



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Identificación de anticuerpos anti-Entamoeba histolytica por reacción de coagulación.

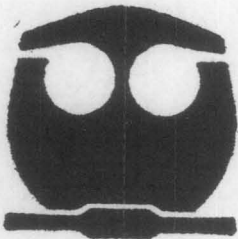
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A ;

MARTIN CARLOS EDUARDO AREVALO DE LEON



1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

CLAS M. E. 22
ADD _____
FECHA _____
PROB _____

Identificación de anticuerpos anti-
Entamoeba histolytica por reacción
de coagulación.

LIBRO DE TÍTULOS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO
UNAM
BIBLIOTECA

MARTIN CARLOS EDUARDO AREVALO DE LEON





EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

Jurado asignado según el tema:

Presidentes:	Prof. Eida Peniche Quintana
Vocal:	Prof. Oscar Velasco Castrejón
Secretarios:	Prof. Abel Gutiérrez Ramos
1er. Suplentes:	Prof. Raúl Garza Velasco
2do. Suplentes:	Prof. Ma. del Pilar Granada Macías

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Biología, Facultad de Química.
UNAM.

Sustentante:

Martín Carlos Eduardo Arévalo de León

Asesor del tema:

Q.F.B. Abel Gutiérrez Ramos

Quiero agradecer a la maestra Ma. Dolores Lastra el haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en los laboratorios del Departamento de Biología. Al maestro Saturnino de León por haber aclarado tantas dudas y haber facilitado material de su laboratorio. Al maestro y amigo Alejandro Bonifaz por la amabilidad de facilitarme su cámara y por el ejemplo de profesionista que debiéramos seguir. A Mercedes Mejía Bocanegra y Arturo Caballero Salcedo, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por haber proporcionado los sueros, sin los cuales, no hubiera sido posible realizar este trabajo. A Santiago Capella por su consejo estadístico.

A mis compañeros Norma Castellanos, Alberto Tiburcio y Ruth Valderrama, por haberme ayudado en la realización de este trabajo, aunque ya no se acuerden de lo importante que esta ayuda fué.

Lógicamente, a mi asesor Abel Gutierrez, por el apoyo en este trabajo, y en el campo profesional.

Si no es aquí, creo que en muy pocas ocasiones tendré otra vez la oportunidad para expresar mi cariño, afecto y agradecimiento por cosas que nada tienen que ver con este trabajo, a tanta gente:

A Margarita, Jhonny y Silvia Elena por ser siempre tan sinceros, objetivos y sobre todo por cumplir tan fielmente con su papel de hermanos mayores, aunque a veces haya renegado. A Cesar Bernarrama por seguir creyendo que tengo 15 años. A Julio van Dooren, Juan e Irene Bonilla, Roberto Alzaga, Horacio Muñoz, Juan Mata, Leonardo López, Elena Arózqueta, Sofía Bonet y Emmanuel Mel por esa amistad tan especial con cada uno de ellos.

A mis compañeros de generación "Bioquímicos '84(a huevo!)" por todos esos momentos tan especiales y por la camaradería con que nos graduamos.

A Felipe, Renato, Rodrigo, Dionisio, Alvaro y Jose Mario por mantener y demostrar esa amistad a pesar del tiempo y la distancia.

A Humberto Gómez, Francisco Rojo, Silvia Mendoza y Adolfo García por el apoyo y estímulo que me han dado.

Dedico este trabajo a Juan José Arevalo Bermejo,
a Ma. Margarita de León y a Alejandra Ortiz A.

INDICE

RESUMEN	1
OBJETIVOS	3
GENERALIDADES	
<u>E. histolytica</u> y la amebiasis	4
Inmunología de la amebiasis	11
La proteína A y sus aplicaciones	16
Métodos de detección de la amebiasis	18
PARTE EXPERIMENTAL	
Reactivos biológicos	21
Metodología	24
-Condiciones de reacción	
-Interpretación	
RESULTADOS	28
ANALISIS DE RESULTADOS	38
CONCLUSIONES	41
APENDICE	43
BIBLIOGRAFIA	48

RESUMEN

El siguiente trabajo es una evaluación primaria de una prueba de coagulación "in vitro" para determinar el título de anticuerpos anti-Entamoeba histolytica en sueros humanos.

La inquietud de realizar este trabajo resultó al estudiar un artículo titulado "Surface coagulation with formalinized, stained protein A staphylococci in the immunologic study of three pathogenic amebae" [4]. En dicho trabajo, los autores hacen un estudio en el que encuentran que las células estafilocócicas con proteína A formalinizadas y combinadas con anticuerpos específicos, se aglutinaban sobre una porción de la superficie amebiana de trofozoítos vivos.

El interés de realizar un estudio primario para una prueba similar "in vitro", fué el de pensar en la posible aplicación de ésta para realizar estudios seroepidemiológicos que fuesen confiables y de sencilla realización, pues los métodos actuales implican un tiempo relativamente corto, pero una disposición de material y condiciones de trabajo que en muchas partes en donde se desean realizar los estudios, son difíciles de encontrar.

La realización de este trabajo implicó el cultivo axénico de Entamoeba histolytica y de Staphylococcus aureus cepa Cowan I, para la preparación de las placas y los reactivos, así como también la obtención de Suero de Coombs. Los procedimientos de obtención de los reactivos, el desarrollo de las reacciones y la condición de las mismas se detallan en capítulos subsecuentes.

El análisis de resultados se realizó en base a un estudio

estadístico y a los antecedentes generales de la amebiasis y la respuesta inmunitaria provocada en el organismo.

OBJETIVOS

-Estudiar la relación entre la coagulación y la prueba de hemaglutinación indirecta, en la detección de anticuerpos anti-Entamoeba histolytica para determinar la posible correlación entre el título de anticuerpos resultante en las dos pruebas.

-Determinar la posibilidad de establecer la coagulación como prueba alterna para el desarrollo de estudios seroepidemiológicos.

-Establecer una discriminación entre sueros positivos y sueros negativos de manera que los resultados de la prueba puedan ser considerados como un resultado parcial confiable dentro de un estudio general del paciente.

-Establecer los mecanismos por medio de los cuales se determine la variabilidad de la prueba y con esto decidir la confiabilidad de la misma.

GENERALIDADES

Entamoeba histolytica y la amebiasis.

La amebiasis es una de las tres parasitosis que más afecta globalmente a la humanidad (aproximadamente el 10% de la población mundial). Su elevada incidencia se debe principalmente a la falta de higiene en los grandes hacinamientos de diferentes países y a la facilidad con que se transmite dicha enfermedad en esas condiciones. En los países desarrollados, el porcentaje de población que padece la enfermedad es mínimo debido al alto grado de control general de condiciones ambientales y de saneamiento. Se ha reportado que en México hasta el 25% del total de la población puede estar infectada por el protozooario, además de que es una de las diez principales causas de mortalidad [16].

La amebiasis puede presentarse en el individuo, de tres maneras diferentes dependiendo de las condiciones del huésped y de las características del parásito, como veremos más adelante. Estos tres estados de colonización se diferencian según el grado de invasión del huésped por el parásito:

1.- Infección asintomática (colonización luminal):

La mayor parte de las infecciones por E. histolytica en el hombre, son completamente asintomáticas, y se detectan generalmente por medio de los exámenes coproparasitológicos en los que se determina la excreción de quistes, o también puede hacerse por medio de sondeos seroepidemiológicos, ya que son

cuando el parásito no lesiona las paredes del intestino, se presenta un mecanismo humoral en contra del mismo, eso sí, con títulos muy bajos [3,14]. La excreción de los quistes puede encontrarse en un 2 a más del 40% de la población, dependiendo también del área que se ha sondeado y del nivel de higiene y sanidad de la misma. El que la enfermedad asintomática se convierta en una infección que comprometa al organismo, dependerá de la capacidad del parásito para generar la enfermedad, como se verá más adelante.

2.- Infección limitada al tracto gastrointestinal:

Los síntomas de una rectocolitis pueden presentarse en dos situaciones: ya sea por ingestión directa de quistes virulentos del parásito, o durante el curso de una infección asintomática prolongada. El período de incubación de la enfermedad es de una a cuatro semanas, pero puede prolongarse hasta un año [7]. La invasión de la capa mucosa se observa más frecuentemente en el ciego y después (en orden descendente), en el colon ascendente, recto, sigmoides y apéndice. Las lesiones generadas por el parásito conforme se disemina a través de las capas de mucosa, son ulceraciones que tienen la forma de matraz invertido o de diamante y éstas pueden identificarse como áreas ligeramente levantadas con orificios amarillos centrales y rodeadas por hemorragias petequiales. La mucosa intermedia parece no estar afectada hasta este punto, y después de tratamiento, la mayoría de las ulceraciones amebianas parecen sanar sin dejar cicatriz.

La amebiasis intestinal puede ser más extensa resultando entonces la formación de ulceraciones confluentes. Estas provocan

una pérdida de capa mucosa y submucosa en áreas considerables. Otra complicación que puede presentarse es la peritonitis. Ocasionalmente hay un engrosamiento de la pared intestinal acompañada de pérdida de capas musculares, imposibilitándose la entrada del contenido del intestino en la cavidad peritoneal, por una membrana edematosa peritoneal que puede romperse en cualquier momento [3]. La invasión repetida del colon, seguida de infección secundaria, puede dar como resultado la formación de un ameboma o gránulo amebiano, que puede ser confundido con un tumor maligno.

