

UNIVERSIDAD DE MONTERREY  
VENCIMIENTO  
OCT. 26 1996  
BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD DE MONTERREY  
VENCIMIENTO  
OCT. 14 1997  
BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD DE MONTERREY  
VENCIMIENTO  
OCT. 21 1997  
BIBLIOTECA

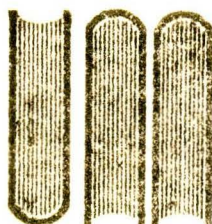
UNIVERSIDAD DE MONTERREY  
VENCIMIENTO  
13 MAR. 2003  
BIBLIOTECA

DDICSA  
\$100.00

# UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE INGENIERIA Y CIENCIAS  
NATURALES Y EXACTAS

040-54  
9643m  
1990



UNIVERSIDAD  
DE MONTERREY

902357

METODO PARA CULTIVAR Entamoeba histolytica  
APLICADO AL DIAGNOSTICO DE  
AMIBIASIS INTESTINAL

REPORTE DEL PROGRAMA DE  
EVALUACION FINAL

*Vo. Bo.  
Luis E. Barcin S.*

QUE PRESENTA

MARIA DEL CARMEN GONZALEZ CANTU

EN OPCION AL TITULO DE  
LICENCIADO EN QUIMICA CON ESPECIALIDAD  
EN ANALISIS CLINICOS

SAN PEDRO GARZA GARCIA, N. L.

DICIEMBRE DE 1990

BIBLIOTECA  
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

A DIOS:

POR QUE A EL LE DEBO LA VIDA Y POR QUE SIEMPRE  
ME HA SEÑALADO EL CAMINO A SEGUIR.



A MIS PADRES:

POR TODO EL CARIÑO, LA PACIENCIA, LA COMPRENSION  
Y EL APOYO QUE ME HAN BRINDADO Y POR QUE HAN ES-  
TADO CONMIGO CUANDO LOS HE NECESITADO.

A MIS HERMANOS:

HUMBERTO Y RODRIGO QUE SIEMPRE ME HAN AYUDADO A  
SEGUIR ADELANTE CON SU CARIÑO Y SU ALEGRIA.

A TODA MI FAMILIA:

POR EL APOYO QUE HE RECIBIDO DE TODOS ELLOS DU-  
RANTE LA REALIZACION DE MI CARRERA.



A JUAN MARTIN:

QUE CON SU AMOR Y LA GRAN CONFIANZA QUE SIEMPRE  
HA TENIDO EN MI, ME HA DADO LOS ANIMOS NECESA-  
RIOS PARA CONTINUAR ADELANTE CON MIS PROYECTOS.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS:

EN ESPECIAL A JORGE, MUÑE, DEBORAH Y NORA QUE SIEMPRE ME DIERON SU APOYO Y SU CARIÑO, YA QUE ESTUVIERON JUNTO A MI CUANDO LOS NECESITE.

A MIS MAESTROS:

Q.F.B. MA. DE LOURDES MARTINEZ M., Q.F.B. SILVIA -  
TERESA JARAMILLO O. Y L.C.Q. JESUS A. GARZA G.  
POR LA AYUDA Y AMISTAD QUE ME HAN BRINDADO A LO LARGO  
DE MI CARRERA.



A MI ASESORA:

Q.F.B LAURA E. GARCIA TOVAR POR SU CONSTANTE MOTIVACION PARA QUE CONTINUARA ADELANTE CON ENTUSIASMO Y -  
CONFIANZA.

AGRADEZCO ESPECIALMENTE AL BIOLOGO RUBEN ARAUJO, BIOLOGO MARIO MORALES Y AL PERSONAL DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DEL NORESTE DEL SEGURO SOCIAL, POR SU COLABORACION EN LA REALIZACION DE ESTE PROYECTO.

A TODAS LAS PERSONAS QUE CONTRIBUYERON CONMIGO DURANTE ESTE PERIODO, EN ESPECIAL A JUANITA LIMON H., ARMANDINA PINTOR, JOSE LUIS MORENO ( CHEPE ) Y JUAN JOSE ALMARAZ.



## I N D I C E

	PAGINA
INTRODUCCION .....	1
MATERIALES Y METODOS .....	14
RESULTADOS .....	24
DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	26
RESUMEN .....	31
BIBLIOGRAFIA .....	32

## I N T R O D U C C I O N

La amibiasis es la infección humana debida al protozooario conocido como Entamoeba histolytica. Se conocen cuando - menos cinco especies de amibas patógenas del hombre: Entamoeba histolytica, E. coli, E. gingivalis, Endolimax nana e Iodamoeba bütschlii ( 1,2 ).

