

39
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores
"CUAUTITLAN"



DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-
LIPOPEPTIDOFOSFOGLICANA EN PACIEN-
TES CON ABSCESO HEPATICO AMIBIANO
EMPLEANDO UN METODO INMUNOENZIMA-
TICO (ELISA).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
JOSE ROMULO MARTIN PACHECO LEON

Director de Tesis: Dr. Armando Isibasi A.



Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1988

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

CONTENIDO

	PAG
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVO.....	11
MATERIAL Y METODOS.....	12
- Sueros.....	12
- Cultivo axénico de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	12
- Obtención de la lipopeptidofosfoglicana.....	12
- Estandarización de ELISA.....	15
- Determinación de anticuerpos anti-LPFG en pacientes con AHA y personas sanas por ELISA.....	16
- Sensibilización de SRBC.....	16
- Determinación de anticuerpos anti-LPFG en pacientes con AHA y personas sanas por HIA.....	17
- Determinación de IgG e IgM anti-LPFG.....	17
- Oxidación de la LPFG.....	17
RESULTADOS.....	19
DISCUSION.....	30
CONCLUSIONES.....	34
RESUMEN.....	35
BIBLIOGRAFIA.....	36

ABREVIATURAS

AHA:	Absceso Hepático Amibiano
ELISA:	Ensayo Inmunoenzimático
HIA:	Hemaglutinación Indirecta
LPFG:	Lipopeptidofosfoglicana
OPD:	o-fenilendiamina
Pa-Pa:	Pastilla-pastilla
Pa-S:	Pastilla-sobrenadante
PS:	Personas Sanas
S-Pa:	Sobrenadante-pastilla
S-S:	Sobrenadante-sobrenadante
SRBC:	Globulos Rojos de Carnero

INTRODUCCION

En 1875, Lesh en San Petesburgo, Rusia descubrió al protozooario en las heces de un paciente, el que sufría disenteria crónica. Las amibas contenidas del paciente produjeron disenteria cuando fueron inoculadas a un perro; sin embargo Lesh no asocio la presencia del parasito con la enfermedad. Las investigaciones de Kartulis (1886) y Lafieur (1891), trabajando en el Cairo y Baltimore respectivamente suministraron las pruebas clinicas y anatomopatologicas de que la amiba era el agente causal de la disenteria y absceso hepatico.

En 1893, Quincks y Roos descubrieron los quistes, y Schaudin, en 1903, dio a la especie el nombre de *Entamoeba histolytica* diferenciandola de la *Entamoeba coli*. Diez años mas tarde, Walker y Sellards (1913), demostraron en Filipinas que mientras *Entamoeba coli* era no patogénica, *E. histolytica* si lo era (1).

E. histolytica, es un protozooario que pertenece a la familia Entamoebidae, orden Amoebida, subphylum Sarcodina, superclase Rhizopoda, clase Lobosea (2). Su ciclo vital completo consiste de cuatro estadios consecutivos: trofozoito, prequiste, quiste y metaquiste (3,4). El trofozoito se reproduce por fisión binaria, produciendo bajo condiciones apropiadas un quiste mononucleado que tras dos divisiones nucleares sucesivas forma un quiste tipico tetranucleado.

Este da lugar a un metazoiste que por division produce ocho trofozoitos uninucleados (1).

El quiste presenta forma esferica u oval, con un diametro de 8 a 20 μm y una pared de 125 a 150 nm de grosor. Su membrana plasmatica frecuentemente presenta profundas invaginaciones y en su citoplasma se observan pelirriosomas, vacuolas y depositos de glucogeno. En el núcleo existe un cariosoma que puede ser central, cuerpos cromatoidales y cromatina periferica adherida a la envoltura nuclear (5).

El trofozoito es una fase altamente dinamica y pleomorfica, su tamaño varia de 15 a 30 μm dependiendo de las condiciones del medio (6). La membrana plasmatica es similar a la de otras celulas eucarioticas, con una cubierta celular apenas detectable (7). El citoplasma contiene diferentes organelos: cuerpos densos, riosomas y polisomas, granulos osmiofilos, cuerpos helicoidales y cuerpos tubulares (8,9); numerosas vacuolas alimenticias grandes y pequeñas, cuyas membranas poseen la misma estructura que la membrana plasmatica (8,10); presenta también lisosomas activos especializados de superficie (10,11). La amiba carece de mitocondrias y aparato de Golgi, su reticulo endoplasmico consiste de vesiculas finas rodeadas de algunos riosomas (8,12,13). El núcleo es ovalado, con un nucleolo central y cromatina periferica. La envoltura nuclear presenta gran cantidad de poros (8).

Se denomina amibiasis al estado resultante de albergar a *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas. La amibiasis intestinal tiene distribución cosmopolita y se estima que la infección afecta aproximadamente a un 10% de la población mundial (14). La transmisión de un huésped a otro se realiza por vía oral mediante la ingestión de quistes en vehículos tales como el agua y alimentos contaminados. La prevención de la amibiasis depende fundamentalmente de medidas de sanidad y buenas prácticas de higiene; así como en la identificación, tratamiento e investigación en portadores sanos y en sujetos con alto riesgo de sufrir la infección: homosexuales, enfermos mentales y viajeros (1).

La patogenia de la amibiasis incluye: 1) colonización del intestino por una cepa amibiana virulenta; 2) contacto íntimo con adherencia a la mucosa intestinal; 3) destrucción de las barreras intestinales por enzimas o productos tóxicos; 4) lisis de las células intestinales y de las células inflamatorias del hospedero. Todo lo anterior ocasiona: interrupción de la mucosa intestinal, ulceración del colon e invasión de tejidos y órganos más distantes, principalmente al hígado (15,16).

La amibiasis clínica se clasifica en asintomática y sintomática, esta última se divide en:

1.- Amibiasis intestinal que puede ser:

- a) Disenteria: "disenteria amibiana aguda"
- b) Colitis no disenterica: "disenteria amibiana cronica"
- c) Ameboma: forma localizada de amibiasis intestinal
- d) Apendicitis amibiana.

2.- Amibiasis extraintestinal que puede ser:

- a) Hepatica: la forma mas comun de amibiasis extraintestinal
- b) Cutanea
- c) En otros organos: pulmones, bazo, cerebro, etc.

El metronidazol es uno de los agentes mas utilizados, debido a que actua en todos los tejidos incluyendo el higado; sin embargo los efectos colaterales y la mutogenicidad reducen notablemente el potencial de uso de este farmaco, teniendose especial cuidado en su prescripcion medica. Un nuevo agente que permanece en estudio es la Quinfamida la cual resulto eficaz en un estudio en Mexico, en el tratamiento de amibiasis cronica(17). Posteriores estudios de este agente seran de utilidad en la incorporacion de este para el tratamiento de la amibiasis.

La tabla 1 muestra los agentes antimicrobianos mas utilizados en el tratamiento de la amibiasis.

Tabla 1 Agentes antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la amebiasis. Organizados por su sitio de acción.

Agentes lumenales	Pared intestinal	Todos los tejidos
Paromomicina	Tetraciclina	Metronidazol
Quinifamida	Eritromicina	tinidazol
Dioctonhidroxiquinoleina		Emetina

En estudios rutinarios de necesc, frecuentemente se encuentran quistes de *E. histolytica* tanto en muestras provenientes de pacientes con cuadro clinico de amebiasis, como en personas sanas. Estos hallazgos hicieron pensar que existian dos cepas de *E. histolytica* una patogena y la otra no. Esta hipotesis no fue posible confirmarla, pues desde el punto de vista morfologico ambos quistes eran siempre identicos.

