades alteradas.



Figura 8.- Microscopia electrónica del intestino de ratas inoculadas con -
Entamoeba chattoni cepa PM 5, con un período de incubación de 30
días. 4,600 X. A) Microvellonidades intestinales normales. - -
B) Microvellonidades cortas y alteradas.

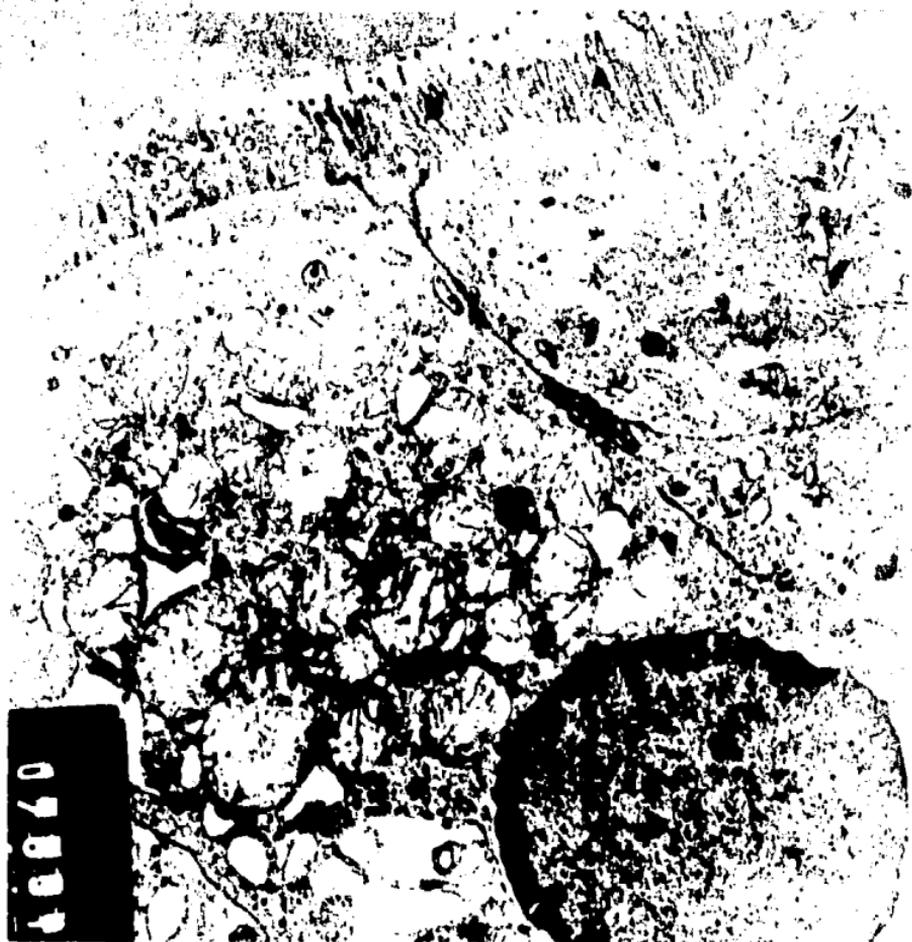


Figura 3.- Microscopía electrónica que muestra las alteraciones en las crevillidades de los enterocitos intestinales de ratón infectado con *Entamoeba histolytica* cepa AN 1, a los 12 días de infección. 4,000 X. A: Mitochondriones normales. E: Mitochondrion del enterocito.



Figura 13.- Alteraciones en las microvellosidades de las células intestina-
les de ratas cuando se les inoculó con Entamoeba histolytica -
 cepa H2-31, en un tiempo de incubación de 30 días. 4,600 X. A) Microvellosidades normales. B) Microvellosidades vistas desde
el ángulo superior.