Todas viven en el intestino grueso, menos E. gingivalis - que se encuentra en la boca. Con la excepción de E. histolytica, ninguno de los protozoarios mencionados tiene - la capacidad de producir lesiones en el intestino, ni mucho menos de invadir los tejidos extraintestinales ( 3 ).



La amibiasis ha existido como causa importante de diarrea y disentería (evacuaciones con sangre, moco y pus) probablemente desde que la especie humana se diferenció de sus predecesores inmediatos en el curso de la evolución ( 4, 5 ). Sin embargo, no fue sino hasta 1875, que el doctor Fedor Aleksandrovich Lösch en San Petersburgo, describió a Entamoeba histolytica en las heces diarreicas de un paciente, e inoculó con ellas a un perro en el que produjo la enfermedad ( 6 ). A partir de entonces gran cantidad de científicos se han dedicado al estudio de este protozoo; entre ellos, Councilman y Lafleur que en 1891 -- describieron la patogenia de la infección por E. histolytica; Schaudinn que señaló las diferencias morfológicas entre E. histolytica y E. coli, en el año de 1903; Walker y Sellards que en 1913 enfatizaron el papel importante de los quistes en la transmisión de la amibiasis, así como algunos otros más ( 1,7,8,9 ).

La infección por E. histolytica es de distribución universal, tanto en climas cálidos como templados; es difícil establecer la verdadera frecuencia de amibiasis en todo el mundo, ya que ésta varía entre 0.2 y 50% ( 2,4 ). Africa y Asia son los continentes donde la incidencia de la amibiasis humana es mayor; en Europa, la enfermedad es importante en la zona sur y en América se encuentra -- desde Alaska hasta Argentina, con grandes variaciones ( 6,



10 ).

La frecuencia es mayor en los grupos de edad preescolar y escolar, sin embargo los adultos también la sufren; puede ser más severa en los períodos de lactancia y embarazo, y en personas inmunodeficientes, homosexuales y turistas -- ( 5,11 ).

Los trabajos realizados por Alfonso Martuscelli y col. señalan la frecuencia de la amibiasis en México obteniendo un resultado del 27% de personas infectadas con E. histolytica ( 12 ). En el estado de Nuevo León se han llevado a cabo estudios realizados por José Vargas-Mena sobre la frecuencia de este parásito en poblaciones escolares, obteniéndose un resultado total del 16.2% de casos positivos ( 13,14,15,16 ). Específicamente en la ciudad de Monterrey, se obtuvo un porcentaje de frecuencia del 15.7% de personas infectadas ( 17 ).

Entamoeba histolytica presenta en la naturaleza tres estadios principales: el trofozoito, el prequiste y el quiste ( 18,19 ).

Los trofozoitos, son las únicas formas presentes en tejidos, varían considerablemente de tamaño entre 8 y 60 micrómetros; son identificables en evacuaciones recientes, sin colorear, gracias a su típica locomoción progresiva y



direccional, y en preparaciones teñidas muestran una membrana citoplásmica delgada y el citoplasma que se divide clásicamente en dos porciones: una zona externa, o ectoplasma, que es más clara y da lugar a los pseudópodos de aspecto hialino; y una zona interna, o endoplasma, finamente granular y con muchas vacuolas. El núcleo ocupa -- aproximadamente una quinta parte del volumen celular y -- aparece como una esfera central rodeada de una membrana delgada, con cromatina granular dispuesta en masas irregulares y un pequeño cariosoma localizado generalmente en posición central ( 1,2,4,18 ). Los trofozoitos en degeneración se mueven lentamente, el límite entre el ectoplasma y el endoplasma se va perdiendo, el citoplasma es más granuloso y el núcleo se conserva mejor ( 20,21,22,23 ).

Las amibas prequísticas son células incoloras, esféricas u ovales, más pequeñas que el trofozoito, pero mayores -- que el quiste; carecen de inclusiones de alimento, la -- formación de pseudópodos es lenta, y el parásito no se des--plaza ( 2 ).

El quiste es la forma infectiva, el cual presenta una estructura inmóvil generalmente esférica que mide de 3.5 a 20 micrómetros de diámetro; cuando se tiñe de manera adecuada muestra de uno a ocho núcleos, pero lo más común es que sean cuatro, con una membrana nuclear delicada, con -



condensaciones de cromatina agregadas sobre la superficie interna, con un endosoma central formado por uno o varios gránulos dispuestos en un órgano compacto. Pueden encontrarse cuerpos cromatoides con bordes romos, redondeados y lisos en el citoplasma, el cual es ligeramente granular y puede contener algunas vacuolas de glucógeno( 1,20,21 ).

