



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CULTIVO MONOXENICO DE AMIBAS
(IMPLEMENTACION DE UN METODO PARA EL
LABORATORIO DE PARASITOLOGIA)

TRABAJO RECEPTACIONAL

que para obtener el título de

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

p r e s e n t a

MARIA DE LA LUZ MENDOZA HERNANDEZ

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

1992



21

T
R.C.
.A.
M4
C.

C1

A5

4.1



1080075337



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

**CULTIVO MONOXENICO DE AMIBAS
(IMPLEMENTACION DE UN METODO PARA EL
LABORATORIO DE PARASITOLOGIA)**

TRABAJO RECEPCIONAL

que para obtener el título de
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

p r e s e n t a

MARIA DE LA LUZ MENDOZA HERNANDEZ

SAN LUIS POTOSI, S.L.P.

1992



T
Rec 121
AS
44



NO OS DEJEIS CORROMPER POR UN
ESCEPTICISMO ESTERIL Y DEPRIMENTE; NO OS
DESALENTEIS ANTE LA TRISTEZA DE CIERTAS
HORAS QUE PASAN SOBRE LAS NACIONES.
VIVID EN LA SERENA PAZ DE LOS
LABORATORIOS Y LAS BIBLIOTECAS.
PREGUNTAOS PRIMERO: ¿ QUE HE HECHO POR
INSTRUIRME? Y DESPUES, AL IR
PROGRESANDO: ¿ QUE HE HECHO POR MI
PATRIA?. HASTA QUE LLEGUE EL DIA EN QUE
PODAIS SENTIR LA INTIMA SATISFACCION DE
PENSAR EN QUE DE ALGUNA MANERA HABEIS
CONTRIBUIDO AL PROGRESO Y BIENESTAR DE
LA HUMANIDAD.

Louis Pasteur.

DEDICO ESTA TESIS:

A Dios, porque ayudandome a superar mis momentos de tristeza, me hizo vivir intensamente los de alegría.

A mis padres:

Dr. Félix Mendoza A., por ser mi ejemplo de dedicación y voluntad, pero sobre todo por su amor y su apoyo para la realización de esta meta.

Sra. Alicia Hernández de M., porque sin su cariño y su comprensión mi vida no estaría completa.

A mis hermanos: Luis Félix, Carlos Alberto y Claudia, por ser lo más valioso que tengo en esta vida.

A mi abuelita Sra. Inés Alonso porque el amor que me ha dado siempre ha sido un estímulo para alcanzar mis sueños.

A Lucita por ser para mí amiga, compañera y hermana.

A Nely y Roberto por todo lo que hemos compartido juntos a lo largo de estos años, y por ser los mejores amigos que alguien puede tener.

A todos mis familiares y amigos.

A G R A D E C I M I E N T O S

Mi más profundo agradecimiento a la maestra Q.F.B. Matilde Cervantes Castillo por la asesoría del presente trabajo, así como por el interés demostrado durante el desarrollo del mismo.

A la Dra. Enedina Jiménez Cardoso, Jefa del Laboratorio de Investigación en Parasitología del Hospital Infantil de México, por la orientación brindada en apoyo a este estudio.

Al Dr. Juan Francisco Reyes Macías, Coordinador del Dpto. de Patología de la Facultad de Estomatología de la U.A.S.L.P., por su ayuda para la obtención del material fotográfico presentado en esta tesis.

A la Srita. Yolanda Guevara Gómez, por su colaboración, sus consejos y sobre todo por su amistad.

Al personal del laboratorio de Parasitología: Q.F.B. Graciela Villanueva R. y Q.F.B. Yasmin Díaz Ruiz, por la amistad que me han brindado.

A la Q.F.B. Ma. Genoveva Alvarez O., por su apoyo incondicional.

CULTIVO MONOXENICO DE AMIBAS
(IMPLEMENTACION DE UN METODO PARA EL LABORATORIO DE PARASITOLOGIA)

C O N T E N I D O

R E S U M E N .

	pag.
1.0 Antecedentes	1
1.1 Medios de cultivo para amibas.	
1.2 Otros métodos de diagnóstico para amibas.	
1.3 Disentería amibiana.	
1.4 Amibiasis en México.	
2.0 Objetivo	7
3.0 Morfología y Ciclo biológico de <i>Entamoeba histolytica</i>	8
4.0 Material y equipo	11
4.0.1 Material de vidrio.	
4.0.2 Otros.	
4.0.3 Sustancias químicas para la preparación de reactivos.	
4.0.4 Material biológico.	
4.0.5 Aparatos.	
4.1 Métodos y procedimientos	13
4.1.1 Preparación de reactivos.	
4.1.2 Método de cultivo.	
4.1.3 Observación microscópica..	
5.0 Discusión y Resultados	16
6.0 Conclusiones	27

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

I N D I C E D E A N E X O S

	pag.
Figura No. 1.- Trofozoítos de <i>Amoeba coli</i> representados por Lösch.	4
Esquema No. 1.- Ciclo de transmisión de <i>Entamoeba histolytica</i>	10
Esquema No. 2.- Diagrama de trabajo para el cultivo monoxénico de <i>Entamoeba histolytica</i>	15
Tabla de resultados.	19
Fotografía No. 1.- Trofozoíto de <i>Entamoeba histolytica</i> de la cepa FCQ 1.	21
Fotografía No. 2.- Trofozoíto de <i>Entamoeba histolytica</i> de la cepa FCQ 1 (sin tinción).	22
Fotografía No. 3.- Trofozoíto de <i>Entamoeba histolytica</i> de la cepa FCQ 2.	23
Fotografía No. 4.- Trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> de la cepa FCQ 2.	24
Fotografía No. 5.- Trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> de la cepa FCQ 3.	25
Fotografía No. 6.- Trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> de la cepa FCQ 3.	26

RESUMEN

Los medios de cultivo han sido desde hace varios años, la base de investigaciones trascendentes. Uno de los protozoarios más estudiados por estos métodos es la *Entamoeba histolytica*, agente causal de cuadros clínicos que van desde una amibiasis intestinal hasta la disentería y absceso hepático amibianos, de gran importancia clínica y epidemiológica en nuestro país.

Es necesario por lo tanto que los métodos de diagnóstico entre los que se puede incluir los medios de cultivo, así como los de investigación, sean actualizados y perfeccionados, dada su utilidad en el diagnóstico, control y erradicación de la mencionada enfermedad parasitaria.

Los primeros medios de cultivo para amibas, se lograron en 1918 por Cuttler, y a partir de entonces han ido evolucionando proporcionando mayor efectividad. Hacia el año de 1968, el doctor G.L. Robinson en Inglaterra dió a conocer su método de cultivo monoxénico para amibas que actualmente apoya al diagnóstico de la amibiasis y a la identificación de cepas patógenas.

Dada la importancia de estos métodos, se vió la necesidad de que los alumnos de 8° semestre de la carrera de Químico Farmacobiólogo, conozcan el manejo y la aplicación de estas técnicas de cultivo, en este caso el método de Robinson objeto de estudio en el presente trabajo.

Dentro de esta investigación se analizaron 53 muestras de materia fecal, y después de comprobar en ellas la presencia de quistes de *Entamoeba histolytica* se procedió a su siembra en el medio de agar salino. De las muestras procesadas, 5 resultaron positivas al cultivo, de las cuales 4 se recolectaron sin conservador y una contenía conservador de MIF.

Una de las muestras presentó prequistes de *Entamoeba histolytica* en varios subcultivos, otra tuvo la particularidad de presentar trofozoítos de *Giardia lamblia* en uno de sus subcultivos. Por otro lado las tres muestras restantes evidenciaron trofozoítos viables de *Entamoeba histolytica* y a las cepas de ellas originadas se les designó como FCQ 1, FCQ 2 y FCQ 3 respectivamente. El tiempo de supervivencia de las cepas obtenidas fué variable, lo que puede ser influido por la patogenicidad de cada una de ellas.

Una vez comprobada la efectividad del métodos de Robinson en el cultivo de *Entamoeba histolytica*, se procedió a su montaje como práctica dentro del laboratorio de Parasitología de esta Facultad, a fin de dar a conocer a los alumnos de la carrera de Químico Farmacobiólogo su aplicación en el diagnóstico clínico de la amibiasis, y al mismo tiempo sentar bases que permitan otro tipo de estudios dentro de esta misma línea de trabajo, como pudiera ser la identificación de los zimodemos.

1.0 ANTECEDENTES.

Debido a la importancia que en nuestro país tienen las parasitosis intestinales, ha sido necesaria la implementación de métodos para identificación de parásitos que permitan estudios más profundos acerca de estas enfermedades.