3.- Infección extraintestinal:

Las complicaciones extraintestinales pueden surgir desde unos cuantos días hasta meses después de establecida la infección intestinal, o puede presentarse en algunos casos sin sintomatología previa o historial clínico de la enfermedad [3,7]. Una de estas complicaciones es la extensión directa a la piel, resultando en una amebiasis cutánea. Esta se caracterizó por la aparición, en las regiones anal y perineal, de ulceraciones dolorosas y de rápido desarrollo con márgenes irregulares. En infecciones severas, puede perforarse la cavidad peritoneal provocando una peritonitis, considerada como la complicación más peligrosa de la amebiasis intestinal.

La peritonitis y la amebiasis cutánea son complicaciones muy raras, comparadas con la diseminación de E. histolytica a través del sistema venoso portal hacia el hígado, en donde se forma un absceso. En dos terceras partes de los casos se encuentra un absceso único, siendo afectado el lóbulo derecho, ocho ve-

ces más que el izquierdo. La pared del absceso consiste de fibroblastos, macrófagos y linfocitos. Aún cuando se pueden encontrar trofozoítos en la pared del absceso, los quistes no se presentan. No se encuentran bacterias y el pus en la vecindad del tejido necrótico es estéril, esto es, que no se encuentran células amebianas viables [3].

El agente etiológico de dicho padecimiento es Entamoeba histolytica. Pertenece al sub-reino y phylum de los animales unicelulares: los Protozoarios; al sub-phylum Sarcodina, superclase Rhizopoda (clase Lobosea); y al orden Amoebida, comprendiendo a las familias Acanthamoeba y Naegleria de vida libre y a la familia Entamoebida que comprende a los organismos Endolimax nana, Iodamoeba butschlii y Dientamoeba fragilis además del género Entamoeba que incluye también a las especies polecki, coli, gingivalis y hartmanni (diferenciada morfológicamente de histolytica) que afectan al hombre. Las especies no asociadas al organismo humano son moshkovskii (de vida libre), así como chattoni e invadens que afectan a los primates y reptiles respectivamente.

Ciclo biológico:

El ciclo de vida del parásito en el hombre comienza por la ingestión oral de las formas quísticas tetranucleadas. El quiste atraviesa el tracto intestinal para llegar finalmente al ileon y ciego en donde forma ocho trofozoítos mononucleados por una serie de divisiones nucleares y citoplásmicas. Estos se reproducen después por medio de fisión

binaria causando padecimientos como diarrea, disenteria^a amebiana y otros síntomas más severos, dependiendo del grado de complicación de la parasitosis. En ciertas condiciones que no se han determinado con precisión, algunos trofozoítos pierden su motilidad y pasan a un estado pre-quístico [3].

Los trofozoítos de E. histolytica miden de 12 a 60 μm . siendo el promedio de poco más de 20 μm . Son anaerobios facultativos, limitados por una doble membrana de 120 \AA . Requieren de un pH ligeramente ácido (6.0-6.5) y medios complejos para su cultivo "in vitro". E. histolytica tiene estructuras parecidas a microfilamentos y actina, pero no microtúbulos citoplásmicos evidentes o mitocondrias. No posee ni citocromos, ni vía clásica de Embden Meyerhoff, retículo endoplásmico rugoso, tubulina citoplásmica o aparato de Golgi. Posee sistemas enzimáticos de malato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y una capacidad limitada para consumir hasta 5% de oxígeno. Las amebas tienen glucógeno, vacuolas digestivas, ectoplasma, endoplasma y cadenas helicoidales de ribosomas que se asocian para formar cuerpos cromáticos.

Virulencia y Patogenicidad:

La virulencia de las diferentes cepas de E. histolytica se ha referido a diversas características de los organismos. Dentro de esta materia hay dos tendencias principales para explicarla. La primera de ellas se basa en que todas las cepas de E. histolytica son potencialmente patógenas, pero que algún estímulo todavía no precisado, convierte al parásito en un organismo verdaderamente histolítico [3]. Dentro de este estímulo

se ha considerado el estado nutricional del huésped, la citotoxicidad del organismo, así como también sus propiedades de superficie, dentro de las cuales resalta el hecho de que entre los trofozoitos virulentos la carga es menor, y de que poseen receptores para concanavalina A [7,13]. La otra tendencia toma como parámetro la capacidad del parásito para fagocitar eritrocitos y la capacidad para destruir neutrófilos polimorfonucleares humanos [3,7,16]. Esta última tendencia ha demostrado que si existen diferencias marcadas en estos aspectos entre las cepas virulentas y las no virulentas.

La patogenicidad de los parásitos está dada por la propiedad de los mismos de adherirse a la pared mucosa del intestino en donde provocan la disgregación celular de la misma y formando, por lo tanto, placas eritematosas. Esta adhesión es lograda por lo menos por dos lectinas con diferentes propiedades de afinidad glucosídica, cuyas posibles contribuciones a la patogenicidad sean adherirse a bacterias, epitelio colónico, leucocitos y otros tejidos del huésped. Una de estas lectinas, que se ha demostrado que es inhibida por la N-acetil-galactosamina, puede estar involucrada en la supresión de la inmunidad celular que ocurre en la amebiasis aguda invasiva no tratada [13].

Se ha observado también que la interacción de la ameba con las bacterias, se lleva a cabo por medio de receptores bacterianos de manosa, que incrementan la capacidad de las bacterias para provocar la separación de células de un sustrato [3]. Se ha estudiado también la relación de la actividad enzimática con la patogenicidad, pero no se ha encontrado ningún indicio de que exista algún tipo de proceso determinado, que condicione la

invasividad del organismo en el huésped. Por otro lado, se ha encontrado un grupo de toxinas que pudieran estar involucradas en los efectos citotóxicos de la invasividad. La actividad de estas toxinas en células de cultivo de tejido fue inhibida de igual forma por suero inmune como no inmune. En este grupo de toxinas puede ser que se encuentren una proteinasa ácida y otra neutra.

Antígenos amebianos:

En estudios citoquímicos y de microscopía electrónica para detectar carbohidratos, se ha determinado que hay una capa superficial o glicocáliz sobre la membrana plasmática de la ameba. Este glicocáliz parece ser más prominente en las cepas invasivas aisladas de abscesos hepáticos y de lesiones colónicas. Se han encontrado también fracciones polipeptídicas en las cepas patógenas que se adhieren a la concanavalina-A, lo que sugiere una diferencia entre las cepas virulentas y las no virulentas, en cuanto a los residuos de manosa o glucosa expuestos.

Por medio de técnicas de inmunoprecipitación, se han estudiado las respuestas de diferentes pacientes contra fracciones semipurificadas de ameba. En estos estudios se observó una gran variedad de respuestas, pero se pudo notar que la mayoría de estas, iban dirigidas contra antígenos de superficie. Para las bandas antigénicas más prominentes de estas fracciones, por medio de electroforesis, se encontraron pesos de 40kd y 88kd. A pesar de todo, no se ha logrado establecer ninguna relación entre los antígenos reconocidos y la duración de la enfermedad, sintomatología u origen de la cepa [3].

Inmunología de la Amebiasis.

Como cualquier otro agente extraño al cuerpo, E. histolytica induce una respuesta inmunitaria humoral y celular, aunque probablemente sea ésta última la que más eficazmente limite la diseminación del parásito y confiera una inmunidad post-infección en el huésped [12,14]. Siempre por efectos de simplicidad se han separado ambos tipos de mecanismos para analizar el papel que juega cada uno frente a un problema dado, aunque ya se sabe lo interrelacionados que están estos dos. Aquí se procederá de la misma forma:

Inmunidad Humoral:

Se ha demostrado en estudios seroepidemiológicos, que del 81 al 100% de personas con amebiasis invasiva colónica o con absceso hepático amebiano producen anticuerpos específicos de la clase IgG contra E. histolytica [3,14,16]. Como ya se apuntó antes, se ha observado producción de estos anticuerpos en pacientes asintomáticos. Los títulos elevados se asocian con una infección invasiva reciente, pero a pesar de que la respuesta humoral puede persistir hasta once años después, no se ha demostrado que el título de anticuerpos se relacione con el estado clínico del paciente [3,9,14]. En otros estudios se ha demostrado la presencia de coproanticuerpos de la clase IgA, aunque estos persisten por corto tiempo [14]. Aust-Kettis y Sundqvist, así como Calderón y col, demostraron en estudios "in vitro" que los trofozoitos amebianos, repetidamente agregan, ingieren o

desprenden anticuerpos humanos pegados a la ameba. De esta manera se pone de manifiesto un mecanismo por medio del cual, el parásito evade los mecanismos humorales de defensa del huésped y provoca una infección invasiva.

Dada la presencia, a veces elevada, de anticuerpos circulantes en la amebiasis invasiva, se podría pensar que la generación de complejos inmunes solubles fuera un factor importante que ayudara al desarrollo de la patogenia por el parásito. Pero las manifestaciones de la enfermedad relacionada con el complejo inmune, no se han observado en los pacientes con amebiasis invasiva, aún cuando se ha demostrado la presencia de estos complejos en algunos sueros [14].