Los trofozoitos se destruyen con mayor facilidad que los quistes; sobreviven unas cuantas horas al frío y la desecación ( 2 ). En cambio, los quistes pueden resistir indemnes varios días en el medio y salvan también la barrera gástrica. Sin embargo, se pueden destruir con facilidad sometiéndolos a ebullición ( 5,22,24 ).

El ciclo de vida de E. histolytica es relativamente sencillo, los quistes ingeridos pasan por el estómago y se exquistan por acción de la tripsina en el intestino delgado, de cada quiste emerge una amiba metaquística que contiene cuatro núcleos, que finalmente se divide en ocho trofozoitos pequeños, éstos pasan a lo largo del canal intestinal hasta encontrar condiciones favorables para la colonización ( 2,24 ). Por lo general en la región del ciego ocurre ésta, pero pueden ser llevados hasta el recto sigmoiides. La invasión de los tejidos se logra probablemente por acción lítica y mecánica, y bajo ciertas condiciones algunos trofozoitos pueden producir metástasis en el híga



do y en otros sitios extraintestinales ( 2,19,21 ).

Cuando los trofozoítos caen en la luz del intestino grueso, empiezan a ser eliminados, y si el tránsito intestinal no es demasiado rápido pueden pasar a la etapa prequística y ser expulsados en las heces como quistes ( 2, 19,21 ).

La amiba absorbe sus alimentos de los tejidos disueltos - por acción de sus enzimas citolíticas e ingiere glóbulos rojos, hemoglobina, sustancias parcialmente sintetizadas por el huésped y fragmentos de tejidos, todo ello por inclusión en un pseudópodo ( 2 ). Posee enzimas como mucina, hialuronidasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, etc., - las cuales contribuyen a su poder patógeno ( 6,25 ).

Las formas más frecuentes de transmisión son la contaminación fecal de alimentos y la transmisión de persona a persona, ya sea por el empleo de estiércol como fertilizante, las moscas, las manos sucias de quienes procesan alimentos ( vía fecal-oral ), el suelo contaminado que cae en los pozos de riego y sobre el agua potable, el contacto sexual entre homosexuales, etc., en general todas relacionadas con prácticas de higiene deficiente ( 4,6,18 ).

Entamoeba histolytica produce lesiones primarias en el intestino y secundarias en otros órganos como el hígado, - pulmón, cerebro y piel ( 10 ). Sin embargo, a menudo sue



le comportarse como un simple comensal y no causar daño al huésped, ésto depende de algunos factores tales como - la virulencia de la cepa, la producción de enzimas proteolíticas y citolíticas, el número de quistes ingeridos, la dieta del huésped, ya que si es a base de carbohidratos - facilita el establecimiento del parásito en el intestino, el colesterol que es un factor necesario para el creci--- miento del parásito, la inmunidad del huésped y la presencia de bacterias entéricas adecuadas que favorezcan el -- crecimiento amibiano ( 2,6,21,26 ).

La amibiasis intestinal puede ser aguda o crónica. La -- aguda tiene un período de incubación de una a 14 semanas y puede manifestarse como diarrea o disentería ( 2 ). Se presentan frecuentemente dolores abdominales, hipersensi- bilidad, fiebre, deshidratación, tenesmo, hepatomegalia - discreta, pérdida de peso y toxemia, este cuadro puede - confundirse con infecciones de otro tipo ( 6,10,21 ).

La amibiasis intestinal crónica se caracteriza por presentar cuadros diarreicos alternados con períodos de consti- pación, calambres abdominales, náuseas, vómito, anorexia, pérdida de peso, flatulencia, tenesmo rectal, o cualquie- ra de estos síntomas aislados ( 4,10 ). Las complicacio- nes de la amibiasis intestinal comprenden: apendicitis, perforación del intestino, hemorragia y amebomas del co--



lon ( 2 ).

Cuando la lesión se produce fuera del intestino, los síntomas son muy variados dependiendo del lugar de la infección, pero en general se producen dolores intensos, fiebre, escalofríos, anorexia y leucocitosis, entre otros ( 6,10 ).

El diagnóstico final de la amibiasis depende de la identificación del parásito; deben agotarse todos los métodos existentes antes de plantear un diagnóstico clínico, el cual supone diferenciar el proceso de otras disenterías y enfermedades intestinales ( 2 ).

Para hacer un diagnóstico de amibiasis asintomática e intestinal, se utilizan muestras de materia fecal. Si la muestra es diarreica o disentérica, se buscan trofozoitos mediante un examen microscópico directo, esto debe hacerse dentro de la primera hora después de la evacuación ( 19 ). Para identificar el trofozoíto se utilizan colorantes como el de Quensel, la tinción de hematoxilina férrica y la tinción tricrómica ( 18,20 ). En cambio, si la muestra fecal es sólida se observarán quistes ( 19 ). Para su identificación se utilizan los procedimientos de concentración por flotación o sedimentación, mediante centrifugación en líquidos de diferentes pesos específicos.