De los métodos surgidos como respuesta a estas necesidades, se pueden mencionar los medios de cultivo para protozoarios, principalmente para la *Entamoeba histolytica*. Este sarcodino, como bien se conoce es el agente causal de la incidiosa amibiasis, y de sus riesgos clínicos más importantes como la disentería y el absceso hepático amibiano.

1.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA AMIBAS.

El interés por estudiar las amibas y su relación con la sintomatología y patología que provocan, ha resultado de la preocupación de médicos e investigadores de todos los tiempos. Desde principios de este siglo los medios de cultivo como métodos de investigación para amibas, han dado pistas para encontrar causas y efectos metabólicos que por otros métodos no hubiera sido posible observar. Cuttler (1918) fue el primero en cultivar a la *Entamoeba histolytica*, sin embargo, corresponde a Boeck y Drbohlav (1925) el mérito de desarrollar el primer método de cultivo reproducible para esta amiba. El medio empleado por estos investigadores estaba formado por una base de huevo en tubo inclinado, y como sobrenadante solución salina isotónica. Muchas modificaciones surgieron a partir de la creación de este método, Balamuth (1946), basándose en el mismo, fue el primero en desarrollar el cultivo monobásico. (1,2)

En todo este tipo de medios ha sido necesario la asociación del parásito con otros comensales (bacterias entéricas por ejemplo) y almidón de arroz, para que las amibas se reproduzcan y crezcan.

Al ir evolucionando estos métodos, se llegó al desarrollo de medios de cultivo monoxénicos, es decir, aquellos en que se asocia al protozoario con un solo tipo de microorganismo. El primer cultivo monoxénico fue llevado a cabo por Jacobs en 1947, un año después Shaffer y cols. lograron cultivar a la amiba en presencia de *Bacteroides symbiosus*, mediante el uso de antibióticos que eliminaron la flora bacteriana secundaria del medio. Phillips (1950) y Chia Teun Pan (1960),

informaron de otros procedimientos para el cultivo del protozoario asociado a *T. cruzi*. En 1968, el doctor G.L. Robinson presentó en Inglaterra su medio de cultivo monoxénico, en el que se desarrolla la *Entamoeba histolytica* en presencia de la bacteria *E. coli*. (1,3)

Las funciones del cultivo son variadas, entre las principales se pueden mencionar: su utilidad en el diagnóstico específico del parásito, en la enseñanza académica, y en estudios farmacológicos para combatir la enfermedad.

La investigación sobre el metabolismo de la amiba es otro renglón importante, y a pesar de que este tipo de estudios dentro de la Parasitología no se han desarrollado suficientemente y de que los medios de cultivo son difíciles de estandarizar, éstos siguen siendo la forma ideal de obtener las bases para determinar los procesos anabólicos y catabólicos del protozoario. (4)

Por todo lo anterior, se puede deducir la importancia que los métodos de cultivo tienen en la actualidad dentro del campo de la Parasitología, ya que son un auxiliar indispensable en las investigaciones realizadas sobre las enfermedades producidas por las amibas, y que en México ocupan un lugar importante, con un índice considerable de mortandad.

1.2 OTROS METODOS DE DIAGNOSTICO PARA AMIBAS.

Los avances obtenidos dentro del estudio de los parásitos patógenos entre los que se cuenta a las amibas, no hubieran sido posibles sin la creación de métodos que permitieran y facilitaran su observación. El primer y más antiguo método coproparasitoscópico es el examen directo, usado ya por el primer microscopista Anton Van Leewenhoek a mediados del siglo XVII, al encontrar en sus propias heces fecales trofozoítos de *Giardia lamblia*. En 1921, Willis describe el primer método coproparasitoscópico de sedimentación por flotación, basado en la propiedad que tienen las soluciones de densidad mayor, de hacer flotar objetos menos densos. Willis utilizó el cloruro de sodio disuelto en agua con este fin; posteriormente Faust y cols. en 1938, describieron su método en el que sustituyeron el cloruro de sodio por sulfato de zinc, este es uno de los métodos más utilizados en la identificación de quistes y algunos huevos de helmintos. Ritchie en 1948, describió su método coproparasitoscópico de sedimentación, esta técnica sigue siendo

sumamente útil para la identificación de huevos, quistes y larvas, no importando aquí el fenómeno de la densidad. (5,6)

Existen además los métodos inmunológicos, que son importantes para el diagnóstico e investigación de la amibiasis; los cuales basan en la detección tanto del antígeno, como en la respuesta hacia el parásito, manifestada por la presencia de anticuerpos específicos detectables después de la infección. Desde hace varios años las pruebas inmunológicas han sido utilizadas ampliamente. Ambrose Thomas y Truong (1972), demostraron que la difusión en gel, la hemaglutinación indirecta y la aglutinación del latex han resultado positivas en más del 90% de casos demostrados para la amibiasis hepática. (7,8)

Existen en la actualidad once diferentes pruebas de serodiagnóstico (entre ellas las antes mencionadas), las cuales fueron presentadas y revisadas por Kagan y Maddison en 1982, estos investigadores demostraron que son altamente eficaces para el diagnóstico de amibiasis invasora. Sin embargo muchos de estos métodos serológicos no hubieran sido posibles sin el apoyo de métodos de cultivo. Actualmente para un diagnóstico diferencial tanto de la cepa patógena o no patógena, así como para su grado de virulencia se utilizan métodos de cultivo. (7,17,18)

1.3 D I S E N T E R I A A M I B I A N A.

Desde tiempos remotos la amibiasis ha existido como un problema de salud para la humanidad, se encuentra referencia escrita de la disentería con probabilidad amibiana, en documentos de gran antigüedad. Hipócrates (460-377 a.C.) dió la primera descripción de las enfermedades ulcerativas del intestino, asimismo Bontius (1629) en el primer libro de medicina tropical escrito en Nueva Batavia relata: "la verdadera disentería es una horrible y destructiva enfermedad, la cual causa más devastaciones en la India que ninguna otra enfermedad". (4,9)

Son muchas las referencias que a través de la historia se hacen con respecto de la disentería, sin embargo cabe destacar algunas de ellas en las que se cuenta como posible causa de este mal a la amibiasis, y los métodos de investigación que se procuraban para su identificación, así se menciona que en 1860, Lambl describe con algún detalle amibas en las evacuaciones de un niño en Praga, que murió de diarrea infantil. Lambl observó pseudópodos homogéneos emitidos por el parásito, los movimientos de estos eran primero activos, pero al cabo de unas horas

cesaban gradualmente; a pesar de estas observaciones no consideró patógenos a dichos microorganismos. Lewis (1870) y Cunningham (1871) encontraron amibas en evacuaciones de pacientes que sufrían de colera en la India, pero al igual que Lambl tampoco les concedieron poder patógeno. (9)

No obstante de lo anterior, la historia de la amibiasis y de las enfermedades producidas por estos parásitos tuvieron un afortunado comienzo. En 1875, el doctor Fedor Aleksandrovich Lösch describió detalladamente en su obra "Desarrollo masivo de amibas en el intestino grueso", el caso de un campesino de veinticuatro años admitido en su clínica de San Petesburgo (hoy Leningrado) que presentaba un cuadro clínico de diarrea, fiebre, debilidad general y tenesmo. En el examen microscópico de sus heces se observaron muchas formas celulares, a veces aisladas y otras incluídas en moco, que por sus movimientos peculiares fueron identificadas por Lösch como parásitos animales y específicamente amibas, las cuales dibujó cuidadosamente de tal manera que en sus ilustraciones pueden identificarse perfectamente los trofozoítos de la amiba que denominó *Amoeba coli* (fig. 1). Al hacer la autopsia de su paciente Lösch observó los trofozoítos de la amiba en las úlceras del colon y con las heces mucosanguinolentas inoculó por el recto a un perro produciéndole disentería, sin embargo a pesar de sus hallazgos y observaciones no llegó a sospechar la relación causa-efecto entre la presencia de amibas y la colitis aguda. (2, 4, 10)

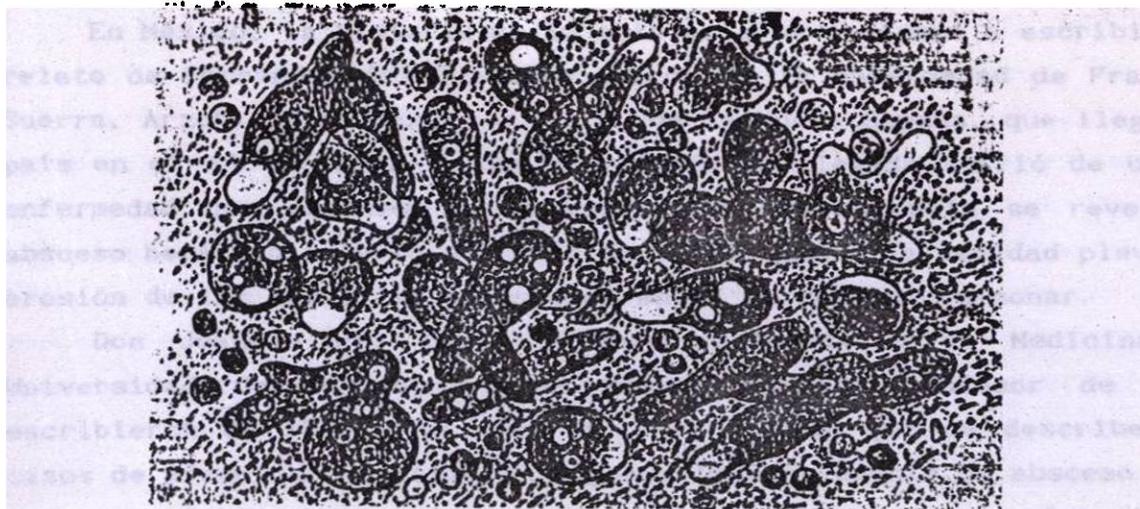


Fig. No. 1: Trofozoítos de *Amoeba coli* representados por Lösch.