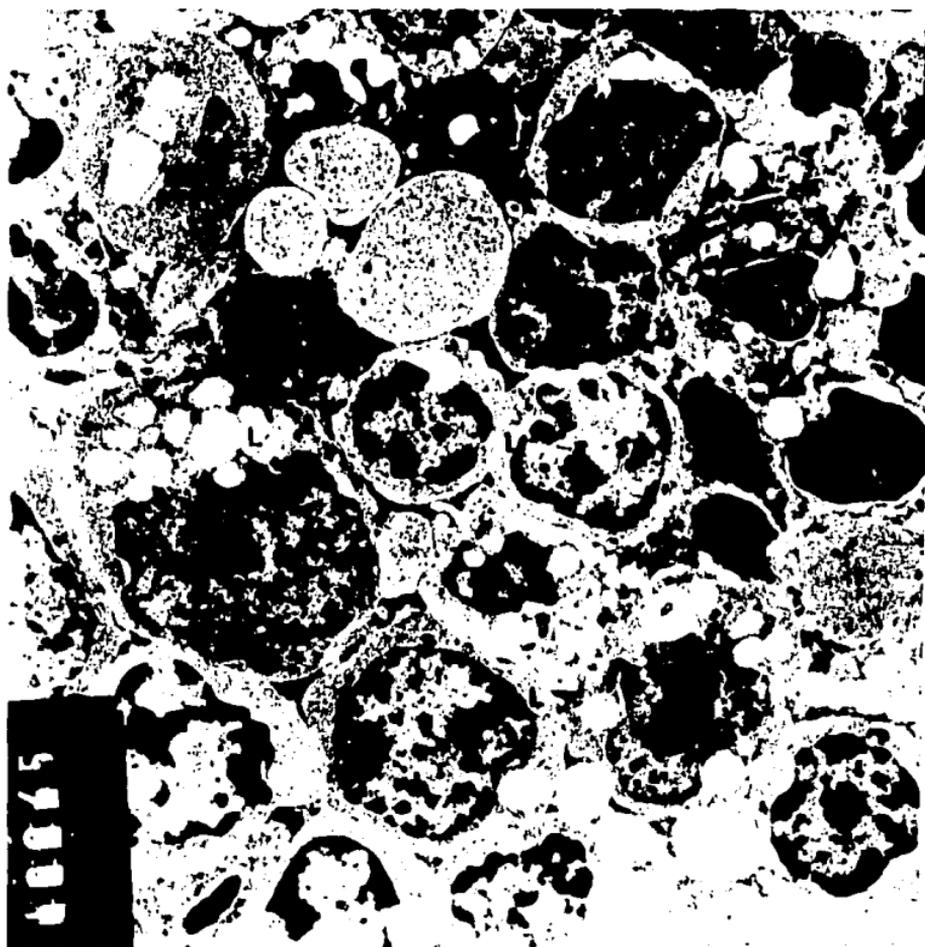


Fig. 21. Micrografía electrónica que muestra la gran proliferación de linfocitos en las células intestinales cuando se inoculó -- Intestineus histolítico cepa HE 1, con un período de incubación de 24 hrs. (10.000x).

CAPITULO VII

COMENTARIOS

Si aplicamos la definición dada por Sepúlveda (42) en relación a amebiasis invasora como "todos aquellos procesos patológicos - causados por la penetración de Entamoeba histolytica a los tejidos ", podemos pensar que en una parte importante de la patogeni-
cidad se involucra al parásito como agente etiológico.

Los estudios de Surgeaunt (37, 38, 39, 40, 41) y Jiménez (1, - 1B), mostraron que el patrón electroforético o zimodemo de las amibas se encuentra relacionado con la patogenicidad, evaluado-
ésto por la historia clínica del paciente.

Las alteraciones producidas por las amibas en el intestino de - animales de experimentación llevadas a cabo por Chávez (45), - Treviño (22), Mora Galindo (25, 26), etc., así como las lesio-
nes producidas en hígado estudiadas por Tanimoto nos dan una -
idea de su relación con la virulencia.

Vinayak (52), utilizando una sola cepa de amibas evaluó la res-
puesta serológica de Entamoeba histolytica en ratas y estable-
ció una comparación con su virulencia, por lo que nosotros al -
estudiar diferentes cepas de amibas pensamos que su potencial -
de invasividad después de ser inoculadas intracecalmente, nos -
dará la posibilidad de inferir su grado de virulencia o invasi-
vidad determinada por el título de anticuerpos.