En 1968, Robinson (18) describio un metodo de cultivo monoxenico de amebas que permitia transformar los quistes de *E. histolytica* en trofozoitos; lo anterior ayudo a mejorar el diagnostico parasitoscopic de la amebiasis, gracias a la obtencion de grandes cantidades de trofozoitos. Este metodo hizo posible que keeves y Bischoff (19), trataran de clasificar cepas de *E. histolytica* por medios bioquimicos.

basandose en el comportamiento electroforético de 5 de sus isoenzimas. Aún cuando obtuvieron una clasificación, no fue posible separar en forma definitiva cepas patógenas, de no patógenas por esta técnica.

En 1978, Sargeant y Williams (20,21), basandose en el mismo principio, lograron separar cuatro cepas de *E. histolytica* y encontraron que todas las muestras provenientes de enfermos de amibiasis sintomática correspondían a una cepa dada; la cual tenía corrimiento electroforético de B para la isoenzima fosfoglucomutasa (PGM) y corrimiento rápido para hexoquinasa (HK). Para demostrar que sus resultados eran correctos, Sargeant repitió el mismo estudio con muestras provenientes de México (22,23), India (24,25), y África del Sur (26), y encontró que el fenómeno se repetía dando como marca de patogenicidad las características de corrimiento de las dos isoenzimas antes citadas.

Para la clasificación de cepas de amibas, Sargeant empleó el término de zimodemo el cual lo definió como una población de amibas que se diferencia de poblaciones similares por la movilidad electroforética de una o más isoenzimas específicas. En la actualidad gracias a esta técnica, es posible clasificar a las amibas en patógenas y no patógenas; sin embargo, debido a su alto costo no es posible aplicarla en laboratorios de rutina.

El cultivo *in vitro* de trofozoítos de *E. histolytica* asociada a bacterias se obtuvo en 1925; sin embargo, no fue sino hasta 1961 que se logró el cultivo axénico, de los mismos por Diamond (27). Esto último permitió avances importantes tanto bioquímicos como inmunológicos en el estudio de la amiba. En 1969 Lunde y Diamond al emplear antígeno total preparado por homogenización de trofozoítos cultivados axénicamente, establecieron patrones inmunoelectroforéticos de diferentes cepas amibianas, y obtuvieron resultados que permitieron demostrar que *E. histolytica* es inmunológicamente diferente a otras amibas de morfología similar (28).

Khan y Meerovitch en 1968 empleando trofozoítos de *E. histolytica* sonicados y liofilizados, obtuvieron bandas de precipitación tanto con sueros de pacientes como con sueros de conejos anti-*E. histolytica*, y observaron reacciones de identidad con antígenos de otras especies amibianas (29). Posteriormente fraccionaron por filtración en gel un extracto acuoso de trofozoítos y obtuvieron siete fracciones a las que le estudiaron sus propiedades físicoquímicas e inmunológicas (30). Más tarde, Alam y Ahmad en 1974 con técnicas similares demostraron la heterogeneidad de la composición antigénica de los trofozoítos (31).

Krupp en 1974 fraccionó un extracto total de amiba por filtración en gel obteniendo tres fracciones las cuales fueron reconocidas por el suero de un conejo inmunizado con

amiba total, además estas fracciones fueron capaces de inducir protección cuando se inmunizaban cobayos y se retaban con *E. histolytica* inoculada intracefalmente (32). Posteriormente en 1977 mediante el empleo de pruebas inmunológicas con sueros de pacientes de diferentes regiones geográficas, identifico catorce antígenos en trofozoitos de *E. histolytica* cultivados en forma axénica (33).

Los antígenos de *E. histolytica* localizados en la superficie celular son los más importantes para la inducción de una respuesta inmune, ya que son los primeros en ponerse en contacto con el sistema inmune del hospedero. En 1976 Parkhouse y cols. demostraron que los principales antígenos de membrana de *E. histolytica* que son reconocidos por sueros de pacientes son glicoproteínas (34).

En 1980 Sawney y cols. por medio de filtración en gel de la porción soluble del antígeno total de *E. histolytica*, purificaron parcialmente una glicoproteína de alto peso molecular, con capacidad hemaglutinante y precipitante (35).

Martínez-Palomo y cols. encontraron que la membrana plasmática de *E. histolytica* contiene residuos de manosa, los cuales actuaban como receptores para concanavalina A (36). En estudios posteriores se demostró que esta lectina aglutinaba mejor a las cepas más virulentas de *E. histolytica* (37). Se han reportado dos moléculas con características de lectina en la superficie de los trofozoitos que par-

participan en la adherencia de los mismos a las células blanco. Estas lectinas pueden ser inhibidas por N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina respectivamente (38,39).

En 1980 Aley y cols. desarrollaron un método que fue capaz de separar las membranas plasmáticas de los trofozoitos de *E. histolytica*, gracias a la unión específica de la concanavalina A con las glicoproteínas de la membrana del trofozoito intacto, con esto se logró la caracterización de seis glicoproteínas de la cepa HM1:IM55 y cuatro de la cepa Hx9:NIH (40).

En 1982 Isibasi y cols. extrajeron una molécula de naturaleza polisacáridica a partir de trofozoitos de *E. histolytica*. El estudio químico de la molécula demostró la presencia de azúcares (glucosa, galactosa, manosa, rribosa, así como trazas de azúcares aminosidos), estos correspondían al 55% de la molécula total. El contenido de aminoácidos fue de 8%, el de lípidos de 2.5% y 1% de fosfatos; debido a esto se le denominó lipopeptidofosfoligucana (LPLG) (41). Se demostró por inmunofluorescencia indirecta que la LPLG se encontraba en la superficie de los trofozoitos (42). Así mismo se han detectado anticuerpos anti-LPLG de la clase IgA en muestras de calostro humano, lo que indica que la LPLG tiene propiedades inmunopénicas (43).

En la amebiasis invasiva la respuesta inmune humoral que se desarrolla se basa principalmente en anticuerpos de la

clase IgG, sin embargo se pueden encontrar en cantidades menores anticuerpos de la clase IgM, IgA e IgE (44).

Los primeros intentos para detectar anticuerpos anti-amida circulantes en pacientes con amibiasis invasiva se basaron en la prueba de fijación del complemento (45). Estos intentos fueron seguidos por la introducción de otras técnicas tales como la inmovilización (46), la precipitación en agar (47), la inmunofluorescencia indirecta (48), aglutinación del latex (49) y la prueba de hemaglutinación indirecta (50,51). Con el advenimiento del cultivo axénico de *E. histolytica*, nuevas técnicas se implementaron para la detección de anticuerpos anti-amida tales como la contraelectroforesis en 1971 (52), el método inmunoenzimático (ELISA) en 1976 (53), y el radioinmunoensayo en 1977 (54). Actualmente algunos autores consideran a la técnica de ELISA como la prueba de elección para el serodiagnóstico de la amibiasis encontrándola superior a la contraelectroforesis, hemaglutinación indirecta y aglutinación del latex; debido a su alta sensibilidad, su sencillez y comodidad (55, 56,57).

En base a la localización superficial de la LPFG, se decidió investigar la presencia de anticuerpos contra esta molécula en los sueros de pacientes con absceso hepático amibiano (AHA) y en personas sanas utilizando para ello la técnica de ELISA.