Las investigaciones de Lösch dieron la pauta a otros investigadores que trataron a su vez de demostrar el papel patógeno de la amiba encontrada por él, varios fracasaron, pero posteriormente las investigaciones de Kartilus (1886) en el Cairo, Hlava (1887) en Praga y de Councilman y Lafleur (1891) en Baltimore, suministraron las pruebas clínicas y anatomopatológicas de que la amiba es el agente causal de un tipo de disenteria y de absceso hepático. Estos dos últimos investigadores crearon los términos "disenteria amibiana" y "absceso hepático-amibiano", además denominaron a la amiba causal como *Entamoeba dysenteriae*. En 1893, Quincke y Roos descubrieron los quistes, además Schaudinn (1903) precisó los caracteres estructurales del parásito y dió a la especie patógena de amibas el nombre técnico de *Entamoeba histolytica* todavía en uso.

Diez años después (1913) de las investigaciones de Schaudinn, Walker y Sellards en las Filipinas obtuvieron pruebas de que *Entamoeba coli* es solo un comensal inocuo del intestino grueso. (11)

Nuestro país no ha quedado al margen de todo este tipo de investigaciones, siendo la amibiasis una de las parasitosis más importantes, resulta interesante observar la evolución que su estudio ha tenido, y las contribuciones que los científicos mexicanos han otorgado para su erradicación.

1.4 AMIBIASIS EN MEXICO.

En México, la historia de la amibiasis se comienza a escribir con el relato de Fernández del Castillo acerca de la enfermedad de Fray García Guerra, Arzobispo de México y Virrey de la Nueva España, que llegó a este país en el año de 1611, y que a poco de su llegada sufrió de una grave enfermedad que lo llevo a la muerte; en la autopsia se revelaron un absceso hepático abierto a través del diafragma a la cavidad pleural, con erosión de las costillas y lesiones en el parénquima pulmonar.

Don Joaquín Pío Eguía y Muro, catedrático de Medicina de la Universidad de México, y Don Manuel Moreno, profesor de cirugía, escribieron en 1890 unas disertaciones en las que se describen muchos casos de afecciones hepáticas, algunas indudablemente de absceso hepático amibiano. Dichas disertaciones fueron presentadas quince años después de las descripciones hechas por Lösch, a pesar de lo cual no se le menciona y centran su interés en los aspectos clínico y terapéutico de la

enfermedad, sin embargo dentro de la bibliografía consultada para el presente trabajo no hay referencia que indique con exactitud si, estos investigadores tuvieron o no contacto con los escritos e investigaciones hechas por Lösch.

Miguel Jiménez quien escribió sus observaciones entre los años 1842 y 1875, no sospechó tampoco la naturaleza infecciosa de la enfermedad y la atribuyó a otro tipo de situaciones: "Lo que a ello conduce son los desordenes de una orgía o de una francachela donde se come hasta el hartazgo sustancias indigestas como las que usa nuestro pueblo en tales ocasiones y se beben hasta la embriaguez licores alcohólicos, algunos, como el pulque, de difícil digestión ...".

La primera referencia acerca de la etiología de la amibiasis se encuentra en México en el año de 1896, en el trabajo de Ismael Prieto, el cual menciona a estos parásitos al lado de cristales de hematoidina, y junto con las bacterias y sus toxinas se les considera los agentes causales de la amibiasis hepática. Sin embargo una de las descripciones más minuciosas y extensas de la amibiasis fué publicada en 1899 por el doctor José Mesa Gutiérrez, en su tesis para el concurso de anatomía e histología patológicas de la Escuela Nacional de Medicina; Mesa Gutiérrez propuso la patogenia para la migración del protozoario desde el intestino hasta el hígado (circulación portal) basándose en sus propias investigaciones. (10,11)

Muchos son los nombres de investigadores mexicanos y extranjeros que en la actualidad han aportado sus conocimientos al estudio de la amibiasis en nuestro país, entre ellos se encuentra el doctor Bernardo Sepúlveda a quien se debe la creación del centro de estudios sobre amibiasis, los doctores H. Brandt y Ruy Pérez Tamayo quienes en 1970 publicaron su monografía sobre amibiasis; posteriormente A. Martínez Palomo realizó un estudio excelente acerca de la biología molecular de la amiba, al grado que en nuestro país cada vez son más los trabajos que en diferentes enfoques tocan puntos importantes del estudio de la patogenia, bioquímica y metabolismo de las amibas, y específicamente de la *Entamoeba histolytica*. (11)

Dado el avance en métodos de laboratorio para el estudio de *Entamoeba histolytica* señalados anteriormente, es necesario que los alumnos de la Licenciatura de Químico Farmacobiólogo de esta Facultad, conozcan y adquieran habilidad en el manejo de los métodos de cultivo para amibas, para que en el campo profesional, participen en la investigación y en la erradicación de la amibiasis intestinal y extraintestinal. De lo cual surge el siguiente :

2.0 O B J E T I V O .

Implementar el método de cultivo de Robinson para *Entamoeba histolytica* a fin de que se incluya en las prácticas de laboratorio de Parasitología, y permita el estudio más detallado de la morfología y biología de esta amiba. Esto proporciona bases para estudios posteriores que se realicen dentro de la misma línea de trabajo.

3.0 MORFOLOGIA Y CICLO BIOLÓGICO DE ENTAMOEBIA HISTOLYTICA.

Dentro del ciclo biológico de *Entamoeba histolytica* se presentan de manera sucesiva cinco estadios morfológicos: trofozoito, prequiste, quiste, metaquiste y trofozoito metaquístico.

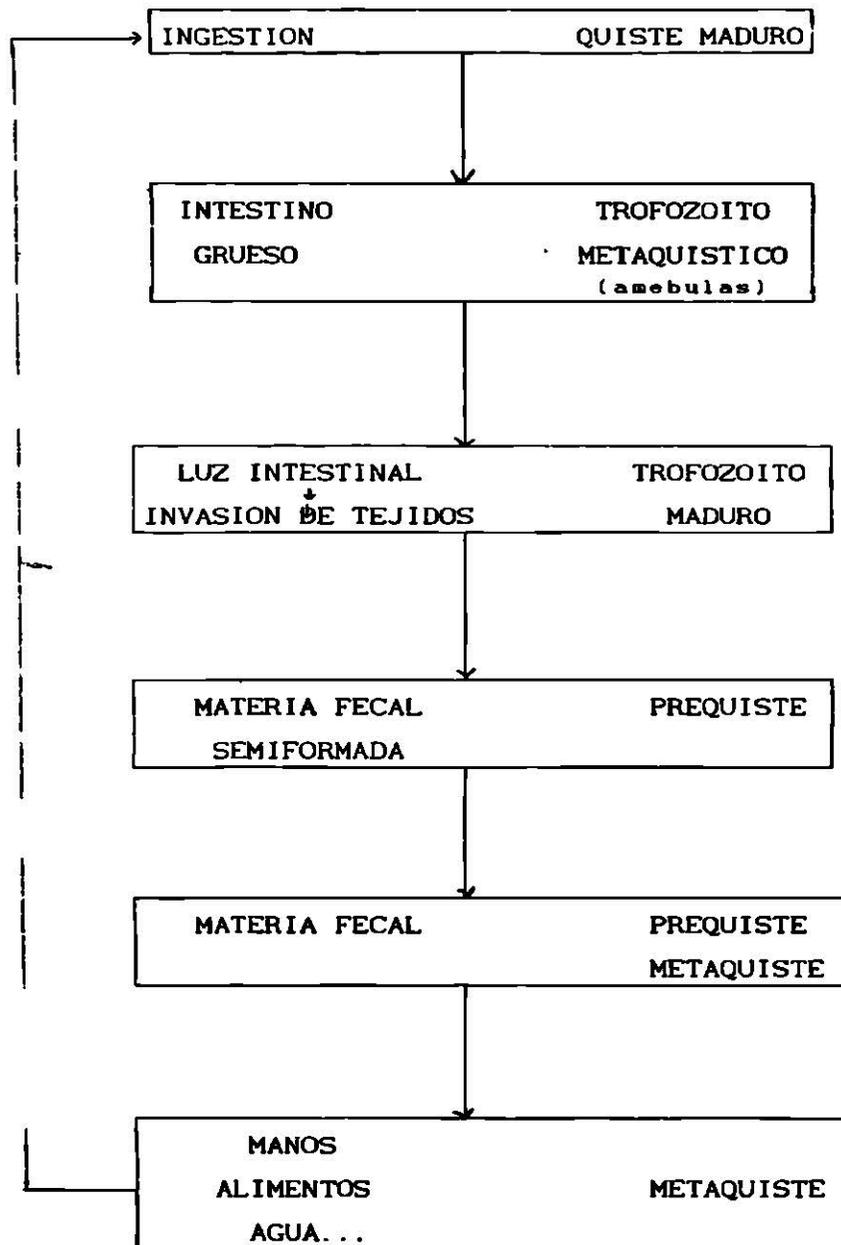
El tamaño del trofozoito varía de 10 a 60 μ y más frecuentemente se sitúa dentro del rango de 20 a 30 μ de diámetro. En el intestino grueso al igual que en las heces fecales líquidas recientemente emitidas, los trofozoitos se mueven activamente por emisión de pseudópodos cortos y explosivos, que se van extendiendo sin dirección definida. El ectoplasma es claro y transparente, diferenciándose del endoplasma granular, en el que a veces se observan vacuolas digestivas. Es difícil observar el núcleo en los microorganismos vivos, sin embargo puede a veces reconocerse como un anillo granuloso fino en las amibas sin teñir; ocupa entre una quinta y sexta parte del diámetro total de la célula. En el centro del núcleo se localiza un endosoma rodeado de un halo incoloro y fijo, formado por un gran número de delicadas fibrillas radiadas a la superficie interna de la membrana nuclear. (2,12)