El cuadro 1, mostró la sobrevida que presentaron los animales inoculados intracecalmente e intestinalmente, donde pudimos observar que las dos cepas inoculadas de primates, una de ellas (PM 4) presentó a los treinta días de incubación una sobrevida del 50% , esto nos indicó que aparentemente la cepa PM 4, tiene una mayor virulencia que la PM 5, la cual presentó una sobrevida del 100%. En relación a la cepa AHM1, pudimos observar que no hubo relación de sobrevida con respecto al tiempo de incubación ya que en general podemos decir que se mantuvo entre 60% y 85%. Por lo que respecta a la cepa HM531, los dos primeros períodos de incubación mostraron una sobrevida del 85%, sin embargo este disminuyó a los treinta días hasta el 60%. La cepa HM1 aparentemente no mostró cifras diferentes de sobrevida en relación a los períodos de incubación y estos fueron entre 71% y 100%.

El número de abscesos en intestino presentados en el cuadro 2, se midió después de los tres períodos de incubación de las cinco cepas estudiadas. Estos abscesos fueron múltiples y fué necesario agruparlos en orden de frecuencia, esto está representado en el cuadro 3, en donde el grupo "1" se consideró cuando estuvieron presentes de 4 a 7 lesiones; el grupo "2" en presencia de 8 a 10 lesiones y el grupo "3" cuando se encontraron de 11 a 13 lesiones.

Para evaluar el grado de patogenicidad producido por las diferentes cepas se determinó el índice de virulencia establecido por

Neal (27, 28). Los resultados mostrados en el cuadro 4 indican que la cepa PM4, presentó un mayor porcentaje de lesiones a períodos de incubación prolongados en donde a 30 días fué mayor que a 15 días y a su vez éste fué mayor a 8 días, lo que nos indica una relación entre el grado de lesiones y la sobrevida de los animales.

La cepa PM 5 presentó lesiones que dieron como resultado un índice de virulencia expresado en porcentaje semejante en los tres diferentes períodos de incubación, lo cual estuvo de acuerdo con la sobrevida de los animales que fué del 100%; es decir, no hay relación entre el diferente período de incubación de estas cepas y las lesiones producidas, ya que no se incrementaron y siempre se mantuvieron entre 50% y 60%.

En relación con la cepa AHM 1 pudimos observar que ésta tuvo una sobrevida entre 60% y 71% y el número de lesiones se encontró entre 60% y 66%, es decir aparentemente hay una relación entre el número de lesiones y la sobrevida de estos animales, lo cual nos está indicando el daño producido al instalarse en el intestino por la colonización amibiana.

Al estudiar la cepa HM 531 y correlacionarla con el índice de virulencia y sobrevida de los animales, pudimos observar que si hubo relación inversa entre estos dos parámetros, ya que a los 8 días de incubación la sobrevida fué mayor, y menor el nú

mero de lesiones, sin embargo, a los 15 días se mantuvo la sobrevida y se incrementó el índice de virulencia, lo que no sucedió a los 30 días de incubación, ya que la sobrevida disminuyó y se mantuvo el índice de virulencia, por lo que podríamos inferir - que el índice de Neal nos indica el grado de virulencia en una cepa desde el punto de vista cualitativo, pero no desde el punto de vista cuantitativo.

Por lo que respecta a la cepa HM 1 aparentemente fué la que produjo el número de lesiones más importantes, determinado - - - - por los porcentajes obtenidos en el índice de Neal donde no -- existió ninguna correlación con la sobrevida de los animales, - ya que ésta se mantuvo entre un 70% y 100% y el número de lesiones observadas dió un índice claramente más importante a los 30 días de incubación que a los 15 y 8 días.