El método de flotación por centrifugación con sulfato de zinc ( Técnica de Faust ) es el que se usa frecuentemente ( 2 ). Para observar quistes se utiliza lugol o solución yodada de D'Antony, si se requiere una preparación permanente se usan las tinciones tricrómicas y de hematoxilina férrica ( 6,8,18,21 ).

Si el retraso en la observación de quistes es inevitable, la refrigeración mantendrá los organismos intactos durante varias horas; otra alternativa es utilizar Merthiolato-Yodo-Formol (MYF), Formol al 10% o alcohol polivinílico ( 2,8 ).

Otro método de diagnóstico menos utilizado en los laboratorios clínicos, es el cultivo de amibas, ya que la mayoría de los investigadores lo reservan para casos especiales. Sin embargo, es de gran utilidad aislar este parásito patógeno directamente de materias fecales con el uso de medios monofásicos o difásicos ya que permite confirmar el diagnóstico por ser más sensible y específico ( 4, 20,28,29 ).

Para fines diagnósticos, se utilizan los medios de cultivo monoxénicos ( Boeck y Drbahlav, 1942 ) en los cuales las amibas patógenas crecen con facilidad en presencia de alguna bacteria como Escherichia coli. Entre los medios de cultivo monoxénicos se encuentran, el medio de Locke



huevo-suero, el medio difásico de Dobell y el de Cleveland Collier ( 4 ). Otro método monoxénico es el de Robinson, que emplea una base de agar salino y suero de bovino como suplemento nutricional ( 30 ).

Sin embargo, para estudiar la biología celular de las amibas, se han desarrollado los medios axénicos ( Diamond, 1961 ), en los cuales no hay necesidad de asociar al parásito con otros microorganismos, y permite que se realicen con facilidad los análisis bioquímicos, morfológicos, fisiológicos e inmunológicos ( 4 ).

La investigación en amibiasis se vería ampliamente beneficiada si se encontraran medios elaborados sobre la base de reactivos económicos y de fácil obtención. En los cultivos monoxénicos, el crecimiento del parásito es dependiente de la flora bacteriana y ayuda a explicar el mecanismo de los diversos antibióticos de amplio espectro, para el tratamiento de la amibiasis ( 2,4,7 ).

Los intentos para obtener un medio de cultivo monoxénico definido han demostrado que la cisteína, el ácido ascórbico, la albúmina de suero de bovino y ciertas vitaminas -- son requerimientos esenciales para el crecimiento ( 4 ). Las condiciones óptimas para el desarrollo de E. histolytica son una temperatura entre 35-37°C, un pH de 7.0 y ba



ja tensión de oxígeno ( 2 ). Esto último se logra empleando tubos o botellas de cierre hermético llenas casi por completo con medio de cultivo; éstos pueden ser tanto de vidrio como de plástico, en los que las amibas se adhieren a la superficie basal ( 4 ). La cantidad de materia fecal sembrada en el medio es mayor a la obtenida con un asa de platino con la que se acostumbra inocular en medios de cultivo bacteriológicos. Para evitar el problema de bacterias contaminantes se usa una técnica de microaislamiento en la que se lavan los quistes y después se siembran en los medios de cultivo conteniendo bacterias conocidas ( 31 ).

Los antagonistas del ácido fólico, antimetabolitos de la piridoxina y pantotenato, análogos de las purinas y pirimidinas, como también los eritrocitos agregados al medio, inhiben el crecimiento amibiano ( 1 ).

Las amibas nunca se encuentran en los cultivos en número comparable a las bacterias en sus cultivos, y por lo general se tienen que explorar muchos campos del microscopio antes de encontrar una sola amiba, por lo tanto se debe examinar al menos tres preparaciones de un cultivo antes de dar información. Para mantener amibas en cultivo es necesario hacer subcultivos cada 48 horas. Ciertas precauciones son necesarias con objeto de evitar la pérdida



del cultivo, tales como: mantener la temperatura apropiada, pues este parásito es muy sensible a los cambios de temperatura, especialmente al frío, y prevenir la contaminación de bacterias que no sean las originales presentes en el cultivo. El número de amibas varía considerablemente en los cultivos, en ciertos días las amibas son tan pocas que uno casi llega a creer que los organismos han perecido, pero en días sucesivos de nuevo se vuelven muy numerosas ( 31 ).