Por otro lado, se ha demostrado que E. histolytica activa tanto la vía clásica como la vía alterna del complemento, lo cual se ha probado demostrando la deposición de C3 en la pared de la ameba en sueros tratados de diferente manera para seleccionar la acción de las vías del complemento [2,3,14]. Además, se ha sugerido que los productos de reacción del complemento pueden estimular a la ameba a incrementar la producción y liberación de enzimas hidrolíticas que contribuyan a la patogenicidad del parásito [3]. De esta manera, la activación del complemento contribuiría tanto a la defensa del huésped como a la patogénesis de E. histolytica. Otros estudios han establecido también la existencia de cepas resistentes a la acción del complemento, lo que puede ser igualmente, un factor necesario para el establecimiento del parásito en el huésped. Esta resistencia a la acción del complemento se ha visto que la poseen característicamente, las cepas patógenas de E. histolytica

Inmunidad Celular:

Se ha demostrado en diversos estudios que los neutrófilos polimorfonucleares sufren cambios morfológicos marcados en presencia de trofozoitos, y que éstos son fagocitados por el parásito a través de un mecanismo dependiente del contacto e independiente del suero. Fué notable también el hecho de que los neutrófilos solo fueron capaces de combatir trofozoitos de cepas con muy baja virulencia. Salata y col y Ravdin y col observaron que las cepas virulentas de E. histolytica que mataban a los neutrófilos no perdían su viabilidad amébrica [14]. La susceptibilidad de los neutrófilos de ser fagocitados por los trofozoitos, se relaciona con la virulencia de estos "in vitro", y también por la presencia de la lectina que es inhibida por la N-acetil-galactosamina.

Estudios y observaciones histopatológicas en modelos "in vivo" de absceso hepático, han demostrado que los neutrófilos constituyen la respuesta primaria de defensa del huésped contra la invasión parasitaria, además de que los productos de degradación por la lisis de los neutrófilos contribuyen al proceso necrótico del tejido hepático [14].

Se ha determinado también por otra parte, la actividad antiamebiana de los macrófagos, los cuales son activados por linfocinas producidas por la acción de concanavalina-A o fitohemaglutinina. La acción amebicida de estos macrófagos se debe a un mecanismo dependiente del contacto, que involucra tanto mecanismos oxidativos como no oxidativos [3,14]. En otros

estudios "in vitro", se ha demostrado también que los linfocitos T citotóxicos poseen un mecanismo amebicida dependiente del contacto, y que el fenotipo T8 es el responsable de éste, así como de que sean activados por la acción de la fitohemaglutinina [3,14].

Dentro de los componentes activos de las linfoquinas inducidas por la acción de la concanavalina-A, se encuentra el γ -interferón, que es capaz de estimular directamente a los macrófagos y linfocitos no adherentes para matar trofozoitos virulentos de E. histolytica [14].

Varios investigadores han observado que derivados protéicos solubles de ameba generan una proliferación de linfocitos T en individuos que no padecen la infección, y que esto no sucede con los linfocitos B. Esta proliferación difiere de la que se produce por acción de la concanavalina-A en la magnitud, cinética y concentración óptima. La actividad mitogénica de estos derivados se ha relacionado, después de estudios de cromatografía de filtración en gel, con la presencia de la lectina que es inhibida por la N-acetil-galactosamina [3,14].

En pruebas de hipersensibilidad retardada y de liberación de factor de inhibición de migración para linfocitos, practicadas a pacientes con amebiasis invasiva, se ha presentado siempre un retraso en la respuesta inmune mediada por células, que ha sido específica para la amebiasis, ya que en estos mismos pacientes se ha encontrado una respuesta normal cuando se hace la prueba de hipersensibilidad retardada con derivado protéico purificado (PPD) y con estreptocinasa-estreptodornasa. La capacidad de respuesta a este estímulo protéico amebiano se genera después de

la recuperación de los pacientes, lo que indica un probable mecanismo inmunosupresor producido por la ameba durante el curso de la infección [3,12,14,15].

La Proteína A y sus aplicaciones inmunológicas.

Desde los primeros estudios seroepidemiológicos para tipificar a las cepas patógenas de las no patógenas de estafilococos, se detectó la presencia de una proteína típica, específica, altamente antigénica, que era el mayor componente de una de las cuatro fracciones proteicas estafilocócicas. Tiempo después Lofkvist y Sjoquist [11] purificaron esta proteína a partir de la cepa de S. aureus Cowan I, que se había identificado como una rica fuente de la misma. En un principio se creyó que esta fracción antigénica de la pared celular de S. aureus tenía un carácter polisacárido, pero posteriormente se confirmó su carácter completamente protéico y se le dió el nombre de Proteína A. Además, se logró establecer la presencia de anticuerpos naturales en sueros humanos dirigidos contra este antígeno.

A raíz de estos hallazgos, Forsgren y Sjoquist [6] realizaron un extenso estudio de la reacción que se observaba entre la proteína A y la inmunoglobulina G, llegando a determinar que la reacción que se presentaba no era de carácter inmune propiamente dicho. Estos investigadores demostraron que la reacción no era con las partes inmunoespecíficas de las inmunoglobulinas, o sea la fracción Fab, sino que era con la fracción cristalizable Fc, a lo que ellos llamaron reacción "pseudoinmune". Esto fue después confirmado por Kronvall, quien en sus estudios determinó que la reactividad de la proteína A se limitaba a los subgrupos 1, 2 y 4 de la inmunoglobulina G [11].

Estos descubrimientos condujeron a la realización de innumerables investigaciones que involucraron esta característica inmunológica de la proteína A. Como resultado de este gran número de estudios, se ha producido una comercialización de células estafilocócicas con proteína A en su pared, o de proteína A libre, toda vez que su aplicación en diferentes ensayos fue ventajosa y recomendada.

La aplicación inmunológica de la proteína A fijada al estafilococo es amplia y se encuentra en pruebas de aglutinación y coaglutinación, de ensayo inmunoenzimático, radioinmunoensayo y hasta de activación estimuladora y mitogénica hacia linfocitos B, como agente antineoplásico y en separación de partículas específicas [11].

Métodos de detección de la amebiasis.

Aparte de la detección sintomatológica de la amebiasis, se han desarrollado varias técnicas inmunológicas para diagnosticar el padecimiento. Estas técnicas son muy útiles: a) cuando la demostración del agente etiológico es difícil, como en el absceso hepático; b) cuando las pruebas diagnósticas de rutina no logran identificar los organismos, como en el caso de enfermedad intestinal severa en el que el paciente ha ingerido ya sustancias interferentes y c) en estudios seroepidemiológicos para determinar la prevalencia y ocurrencia de la enfermedad en grupos poblacionales.

Hay numerosas técnicas basadas en la fijación, tinción y concentración, que pueden usarse para la identificación de las amebas en muestras de heces. Son las pruebas más utilizadas para el diagnóstico de E. histolytica en infecciones intestinales, pero son tardadas, costosas y sobre todo, dependen de la habilidad y experiencia en el examen microscópico por parte del operador. Hasta el momento, no hay una prueba de este tipo que pueda diferenciar quistes amebianos patógenos de no patógenos; pero si se observan glóbulos rojos ingeridos por los trofozoítos, se puede inferir un posible proceso invasivo. Se necesitan examinar por lo menos tres muestras de diferentes días para detectar más del 80% a 90% de las infecciones.

También existen pruebas como la sigmoidoscopia y la biopsia, pero no son confiables puesto que se realizan en pacientes que ya han tenido que ser hospitalizados y que, por lo tanto, ya tomaron

sustancias que pueden interferir con los resultados obtenidos (ver tabla 1).

TABLA 1:

Sustancias interferentes en pruebas parasitológicas.

Tetraciclinas

Sulfonamidas

Antiácidos, laxantes

Metronidazol

Mebendazol

Soluciones antidiarréicas y enemas

Sulfato de bario

Las técnicas serológicas son las más confiables de todas, y aún así, tienen limitaciones. La justificación para utilizar estas pruebas, que ha sido generalmente aceptada, es la interferencia de diversas sustancias en las pruebas hechas en heces. La razón por la cual las pruebas serológicas no se han considerado como métodos absolutos de diagnóstico, es la observada persistencia de anticuerpos en pacientes, mucho tiempo después de haber sanado [3,9,10,17]. Además, no se puede relacionar directamente el título de anticuerpos con la severidad de la enfermedad, ni hay diferencia en la persistencia de los anticuerpos cuando se ha sufrido un absceso hepático o infección intestinal [10]. De todas maneras, se ha sugerido que los pacientes con absceso hepático amebiano tienden a tener títulos más elevados

[3]. En la tabla 2 se enumeran las pruebas serológicas que se aplican en la mayoría de los países, de los cuales, la contrainmunolectroforesis y la hemaglutinación indirecta son las más difundidas por su sensibilidad y confiabilidad.

TABLA 2:

Pruebas serológicas utilizadas en el
diagnóstico de amebiasis .

Hemaglutinación indirecta

Contrainmunolectroforesis

Inmunofluorescencia indirecta

Aglutinación en látex

Inmunolectroforesis

Ensayo inmunoenzimático

Inmunodifusión en gel

otros .

Se han desarrollado algunas técnicas de detección de antígenos solubles amebianos, aplicando el ensayo inmunoenzimático, pero su utilización ha sido muy limitada [3,10].

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos biológicos.

-Sero de Coombs:

Obtenido mediante la inmunización de conejos con suero humano normal. El suero crudo se purificó utilizando el método de precipitación de γ -Globulinas por "salting-out" (ver Apéndice).