Por lo que respecta al título de anticuerpos de acuerdo a los - estudios de Ríos (33), este demostró que hay una relación con respecto al diferente período de incubación. Como pudimos observar en el cuadro 5, los títulos de anticuerpos fueron diferentes en las cinco cepas estudiadas, donde aparentemente en la cepa - PM 4 no se presentó un incremento en relación con los tres períodos de incubación manteniéndose en forma más o menos constante. Por lo que respecta a la cepa PM 5 los títulos se vieron - claramente incrementados con respecto al tiempo de incubación - y en alguno de los animales mostraron títulos más altos en rela

ción a los observados con la cepa PM 4.

El análisis de los resultados con respecto a los títulos observados con la cepa AHM 1 mostró también una cinética específica donde éstos fueron incrementados con respecto al tiempo de incubación siendo más elevados en los dos primeros tiempos de incubación.

En relación a la cepa HM 531 la cinética observada nos presentó un incremento en el título de anticuerpos en los períodos de in cubación que seguramente fueron los títulos más altos obtenidos en nuestros estudios, donde desde los 8 días se presentó una - reacción inmunológica importante la cual fué incrementada y a - los 30 días todos los animales presentaron títulos muy bajos, - lo cual nos está indicando que posiblemente este lote de animales presentó un rechazo a la formación de anticuerpos o bien en ese momento la técnica no fué la sensible que nosotros hubiéramos querido, basándose en el hecho de que la sobrevida fué del 60% y el número de lesiones correspondió al 55%.

Por lo que respecta a la cepa HM 1 los títulos de anticuerpos - no fueron incrementados con respecto al tiempo de incubación y presentaron valores semejantes a los observados en la cepa PM 4. Podríamos inferir que las capacidades antigénicas están presentes en las cinco cepas.

El tratamiento estadístico de los resultados encontrados con respecto al número de lesiones después de 30 días de incubación ~~fué~~ ~~presentado~~ en el cuadro 6, donde pudimos observar que hubo diferencias estadísticamente significativas entre la cepa PM 5 y HM 1, así como con la cepa HM 531 y HM 1; por otro lado, al llevar a cabo el tratamiento estadístico con el título de anticuerpos en estos animales, después de 30 días de incubación las diferencias se observaron entre la cepa AHM 1 y la cepa PM 5, así como la HM 1 y HM 531; y la cepa PM 4 y PM 5.

Con respecto a las lesiones presentadas en el cuadro 7 después de 15 días de incubación, pudimos observar que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellas, sin embargo, el título de anticuerpos presentes en cada una de las cepas, sí mostró diferencias estadísticamente significativas entre la cepa PM5 y la cepa PM 4; entre la cepa AHM 1 y la cepa PM 4; entre la cepa HM 531 y las cepas PM 4, PM 5 y AHM 1.

El análisis estadístico del número de lesiones después de 8 días de incubación en el intestino de los animales se presentó en el cuadro 8, la cual mostró diferencias estadísticamente significativas entre la cepa PM 4 y la AHM 1; con la cepa AHM 1 y la HM 531; así como la cepa HM 531 con la HM 1. Por lo que respecta a los títulos de anticuerpos, la cepa HM 531 presentó diferencias estadísticamente significativas con las cepas PM 4 y la AHM 1, así como la AHM 1 y la HM 1 con la cepa PM 4.

La cinética de formación de anticuerpos y número de lesiones en los tres períodos de incubación presentado en el cuadro 9 mostró que para la cepa PM 4 el número de lesiones determinado de acuerdo al índice de Neal, se vieron incrementados, sin embargo al llevar a cabo el tratamiento estadístico, éste no mostró diferencias estadísticamente significativas, aunque al llevar a cabo este mismo tratamiento con los títulos de hemaglutinación, estos señalaron que había diferencias estadísticamente significativas entre los períodos de incubación de 8 y 15 días. En relación a la cepa PM 5 los resultados mostraron en el tratamiento estadístico estar de acuerdo con el Índice de Neal, determinado mediante la fórmula establecida por él, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el número de lesiones y el período de incubación así como lo relacionado con el título de anticuerpos.

Por lo que respecta a la cepa AHM 1 el número de lesiones producidas en los animales tratados estadísticamente, así como el título de hemaglutinación, mostró resultados semejantes a los obtenidos por el Índice de Neal donde no se presentaron diferencias en los tres períodos de incubación.