OBJETIVO

Estandarización de un método inmunoenzimático (ELISA), el cual sea de utilidad para el diagnóstico de la amebiasis, usando como antígeno una molécula de superficie de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* con características lipopolisacáridicas (LPFG).

MATERIAL Y METODOS

1.- SUEROS

Se utilizaron 100 sueros de pacientes con diagnóstico clínico y radiológico de absceso hepático amibiano (AHA), provenientes de un banco de sueros del Centro Médico Nacional y 100 sueros de personas sanas provenientes de donadores de sangre.

2.- CULTIVO AXENICO DE TROFOZOITOS

Se realizó el cultivo axénico de trofozoitos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS en medio TYI-S-33 de acuerdo al método descrito por Diamond (58).

3.- OBTENCION DE LA LPGA DE *E. histolytica*

Los trofozoitos cultivados y cosechados se ajustaron a una cantidad de 1×10^6 contados en nematocitometro. Posteriormente se sometieron a ruptura por congelamiento-descongelamiento, hasta que microscópicamente se observó ruptura total, el homogeneizado así obtenido se sometió a ultracentrifugación a $100\ 000 \times g$ durante 2 horas (centrifuga Beckman L8-M). Tanto a la pastilla como el sobrenadante obtenidos de la ultracentrifugación se resuspendieron en agua destilada y se les practicaron tres extracciones sucesivas con un volumen igual de fenol al 90% de acuerdo con la técnica de Westphal-Jann (59), manteniendo la temperatura de extracción a $58^{\circ}C$ por 15 minutos en baño maría con agitación constante, pasado el tiempo se dejó enfriar y se centrifugó a $1000 \times g$

durante 45 minutos (centrifuga Beckman TJ-6), separándose las fases acuosas, posteriormente se dializaron exhaustivamente contra agua destilada para eliminar los residuos de fenol. Tanto la fracción rica en polisacarido del sobrenadante (S), como la fracción rica en polisacarido de la pastilla (Pa) obtenidas en la fase acuosa resultante de las extracciones con fenol se centrifugaron nuevamente a $100\ 000 \times g$ durante 2 horas a $40^{\circ}C$, obteniéndose entonces las fracciones denominadas: Pastilla-Pastilla (Pa-Pa) y Pastilla-Sobrenadante (Pa-S) así como las denominadas Sobrenadante-Pastilla (S-Pa) y Sobrenadante-Sobrenadante (S-S) respectivamente (Fig. 1), las fracciones obtenidas fueron liofilizadas.

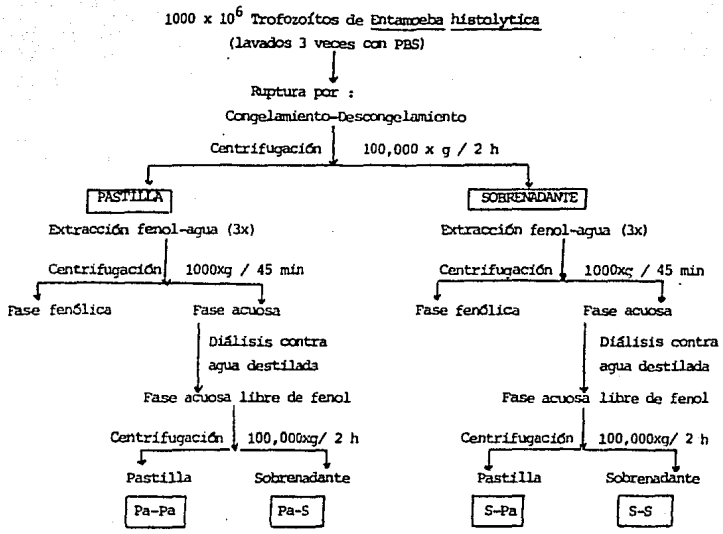


Fig. 1 Extracción del antígeno lipopolisacárido de *E. histolytica* a partir de trofozoitos de *E. histolytica*.

4.- TÉCNICA DE INMUNOANÁLISIS ENZIMÁTICO (ELISA)

Para evaluar la presencia de anticuerpos anti-LPFG en el suero de los pacientes con AHA y personas sanas, se empleó la técnica de ELISA (60).

4.1 Estandarización de la técnica de ELISA.

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (NUNC Immunoplate 1), las cuales se recubrieron con 10, 5, 2 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPFG en amortiguador de carbonatos (carbonato de sodio-bicarbonato 0.1 M, pH 9.6), colocando 100 μl por pozo y se dejaron toda la noche a 4°C. Posteriormente las placas se lavaron 3 veces con PBS-1 (150 mM NaCl, regulador de fosfatos 10 mM pH 7.2, Tween 20 al 0.1%), los pozos se llenaron con solución de bloqueo (gelatina al 1% en PBS) y se incubaron 1 h a 37°C. Las placas se lavaron con PBS-1 y se les adicionaron 100 μl /pozo del suero de un paciente con AHA diluido 1:100, 1:400, 1:1600 y 1:6400 en PBS-1-gelatina 0.5% y se incubaron 3 h a 37°C. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS-1 y se adicionaron 100 μl /pozo del conjugado (anti-gamma globulina humana de cabra unida a peroxidasa, SIGMA Co) diluida 1:500, 1:1000 y 1:2000 en PBS-1-gelatina 0.5%, incubándose 90 minutos a 37°C. Pasado el tiempo las placas se lavaron 5 veces y se colocaron 100 μl de la solución del sustrato (o-fenilendiamina y H_2O_2 en amortiguador de citratos 0.05M pH 5.6). Finalmente la reacción se paro después de 10 minutos con H_2SO_4 2.5 N 1 gota por pozo y el desarrollo del color se leyó a 490 nm en un lector de ELISA (Minireader II, DYNATEC).

4.2 Determinación de anticuerpos anti-LPF6 en pacientes con AHA y personas sanas por ELISA

Una vez encontradas las condiciones óptimas para la determinación de anticuerpos anti-LPF6 se analizaron los 100 sueros de personas sanas y 100 sueros de pacientes con AHA, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

5.- DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-LPF6 EN PACIENTES CON AHA Y PERSONAS SANAS POR HEMAGLUTINACION INDIRECTA (HIA).

Se empleó la técnica de HIA para la determinación de anticuerpos anti-LPF6 en los dos grupos estudiados por ELISA, la hemaglutinación se realizó de acuerdo con la técnica de Disnon y cols. (61).

5.1 Sensibilización de glóbulos rojos de carnero (SRBC)

Se utilizaron glóbulos rojos de carnero conservados en solución de Alsever (glucosa 2.05%, citrato de sodio 0.8%, ácido cítrico 0.055%, cloruro de sodio 0.42%). Se tomaron 4 ml de SRBC, se lavaron tres veces con PBS y se tomaron 0.3 ml del suavete, se le añadieron 20 ml de PBS el cual contenía 2 mg de púavina y 1 mg de cisteína. Todo lo anterior se incubó a 37°C por 30 minutos, pasado el tiempo los eritrocitos se lavaron tres veces y el botón se resuspendió en 10 ml de PBS. A la suspensión de SRBC así tratados y con el fin de sensibilizarlos se les agregó 0.6 ml de LPF6 a una concentración de 1 mg/ml y se dejaron a 37°C por 30 minutos, pasado el tiempo los SRBC sensibilizados se lavaron tres veces para eliminar el exceso de antígeno y se ajustaron a una concentración

final del 1% con PBS pH 7.2.