-Staphylococcus aureus cepa Cowan I:

Cultivo puro de Staphylococcus aureus ATCC12598. La propagación se realizó en medios de cultivo TSA en donde después de haber observado el crecimiento masivo de los microorganismos se procedió a cosecharlos añadiendo solución salina isotónica esterilizada, recolectándolos mecánicamente en un frasco vial. Después se procedió a preparar la solución madre al 10%, para lo cual se lavaron las células 3 veces en PBS pH=7.2, se midió el volumen del paquete celular y se suspendió al 10%. Se le agregó formalina al 1.5% de concentración final y se dejó reposar 3 horas a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche a 4°C. Se lavaron las células 3 veces con PBS pH=7.2 y se calentaron a 80°C por 5 minutos, enfriándose después a 8°C. Se lavaron otras 3 veces y se resuspendieron al 10% en PBS pH=7.2 agregándose azida de sodio al 0.1% de concentración final.

-Solución de Trabajo:

Esta se preparó tomando 1 ml de la solución madre al 10%, la

cual se lavó 2 veces con PBS pH=7.2 centrifugando hasta sedimentación total. Se resuspendió en 1 ml de PBS pH=7.2 y se añadieron 0.2 ml de suero de Coombs, mezclándolos y dejándolos reaccionar por una hora y media a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar 2 veces con PBS pH=7.2 y se resuspendieron finalmente en 8 ml de PBS pH=7.2.

-Cultivo Axénico de Entamoeba histolytica:

Cultivo desarrollado según la técnica de Louis S. Diamond [5]. Las placas antigénicas se prepararon a partir de este cultivo tratando a las amebas de la manera siguiente: Se separaron del medio de cultivo con agua destilada estéril y se procedió a fragmentar las células por medio de criofracturación como primer paso y posteriormente, por exposición en ultrasonido para hacer mayor la fragmentación. Después de haber hecho esto se procedió a determinar la cantidad de proteína total en el homogeneizado según la técnica de Bradford [1]. La concentración de proteínas determinada en el homogeneizado fué de 36.25 µg/ml. Al homogeneizado se le adicionó azida de sodio y se congeló hasta la preparación de las placas, lo cual consistió en extender una gota del mismo en el portaobjetos por medio de un asa bacteriológica, dejando secar ésta para fijar después por calor. Las placas se guardaron en congelación hasta el momento de su uso.

-Sueros humanos:

Los sueros humanos utilizados en esta prueba provienen de la encuesta nacional realizada por el Instituto de

Investigaciones Biomédicas y la selección de los mismos se hizo en base al título (positivo o negativo) determinado por los métodos de análisis ahí realizados (hemaglutinación indirecta). El título de corte asignado por el IIB es de 1:80, el cual se basa en estudios estadísticos realizados con anterioridad para dar validez a la encuesta. Los sueros analizados provienen de las entidades estatales de Tabasco, Morelos y Colima.

Metodología.

-Condiciones de reacción:

Las placas de reacción se corrieron de la siguiente manera: se añadió una gota de suero problema sobre la placa de reacción de manera que cubriera toda la zona antigénica. Se dejó reaccionando durante 15 minutos en cámara húmeda. Se lavó la placa con Solución Buffer de Fosfatos y se añadió posteriormente la Solución de trabajo al 10%. Esta también se dejó reaccionar durante 15 minutos en cámara húmeda, lavando la placa al final con PBS pH=7.2 y dejando secar a temperatura ambiente.

Después de esto se procedió a teñir las placas antigénicas con Cristal Violeta y Lugol, de manera que solo se tiñeran los estafilococos pegados al suero de Coombs.

Las observaciones se realizaron en un microscópio Zeiss con el objetivo x40.

El reactivo de trabajo (sol. al 10% de estafilococos), a pesar de encontrarse reportada una estabilidad de hasta 3 semanas [4], no se utilizó después de dos semanas de haber sido preparado, para evitar al máximo una diferencia de reactividad que se reflejara en los resultados finales. Tres veces se preparó la solución de trabajo: la primera para comprobar la reactividad de la solución y para fijar los parámetros de la misma, y las últimas dos para correr los sueros problema. En las últimas dos pre-

paraciones se hicieron pruebas de reactividad con los sueros controles (tanto positivos como negativos) para comprobar la uniformidad de reactividad en ambas soluciones.

Los sueros estudiados fueron en un 48% del sexo femenino y en un 52% del sexo masculino. El promedio de edad de ambos sexos es de 26.7 años.

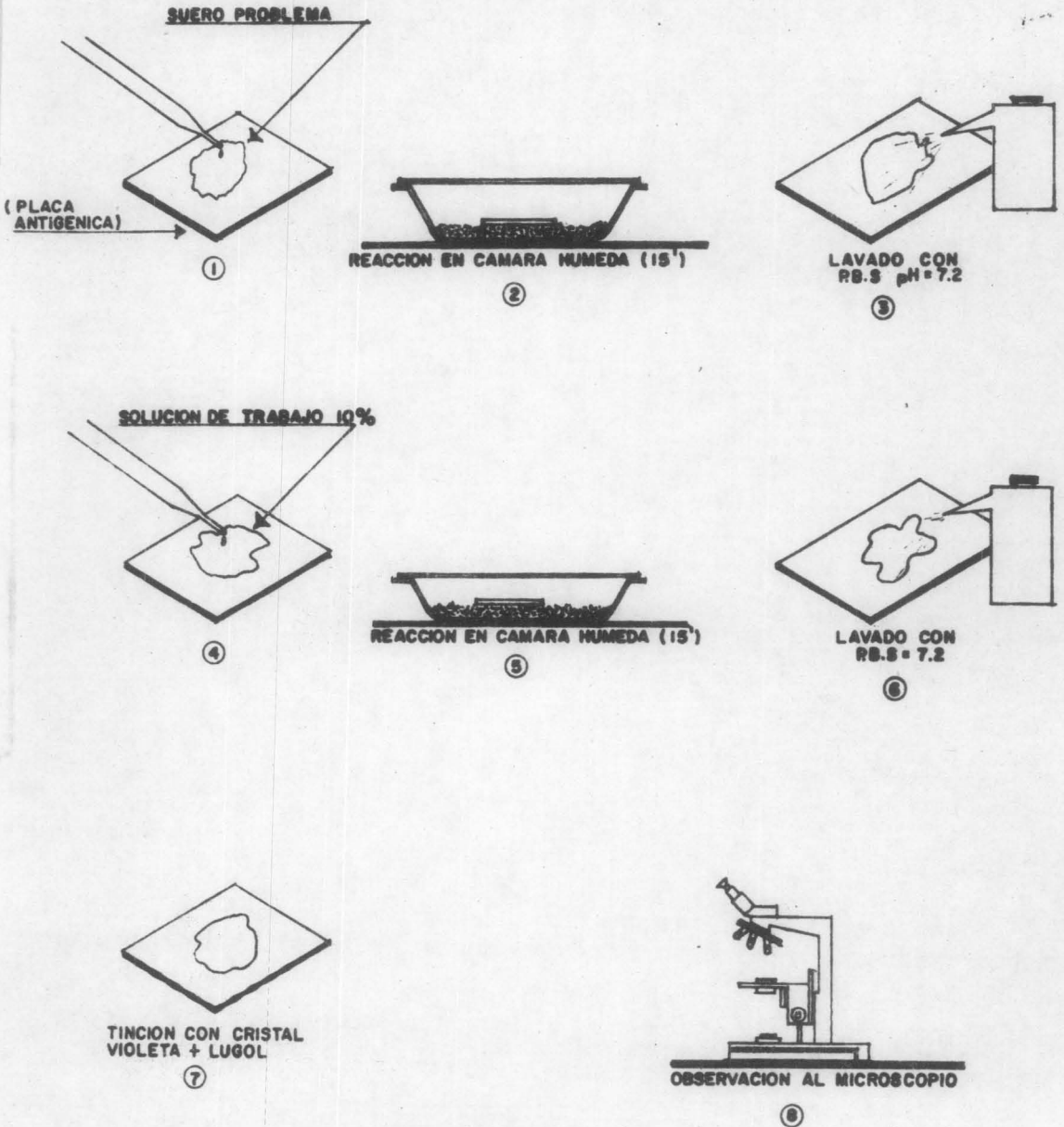
Se corrieron 58 sueros positivos y 8 sueros negativos (un suero negativo por cada siete positivos). El rango de títulos, determinados por la técnica de Hemaglutinación Indirecta, abarca valores por debajo del título de corte determinado para los mismos (1:80), hasta 1:640.

Como controles positivos se utilizaron sueros de pacientes con amebiasis extraintestinal (absceso hepático), cuyos títulos fueron de 1:1,280 y 1:2,560 (los más altos).

Como controles negativos se utilizaron cuatro sueros normales de conejo, para detectar la posible presencia de reacciones inespecíficas por el hecho de que aún con sueros humanos de títulos muy bajos, se presentaron reacciones de aglutinación en las reacciones de prueba de reactividad.

También se corrieron placas a las cuales únicamente se les adicionó la solución de trabajo, y otras que nada más se lavaron con la solución PBS.

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA TÉCNICA



-Interpretación:

La interpretación de resultados se hizo de acuerdo con la cantidad de acúmulos de estafilococos, observada al microscopio, en las placas de reacción. El valor máximo (++++) se asignó a la apariencia de los sueros controles positivos, y el mínimo (-), a aquella de los sueros controles negativos (SNC= suero normal de conejo). Esto indicaría una determinación cualitativa de la presencia de anticuerpos anti-Entamoeba histolytica en el suero de un paciente.