En cuanto a los resultados obtenidos con la cepa HM 531, el número de lesiones no mostró diferencias estadísticamente significativas, no así lo relacionado con el título de hemaglutinación a los 8 días con respecto a los 15 días y obviamente con respec

to a los 30 días, aunque ya sabemos que aquí los animales responden muy lentamente. El tratamiento estadístico presentado - de acuerdo al número de lesiones producidas por la cepa HM 1, - mostró diferencias estadísticamente significativas entre los 15 días y los 30 días de incubación, lo cual estuvo de acuerdo con el índice de Neal determinado, sin embargo los títulos de hemaglutinación no fueron estadísticamente significativos.

CAPITULO VIII

CONCLUSIONES.

- 1.- Se estudió la sobrevida de los animales inoculados en las cinco diferentes cepas estudiadas. Con respecto a E. Chattoni - cepa PM4, esta presentó una sobrevida del 50% después de 30 días de incubación. E.histolytica cepa AHM1 y E.histolytica cepa HM 531 mostraron una sobrevida del 60%; y las cepas E. chattoni PM5 y E. histolytica HM1, tuvieron una sobrevida mayor que fluctuó entre el 100% y el 80% respectivamente.
- 2.- En relación a la sobrevida de los animales inoculados con un período de incubación de 15 días, E.chattoni cepa PM4 y E. histolytica cepas AHM1 y HM 531, manifestaron valores semejantes, entre el 71.42% y 85.71%; y E. chattoni cepa PM5 y E. histolytica cepa HM1 presentaron el 100% de sobrevida.
- 3.- El porcentaje de animales que sobrevivieron a la inoculación durante 8 días, E. chattoni cepa PM4 y E. histolytica cepas AHM1, HM 531 y HM1, fluctuaron entre 71.42% y 85% y E. chattoni cepa PM5 presentó el 100% de sobrevida.
- 4.- Con respecto a las lesiones observadas después de 30 días de incubación E.histolytica cepa HM1 fué la que presentó un porcentaje mayor de ellas, incrementándose a medida que aumentó

el tiempo de incubación, lo cual fué semejante en E. chattoni cepa PM4. E. chattoni cepa PM5 y E. histolytica cepas AHM1 y HM 531 no mostraron diferencias en el número de lesiones después de los diferentes tiempos de incubación.

- 5.-Con respecto a los títulos de hemaglutinación en los tres períodos de incubación, E. chattoni cepa PM4 presentó títulos constantes a diferencia de E. chattoni cepa PM5, que presentó títulos de anticuerpos mayores, pero sin modificarse en forma importante E. histolytica cepa AHM1 incrementó títulos de anticuerpos diferentes aumentándose de acuerdo al período de incubación. Un comportamiento semejante lo tuvo E. histolytica cepa HM1. E. histolytica cepa HM 531 aumentó su título de anticuerpos después de 8 y 15 días de incubación, sin embargo después de 30 días, éstos no se vieron incrementados, probablemente la falta de respuesta de los animales se debió a una tolerancia del antígeno.
- 6.- Al estudiar el número de lesiones presentadas en los animales inoculados desde el punto de vista estadístico se observó que después de 30 días de incubación, E. chattoni cepa PM4 y E. histolytica cepa HM 531 tuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a E. histolytica cepa HM1; y a su vez los títulos de anticuerpos obtenidos con E. histolytica cepa HM 531 presentó diferencias estadísticamente significativas con E. histolytica cepas AHM1 y HM 531; y E. histolytica cepa AHM1 también lo hizo con respecto a E. chattoni cepa PM5.
- 7.-El número de lesiones presentadas en los animales inoculados con las cinco cepas en estudio después de 15 días de incubación

revelaron desde el punto de vista estadístico que no hubo diferencias con ninguna de las cepas, no así el título de anticuerpos, ya que nuevamente E. histolytica cepa HM 531 presentó diferencias estadísticamente significativas con E. chattoni cepas PM4 y PM5 y E. histolytica cepa AHM1. E. histolytica cepa AHM1 solamente lo hizo con respecto a E. chattoni cepas PM4 y PM5.