Algunos investigadores han realizado estudios de amibiasis tanto en medios monoxénicos como axénicos, entre ellos se encuentran De la Torre y col. quienes en 1971 aislaron una cepa virulenta (HM1:IMSS) en la ciudad de México, la cual es empleada con éxito en laboratorios de varios países y ha retenido el mismo grado de virulencia a lo largo de los años; estas amibas han servido para demostrar que los cultivos axénicos son capaces de producir abscesos hepáticos en los hámsteres ( Tanimoto y col., 1971 ), así como ulceración de la mucosa intestinal en cobayos y hámsteres ( Anaya-Velázquez y col., 1985 ) ( 4 ).

Las dificultades encontradas para el crecimiento axénico de E. histolytica han obligado a varios grupos a trabajar con cultivos de E. invadens, un parásito que puede producir disentería y abscesos hepáticos en reptiles. Esta especie es menos susceptible a cambios en la composición --



del medio y produce mejores rendimientos que la E. histolytica ( 4 ).

En el Hospital Infantil "Federico Gómez" de la Cd. de México, se llevan a cabo estudios con diferentes medios monoxénicos obteniéndose resultados del 58% de positividad con el medio adicionado de tioglicolato ( Jiménez y col., 1990 ). Comparando el porcentaje de efectividad con otros medios, éste indica ser el más apropiado para el crecimiento amibiano ( 30 ).

Debido a la importancia que presenta la infección por E. histolytica y por su alta frecuencia en la población, es necesario que se efectúe un método de diagnóstico completo para la amibiasis, que incluya el cultivo además del examen coproparasitoscópico seriado que se realiza actualmente en los laboratorios de Análisis Clínicos. Por lo tanto el objetivo de este estudio es estandarizar el método de cultivo monoxénico adicionado de tioglicolato, ya que así se reportarán resultados más exactos para dar un mejor servicio a los pacientes.



## M A T E R I A L E S   Y   M E T O D O S

Para realizar este estudio se recolectaron muestras de materia fecal de la población que asistió al Laboratorio de Análisis Clínicos Servicio Social Labastida-UDEM del día 17 de septiembre al 10 de noviembre de 1990. Las mues---tras fueron recogidas los días lunes y martes, se refrigeraron para conservarlas y se transportaron al laboratorio de Microbiología y Parasitología de la División de Inge--niería y Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad - de Monterrey, para ser procesadas.

Una vez analizadas estas muestras por el método copropararasitoscópico con la técnica de Faust, se tomaron las que -



resultaron positivas con E. histolytica para posteriormente inocularlas en el medio de cultivo monoxénico adicionado de tioglicolato. Al mismo tiempo se inoculó una cepa de amibas ( control positivo ) para llevar un control de calidad adecuado en el proceso. Esta cepa fue donada por la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste del Seguro Social de la Cd. de Monterrey, Nuevo León.

TECNICA DE FAUST: FLOTACION POR CENTRIFUGACION CON SULFATO DE ZINC.

- 1.- Recolectar la muestra de materia fecal en un frasco limpio.
- 2.- Preparar una suspensión 1 a 10 de materia fecal en agua.
- 3.- Centrifugar un minuto a 2300 rpm. Descartar el sobrenadante, añadir 2 ml de agua y suspender el sedimento por agitación, agregar agua hasta llenar el tubo.
- 4.- Repetir el lavado y centrifugar.
- 5.- Extraer el último líquido sobrenadante, añadir 2 ml de sulfato de zinc de densidad 1.18 ( R-1 ), suspender el sedimento y llenar el tubo con esta solución.
- 6.- Centrifugar un minuto a 2300 rpm.
- 7.- Tomar con un asa bacteriológica una muestra de la superficie del tubo y colocarla en un portaobjetos,



añadir una gota de lugol ( R-2 ) y colocar un cubre objetos. Realizar el examen microscópico.

## TECNICA DEL CULTIVO MONOXENICO ADICIONADO DE TIOGLICOLATO.

### I. SIEMBRA:

- 1.- Mezclar aproximadamente 10 gr de materia fecal - en la que se demostró la presencia de E. histolytica por la técnica de Faust con 5 ml de medio - "BR" ( R-4 ) y filtrar a través de una gasa; tomar un ml del filtrado e inocular en un tubo con agar salino ( R-5 ) en forma inclinada.
- 2.- Adicionar 4 gotas de solución de eritromicina -- ( 5 ug/ml ).
- 3.- Agregar 5 mg de almidón de arroz en polvo.
- 4.- Agregar 2 ml de medio "BR" ( R-4 ).
- 5.- Dejar incubar durante 24 horas a 37°C.

### II. CULTIVO:

- 1.- Descartar el sobrenadante del tubo que contiene la siembra con pipeta pasteur.
- 2.- Adicionar 2 gotas de solución de eritromicina -- ( 5 ug/ml ).
- 3.- Agregar 5 mg de almidón de arroz en polvo.
- 4.- Agregar 2 gotas de peptona al 20% ( R-6 ).
- 5.- Adicionar 1.5 ml de ftalato de potasio en solución ( R-7 ).