5.2 Desarrollo de la técnica de HAI

Antes de correr la prueba los sueros a probar fueron decomplementados por calentamiento a 56°C durante 30 minutos. Se utilizaron placas de microtitulación de fondo concavo en las cuales se pusieron 100 µl de cada suero diluido 1:10 en PBS y se hicieron diluciones dobles hasta 1:20480, se agregaron 100 µl de SRBC sensibilizados y las placas se incubaron por dos horas a 37°C. El título se registró como el recíproco de la mayor dilución del suero a la que se observó aglutinación de los SRBC.

6.- DETERMINACION DE IgG e IgM ESPECIFICAS CON ACTIVIDAD ANTI-LPFG EN PACIENTES CON AHA POR ELISA

Se realizó la determinación de IgG e IgM en el suero de 40 pacientes con AHA y 40 sueros de personas sanas por ELISA de acuerdo con la metodología ya descrita anteriormente, utilizando para ello conjugados específicos anti-IgG (anti-cadena γ, SIGMA Co) y anti-IgM (anti-cadena μ, SIGMA Co), los sueros se diluyeron 1:400 y la concentración de LPFG fue de 5 µg/ml.

7.- OXIDACION DEL ANTIGENO POLISACARIDICO (LPFG)

La LPFG en cantidad de 2 mg se trató con NaIO_4 0.025 y 0.05 M por 2 horas a temperatura ambiente, pasado el tiempo, el exceso de metaperiodato se eliminó dializando contra amortiguador de recubrimiento para ELISA, finalmente se ajustaron

a una concentración de 1 mg/ml.

7.1 Prueba de ELISA usando el antígeno tratado con NaIO_4

La LPSG tratada con NaIO_4 0.025 y 0.05 M se diluyó a una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en amortiguador de recubrimiento y se realizó la técnica de ELISA utilizando 25 sueros de pacientes con AHA.

RESULTADOS

1.- AISLAMIENTO DEL ANTIGENO LPFG

De acuerdo con la figura 1 se obtienen cuatro fracciones diferentes del antígeno polisacárido denominadas S-Pa (Sobrenadante-pastilla), S-S (Sobrenadante-sobrenadante), Pa-Pa (Pastilla-pastilla) y Pa-S (Pastilla-sobrenadante), siendo esta última la que se utilizó por ser la más antigenica, ya que esta es capaz de de inhibir la hemaglutinación en cantidades tan pequeñas como 8×10^{-5} mg (62).

2.- ESTANDARIZACION DE ELISA

La figura número 2 muestra los resultados de la optimización de la técnica de ELISA cuando se varió la cantidad de antígeno fijado a la placa, así como la dilución del suero problema y la dilución del conjugado. Se escogió una concentración de antígeno de 5 $\mu\text{g/ml}$, una dilución del suero a probar de 1:400 y la dilución del conjugado fue de 1:1000, ya que con estas condiciones se obtuvo una lectura de 1 unidad de absorbancia a 490 nm, lo que nos permite tener un amplio rango para las posibles fluctuaciones en la determinación de anticuerpos anti-LPFG, tanto en los pacientes con AHA así como en las personas sanas.

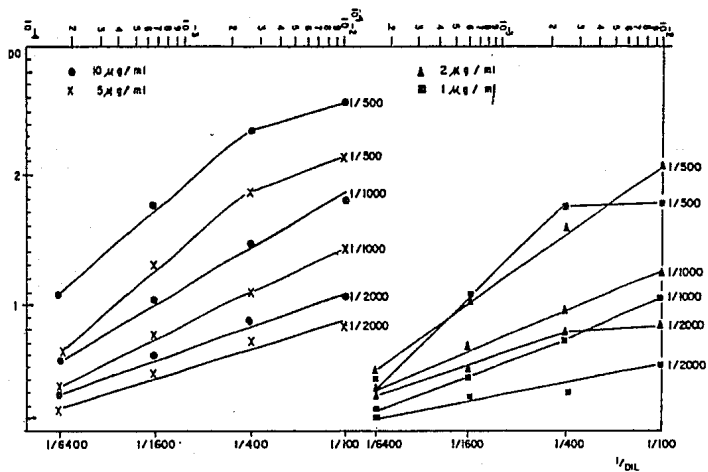


Fig. 2 Estandarización de ELISA.

3.- DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-LPFG EN PACIENTES CON AHA POR LA TECNICA DE ELISA

La figura numero 3 muestra los resultados de la determinación de anticuerpos anti-LPFG en 100 sueros de pacientes con AHA y 100 sueros de personas sanas. Las lecturas de densidad optica a 490 nm para los sueros de pacientes con AHA tuvieron una media de 0.93 con una desviacion estandar de 0.23, el grupo de personas sanas mostro una media de 0.37 con una desviación estandar de 0.12. La sensibilidad y especificidad del metodo se calculo de acuerdo a las siguientes formulas:

SENSIBILIDAD = VALORES POSITIVOS/TOTAL DE VALORES POSITIVOS

ESPECIFICIDAD = VALORES NEGATIVOS/TOTAL DE VALORES NEGATIVOS

El valor de corte para diferenciar entre valores positivos y negativos fue a una densidad optica de 0.7 a 490 nm. La sensibilidad y la especificidad fue de:

	SANOS	POSITIVOS
ENFERMOS	89	0
NEGATIVOS	11	100

SENSIBILIDAD = $89 / 100 = 0.89 = 89\%$ de sensibilidad
 ESPECIFICIDAD = $100 / 100 = 1 = 100\%$ de especificidad.

En la figura número 4 se muestra el polígono de frecuencias cuando se graficó la frecuencia de las lecturas de densidad óptica a 490 nm obtenidas en la determinación de anticuerpos anti-LPF6 por el método de ELISA en el grupo de personas y pacientes con AHA.

4.- DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-LPF6 POR HAI.

La tabla 2 muestra los títulos nemaglutinantes obtenidos de la determinación de anticuerpos anti-LPF6 por la técnica de HAI y las personas sanas. El valor de corte para diferenciar entre valores positivos de negativos fue a un título de 320. La sensibilidad y especificidad de este método fue de 80.8 y 91.7 respectivamente. En la figura número 5 se muestra el polígono de frecuencia cuando se grafica la frecuencia del log del título en el grupo de personas sanas y en los pacientes con AHA.

5.- DETERMINACION DE IgG e IgM ESPECIFICAS ANTI-LPF6 EN PACIENTES CON AHA.

En la figura número 6 se muestran los resultados de 40 sueros de pacientes con AHA y 40 sueros de personas sanas, cuando se investigó la presencia de anticuerpos de la clase IgG e IgM específicos anti-LPF6 por el método de ELISA. Las lecturas de densidad óptica en el grupo de pacientes con AHA presentan para IgG una media de 0.86 mientras que para IgM fue de 0.71, el grupo de personas sanas mostró para IgG una media de 0.28 y para IgM fue de 0.22.