8.- El tratamiento estadístico del número de lesiones presentadas en los animales inoculados con las cinco cepas después de 8 días de incubación mostró diferencias estadísticamente significativas con E. histolytica cepa AHM1 y E. chattoni cepa PM4 y con la cepa E. histolytica HM 531 y E. histolytica cepa HM1; y en relación al título de anticuerpos durante este período de incubación, E. histolytica cepa HM 531 presentó diferencias estadísticamente significativas con E. chattoni cepa PM4 y E. histolytica AHM1; Así mismo E. histolytica cepa HM1 y E. chattoni cepa PM4.

9.- Este estudio desde el punto de vista histopatológico hizo ver que las alteraciones presentadas en el hígado y en el intestino de los animales inoculados, la lesión más frecuente fué la inflamación granulomatosa en hígado y las alteraciones en las microvellosidades del intestino con aplanamiento y degeneración de ellas.

10.- La microscopía electrónica del intestino de las ratas inoculadas, mostró un detalle más fino de alteraciones en las microvellosidades, además de una gran proliferación de leucocitos y células plasmáticas, lo cual nos habla de una inflamación aguda.

CAPITULO IX

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ahued Romero Maricela; .-Purificación parcial de antígenos de superficie en diferentes cepas de Entamoeba histolytica y obtención de algunos anti cuerpos específicos. Tesis para obtener la licenciatura de Químico-Farmacéutico-Biólogo. Universidad Motolinia 1983.
- 2.- Artigas J., Beaver P.C.- Salmon diet in relation to amebic colitis in - the dog. Amer, J. Trop. Med. Hyg. 10, 1961.
- 3.- Brumpt E.- Etude sommaire de l'Entamoeba dispar n.- sp. amibe a kystes - quadrinuclées, parasite de l'homme. Bull. Acad. Med. 94,1925.
- 4.- Burrows RB, Klink GK. 1955. Entamoeba polecki infections in man. Am. J. Hyg. 62, 156-157.
- 5.- Carrera G.M., Sadun E.H., Faust E.C.- The effect of protein deficient - diets on the susceptibility of guinea pigs to infection with Entamoeba histolytica. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1. 1952
- 6.- Canway H., Watt D.A.L.- Indigenous amoebic dysentery in Scotland. A - case report. Scottish Med. J., 6, 1961.
- 7.- Culbertson Clyde G., Kathleen Harper.- Surface coagglutination with formalinized stained protein "A" staphylococci in the immunologic - study of three pathogenic amebae. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29 (5), 1980 785-794.
- 8.- Deshiens, R. : L'amibiase et l'amibe disenterique. Paris, Masson et.. - Cie. 1965, 127
- 9.- Diamond, L.S.; Tanimoto-Weki, M.; Martínez Palomo, A. Production Of - cecal lesions in newborn guinea pigs with axenically cultivated - - - Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. (Méx), 1978, 9 (Supl 1): 223-228

- 10.- Eisert J., Hannibal J.E. jr., Sanders S.L.- Fatal amoebiasis complicating corticosteroid management of pemphigus vulgaris. New England J. - Med., 261, 1959.
- 11.- Estrada Lorenzo Leonel.- Aislamiento de antígenos en tres cepas de Entamoeba histolytica y dos de Entamoeba chattoni. Investigación de su papel protector en el hámster. Tesis para obtener el título de Químico-Farmacéutico-Biólogo. Universidad Motolinía. 1985.
- 12.- Furszyfer M. Paul, Navarrete Arita Salvador, Morales Román José Juan, Martínez V. José Antonio.- Un nuevo fármaco anteamebiano hemezol vs. - metronidazol en el tratamiento de pacientes con amebiasis intestinal - Vol. L. 109-118.
- 13.- Giffin J.L. "Human amebic dysentery. Electron microscopy of Entamoeba histolytica contacting, ingesting and digesting inflammatory cells". Am. J. Trop. Med. Hyg. 1972, 21; 895-906
- 14.- Grundy M.S.- Antigen fraction from Entamoeba histolytica strain HK-9 - for use in ELISA. Arch. Inv.Med. (Méx) 1982, 13 (supl 3) : 249-253.
- 15.- Gutiérrez G.: Manual de Infectología, 6a. Ed. Ediciones médicas del - Hospital Infantil de México, Méx. 1978, 56-65.
- 16.- Gutiérrez Trujillo G.- Características principales de la amebiasis invasora en el niño. Actualización de algunos conceptos clínicos y epidemiológicos. Arch. Inv. Med. (Méx) Vol. II Supl 1- 1980. 281-286.
- 17.- Hoare, C.A.: Parasitological Reviews. The commensal phase of Entamoeba histolytica. Exp. Parasit. 1952. 1,411-415.
- 18.- Jiménez Cardoso E., Kumate J. Correlación clínica de zimodemas de - - Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Méd. Vol. 13 Supl. 3 - 1982.