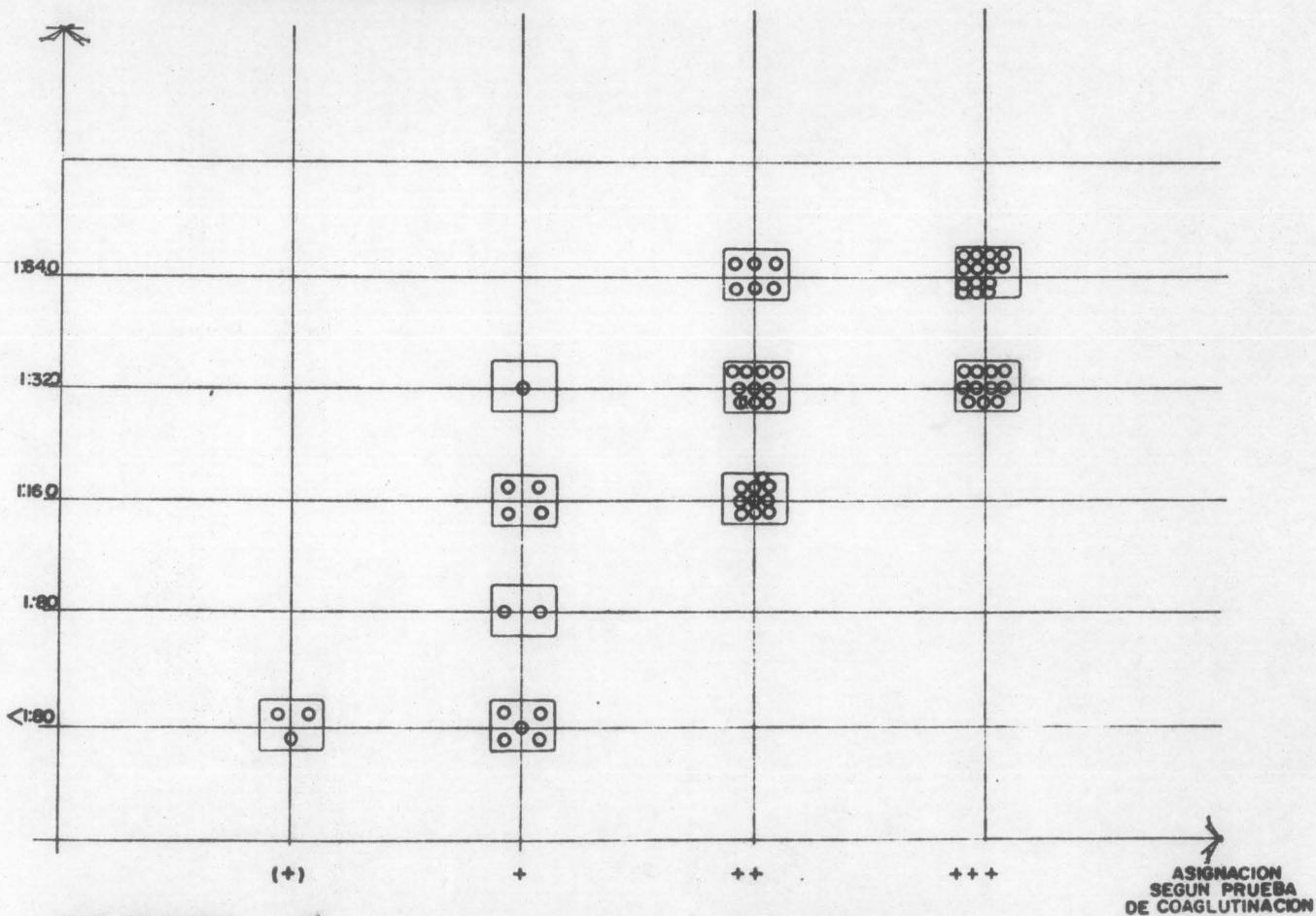
RESULTADOS

Los resultados observados fueron los siguientes:

- (+): 3 sueros negativos.
- + : 5 sueros negativos, 2 de 1:80, 4 de 1:160 y 1 de 1:320.
- ++: 10 sueros de 1:160, 10 de 1:320 y 6 de 1:640.
- +++: 11 sueros de 1:320 y 14 de 1:640.

La asignación de ++++ corresponde a los sueros controles positivos 1:1,280 y 1:2,560, la cual no se presentó en los sueros estudiados.

DISTRIBUCION DE ASIGNACION



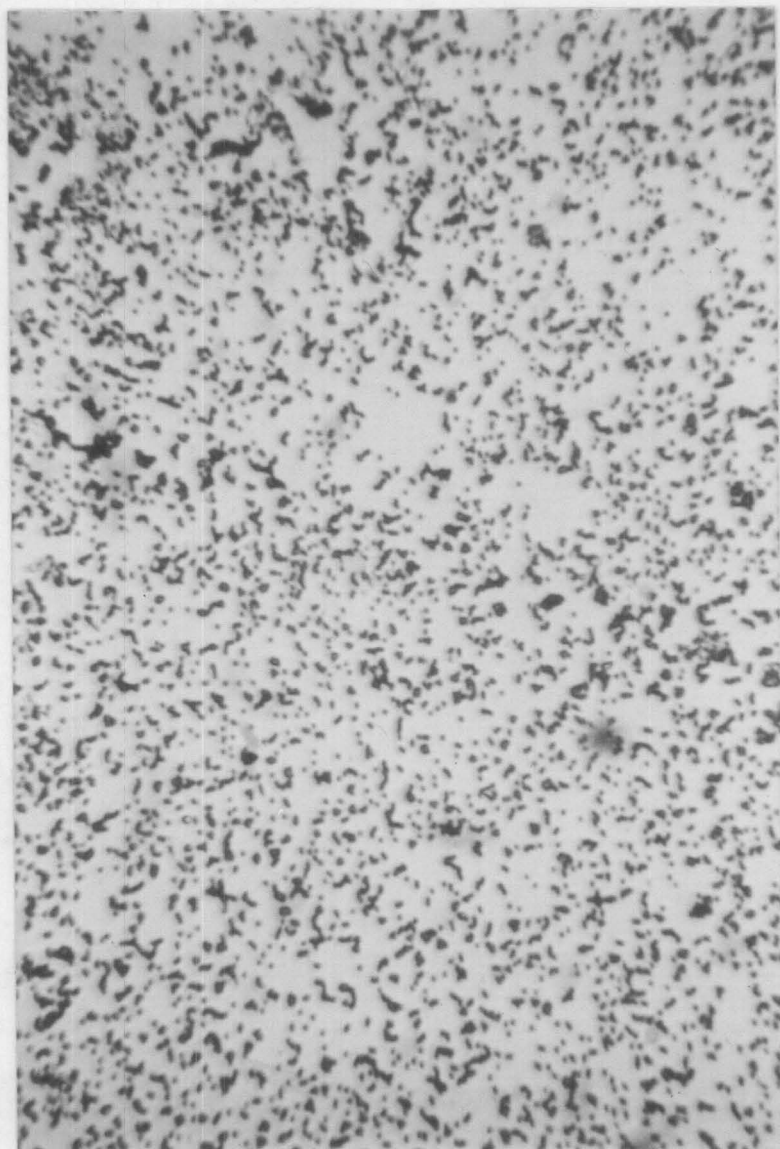
TOTAL DE SUEROS 66
 POSITIVOS 58
 NEGATIVOS 8

ASIGNACION
 SEGUN PRUEBA
 DE COAGULACION

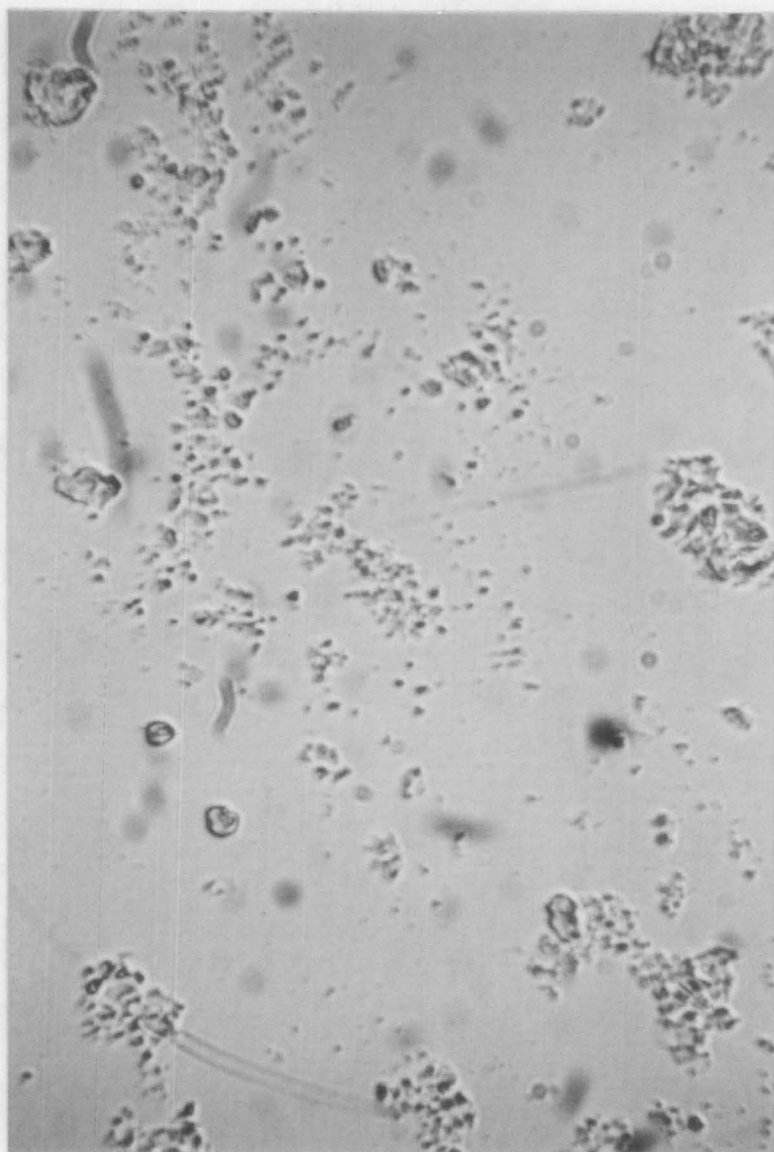


CONTROL POSITIVO (Título HAI 1:2,560)