- 6.- Agregar 2 ml de medio "BRS" ( R-8 ).
- 7.- Incubar durante 48 horas a 37°C.

### III. PRIMER SUBCULTIVO:

- 1.- Tomar del frasco que contiene el cultivo una gota con pipeta pasteur y colocarla en un portaobjetos.
- 2.- Adicionar una gota de lugol ( R-2 ) y colocar un cubreobjetos para hacer la observación al microscopio ( las amibas deberán verse teñidas por el lugol ).
- 3.- Tomar del fondo del frasco una gota como inóculo para realizar el segundo subcultivo y preparar - en la misma forma que el primero.
- 4.- Incubar a 37°C durante 48 horas para la segunda observación.

NOTA: En un cultivo positivo empiezan a aparecer las amibas dentro de las primeras 48 horas, pero se sigue subcultivando para aumentar la población amibiana.

Para realizar el diagnóstico definitivo con este método - de cultivo se lleva a cabo una técnica de tinción con Hematoxilina Férrica.



TECNICA DE TINCION CON HEMATOXILINA FERRICA TOMPKINS AND MILLER.

- 1.- Preparar los frotis tomando una gota del fondo del tubo donde se cultivó la amiba y mezclar con una gota de suero de bovino, hacer una extensión con ayuda de una pipeta pasteur, y dejar secar.
- 2.- Colocar en etanol al 70% con solución de yoduro de D'Antony ( R-9 ) por 2 a 5 min.
- 3.- Colocar en etanol al 50% por 3 min.
- 4.- Lavar con agua por 3 min.
- 5.- Colocar en solución mordente de sulfato férrico de amonio al 4% ( R-10 ) por 5 min.
- 6.- Lavar con agua por 1 min.
- 7.- Colocar en Hematoxilina acuosa al 0.5% ( R-11 ) durante 2 min.
- 8.- Lavar con agua por 1 min.
- 9.- Colocar en ácido fosfotúngstico acuoso al 2% ( R-12 ) por 2 a 5 min.
- 10.- Lavar con agua por 10 min.
- 11.- Colocar en etanol al 70% (añadiendo una pequeña cantidad de carbonato de litio acuoso saturado) por 3 min.
- 12.- Colocar en etanol al 95% por 5 min.
- 13.- Colocar en dos cambios de etanol al 98% por 5 min cada uno.
- 14.- Dejar en xileno o tolueno durante toda la noche.



## REACTIVOS

### ( R-1 ) Solución de Sulfato de Zinc:

Sulfato de zinc heptahidratado	333.0 g
Agua	1000.0 ml

Se disuelve el sulfato de zinc en el agua, y se ajusta a una densidad de 1.18. Se almacena a temperatura ambiente.

### ( R-2 ) Lugol:

Yodo	5.0 g
Yoduro de potasio	10.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Se disuelven las sustancias en el agua destilada y se almacena en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

### ( R-3 ) Medio "R":

Cloruro de sodio	125.0 g
Acido cítrico monohidratado	50.0 g
Fosfato monobásico de potasio	12.5 g
Sulfato de amonio	25.0 g



Sulfato de magnesio heptahidratado	1.2 g
Acido láctico	100.0 ml
Hidróxido de sodio al 40%	7.5 ml
Azul de bromotimol al 0.04%	2.5 ml
Agua destilada	2500.0 ml

Se disuelven las primeras seis sustancias en el agua destilada; de esta solución se toman 100 ml y se adiciona el hidróxido de sodio y el azul de bromotimol, se ajusta el pH a 7.3 y se afora a 1000 ml con agua destilada. Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 min.

( R-4 ) Medio "BR":

Medio "R" ( R-3 )	100.0 ml
Cultivo de <u>Escherichia coli</u>	una gota

Se inocular el medio "R" con el cultivo de la bacteria, se deja incubar a 37°C durante 48 horas, después de este -- tiempo puede ser guardado a temperatura ambiente durante 2 meses.

( R-5 ) Agar salino:

Agar bacteriológico	15.0 g
---------------------	--------



Tioglicolato de sodio	25.7 g
Agua destilada	1000.0 ml

Se disuelven el agar bacteriológico y el tioglicolato de sodio en el agua destilada, se deja ebulir por 1 min. Se coloca en tubos y se esteriliza a 121°C durante 15 min, se deja enfriar en forma inclinada. Se guarda en el refrigerador.

( R-6 ) Peptona al 20%:

Peptona	20.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Se disuelve la peptona en el agua destilada, se esteriliza a 121°C durante 15 min.