DO
490 nm

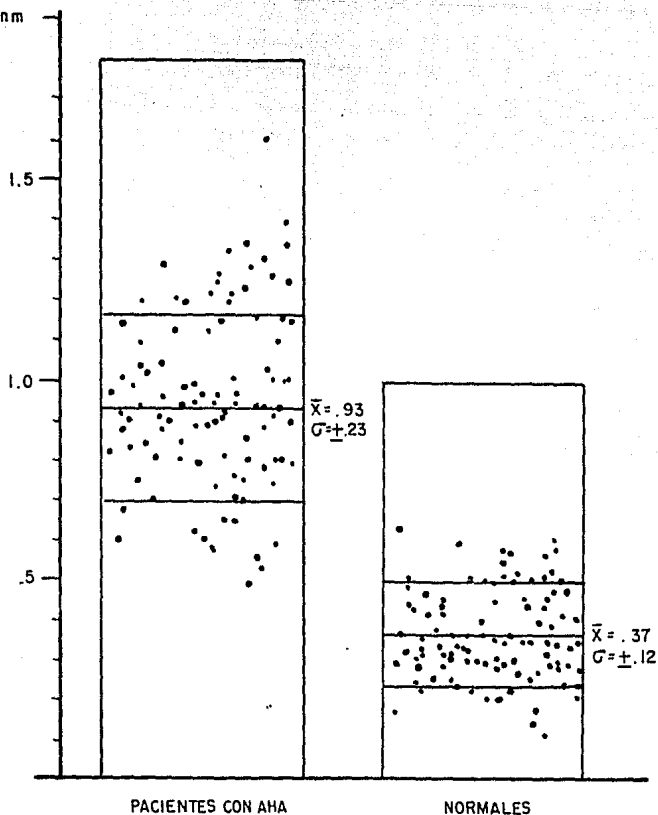


Fig. 3 Determinación mediante el método de ELISA de anticuerpos anti-LF6 en el suero de pacientes con AHA. Antígeno LF6 5 μ g/ml, sueros de pacientes con AHA y personas sanas diluidos 1:400, suero de cabra anti-inmugoglobulinas humanas diluido 1:1000

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-LPFG EN A.H.A.

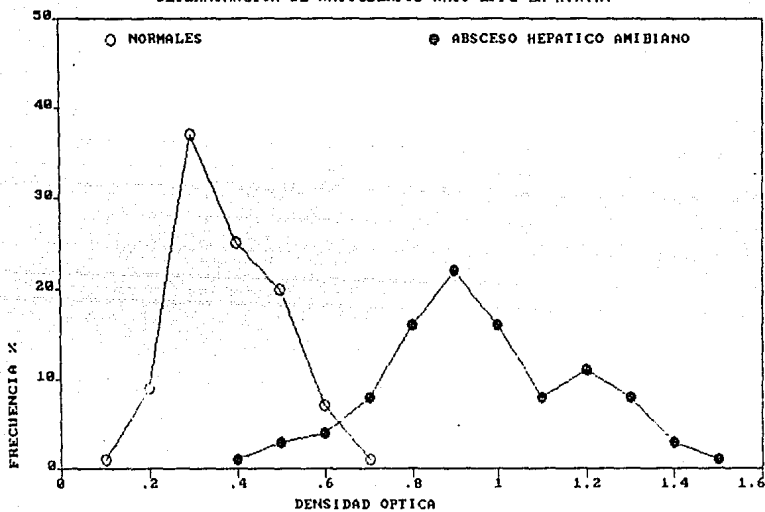


Fig. 4 frecuencia de las lecturas de densidad optica a 490 nm para el grupo de personas sanas y el grupo de pacientes con A.H.A.

Tabla 2. Títulos de anticuerpos anti-E. *histolytica* en la prueba de hemaglutinación en pacientes con AHA y en personas sanas.

TITULOS	LOG 1/DILUCION	AHA	PERSONAS SANAS
10	1	0	0
20	1.3	0	1
40	1.6	1	14
80	1.9	4	20
160	2.2	2	43
320	2.5	10	17
640	2.8	22	4
1280	3.1	36	1
2560	3.4	11	0
5120	3.7	5	0
10240	4.0	3	0
20480	4.3	6	0
TOTAL		100	100

ANTICUERPOS ANTI-LPFG EN PACIENTES CON A.H.A.

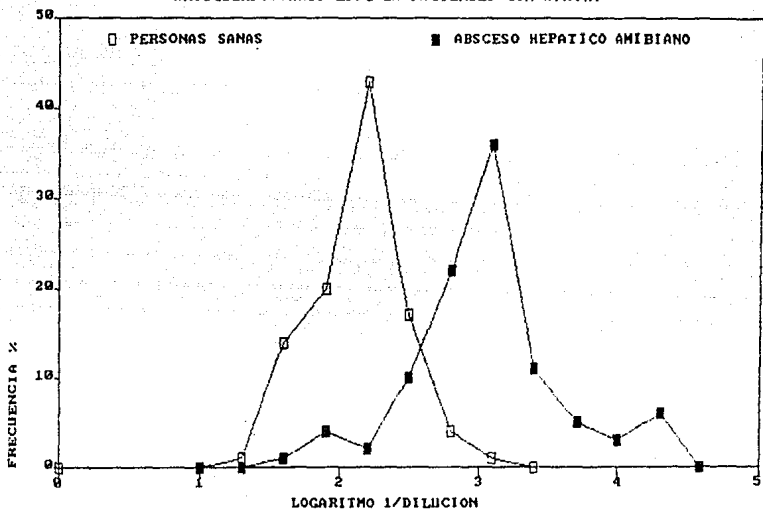


Fig. 5. Frecuencia del log 1/dilucion en el grupo de pacientes con AHA y el grupo de personas sanas.

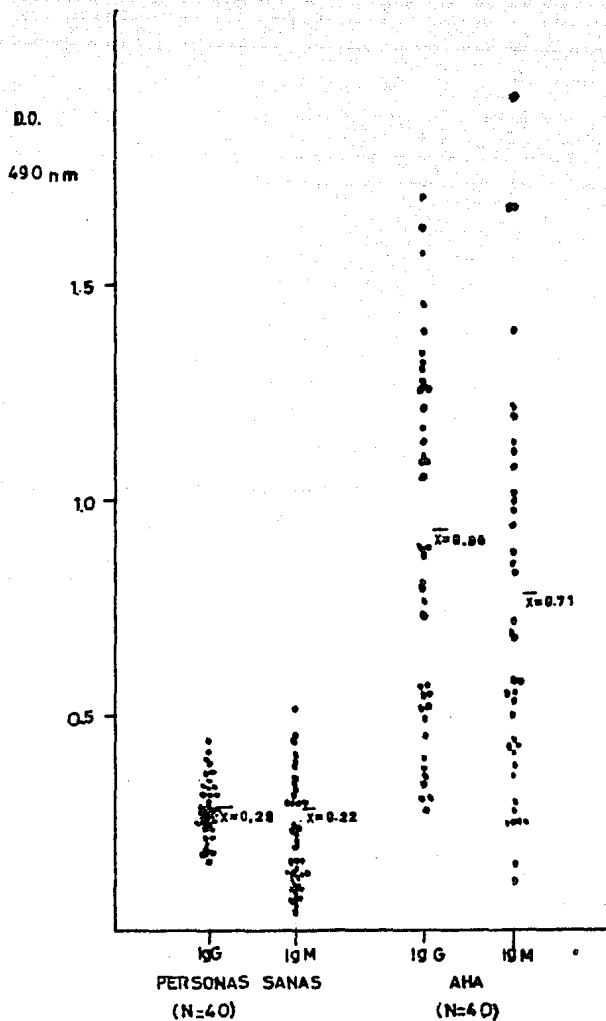


Fig. 6 Determinación de IgG e IgM anti-LPIG en un grupo de pacientes con AHA.