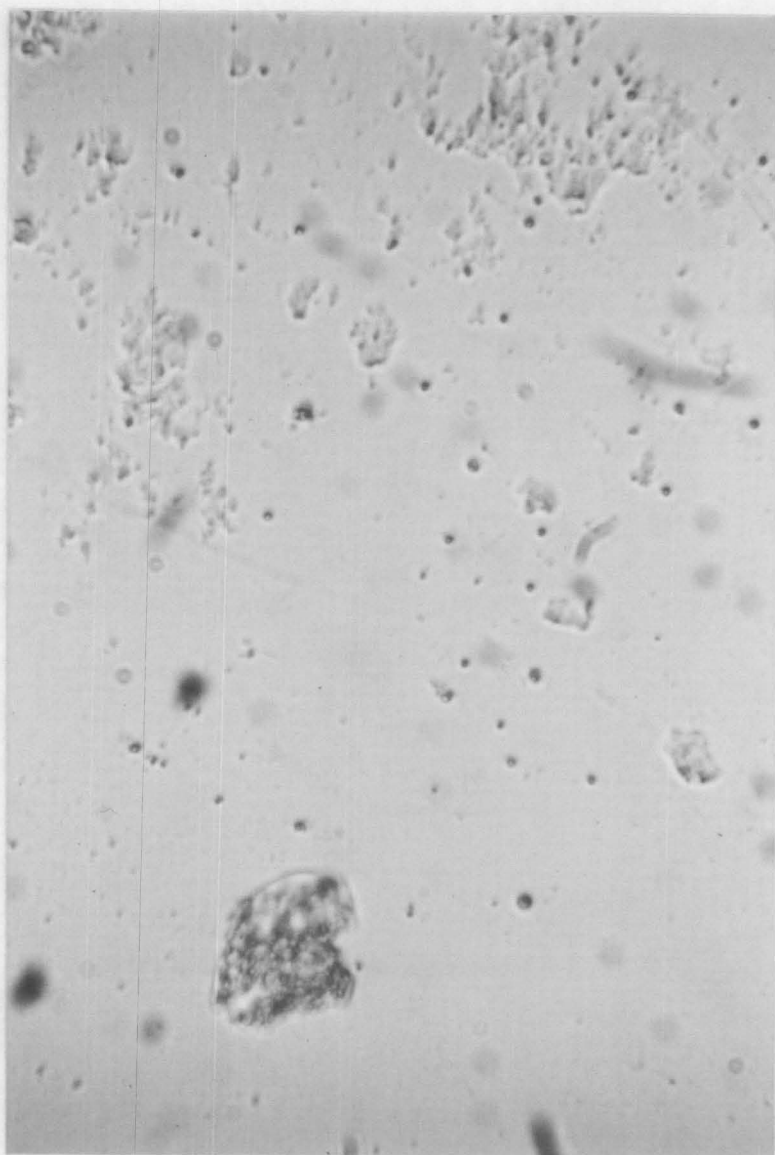
ASIGNACION DE ++++ PARA PRUEBA DE COAGULINACION



CONTROL NEGATIVO (Suero normal de conejo)
ASIGNACION DE (-) PARA PRUEBA DE COAGULACION

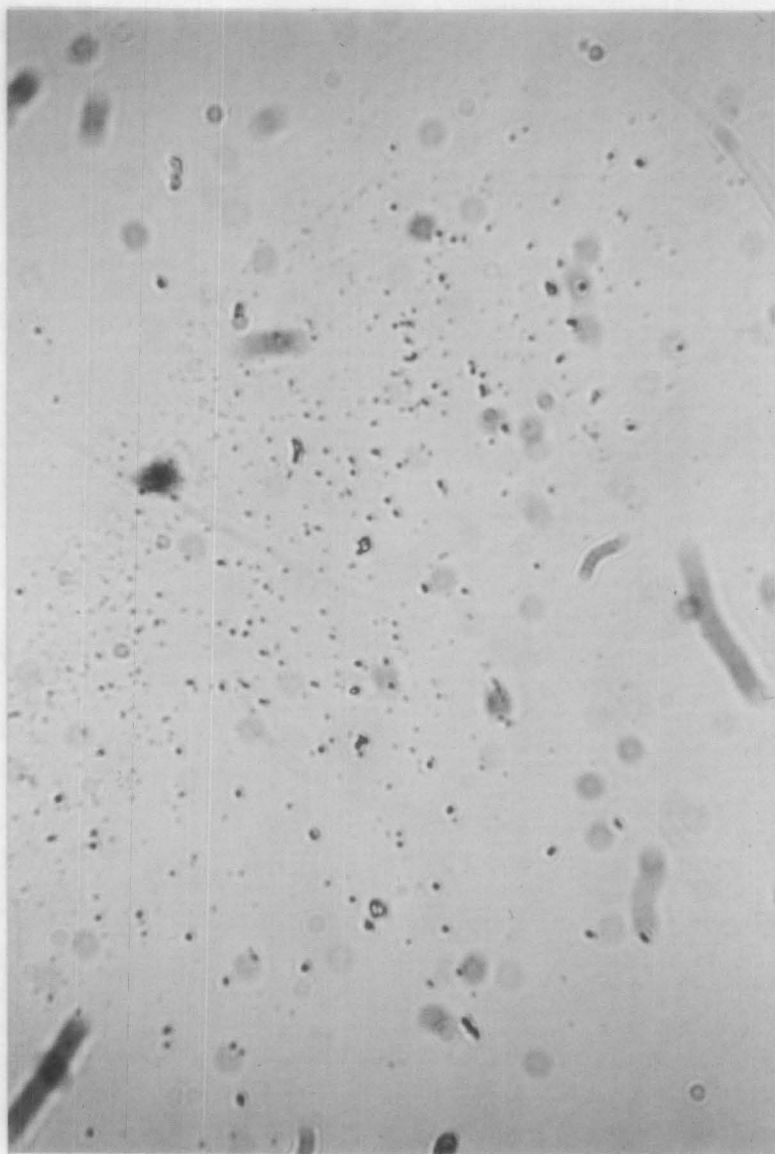


SUERO HUMANO, Titulo HAI menor a 1:80
ASIGNACION SEGUN PRUEBA DE COAGLUTINACION: (+)