Dentro del citoplasma de trofozoitos activos, son comunes las vacuolas alimenticias que suelen contener glóbulos rojos del hospedero, sobre todo en muestras tomadas de heces diarreicas. Durante algún tiempo los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* habitan y se multiplican en las criptas del intestino grueso utilizando probablemente las secreciones mucosas como alimento y en simbiosis con ciertas bacterias entéricas. Una vez que ocurre la invasión de tejidos, la amiba obtiene de ellos el sustrato metabólico necesario para sobrevivir.

En una infección asintomática, las amibas son eliminadas con las materias fecales formadas, pero al deshidratarse estas en su paso hacia las partes más distantes del intestino grueso, la amiba tiende a enquistarse. Durante los casos activos en los que la materia fecal transita rápidamente por el intestino, no hay tiempo suficiente para el enquistamiento, es debido a esto que aparecen trofozoitos en las heces diarreicas, como en los casos de disentería, en estos casos al igual que en el de las amibas que invaden tejidos no forman quistes. (12,13)

Al comenzar el enquistamiento, los trofozoitos se desprenden del alimento no digerido y se tornan esféricos. En este estadio se denomina de prequiste. Es muy rico en glucógeno, ya que una vacuola de gran tamaño conteniendo esta sustancia ocupa gran parte del citoplasma.

Los prequistes secretan rápidamente una cubierta resistente y relativamente delgada con la que se rodean para formar el quiste; este es por lo general redondo, aunque en algunos casos puede tomar forma oval y alargada. Tiene un diámetro entre 10 y 20 μ , puede ser tan pequeño como 5 μ . Un quiste joven posee un solo núcleo que se divide rápidamente para pasar a estadios de dos y cuatro núcleos, mientras se efectúa esta división nuclear tanto la vacuola de glucógeno como los cuerpos cromatoidales desaparecen. En las materias fecales semiformadas se localizan tanto prequistes como quistes con uno o cuatro núcleos, siendo los más comunes estos últimos a los que también se les denomina **metaquistes** en la materia fecal formada y a diferencia de los trofozoítos, si sobreviven fuera del hospedero, siendo capaces de infectar a uno nuevo. Al entrar los quistes a un nuevo organismo, tanto su citoplasma como el núcleo se dividen para formar ocho pequeñas amébulas, o **trofozoítos metaquisticos** básicamente iguales a los trofozoítos maduros exceptuando en el tamaño (Esquema No. 1). (13)



Esquema No. 1: Ciclo de transmisión de la *Entamoeba histolytica*.

4.0 MATERIAL Y EQUIPO.

4.0.1 MATERIAL DE VIDRIO.

Cajas de petri 15 cm. Pirex
Cubreobjetos 22 x 22 mm. Corning
Frascos de dilución 100 ml. Corning
Frascos con tapón de rosca 7 ml. Uso comercial
Matraces Erlenmeyer 250, 500 y 1000 ml. Pirex
Pipetas 1, 5 y 10 ml. Pirex
Pipetas pasteur Pirex
Portaobjetos 25 x 75 mm. Corning
Tubos de ensaye con tapón de rosca 13 x 100 mm. Pirex
Vasos de precipitado 150, 250 y 600 ml. Pirex

4.0.2 OTROS.

Aplicadores de madera.
Algodón.
Cubre bocas.
Gradillas.
Gasas.
Guantes estériles.
Mechero Bunsen.
Pizetas.

4.0.3 SUSTANCIAS QUIMICAS PARA LA PREPARACION DE REACTIVOS.

Agar bacteriológico	Bioxon
Agar Eosina-azul de metileno	Bioxon
Almidón de arroz	Sigma
Acido cítrico monohidratado	Baker Analyzed S.A.
Acido láctico 90.08%	Sigma
Azul de bromotinol	Técnica Quím. S.A.
Cloruro de sodio	Mallinckrodt
Estreptomina 1 g	Lakeside
Extrán 4 lt	Merck
Fosfato monobásico de potasio	Técnica Quím S.A.
Ftalato de potasio	Sigma
Hidróxido de sodio	Lab. Laitz S.A.

Penicilina G sódica 1,000,000 U	Lakeside
Peptona de carne	Bloxon
Sulfato de amonio	Técnica Quím. S.A.
Sulfato de magnesio.7 H ₂ O	Baker Analyzed S.A.

4.0.4 MATERIAL BIOLÓGICO.

Cepa "B5" de *Escherichia coli*.
Muestras de materia fecal.
Suero bovino.

4.0.5 APARATOS.

Autoclave	Presto Cap. 12 lt.
Balanza analítica	Mettler AE-160
Estufa bacteriológica	Felisa Mod. 131
Potenciómetro (pH meter)	Corning

4.1 METODOS Y PROCEDIMIENTOS.

4.1.1 PREPARACION DE REACTIVOS.

Agar salino.- Se prepara agar al 1.5% con NaCl al 0.7% el cual es distribuido en frascos de vidrio con tapón de rosca en alicuotas de 4 ml cada uno, se esteriliza a 15 lb durante 15 min para después dejarlo enfriar en forma inclinada.

Mezcla de antibióticos.- Se prepara disolviendo un frasco de penicilina (1,000,000 U) en 5 ml de agua destilada estéril, se pasa esta mezcla a otro frasco conteniendo estreptomycin (1 g), se mezcla y se afora a 25 ml con agua destilada estéril. Se guarda en refrigeración en alicuotas de 5 ml en tubos con tapón de rosca.

Bactopeptona.- Se prepara una solución de peptona al 20% después de lo cual se esteriliza a 15 lb por 15 min colocándose en alicuotas de 2.5 ml en frascos con tapón de rosca.

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

Almidón de arroz.- El almidón de arroz se toma directamente del frasco que lo contiene.

Medio "R".- Se prepara una solución concentrada de la siguiente manera: 125 g de NaCl, 50 g de ácido cítrico monohidratado, 12.5 g de fosfato monobásico de potasio, 25 g de sulfato de amonio, 125 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 100 ml de ácido láctico, todo esto se disuelve para llevarse a 2,500 ml con agua destilada. De esta solución se toman 100 ml y se adicionan 7.5 ml de NaOH al 40% y 2.5 ml de azul de bromotimol al 0.04%, previamente se ajusta el pH a 7.3 y se afora a 1000 ml con agua destilada, esterilizándose a 15 lb de presión por 15 min.

Solución de peptona al 2%.- Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de la cepa "B5" de *Escherichia coli*.

Medio "BR".- 100 ml del medio "R" se utilizan para cultivar 1 gota de solución de peptona que contiene el crecimiento de la cepa "B5" de *Escherichia coli*, se deja en la estufa a 37°C durante 48 hrs, después de este tiempo puede ser guardado a temperatura ambiente por dos meses.