6.- DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-LPFG POR EL METODO DE ELISA USANDO EL ANTIGENO TRATADO CON NaIO_4 0.025 Y 0.05 M.

En la figura numero 7 se muestran los resultados de la determinacion de anticuerpos anti-LPFG por ELISA en el suero de 20 pacientes con AHA cuando el antígeno polisacaridico se trató con NaIO_4 0.025, 0.05 M y un control de antígeno no tratado.

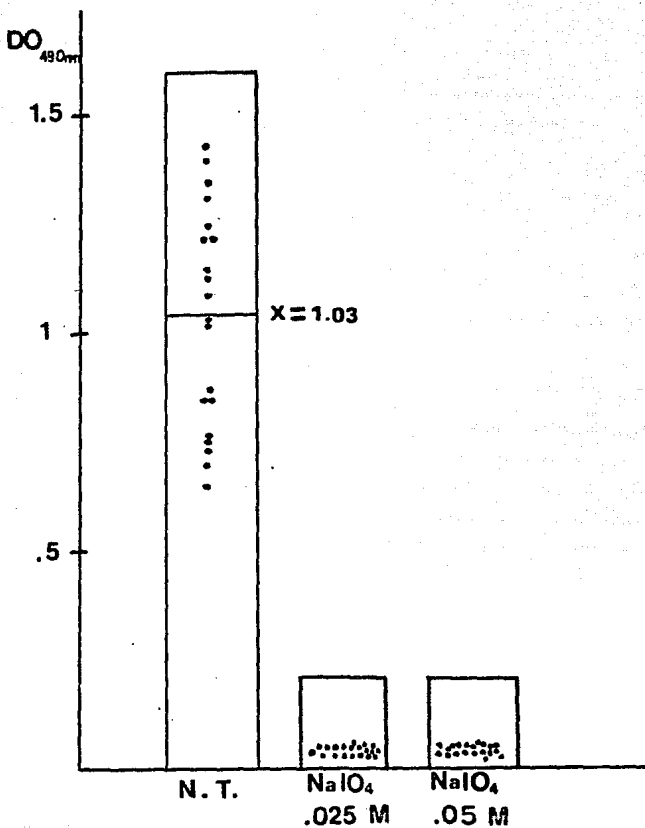


Fig. 7 Determinación de anticuerpos anti-LPF5 por ELISA usando el antígeno tratado con NaIO₄ 0.025 y 0.05 M (N.T. antígeno no tratado).

DISCUSION

La membrana plasmática de los trofozoitos de *L. nistolytica* tiene un grosor aproximado de 10 nm. Esta membrana se encuentra cubierta en su parte externa por el glicocalix o cubierta superficial, su presencia se ha demostrado con el uso de reactivos citoquímicos como el rojo de rutenio o el azul de alciano, los cuales aumentan la densidad electrónica de los componentes polisacáridicos de la membrana, según lo describieron Lusbaugh y Miller en 1974 (63). El estudio de esta cubierta es de particular interés porque contiene algunos de los antígenos amebianos que son reconocidos como extraños por el hospedero, durante el establecimiento de la amebiasis invasiva.

El estudio de las propiedades dinámicas de los componentes de la membrana plasmática de *L. nistolytica* y la identificación de los antígenos localizados externamente, permiten obtener información sobre los mecanismos involucrados en la interacción del trofozoito con el sistema inmune; además conocer los medios por los cuales estos parásitos sobreviven en el hospedero humano. Aun cuando en los últimos años se han caracterizado algunas proteínas y glicoproteínas de la membrana del trofozoito (40), en la actualidad existe poca información acerca de la purificación completa de alguna de ellas. En 1976 y 1978, Ishasi y cols. reportaron la extracción de moléculas polisacáridicas de trofozoitos de *L. nistolytica*, obtenidas por el método de Freeman-Staub. El análisis químico de estos polisacáridos demostró la pre-

sencia de azúcares neutros tales como la manosa, la galactosa y la glucosa. El estudio inmunológico de estas moléculas, reveló que reaccionaban con el suero de conejos inmunizados intraperitonealmente con trofozoitos vivos, pero en ninguno de los casos reaccionaban con los sueros provenientes de pacientes con diagnóstico de amibiasis intestinal o hepática (65,66). En 1982 el mismo grupo, reportó la extracción de una LPFG, la cual resultó ser inmunogénica en conejos y reaccionó por contraelectroforesis con el suero proveniente de pacientes con diagnóstico clínico y radiológico de absceso hepático amibiano (41); por otro lado se encontró que la LPFG estaba presente en las cepas de *E. histolytica* H9:NIH y HMI:IMSS y que ambas LPFG reaccionaban con los sueros provenientes de los mismos pacientes. Todo lo anterior demostró la importancia que esta molécula puede tener en la relación hospedero-parasito (62).

El presente trabajo demostró, que la LPFG fue reconocida tanto por los sueros de los pacientes con AHA, como por el de las personas sanas; sin embargo la diferencia encontrada entre ambas poblaciones, fue muy importante. En este estudio, la técnica de ELISA fue más sensible que la hemaglutinación indirecta. La sensibilidad y la especificidad de la prueba de ELISA fue de 89% y 100% respectivamente a concentraciones de 5µg/ml de la LPFG. Estos resultados demuestran la importancia que puede tener este antígeno para el diagnóstico de la amibiasis, así como en la relación hospedero-parasito.

Walsh (67) en 1986 al hacer una revisión acerca de los problemas en el reconocimiento y diagnóstico de la amibiasis,

indico que una de las principales limitaciones en la correcta interpretación de los datos epidemiológicos de la amibiasis ha sido el uso indiscriminado de diferentes técnicas serológicas y de diferentes antígenos en cada estudio. Por lo tanto en un futuro será necesario contar con antígenos bien definidos que sean reconocidos por los sueros de los pacientes con amibiasis.

La respuesta inmune humoral en los casos de amibiasis intestinal y extraintestinal reside predominantemente en la fracción IgG (68). Existen informes contradictorios sobre la determinación de IgM específica durante la amibiasis. Boonpu-knavig (69), en 1967, utilizando la técnica de If, encontró actividad anti-amibiana casi exclusivamente en la fracción IgG; encontró únicamente trazas de IgM en dos de seis casos de ascenso hepático y en uno de dos casos de disentería crónica. Luños y cols (70), en 1986 utilizando la técnica de ELISA, encontraron que la fracción IgG era la predominante, mientras que la fracción IgM reveló escasa actividad y fue semejante a la observada en los sujetos sanos.

Nuestros resultados muestran una respuesta humoral semejante para las fracciones IgG e IgM; por lo tanto no fue posible diferenciar la respuesta primaria de la secundaria. El análisis de isotipos muestra diferencias entre el grupo de pacientes con AHA y el grupo de personas sanas. En los pacientes con AHA hubo una media de 0.86 para IgG y de 0.71 para IgM y en el grupo de personas sanas se encontró una media de 0.26 para IgG y de 0.22 para IgM.

La LPFG es un antígeno polisacárido, resistente al calor y a la actividad proteolítica de las enzimas propias de la amiba, por lo que la hace un buen candidato como antígeno en la seroepidemiología de la amibiasis.

La naturaleza polisacáridica de la LPFG se demostró, cuando al ser tratada con metaperiodato de sodio, no fue reconocida en la prueba de ELISA, por los sueros de los pacientes con diagnóstico de AHA (Figura 7).

CONCLUSIONES

La LPFG fue reconocida por el suero de los pacientes con AHA, así como por el suero de las personas sanas.