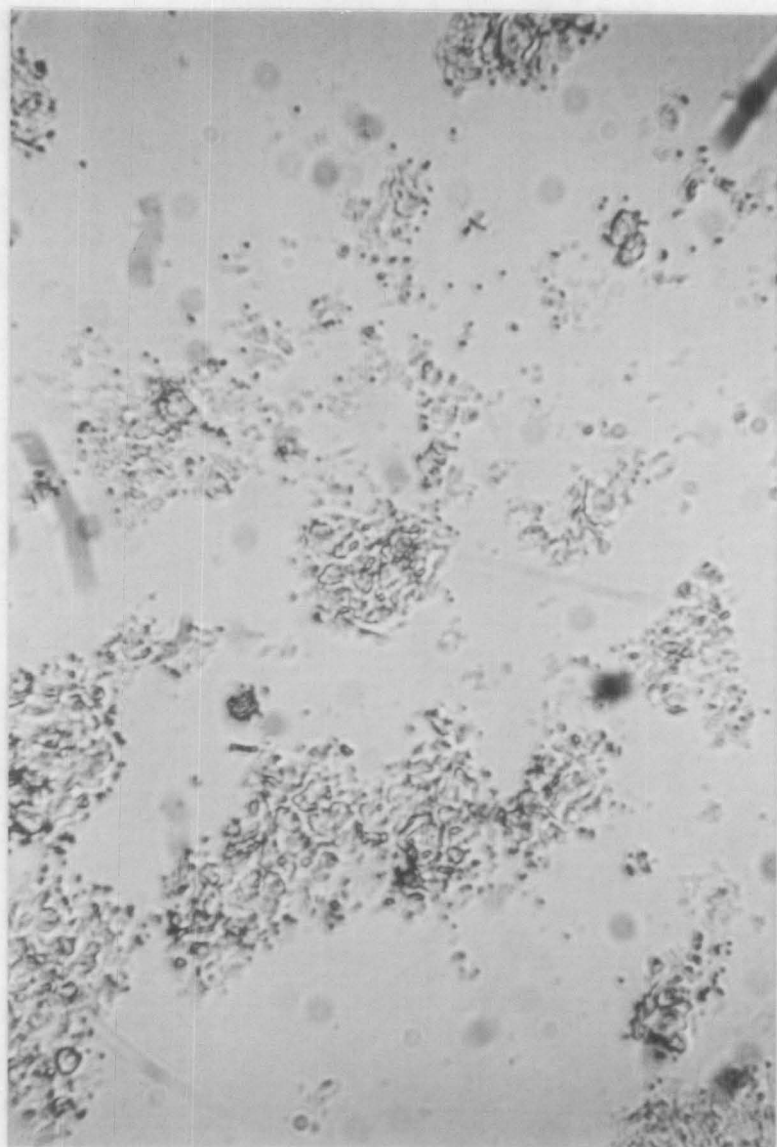
SUERO HUMANO, Título HAI 1:160

ASIGNACION SEGUN PRUEBA DE COAGLUTINACION: +



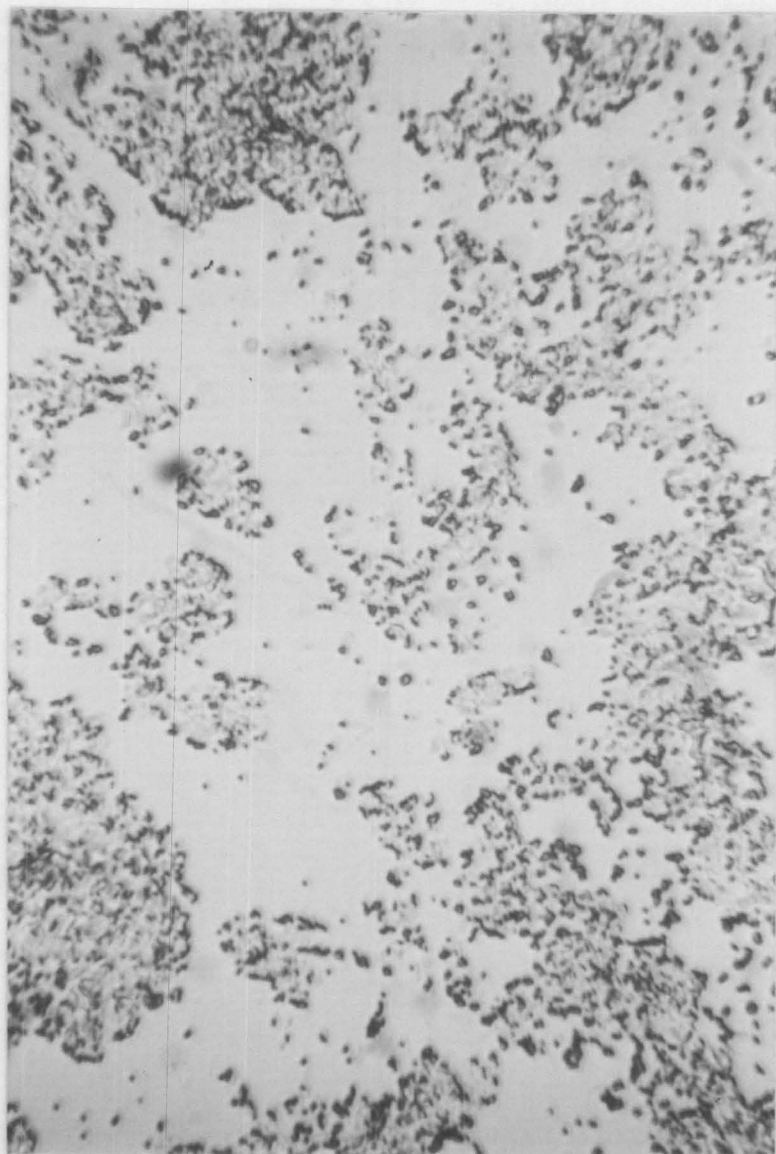
SUERO HUMANO, Título HAI 1:320

ASIGNACION SEGUN PRUEBA DE COAGLUTINACION: + +



SUERO HUMANO, Título HAI 1:640

ASIGNACION SEGUN PRUEBA DE COAGLUTINACION: + + +



Títulos de los sueros estudiados

placa1-p	57664-D 1:160 40-F ++	57842-D 1:160 8-F ++	56948-D 1:160 6-M ++	56403-D 1:160 33-M +	
placa2-p	55696-D 1:640 46-M +++	58240-D 1:160 33-F ++	57839-D 1:160 10-M ++	58276-D 1:160 35-F ++	Placas 1 a 5 son de Tabas- co.
placa3-p	58030-D 1:320 47-M +	56430-D 1:320 56-M +++	58306-D 1:160 58-M ++	56313-D 1:160 31-M +	«# expediente «título HAI «edad-sexo «título coa- glutinación
placa4-p	58331-D 1:160 9-M ++	56356-D 1:160 2-M +	58365-D 1:160 6-M +	56481-D 1:640 50-F ++	
placa5-n	32819-D 10-M (+)	32980-D 24-F +	33002-D 43-M +	32881-D 13-M +	
placa6-p	55850 1:160 14-M ++	57090 1:160 14-M ++	57082 1:320 13-F ++	57117 1:320 31-M ++	Placas 6 y 7 son de More- los III y IV
placa7-p	56780 1:320 25-F +++	57130 1:320 13-M ++	56769 1:640 11-F +++	56770 1:640 35-F +++	
placa8-n	32086-D 1-M (+)	31813-D 45-F (+)	31849-D 19-F +	32192-D 40-M +	
placa9-n	SNC (-)	SNCin (-)	SNC (-)	SNCin (-)	

placa10-p	57242-D 1:640 14-F ++	57149-D 1:320 17-F +++	57395-D 1:640 38-F +++	56784-D 1:320 15-M +++	10, 11 y 12 tambien son de Morelos III y IV
placa11-p	57486-D 1:320 14-M ++	57984-D 1:640 26-F +++	57942-D 1:320 8-F +++	57944-D 1:320 3-M +++	
placa12-p	57956-D 1:640 50-F ++	57257-D 1:640 10-F +++	57460-D 1:320 6-M +++	57954-D 1:320 70-M ++	
placa13-p	29695-D 1:640 13-F +++	29760-D 1:320 60-F +++	29692-D 1:640 39-F ++	29759-D 1:320 23-M ++	
placa14-p	29705-D 1:640 19-M +++	29718-D 1:640 63-M +++	29721-D 1:640 63-F +++	30145-D 1:640 17-M +++	Placas 13 a 18 son de Colima.
placa15-p	30115-D 1:320 18-F ++	30021-D 1:320 49-F +++	30707-D 1:640 8-F ++	30710-D 1:640 24-M +++	
placa16-p	30706-D 1:640 55-F ++	30633-D 1:320 5-M +++	30644-D 1:320 5-F ++	30410-D 1:320 28-F ++	
placa17-p	30484-D 1:320 25-F +++	30838-D 1:640 16-M +++	31133-D 1:320 35-F ++	32092-D 1:640 45-M +++	
placa18-tc	30792-D 1:80 26-M +	31173-D 1:80 17-F +			

SNC= suero normal de conejo
in= inactivado
++++= Titulo de HAI 1:2,560

ANALISIS DE RESULTADOS

Para determinar si los resultados obtenidos en la prueba pueden ser tomados en cuenta con confiabilidad, y de esta forma llegar a concluir de una manera correcta, se aplicó a los mismos una prueba estadística de correlación, que es la prueba de contingencia para pruebas no paramétricas.

Siempre que se realiza un experimento sobre una población, que de alguna u otra manera ya se ha evaluado, es deseable indicar el grado de asociación que existe entre los resultados de los diferentes experimentos o por lo menos, como en este caso, de afirmar si alguna asociación observada en la muestra de puntajes, indica que las variables en estudio están asociadas muy probablemente en la población de la que se tomó la muestra. El coeficiente de correlación representa por sí mismo el grado de asociación. Las pruebas de significación del coeficiente determinan, en un nivel de probabilidad declarado, si la asociación verdaderamente existe en la población de la que se tomó la muestra productora de los datos con los que se calculó el coeficiente de correlación.

Esta prueba se basa en el cálculo de un coeficiente de contingencia para medir el grado de asociación o relación entre dos conjuntos de atributos, cuando por lo menos uno de los atributos asignados a los elementos es clasificatorio. (En el apéndice se presenta de manera resumida el método de cálculo).

La tabulación de los datos, con los valores de cálculo in-

cluidos se presenta a continuación:

Evaluación por cruces	Título por HAI			Total
	1:160 ó menos	1:320	1:640	
+	14(5.45)	1(5)	0(4.55)	15
++	10(9.45)	10(8.67)	6(7.88)	26
+++	0(9.09)	11(8.33)	14(7.58)	25
Total	24	22	20	66

Oij: números sin paréntesis; Eij: números con paréntesis

Según la fórmula de cálculo para χ^2 (chi cuadrada):

$$\chi^2 = \sum [(O_{ij} - E_{ij})^2 / E_{ij}]$$

en donde Oij son las frecuencias observadas y Eij las frecuencias esperadas, obtenemos el resultado $\chi^2 = 37.23$, y sustituyendo este valor en la fórmula del coeficiente de contingencia:

$$C = \sqrt{\chi^2 / N + \chi^2}$$

en donde N es el número total de muestras, tenemos que $C = 0.60$.

Ahora no queda más que comprobar que este valor es significativo, y para 4 grados de libertad, la probabilidad de que $\chi^2 > 37.23$ es menor que 0.001 (ver tabla en el Apéndice). Por lo que realmente el valor de $C = 0.6$ es significativamente diferente de cero.

Otra manera de analizar los resultados obtenidos sería asignando cualidades a nuestra escala de evaluación.

Por los parámetros escogidos para realizar las pruebas, se establecieron para estas asignaciones los siguientes enunciados:

- +.....Normal
- ++.....Confirmación por HAI y análisis de sondeo
- +++.....Confirmación por HAI y análisis de sondeo
- ++++.....Posible proceso infeccioso de alto riesgo

La asignación de "Normal" clasifica a las personas que han sufrido con anterioridad una infección amibiana, o que ya son tolerantes al microorganismo, lo cual no es raro encontrar en una población que se encuentra tan expuesta al mismo.