- 19.- Koffler D. Carr T.I., Agnello Vand cols. Antibodies to polinucleotide in human sera. Antigenic specificity and relation to disease. J. Exp Méd. 134:294,1971
- 20.- Kumate, J., E. Aranda.- Enfermedades diarréicas en el niño 5a. Ed. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, Méx. 1978, 236-246.
- 21.- Larsh J.E.- The effect of a lacktongue-producing diet on experimental-amebiasis in dogs. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1, 1952.
- 22.- Lavin de Cruz E., Treviño N. Estudio secuencial de la invasión de la mucosa del colon por Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Méd. (Méx) 1980 11 (Supl. 1): 199-209
- 23.- Levin. 1961.- Protozoan parasites of domestic animals and of man. - - , Burgess Publishing, Minnesota.
- 24.- Lynch J.E.- Histological observations on the influence of a special diet used in experimental amebiasis in guinea pigs. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 6, 1957.
- 25.- Martínez Palomo, Orozco, Fernández Castelo.- Detección del daño celular temprano producido por Entamoeba histolytica sobre epitelios. Arch. - Inv. Méd. (Méx), Vol. 13 (Supl. 3) 1982 pág. 169.
- 26.- Martínez Palomo; Chávez B.; Mora Galindo J. Interacción entre Entamoeba histolytica y el epitelio cecal del cobayo. Arch. Inv. Méd. (Méx) 1978 9 (Supl.1) 261-274.
- 27.- Neal R.A. (1951). Some observations on the variation of virulence and response to chemotherapy of strains of Entamoeba histolytica in rats.- Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 44. 439-452.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 28.- Neal R.A. and Vicent R. (1955). Strain variations in Entamoeba histolytica . 1. Correlation of invasiveness in rats with clinical history and treatment of experimental infection. Parasitology, 45, 152-162.
- 29.- Massod D. and Sohail A. Immunogenicity of Entamoeba histolytica antigenic fractions. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. Vol. 68. No. 5, 1974.
- 30.- Mody V.R.- Corticosteroids in latent amoebiasis. Brit. Med. J., 103, - 1959.
- 31.- Pittman F.E.; El. Hashimi W.K.; Pittman J.C.; Studies of human - - - amebiasis. II. Light and electro-microscopic observations of colonic - mucosa and exudate in acute amebic colitis. Gastroenterol., 1973, 65; - 588-603.
- 32.- Ridley DS, Hawgood BC, 1956, The value of formol ether concentration - of faecal cysts and ova. J. Clin Path. 9, 74-76.
- 33.- Ríos, Capín, Ortiz. Reacción Inmunitaria de hámsters infectados o inmunizados con Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. (Méx) 9 (Supl. 1): - 303, 1978
- 34.- Robinson GL. 1968. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg. 62, 285-294.
- 35.- Romer Hans Dr., Gómez Ma. de los Angeles, Torres Alvarez Pedro, Perozo de Ruggiery Gladys.- Tinidazol en el tratamiento de la amibiasis intestinal de los niños. Inv. Med. Inter. (1980) 7, 20.
- 36.- Sadun E.H., Bradin J.L. jr., Faust E.C.- The efect of ascorbic acid - deficiency on the resistence of guinea pigs to infection with - - - - Entamoeba histolytica of human origin. Amer J. Trop. Med. 31. 1951.