El uso de la LPFG nos permitió diferenciar a las dos poblaciones estudiadas tanto por la técnica de ELISA como por la de hemaglutinación indirecta.

El análisis de isotipos demostró la presencia de anticuerpos específicos de la clase IgG e IgM anti-LPFG.

Aparentemente los anticuerpos estudiados se encuentran dirigidos contra la porción polisacáridica de la LPFG, lo que indicaría que los azúcares son la región inmunodominante del antígeno.

El uso de la LPFG podría ser de utilidad en el serodiagnóstico de la amibiasis, así como en el estudio de la relación hospedero-parasito.

RESUMEN

Empleando el método de inmunoenálisis enzimático (ELISA) se determinó la presencia de anticuerpos anti-LP16 en el suero de 100 pacientes con ascoso hepático ambiano y en el suero de 100 personas sanas. La LP16 fue extraída por el método fenol-agua (Westphal-Jann) de trofocitos de *Entamoeba histolytica* cepa HM1:IMSS cultivados asexualmente. Las lecturas de densidad óptica para los sueros diluidos 1:400 en el grupo de pacientes con AHA presentan una $\bar{x} = 0.93 \pm 0.23$ y el grupo de personas sanas presenta una $\bar{x} = 0.37 \pm 0.12$. El análisis de isotipos en 40 sueros de pacientes con AHA mostro para IgG una media de 0.66 mientras que para IgM fue de 0.71, el grupo de personas sanas mostro para IgG una media de 0.26 y para IgM fue de 0.22. Los resultados obtenidos indican la presencia de anticuerpos específicos anti-LP16 y permite diferenciar a las dos poblaciones estudiadas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Guerrant, R.L. 1986. The global problem of amebiasis: current status, research needs, and opportunities for progress. *Revs. Infect. Dis.* 8(2):218-227.
- 2.- Ravdin, J.I., and Guerrant, R.L. 1982. A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. *Revs. Infect. Dis.* 4(6):1185-1207.
- 3.- Kudo, R.R. 1976. *Protozoología* 5a. ed. Continental, Mexico.
- 4.- McLaughlin, J., Lindmark, D. G. 1978. Membrane bound phosphatases in *E. histolytica*. *Arch. Invest. Méd.(Méx)* 9(Supl):141-148.
- 5.- Albach, R.A., Booden, F., Boonlayangoor, P. and Downing, S. 1980. Concepts of function of peripheral non-chromatine and endosome in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd.(Méx)*, 11(Supl):63-74
- 6.- Martínez-Palomo, A., 1982. *The Biology of Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons, Ltd., Great Britain.
- 7.- Pinto da Silva, P., Martínez-Palomo, A., and González-Robles, A. 1975. Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. Topochemistry and dynamics of the cell surface: Cap formation and microexudate. *J. Cell. Biol.* 64:538-550.
- 8.- Ludvik, J., and Shipstone, A.C. 1970. The ultrastructure of *Entamoeba histolytica*. *Bull. Org. Mond. Santé.* 43:301-308.
- 9.- Miller, J.H., Swartzwelder, J.C., and Deas, J.L. 1961. An electron microscopic study of *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.* 47:577-587.
- 10.- Aley, S.B., Cohn, Z.A., and Scott, W.A. 1984. Endocytosis in *Entamoeba histolytica*. Evidence for a Unique Non-acidified Compartment. *J. Exp. Med.*, 160:724-737.
- 11.- Eaton, R.D.P., Meerovitch, E., and Costerton, J.W. 1970. The functional morphology of pathogenicity in *Entamoeba histolytica*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 64:299-304.
- 12.- Lowe, C.Y., and Maegraith, B.C. 1970. Electron microscopy of axenic strain of *Entamoeba histolytica*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 64:293-298.
- 13.- McLaughlin, J., and Meerovitch, E., 1975. The surface membrane and cytoplasmic membranes of *Entamoeba histolytica* (Rodhain 1934). I. Gross chemical and enzymatic properties. *Comp. Biochem. Physiol.* 52B:477-486.

- 14.- Sepúlveda, B., and Martínez-Palomo, A. 1984. Amebiasis in Tropical and geographical medicine. K.S. Warren and Mahmoud eds. Mc Graw-Hill. New York.
- 15.- Bos, H.J. 1973. The problem of Pathogenicity in Parasitic *Entamoeba*. Acta Leidensia. 40:1-112.
- 16.- Ravdin, J.I. 1986. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. Revs. Infec. Dis. 8(2):247-260.
- 17.- Araujo, R.F., Benavidez, L.M., Vega, H.C. 1983. Treatment of chronic amebiasis in pediatric patients with a suspension of quinifamide. Clin. Ther. 6:47-52.
- 18.- Robinson, G.L. 1978. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 62:285-294.
- 19.- Reeves, R.E. and Bischoff, J.M. 1968. Classification of *Entamoeba* species by means of electrophoretic properties of amoebal enzymes. J. Parasitol. 54:594-600.
- 20.- Sargeant, P.G. and Williams, J.E. 1978. Electrophoretic isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:164-166.
- 21.- Sargeant, P.G., Williams, J.E. and Grene, J.D. 1978a. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:519-521.
- 22.- Sargeant, P.G., Williams, J.E., Kumate, J. and Jiménez, E. 1980a. The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in Mexico City. A pilot survey I. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74:653-656.
- 23.- Sargeant, P.G., Williams, J.E., Bhojwani, R., Campos, J.E., and Gomez, A. 1982a. The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in a rural and urban area of Mexico. A pilot survey II. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76:208-210.
- 24.- Sargeant, P.G. and Williams, J.E. 1979. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 73:225-227.
- 25.- Sargeant, P.G., Beveja, U.K., Nanda, R. and Anand, B.S. 1984. Influence of Geographical factors in the distribution of Pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*: Identification of zymodeme XIV in India. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 78:96-101.
- 26.- Sargeant, P.G., Williams, J.E., Jackson, T.F.H.G. and Simjee,

- A.E. 1982b. A zimodeme study of *Entamoeba histolytica* in a group of South African school children. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76:401-402.
- 27.- Diamond, L.S. 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Science 134:336-337.
- 28.- Lunde, M.N., and Diamond, L.S. 1969. Studies on antigens from axenically cultivated *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba histolytica*-like amebae. Am. J. Trop. Med. Hyg. 18(1):1-6.
- 29.- Khan, Z.A., and Meerovitch, E. 1968. A comparative study of antigens of some of the "histolytica-type" strains of *Entamoeba*. A qualitative and quantitative evaluation of antigens by Indirect Hemagglutination. Am. J. Trop. Med. Hyg. 17(4):528-539.
- 30.- Khan, Z.A., and Meerovitch, E. 1970. Studies on the purification of *Entamoeba histolytica* antigens by gel filtration. I. Some physicochemical properties of the insolated fractions. Can. J. Microbiol. 16:485-492.
- 31.- Alam, M., and Ahmad, S. 1974. Immunogenicity of *Entamoeba histolytica* antigen fractions. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 68:370-373.
- 32.- Krupp, I.M. 1974b. Protective immunity to amebic infection demonstrated in guinea pigs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23:355-360.
- 33.- Krupp, I.M. 1977. Definition of the antigenic pattern of *Entamoeba histolytica*, and immunoelectrophoretic analysis of the variations of patient response to amebic disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26:387-392.
- 34.- Parkhouse, M., Cid, M.A., y Calderon, J. 1978. Identificación de antígenos de membrana de *Entamoeba histolytica* con anticuerpos de pacientes con amebiasis. Arch. Inv. Med. (Mex), 9(Supl):211-218.
- 35.- Sawney, S., Chakravarti, R.N., Jain, P., and Vinayak, V.K. 1980. Immunogenicity of axenic *Entamoeba histolytica* antigen and its fractions. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 74:26-29.
- 36.- Martínez-Palomares, A., González-Rodriguez, A., and de la Torre, M. 1973. Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by concanavalin A. Nature New Biol. 245:186-188.
- 37.- Ghadirian, E., and Meerovitch, E. 1984. Lectin-induced agglutination of trophozoites of different species and strains of *Entamoeba*. Z. Parasitenkd. 10:147-152.