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

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

4.1.2 METODO DE CULTIVO.

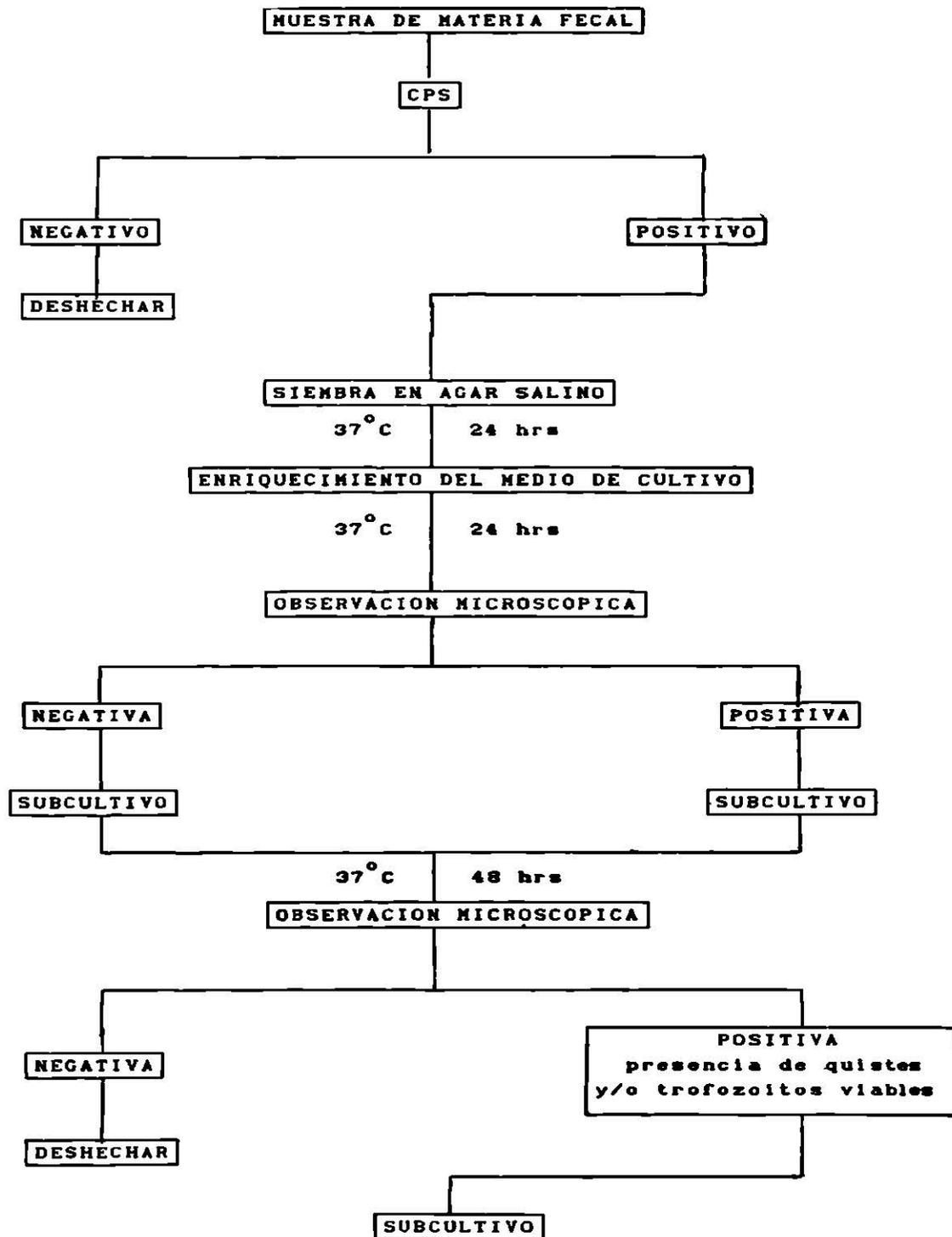
Siembra.- Aproximadamente 50 mg de materia fecal recién recolectada sin conservador, en la que se demostró la presencia de *Entamoeba histolytica* por el método de Faust, es sembrado en el frasco que contiene agar salino en forma inclinada, al cual se le adicionan 2 gotas de mezcla de antibióticos preparada como se indica anteriormente, 5 mg de almidón de arroz en polvo y 2 ml del medio "BR", se deja cultivar durante 24 hrs a 37°C.

Cultivo.- Al frasco que contiene la siembra de la amiba se le descarta el sobrenadante con pipeta pasteur y se le adiciona 1 gota de mezcla de antibióticos, 5 mg de almidón de arroz en polvo, 2 gotas de peptona al 20%, 1.5 ml de ftalato de potasio (solución diluida), 2 ml del medio "BRS" y se le deja cultivar por otras 24 hrs a 37°C.

Subcultivo.- Con todo cuidado del fondo del frasco que contiene el cultivo de amibas, se toma con pipeta pasteur 1 gota que se coloca en un portaobjetos y se le adiciona una gota de lugol, se cubre con un cubreobjetos para hacer la observación microscópica del crecimiento del cultivo, las amibas viables deberán observarse teñidas por el lugol. También del fondo del frasco se toma 1 gota como inóculo para hacer el segundo subcultivo, que es preparado en la misma forma como se describe para el cultivo. Se les deja incubar durante 48 hrs a 37°C para hacer la segunda observación. En un cultivo positivo empiezan a aparecer las amibas dentro de las primeras 48 hrs.

4.1.3 OBSERVACION MICROSCOPICA.

Se realiza la observación microscópica cada 48 hrs, en caso de que los cultivos sean negativos a las 72 hrs se deshechan. Los cultivos positivos se siguen subcultivando cada 48 hrs, revisando el crecimiento de las amibas (Esquema No. 2).



Esquema No. 2: Diagrama de trabajo para el cultivo monoxénico de *Entamoeba histolytica*

5.0 DISCUSION Y RESULTADOS.

Las muestras biológicas procesadas en el presente trabajo, fueron obtenidas de personas en las que se detectó alguno de los factores que propician la presencia de parásitos intestinales, tales como: higiene deficiente, contaminación de alimentos, o bien que presentaron algún síntoma (dolor abdominal, diarrea, etc.). Las edades oscilaron entre 4 y 72 años, 26 muestras fueron de hombres y 27 de mujeres; la edad y sexo de las personas muestreadas, son factores de escasa significación para el objetivo del presente trabajo, sin embargo cabe señalar que la infección por *Entamoeba histolytica* está presente por igual en hombres y mujeres sin que influya tampoco la edad. (15)

De 53 muestras obtenidas, 37 se recolectaron sin conservador en frascos limpios de boca ancha, 11 con conservador de MIF y 5 con conservador de pinol. El método original de Robinson para el cultivo monoxénico sugiere la siembra de muestras frescas recién emitidas y sin conservador, posiblemente para evitar la acción no deseable de sus componentes sobre el desenquistamiento; sin embargo, dentro de este estudio se sembraron algunas muestras que contenían conservador con el fin de comprobar dichas acciones. (3)

Las muestras de materia fecal, se procesaron por dos métodos coproparasitoscópicos, el de concentración por flotación de Faust y el directo. El método de Faust elegido para este trabajo, ofrece la ventaja de ser efectivo en la detección de protozoarios intestinales, el empleo del método directo sirvió de apoyo al de concentración, sobre todo en lo que se refiere a la búsqueda de otro tipo de parásitos intestinales (helminths) que por el de Faust pudieran pasar desapercibidos (16). Por otro lado el método de Faust permitió hacer una detección parcialmente cuantitativa de quistes de *Entamoeba histolytica*, y el reporte por cruces obtenido, determinó la cantidad de frascos de agar salino en lo que se sembraron cada una de las muestras, es decir, si una muestra se reportó con una a dos cruces, se sembraron dos frascos y con tres a cuatro cruces tres frascos, asimismo si no se observaron quistes, solo se sembró uno. Pasadas 48 hrs, se revisaron los cultivos por medio de la observación microscópica y dependiendo del número de quistes viables presentes, se procedió a los subcultivos, estos se revisaron nuevamente a las 48 hrs

para aplicar el siguiente criterio: si no había en ellos evidencia de quistes y/o trofozoítos se deshecharon y se recurrió a una nueva siembra con la muestra de otra persona. Por otro lado, si el subcultivo resultaba positivo este se continuó las veces necesarias, cambiandose de frasco cada 48 hrs hasta la no viabilidad de los quistes y trofozoítos, tal como se indica en la técnica de Robinson. Cabe destacar que se sembraron muestras en las que no se demostró presencia de quistes, por ninguno de los métodos coproparasitoscópicos mencionados, sin embargo algunos autores señalan que estas muestras pueden resultar positivas al cultivo, si se dejan un máximo de 72 hrs dentro del mismo, por otra parte permite confirmar un resultado dudoso en algún paciente sintomático o no, deshechando así diagnósticos erróneos. Ninguna de las muestras con estas características, mostraron positividad en el cultivo. (2,5,6)