( R-7 ) Solución de ftalato de potasio:

Biftalato de potasio	60.0 g
Hidróxido de sodio al 40%	25.0 ml
Agua destilada	500.0 ml

Se disuelve el biftalato de potasio en el hidróxido de so  
dio al 40% y se afora a un volumen de 500 ml con agua des



tilada; se ajusta el pH a 6.3 y se esteriliza a 121°C durante 15 min. La solución de trabajo se utiliza llevando a cabo una dilución de 1:10 con agua estéril.

( R-8 ) Medio "BRS":

Medio "BR" ( R-4 )	50.0 ml
Suero de bovino	50.0 ml

Se adiciona el suero de bovino filtrado e inactivado a 56°C durante 30 min, al medio "BR".

( R-9 ) Solución de yoduro de D'Antony:

Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	1.5 g
Agua destilada	100.0 ml

Se disuelven las sustancias en el agua destilada. Se almacena en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

( R-10 ) Solución mordente de sulfato férrico de amonio:

Sulfato férrico de amonio	4.0 g
---------------------------	-------



Agua destilada 100.0 ml

Se disuelve el sulfato férrico de amonio en el agua destilada, se deja reposar una semana antes de usarlo.

( R-11 ) Solución de Hematoxilina acuosa:

Hematoxilina 0.5 g  
Agua destilada 100.0 ml

Se disuelve la hematoxilina en el agua destilada, se deja reposar durante una semana antes de usarlo.

( R-12 ) Acido fosfotúngstico acuoso:

Acido fosfotúngstico 2.0 g  
Agua destilada 100.0 ml

Se disuelve el ácido fosfotúngstico en el agua destilada, se deja reposar una semana antes de usarlo.



## R E S U L T A D O S

En el período comprendido entre el 17 de septiembre al 10 de noviembre de 1990, se cultivaron un total de 25 muestras de materia fecal en las que se había comprobado la presencia de Entamoeba histolytica por el examen coproparasitológico seriado ( Técnica de Faust ).

Se obtuvieron 6 casos positivos ( 1.5% ) con el medio de cultivo monoxénico adicionado de tioglicolato, en los cuales se observaron tanto quistes como trofozoitos de E. histolytica.

En este período se inculó también una cepa de dicho pará



sito en el mismo medio, para utilizarse como control. Se obtuvieron resultados positivos en todos los subcultivos realizados.



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

Se recomienda utilizar el cultivo para la identificación de E. histolytica como método adicional al examen coproparasitológico seriado, debido a que de esta manera el -- diagnóstico de la amibiasis intestinal será más completo y se reportarán resultados exactos ( 31 ).

Como se mencionó anteriormente la técnica estandarizada - en el presente estudio, es utilizada en el Hospital Infantil "Federico Gómez" de la Cd. de México, en donde se ha comprobado en base a los resultados obtenidos con este me dio que es el más efectivo para el crecimiento amibiano ( 30 ).



Es necesario enfatizar que para lograr la estandarización de la técnica se deben considerar todos los factores físicos y químicos que intervienen en el desarrollo del parásito. Entre estos factores se encuentran el pH, el tamaño del inóculo, el tratamiento de la muestra y el tiempo de incubación de los cultivos.

Una de las primeras observaciones fue la contaminación -- del medio por levaduras, esto se debió a que el almidón -- utilizado no había recibido el tratamiento adecuado; este problema se solucionó al llevar a cabo la esterilización de dicho material por espacio de 3 horas a una temperatura de 125°C en la estufa. Se utiliza el almidón de arroz en el medio debido a que incrementa el crecimiento del pa rásito ( 32 ).

El pH adecuado para el crecimiento amibiano debe ser de -- 7.0, sin embargo no causa ningún efecto si varía entre -- 6.9 y 7.3. Es indispensable medir el pH del medio "R" an tes y después de su esterilización, ya que como se pudo -- observar cualquier cambio en éste, influye en los resultata dos del cultivo. Debe mantenerse este pH para que ocurra la exquistación del parásito y así se realice su ciclo -- vital.

Debido a que la muestra contenía gran cantidad de bacte--



rias, así como de materiales residuales, fue necesario -- mezclarla con medio "BR" para después filtrarla a través de una gasa y del filtrado se tomó el inóculo para ser -- cultivado. Este paso es esencial para incrementar la sensibilidad del método.

El antibiótico empleado para inhibir la multiplicación y para eliminar a las bacterias sensibles en el medio de -- cultivo fue la eritromicina, ya que es activa contra un - número considerable de especies microbianas incluyendo -- neumococos, estreptococos y corinebacterias ( 21 ).

La cepa de Escherichia coli fue utilizada porque el ex-- quistamiento y enquistamiento de las amibas se efectúa sólo en presencia de bacterias. También es importante para iniciar el desarrollo amibiano y regular el crecimiento ( 32 ).