En "Confirmación por HAI y análisis de sondeo" se requiere realizar al individuo una historia clínica completa y determinar su título de anticuerpos por la prueba cuantitativa para determinar con el conjunto, si éste se debe a una infección anterior ya controlada o a un proceso infeccioso en curso.

En "Posible proceso infeccioso de alto riesgo" lo adecuado sería determinar por diferentes análisis si el paciente presenta un proceso infeccioso que pueda comprometer seriamente su salud.

CONCLUSIONES

-Con los resultados obtenidos por el análisis estadístico, aunque el número de muestras estudiadas es pequeño, la prueba desarrollada para el estudio de anticuerpos anti-Entamoeba histolytica es representativa del título de los mismos en los pacientes.

-Su aplicación en estudios seroepidemiológicos o de sondeo de poblaciones, es conveniente por la rapidez y facilidad con que se pueden realizar estos estudios.

-Para poder tener seguridad en la confiabilidad de la prueba y que de esta manera, pueda considerarse como una prueba alternativa en los estudios seroepidemiológicos, es necesario establecer las condiciones óptimas de realización de la misma.

-Aunque en el presente trabajo se hizo el estudio con placas antigénicas de una sola concentración, para saber si existe o no variabilidad en los resultados por la concentración amebiana en la placa, sería recomendable hacer la prueba a un número mayor de sueros problema cuyos títulos ya se hayan determinado por HAI, pero sobre placas de diferente concentración y evaluar los resultados de cada suero y en conjunto, según la concentración,

-Pueden hacerse evaluaciones también para sueros diluidos, cuando el título de éstos se encuentre probablemente por encima del valor límite de la escala y quiera hacerse una aproximación más precisa.

-Probablemente el punto más crítico de esta prueba, y que por tanto tiene que ser el más considerado y sobre el cual se

tenga más control, es el de la apreciación del analista para asignar los valores a los sueros problema. Este aspecto tiene que ser controlado haciendo estudios de variabilidad en los resultados de analistas diferentes sobre un mismo conjunto de sueros.

-Siempre es deseable que las pruebas de análisis sean lo más concluyentes posible, pero siempre hay una serie de factores que tienen que considerarse, y por tanto solo se obtiene un resultado parcial.

-Por las características estudiadas del comportamiento del sistema inmunitario frente a una infección amebiana, se podría decir que cuando se detecta un título con 4 cruces, se observa el resultado de un proceso infeccioso en curso, que puede ser peligroso para el paciente.

-Para tener más seguridad en este último punto, o para saber si realmente se puede hacer una aseveración de este tipo, se requerirían hacer estudios seroepidemiológicos en pacientes con infección invasiva severa o con absceso hepático amebiano, y en base a estos resultados determinar qué tan confiable sería el resultado de la prueba.

APENDICE

Esquema de inmunización del conejo para la obtención del Suero de Coombs:

Día	Intravenosa	Intramuscular
1	0.5ml	
3	0.5ml	
5	0.5ml	
7		0.5ml
9	0.5ml	
11	0.5ml	
15		0.5ml
18	0.5ml	

Sangría el día 22.

Técnica de "salting out" para precipitación
de gamma-globulinas:

En este método se precipita a la γ -globulina mediante la adición de solución saturada a temperatura ambiente de sulfato de amonio para tener una concentración en la mezcla de 1/3 de saturación. Esta precipitación se realiza varias veces con lo que se logra tener a la γ -globulina con un grado bastante alto de pureza. El sulfato de amonio que queda "atrapado" en el precipitado de γ -globulina se elimina mediante diálisis contra solución salina amortiguada con boratos. El producto resultante de este método de purificación, es una mezcla de todos los anticuerpos contenidos en el suero, pero libres de las demás proteínas que constituyen dicho suero.

Técnica de Bradford para determinación de proteínas:

-Preparación del reactivo:

Azul brillante de Coomassie G-250 100mg
Etanol 95% 50ml
Acido fosfórico 85% 100ml
Agua desionizada , aforar hasta 1,000ml

Se disuelve el colorante en el etanol y se adiciona el ácido fosfórico, lentamente. Se afora después con el agua desionizada a 1,000ml.

-Curva estándar:

μ l estándar (1mg/ml)	μ l SSI	ml Reactivo de Bradford	Conc. μ g/ml
-	100	5	0 (Blanco)
10	90	5	10
20	80	5	20
40	60	5	40
60	40	5	60
80	20	5	80
100	-	5	100

Los problemas se preparan adicionando 100 μ l de solución a 5ml del reactivo. Tanto los problemas como la curva se leen a 595nm entre 2 minutos y 1 hr después de la reacción.

Prueba del coeficiente de contingencia

Para computar el coeficiente de contingencia entre puntajes de dos conjuntos de categorías, por ejemplo A_1, A_2, \dots, A_k y B_1, B_2, \dots, B_r , se colocan las frecuencias en una tabla de contingencia como la tabla I. Los datos pueden tener cualquier número de categorías para formar una tabla $k \times r$.

Se anotan las frecuencias esperadas para cada celdilla (E_{ij}) al determinar las frecuencias que ocurrirían de no haber asociación o correlación entre las dos variables. El grado de asociación entre las dos variables se incrementa a medida que las discrepancias entre los valores esperados y los observados es mayor.

Tabla de contingencia para cálculo de C

	A1	A2	...	Ak	Total
B1	(A1, B1)	(A2, B1)		(Ak, B1)	
B2	(A1, B2)	(A2, B2)		(Ak, B2)	
...					
Br	(A1, Br)	(A2, Br)		(Ak, Br)	
Total					N

El grado de asociación entre dos conjuntos de atributos sean ordenables o no, e independientemente de la naturaleza de la variable o de la distribución básica del atributo, puede descubrirse mediante

$$C = \sqrt{X^2 / N + X^2}$$

$$\text{donde } X^2 = \sum \sum (O_{ij} - E_{ij})^2 / E_{ij}$$

Las E_{ij} se calculan multiplicando para cada celdilla el total de la columna por el total del renglón y dividiendo este resultado entre el total de la muestra.

La página 47 no venía en el impreso original

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bradford, Marion M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254. (1976).
- 2.- Calderon, Jesus; Schreiber, Robert D. "Activation of the Alternative and Classical Complement pathways by Entamoeba histolytica". *Infection and Immunity*. 50, 2, 560-565. (1985).
- 3.- Chayen, A.; Avron, B. "Entamoeba histolytica, Antigens and Amoebiasis". *Current Topics of Microbiological Immunology*. 20, 19-41. (1985).
- 4.- Culberston, Clyde G.; Harper, Kathleen. "Surface coagglutination with formalinized, stained Protein A staphylococci in the immunologic study of three pathogenic amoebae". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 29, 5, 785-794. (1980).
- 5.- Diamond, Louis S. "Techniques of axenic cultivation of E. histolytica schaudinn, 1903 and E. histolytica-like amoebae". *The Journal of Parasitology*. 54, 5, 1047-1056. (1968).
- 6.- Forsgren, Arne; Sjoquist, John. "'Protein A' from S. aureus. I: Pseudo-immune reaction with human Gamma-globulin". *The Journal of Immunology*. 97, 6, 822-827. (1966).
- 7.- Guerrant, Richard L. "The global problem of Amebiasis: Current status, research needs and opportunities for progress". *Reviews of Infectious Diseases*. 8, 2, 218-227. (1986).
- 8.- Gutierrez, Gonzalo. "Epidemiología y control de la amebiasis en México". *Archivos de Investigación Médica (Méx.)*. 17, 373-383. (1986).
- 9.- Healy, George R.; Visvesvara, Govinda S. and Irving G. Kagan. "Observations on the persistence of antibodies to E. histolytica". *Archivos de Investigación Médica (Méx.)*. 5, 2, 495-500. (1974).
- 10.- Healy, George R. "Immunologic tools in the diagnosis of amebiasis: Epidemiology in the United States". *Reviews of Infectious Diseases*. 8, 2, 239-245. (1986).
- 11.- Immunological applications of fixed Protein A-bearing

- Staphylococcus aureus cells. CALBIOCHEM. Brand Biochemicals. Behring Diagnostics. Division of American Hoechst Corporation. Artículo de divulgación. (1983).
- 12.- Kagan, Irving G. "The Immunology of Amebiasis". Archivos de Investigación médica. 4, 169-175. (1973).
 - 13.- Ravdin, Jonathan I. "Pathogenesis of Disease caused by E. histolytica: Studies of adherence, Secreted toxins and Contact-dependent cytotoxicity". Reviews of Infectious Diseases. 8, 2, 247-259. (1986).
 - 14.- Salata, R. A.; Ravdin, Jonathan I. "Review of the human immune mechanisms directed against E. histolytica". Reviews of Infectious Diseases. 8, 2, 261-269. (1986).
 - 15.- Sepúlveda, B. "Inmunología de la Amebiasis". Memorias de la Primera Conferencia Internacional sobre amebiasis. Méx. 78-83. (1976).
 - 16.- Walsh, Julia A. "Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality". Reviews of Infectious Diseases. 8, 2, 228-238. (1986).
 - 17.- Walsh, Julia A. "Amebiasis in the world". Archivos de Investigación Médica (Méx.). 17, 385-389. (1986).