De las 53 muestras analizadas, 43 resultaron positivas a *Entamoeba histolytica*; es necesario señalar que la presencia de quistes en materia fecal no siempre esta relacionada con los síntomas, por lo tanto este equilibrio entre hospedero y parásito hace que pacientes asintomáticos, se involucren en el mecanismo de transmisión de la amibiiasis. (14,15)

En la tabla de resultados se señalan las muestras 18, 41, 42, 48 y 53, que para los fines del objetivo de este trabajo se consideran positivas, las cuales presentaron quistes de *Entamoeba histolytica* a la observación microscópica y posteriormente positividad al cultivo monoxénico. En la muestra 18 se observó la presencia de quistes (+ + +) y hasta el 7° subcultivo se evidenció la aparición de prequistes de *Entamoeba histolytica*, no encontrándose presencia de éstos hacia el 8° subcultivo. La muestra 41 mostró trofozoítos móviles perfectamente evidenciados, desde el 2° hasta el 16° subcultivo. Esta muestra contenía conservador de MIF, por lo que es particularmente notable el desarrollo de trofozoítos viables en su cultivo, a la cepa se le designó como FCQ 1 y su tiempo de supervivencia fué de cuatro semanas. La cepa se muestra en las fotografías 1 y 2. La muestra 42, tuvo la particularidad de presentar además de quistes de *Entamoeba histolytica*, quistes de *Giardia lamblia*, mostrando en el 2° subcultivo además de quistes viables de ambos protozoarios, trofozoítos de *Giardia lamblia*, mismos que no volvieron a hacerse evidentes en los subcultivos posteriores. Llama la atención el hecho de que el método de cultivo monoxénico de Robinson es utilizado particularmente en el desarrollo de *Entamoeba histolytica* y con menor

frecuencia para otro tipo de amibas, sin embargo el autor del método menciona casos aislados en que este flagelado intestinal se desarrolla en el cultivo con una menor probabilidad de supervivencia, pues su habitat difiere del de la amiba mencionada. (3,4)

La muestra 48, mostró presencia de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* desde el 2° al 9° subcultivo; esta cepa se designó como FCQ 2, cuyo tiempo de supervivencia fué de dos semanas, en ella se observó la movilidad de la amiba mucho más evidente que en la cepa anterior, en el 7° subcultivo la cantidad de trofozoítos presentes fué grande, declinando rapidamente hacia el 8° subcultivo para desaparecer completamente en el 9°. Algunos autores explican que el crecimiento pico de las amibas en cultivo en muchas ocasiones precede a su desaparición paulatina, y atribuyen esto a la cepa de la cual proceden, es decir que mientras más patógena sea, su desaparición será más rápida y visceversa aunque esto no puede generalizarse ocurre con frecuencia (4,5,6,). La cepa se muestra en las fotografías 3 y 4.

La muestra 53, designada como cepa FCQ 3 en la que el desarrollo amibiano comenzó desde el 2° subcultivo hasta el 24° su tiempo de supervivencia fué de seis semanas; la cepa se muestra en las fotografías 5 y 6, fué la cepa más duradera y en la que el desarrollo amibiano ha sido más notable con aumentos y descensos de la población de trofozoítos, el tamaño de los trofozoítos fué variable, lo que puede indicar la mezcla de cepas diferentes en una misma muestra.

Llama la atención el número de cinco muestras positivas al cultivo en relación a treinta y ocho en las que a pesar de demostrarse la presencia de quistes en materia fecal , no se observó desarrollo de trofozoítos en los cultivos; esto puede explicarse en base a que los reactivos se encontraban en proceso de estandarización y el manejo de los mismos no ofrecía presición, por otro lado habrá de tomarse en cuenta que la experiencia es importante en la aplicación de cualquier técnica para lograr la eficiencia del método, misma que para este caso era mínima. Todo esto, aunado a la dificultad para conseguir los reactivos fueron situaciones que pudieron influir en el número de muestras positivas al cultivo.

TABLA DE RESULTADOS

Número de muestra	Síntomas	•CPS	Número de siembras	Número de subcultivos	Cultivo positivo
■ 1	NO	+ +	2	8	---
■ 2	NO	--	1	2	---
** 3	NO	--	1	2	---
■ 4	LIGEROS	+ + +	2	8	---
■ 5	NO	+ + +	2	6	---
■ 6	LIGEROS	+ + + +	3	12	---
■ 7	NO	+	2	6	---
** 8	LIGEROS	+ + +	3	8	---
■ 9	NO	+	2	4	---
■ 10	DESCONOCIDOS	+ + + +	3	8	---
■ 11	DESCONOCIDOS	+ + +	3	6	---
* 12	DESCONOCIDOS	+ +	2	4	---
* 13	DESCONOCIDOS	+ +	2	4	---
■ 14	DESCONOCIDOS	+ + +	3	6	---
■ 15	DESCONOCIDOS	+ +	2	4	---
■ 16	NO	+	2	2	---
■ 17	NO	--	1	2	---
■ 18	NO	+ + +	3	8	PREQUISTES
■ 19	LIGEROS	+ + + +	3	8	---
■ 20	NO	+ +	2	4	---
■ 21	NO	+ +	2	4	---
■ 22	NO	--	1	2	---
■ 23	NO	--	1	2	---
■ 24	NO	--	1	2	---
■ 25	NO	--	1	2	---
■ 26	NO	--	1	2	---
■ 27	LIGEROS	+ +	2	4	---
■ 28	NO	+	1	4	---
■ 29	NO	+ +	2	5	---
■ 30	LIGEROS	+ + +	3	6	---

continua.....

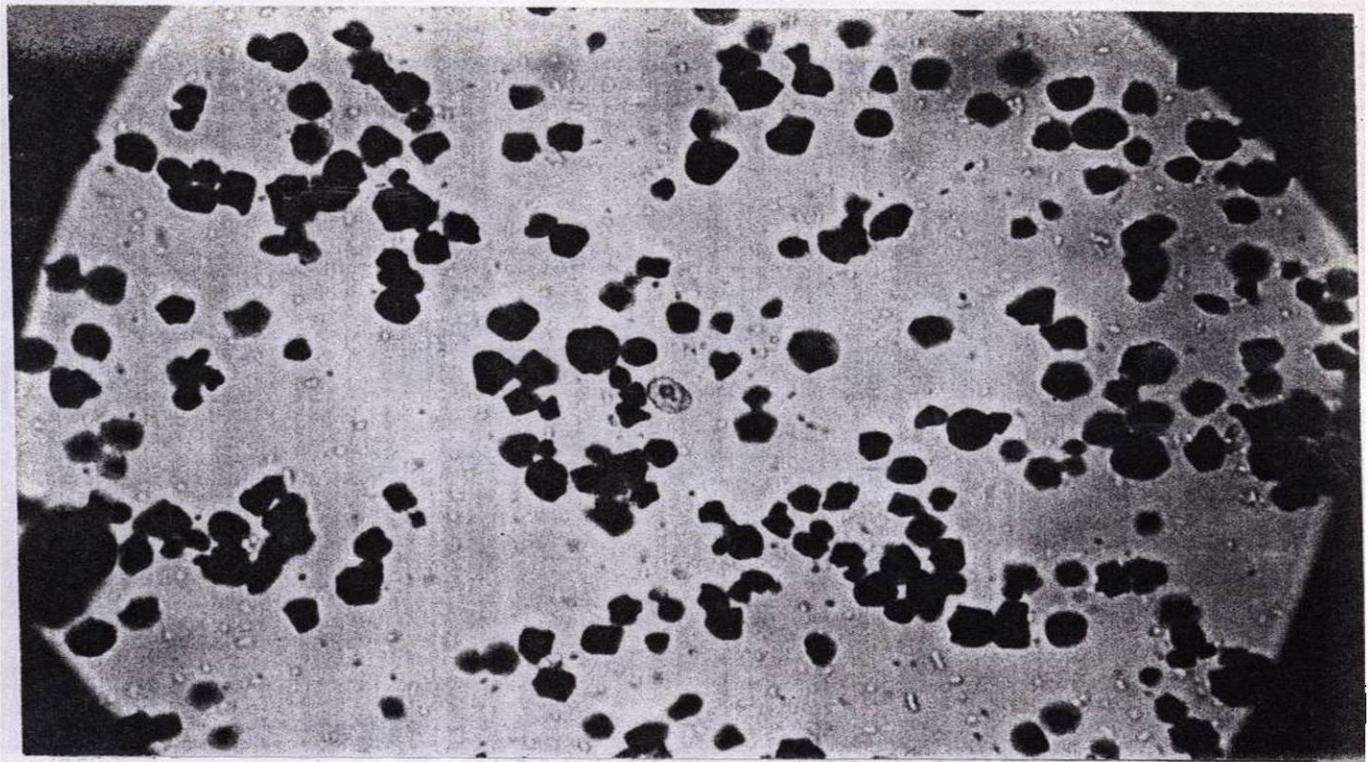
■ 31	NO	+ + + +	3	8	---
** 32	NO	+ +	2	6	---
■ 33	NO	--	1	4	---
* 34	NO	+ + +	3	6	---
* 35	LIGEROS	+ +	2	8	---
* 36	DESCONOCIDOS	+	1	4	---
* 37	DESCONOCIDOS	--	1	2	---
■ 38	DIARREA	+	2	6	---
* 39	DESCONOCIDOS	+ +	2	4	---
* 40	DESCONOCIDOS	+ +	2	4	---
* 41	DESCONOCIDOS	+ +	2	8	cepa FCQ 1
■ 42	DESCONOCIDOS	+	3	8	---
■ 43	NO	+ + + +	3	3	---
■ 44	NO	+ + +	2	3	---
** 45	NO	+ + +	2	4	---
■ 46	LIGEROS	+	1	2	---
■ 47	DESCONOCIDOS	+ +	2	4	---
■ 48	LIGEROS	+ + +	2	6	cepa FCQ 2
■ 49	NO	+ +	2	2	---
** 50	NO	+ + + +	2	2	---
■ 51	NO	+	2	3	---
* 52	NO	+ + +	2	2	---
■ 53	LIGEROS	+ + +	3	24	cepa FCQ 3