- 37.- Sargeant PG. 1962.- Confirmation of amoebic cyst chromatoids by wey strain after Ridley's faecal concentration. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 56. 12
- 38.- Sargeant, Williams JE.- Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and nonpathogenic intestinal amoebae of man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 225-227.
- 39.- Sargeant, Williams J. E. Grene JD. 1978. The differentiation of invasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 519-521.
- 40.- Sargeant, Williams JE, Neal RA. 1980. A comparative study of Entamoeba histolytica (NIH : 200, HK 9, etc) "E. histolytica-Like" and other morphologically identical amoebae using isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74. 469-474
- 41.- Sargeant, Williams JE. Kumate J. Jiménez E. 1980. The epidemiology of Entamoeba histolytica in Mexico City. A pilot survey L. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 653-656.
- 42.- Sepúlveda, B.: La amebiasis invasora por Entamoeba histolytica. *Gac. Med. de México.* 1970. 100, 101-253.
- 43.- Sepúlveda B., Aubavel Martha, Landa Luis, Velázquez Guadalupe.- Avances en la técnica de contraínmunolectroforesis para el estudio serológico de las amibas. *Arch. de Inv. Méd. México* Vol. 3. Supl. 2. 1972. 363-370
- 44.- Sepúlveda B., Treviño N., Cruz de Lavin, E. Tanimotoweki M. et. al. -- Estudio ultramicroscópico de la invasión de la mucosa del colon por Entamoeba histolytica. *Memorias de la Conferencia Internacional de Amibiasis.* Sepúlveda B. y Diamond L.S. (eds) México, 1975, 358-369.

- 45.- Sepúlveda B. Chevez A. Segura M. et. al. Fases iniciales de la acción patógena de Entamoeba histolytica sobre el colon del hámster. III. - Inoculación directa en el ciego extraído del animal e incubado en medio de cultivo. Memorias de la Conferencia Internacional sobre amibi-
biasis. Sepúlveda B. y Diamond L.S. (eds). México 1975, 448-458.
- 46.- Swartzwelder J.C., Avant W.H.- Immunity to amebic infection in dogs -
Amer. J. Trop. Med. Hyg. 1, 1952.
- 47.- Tamayo R.- Pérez and H. Brant. Amibiasis in pathology protozool and -
helminthic disease with clinical correlation. R. A. Marcial-Rojas. edi-
tor. R.E. Kricger Publishing Co. Inc. Huntington, N.Y. 1975, 1945.
- 48.- Tanimoto, Sepúlveda, Vázquez Saavedra y Landa. Lesiones producidas en -
el hígado del hámster por inoculación de Entamoeba histolytica cultiva
da en medio axénico. Arch. Inv. Méd. Vol. 2 Supl. 1971, . 275-284.
- 49.- Tanimoto, Sepúlveda, Vázquez Saavedra y Landa. Inducción de Inmunidad
antiamibiana en el hámster con antígeno obtenido de cultivos axénicos-
de Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Méd. Vol. 2 Supl 1971.
- 50.- Villarejos V.M.- Role of salmon diet and of rectal intubation in experi-
mental amebic colitis in dog. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 11, 1962a.
- 51.- Villarejos V.M.- Cortisone and experimental amibiasis in rat. Research
note, J. Parasitol. 48, 1962 b.
- 52.- Vinayak V.K., Sunita Sawhney, P. Jain, S. Chugh, S.R. Naik and R.M. -
Chakravarti.- Virulence of Entamoeba histolytica in rat and its - - -
comparison with the serological responses of the amoebic patients. -
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. Vol.75. No. 1, 1981. 32-37.
- 53.- Wxazall BGD, Cullifors, BJ. 1968. A. thinlayer starch gel method for -
enzyme typing of blood strains. J. Forens, Sci. Soc. 8, 81.