- 38.- Kobiler, D., Mirelman, D. 1980. Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* 29: 221-225.
- 39.- Kavdin, J.I., Murpny, C.F., Salata, R.A., Guerrant, R.L., and Hewlett, E.L. 1985. The N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica*. I. Partial purification and relationship to amebic *in vitro* virulence. *J. Infect. Dis.* 141:812-822.
- 40.- Aley, S.B., Scott, W.A., and Cohn, Z.A. 1980. Plasma Membrane of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 152:391-404.
- 41.- Isibasi, A., Cruz, M.S., Ramirez, A. y Kumate, J. 1982. Inmunológica de una lipopeptidofosfoglicana extraída de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* cepa HK-9 cultivada en medio axénico, utilizando el método de fenol-agua. *Arch. Inv. Med.(Méx)* 13(Supl):51-55.
- 42.- Isibasi, A., Cruz, M.S., Soto, X., Ramirez, A. y Kumate, J. 1982. Localización en los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* de una lipopeptidofosfoglicana extraída por fenol-agua de la cepa HK-9. *Arch. Inv. Med.(Méx)* 13(Supl):57-62.
- 43.- Acosta-Altamirano, G., Torres-Sanchez, E., Meraz, E., Isibasi, A., Kumate, J. 1986. Detección de anticuerpos de clase IgA dirigidos contra una lipopeptidofosfoglicana de *E. histolytica* en muestras de calostro humano. *Arch. Inv. Med.(Méx)*. 17(Supl):291-295.
- 44.- Perches, A., Kretschmer, R., Lee, E., y Sepúlveda, B. 1970. Determinación de inmunoglobulinas del suero en pacientes con amibiasis invasora. *Arch. Inv. Med.(Méx)*. 1(Supl):97-100.
- 45.- Wagener, E.H. 1924. A precipitin test in experimental amoebic dysentery in cats. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 26:15-20.
- 46.- Zaman, V. 1960. Studies with the immobilization reaction in the genus *Entamoeba*. *Am. Trop. Med. Parasitol.* 54:381-391.
- 47.- Nakamura, M., and Baker, L.E. 1957. Agar diffusion precipitin technique for the detection of antibodies against *E. histolytica*. *Bacteriol. Proc.* M105,95.
- 48.- Goldman, M. 1954. Use of fluorescein-tagged antibody to identify cultures of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*. *Am. J. Hyg.* 59:318-325.
- 49.- Morris, M.H., Powell, S.J., and Elsdon-Dew, R. 1970. Lix agglutination test for invasive amebiasis. *Lancet* i:1362-1363.
- 50.- Kessel, J.F., Lewis, W.P., and Kim, H. 1961. Preliminary report on a hemagglutination test for *E. histolytica*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 106:409-413.

- 51.- Kessel, J.F., Lewis, W.P., Molina-Pasquel, C., and Turner, J.A. 1985. Indirect hemagglutination and complement fixation tests in amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14:540-550.
- 52.- Sepúlveda, B., Lee, E., de la Torre, M., y Landa, L. 1971. El diagnóstico serológico de la amebiasis invasora con la técnica de inmunoelectroforesis cruzada. *Arch. Inv. Med. (Méx.)* 2(Supl):263-268.
- 53.- Bos, H.J., Eijk, A.A., and Steerenberg, P.A. 1975. Application of ELISA-enzyme linked immunosorbent assay- in the serodiagnosis of amoebiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 69:440.
- 54.- Voller, A., Bidwell, D.L., Bartlett, A., and Edwards, R. 1977. A comparison of isotopic and enzyme immunoassays for tropical parasitic diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71:431-437.
- 55.- Kim, H., and Finkelstein, S. 1978. Serologic responses in amebiasis. *Arch. Inv. Med. (Méx.)* 9(Supl):357-361.
- 56.- Knobloch, J. and Mannweiler, E. 1983. Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:727-732.
- 57.- Knobloch, J., Mannweiler, E., Hofer, W., and Kern, P. 1982. Efficiency of serodiagnosis in amebiasis. Results obtained by four different test in 13,458 persons with varying exposure. *Tropenmed. Parasitol.* 33:107-110.
- 58.- Diamond, C. 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudin 1903 and *E. histolytica*-like amebae. *J. Parasitol.* 54:1041-1056.
- 59.- Westphal, O., and Jann, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In *Methods of carbohydrate chemistry*. Eds. Whistler, R.A., Bemiller, J.N. and Walfrom, M.L. 5:93-95. New York. Academic Press.
- 60.- Engvall, E., Perlman, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Immunochem.* 8:874-879.
- 61.- Dishon, I., Slutsky, G.M., El-On, and Greenblatt, C.L. 1981. Coagglutination and indirect hemagglutination in the detection of an excreted immunologically active substance from *Leishmania*. *Isr. J. Med. Sci.* 17:245-248.
- 62.- Iribasi, A., Cruz, M.S., Cottlieb, M., Kumate, J. 1986. Purificación de la porción polisacáridica de la lipopeptidofosfoligancana extraída de trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Inv. Med. (Méx.)* 11(Supl):73-79.

- 63.- Lushbaug, W.B., and Miller, J.H. 1974. Fine structural topography of *Entamoeba histolytica* Shaudin, 1903. J. Parasitol. 60:421-433.
- 64.- Pinto da Silva, P., Martínez-Palomo, A., and González-Robles, A. 1975. Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. J. Cell. Biol. 64:538-550.
- 65.- Isibasi, A., García Tamayo, F., y Kumate, J. 1976. Polisacáridos obtenidos de *Entamoeba histolytica* en cultivo axénico. En "Memorias de la Conferencia Internacional Sobre Amibiasis" Eds. Sepúlveda, B. y Diamond, L.S., IMSB. Mexico. Pag: 82-86.
- 66.- Isibasi, A., Sánchez, N., García Tamayo, F., y Kumate, J. 1978. Serología con polisacáridos de *Entamoeba histolytica*. Arch. Inv. Med.(Mex). 9(supl):285-289.
- 67.- Walsh, A.J. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8(2):228-238.
- 68.- Juniper, K., Worrell, C.L., Minshew, M.C., Roth, L.S., Cybert, H., Lloyd, R.E. 1972. Serologic diagnosis of amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21:157-168.
- 69.- Boonpuknaving, S. and Nairn, R.C. 1967. Serological diagnosis of amoebiasis by immunofluorescence. J. Clin. Path. 20:875-878.
- 70.- Muñoz, O., Hernández-Velarde, R., Cruz-Mejía, E., Martínez, M.C. 1976. ¿Es posible distinguir entre infección hepática antigua y reciente mediante el análisis inmunoenzimático. Arch. Invest. Med.(Mex). 17(supl):327-330.