o Metodo de Faust.

■ Muestras sin conservador.

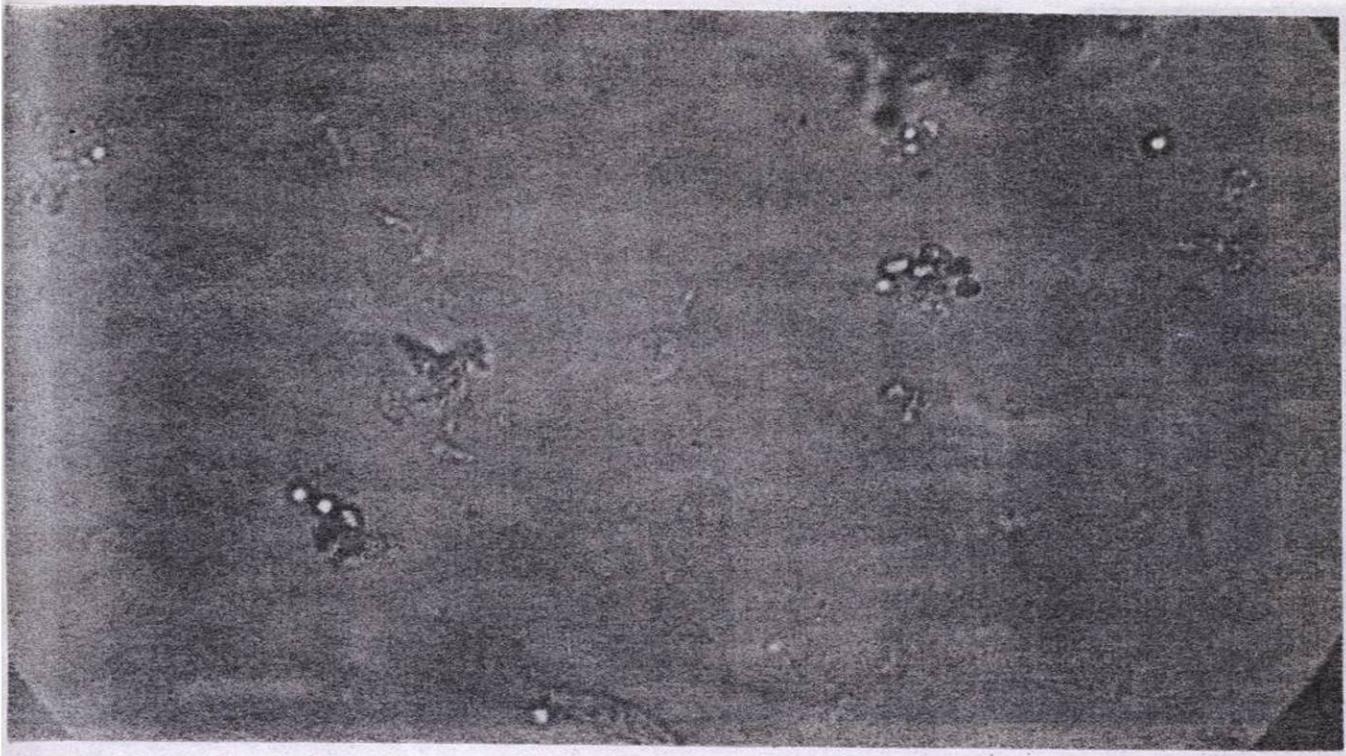
* Muestras con conservador de MIF.

** Muestras con conservador de pinol.



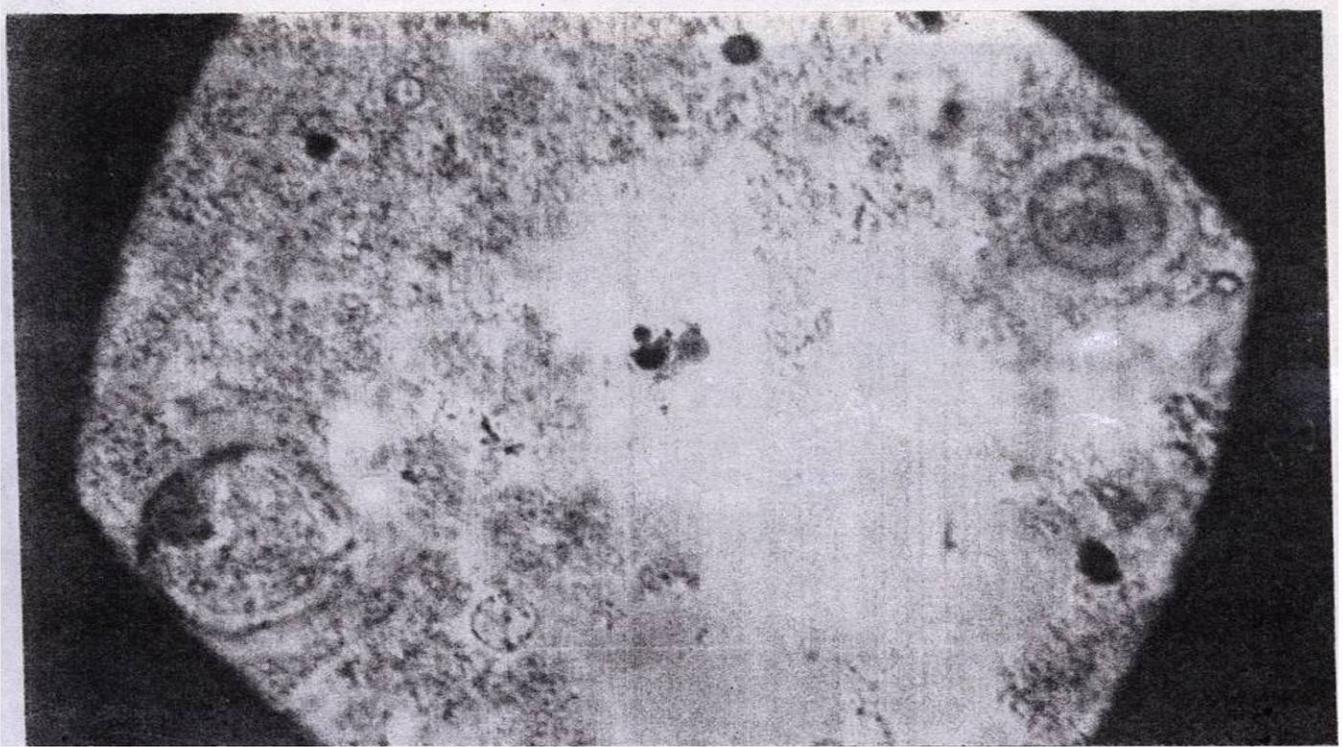
Fotografía No. 1

Trofozoíto de *Entamoeba histolytica* de la cepa FCQ 1 (tinción de yodo).
Notese el núcleo claramente diferenciado por la ausencia de inclusiones
dentro del citoplasma. (aumento 450x)



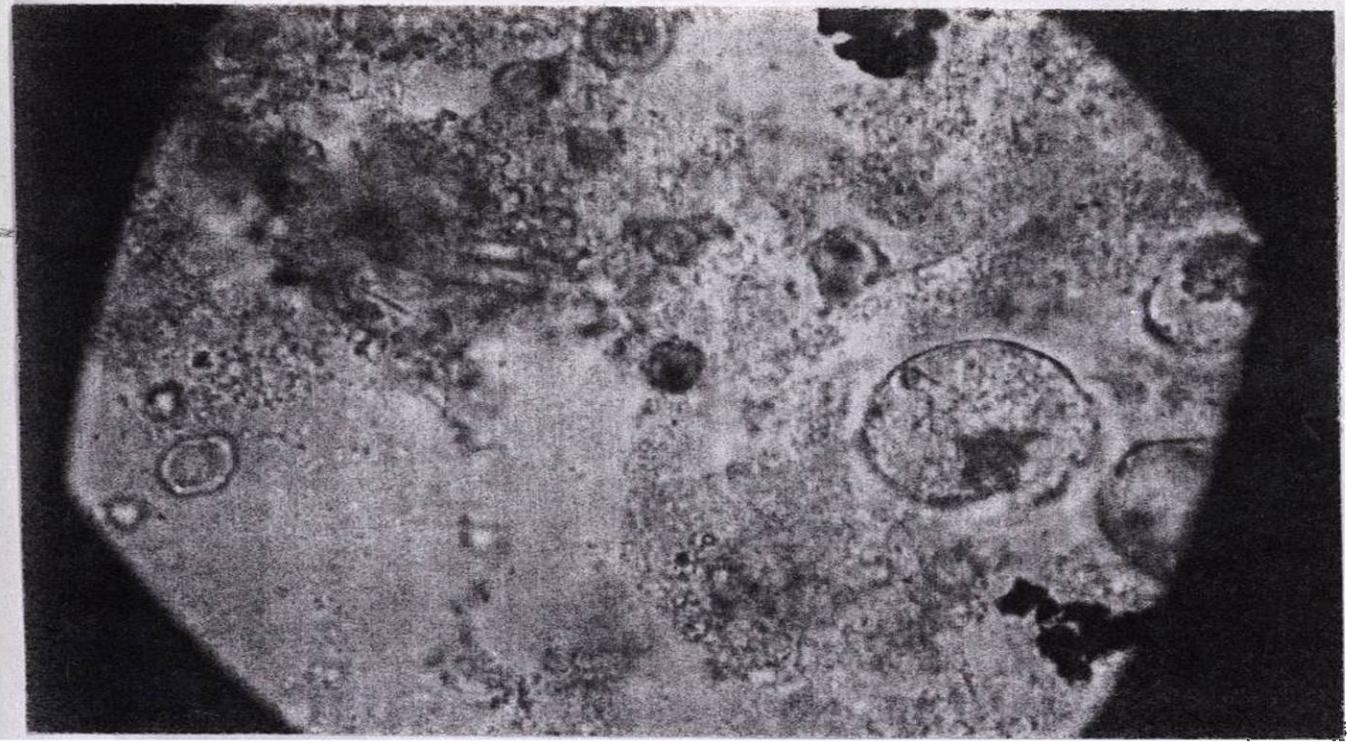
Fotografía No. 2

Trofozoíto de *Entamoeba histolytica* de la cepa FCQ 1 (sin tinción).
El núcleo puede apreciarse como un anillo difuso excéntrico en el
citoplasma del protozooario. (aumento 450x)



Fotografía No. 3

Trofozoito de *Entamoeba histolytica* de la cepa FCQ 2 (tinción de yodo).
En él pueden apreciarse claramente las inclusiones de almidón ingeridas
del cultivo. (aumento 450x)



Fotografía No. 4

Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* de la cepa FCQ 2 (tinción de yodo).
Presencia de varios trofozoítos con inclusiones de almidón y emisión de
pseudópodos. (aumento 450x)



Fotografía No. 5

Trofozoitos de *Entamoeba histolytica* de la cepa FCQ 3 (tinción de yodo).
Notese la clara emisión de pseudópodos y las inclusiones de almidón que
no permiten la observación del núcleo. (aumento 450x)



Fotografía No. 6

Trofozoito de *Entamoeba histolytica* de la cepa FCQ 3 (tinción de yodo)
Se observan además presencia de trofozoitos claramente destruidos y otros
contaminantes del cultivo. (aumento 450x)

6.0 CONCLUSIONES.

- La implementación del método de Robinson modificado para los fines de este estudio y la consecuente estandarización de reactivos, permitió la observación de trofozoítos viables de *Entamoeba histolytica* en tres cepas aisladas en el laboratorio de Parasitología de esta Facultad. Dichos trofozoítos mostraron emisión de pseudópodos, fagocitosis e inclusiones de almidón distinguibles claramente con la tinción de yodo.

- Dada la necesidad de que estas técnicas se estudien y difundan, el método " Cultivo monoxénico de Robinson para amibas" (modificado), queda incluido como práctica de laboratorio en el curso de Parasitología para alumnos de 8° semestre de la carrera de Químico Farmacobiólogo, se pretende con esto que el estudiante adquiera habilidad en el manejo de los medios de cultivo para amibas y además se profundicen los conocimientos acerca de la biología de la *Entamoeba histolytica*.

- Los medios de cultivo para amibas, son útiles en el diagnóstico clínico especializado de la amibiasis intestinal, cuando los resultados por método coproparasitoscópico son dudosos; por lo tanto, es importante dar a conocer su aplicabilidad en el laboratorio de Análisis Clínicos, a fin de que la identificación de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* intestinal permita prevenir una amibiasis invasora; además este tipo de estudios de laboratorio puede apoyar el seguimiento en la terapia medicamentosa.

- Dado que es posible detectar cepas patógenas de las no patógenas por medio de corrimiento electroforéticos llamados zimodemos, el método de cultivo monoxénico es la base para dichas técnicas, ya que una vez logrados los trofozoítos viables, se procede a identificar el grado de virulencia de la cepa. La aplicación de los zimodemos, puede ser en parte el apoyo de estudios inmunológicos y farmacológicos que pretendan realizarse posteriores a este trabajo.

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

- 1.- De la Torre, M; Landa, L; Sepúlveda, B. Avances en los métodos para el cultivo de *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Méd., Vol 1: 9-11; 1970.
- 2.- Carroll, F.E.; Rosell, P.F.; Jung, R.C. Parasitología Clínica. Salvat: 136-140; 1977.
- 3.- Robinson, G.L. The Laboratory Diagnosis of Human Parasitic Amoebae. Trans. R. Soc. trop. Med., Vol 62: 285-294; 1968.
- 4.- Martínez, P.A. Amibiasis. Panamericana: 11-14, 28-29; 1989.
- 5.- Melvin, M.D.; Brooke, M.M.. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de parasitosis intestinales. Interamericana: 33-34; 1971.
- 6.- Salazar, S.P.; De Haro, A.I. Manual de técnicas para el diagnóstico Morfológico de las Parasitosis: 87,91,93,96; 1980.
- 7.- Stites, D.P.; Fudenberg, H.H.; Stobo, J.D. Inmunología Básica y clínica. El Manual Moderno: 706-707; 1985.
- 8.- Vigar, Z. Atlas de Parasitología Médica. Panamericana: 6-7; 1982.
- 9.- Kean, B.H. A History of Amebiasis. Trop. Med. & Parasit. Classic. Investigations, Vols. 1 and 2; 1-8; 1978.
- 10.- Brandt, H.; Ruy, P.T. Amibiasis. La Prensa Médica Mexicana 1970.
- 11.- Carrada-Bravo, T. La amibiasis invasora como problema de salud pública. Bol. med. Hosp. Infant. Méx., Vol 46 2: 139-140; 1989.
- 12.- Brown, H.W. Parasitología Clínica. Interamericana: 28-29; 1991.

- 13.- Schmidt, G.D.; Roberts, L.S. Fundamentos de Parasitología. C.E.C.S.A.: 114-116; 1988.
- 14.- Perches, A. Tratamiento médico de la amibiasis. Arch. invest. Med. (Méx.) 9 (supl. 1); 1978.
- 15.- Biagi, F. Enfermedades parasitarias. La Prensa Médica Mexicana: 90-91; 1980.
- 16.- Arriaga, H. R. Estudio comparativo de cuatro métodos empleados en el diagnóstico de las parasitosis intestinales. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas, U.A.S.L.P., 1989.
- 17.- Jiménez, C. E.; Kumate, J. Correlación Clínica de zimodemos de *E. histolytica*. Arch. Invest. Méd. (Méx), 13 (supl. 3): 71-81; 1982.
- 18.- Andrews, B.J.; Mentzoni, L. and Bjorvatn. Zymodeme conversion of isolates of *Entamoeba histolytica*. Trans. R. Soc. trop. Med., vol 34: 63-65; 1990.

Arieta 870, C.P.78000
San Luis Potosi, SLP.