La temperatura óptima para el crecimiento debe ser entre 35-37°C; el tiempo de incubación al cual deben ser sometidas es de 48 horas, ya que al término de este período se empiezan a observar las amibas. Sin embargo, para aumentar la población de parásitos es necesario llevar a cabo subcultivos cada 48-72 horas.

El tioglicolato incorporado al medio de cultivo acelera -



el crecimiento de la población amibiana, porque mantiene el potencial de óxido-reducción del medio y ayuda a incrementar la adhesión y la multiplicación de los parásitos.

La observación microscópica se realizó minuciosamente en diferentes campos de las preparaciones, encontrándose tanto quistes como trofozoitos característicos. También con este procedimiento se comprobó que el desarrollo de la cepa control de E. histolytica inoculada en el medio fue adecuado.

En los resultados obtenidos influyeron también algunos factores como son la fragilidad de las amibas y su pronunciada sensibilidad a variaciones, ya sea de temperatura o de alguno de los componentes del medio. Por lo que es recomendable que se mantenga una temperatura constante dentro del laboratorio y que se controle el uso de nuevos lotes de reactivos en los cultivos.

Una vez observadas las amibas en fresco, se deben realizar preparaciones permanentes utilizando la tinción de Hematoxilina Férrica. Sin embargo, es conveniente tener una población amibiana importante en el cultivo, para poder localizarlas en el frotis y establecer así el diagnóstico definitivo.



La especificidad del método de cultivo se pudo comprobar al inocular muestras de materia fecal que presentaban --- además de E. histolytica otros parásitos, los cuales no - influyeron en el crecimiento de ésta, ni se desarrollaron en el medio.

Por todo lo anteriormente mencionado, se recomienda que - para incrementar el número de cultivos positivos se con-- trolen con exactitud todos los factores que intervienen - en el desarrollo de las amibas.

El cultivo de E. histolytica debe considerarse como un -- gran progreso en los métodos experimentales para la inves-- tigación médica y biológica del presente y del futuro. Y debido a la gran frecuencia que presenta la amibiasis - en nuestro país, es importante implantar el método de cul-- tivo como una herramienta adicional de diagnóstico para - contribuir al control de esta enfermedad.



## R E S U M E N

En el presente estudio se empleó el medio de cultivo monoxénico adicionado de tioglicolato para aislar Entamoeba histolytica de materia fecal, con el fin de llegar a usarlo como método adicional de diagnóstico de la amibiasis intestinal.

Se analizaron un total de 25 muestras de materia fecal en la que se había comprobado con anterioridad la presencia de dicho parásito por el examen coproparasitoscópico seriado, obteniéndose 6 casos positivos ( 1.5% ) en los que se observaron tanto quistes como trofozoitos de E. histolytica.



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

1. Brandt, H. y R. Pérez. 1970. Amibiasis. Ed. La Prensa Médica Mexicana, México. pp. 8-16.
2. Brown, H. W. y F. A. Neva. 1986. Parasitología Clínica. 5a. Ed. Nueva Editorial Interamericana, México. pp. 25-40.
3. Martínez-Palomo, A. and M. Martínez-Báez. 1983. Selective Primary Health Care: Strategies for control of disease in the developing world. X. Amebiasis. Rev. Inf. Dis. 5: 1093- 1100.



4. Martínez, A. 1989. Amibiasis. Ed. Médica Panamericana, México. pp. 10-25.
5. OMS. 1987. Prevención y control de infecciones parasitarias intestinales. Serie de Informes Técnicos, España. pp. 27-28.
6. Zavala, J. T. 1974. Parasitología. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp. 13-23.
7. Sepúlveda, B. y L. S. Diamond. 1979. Amibiasis. Instituto Mexicano del Seguro Social, México. pp. 42-52.
8. Katz, M. and D. Despommier. 1986. Parasitic Diseases Ed. Springer-Verlag, USA. pp. 133-140.
9. Martínez, A., V. Tsutsumi, F. Anaya and A. González. 1989. Ultrastructure of experimental intestinal - invasive amibiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41: 273-279.
10. Faust, E. C., P. F. Rusell y R. C. Jung. 1974. Parasitología Clínica de Craig y Faust. Ed. Salvat, México. pp. 135-159.
11. Ravdin, J. I. 1989. Amebiasis now. Am. J. Trop. Med.



Hyg. 41: 40-48.

12. Martuscelli, A., E. Robledo y F. Navarrete. 1960. Frecuencia de las parasitosis intestinales en México. Revista Médica del Hospital General. México. 8: 579-618.
13. Vargas-Mena, J. y E. Montes. 1971. Frecuencia de Parasitosis intestinales en el estado de Nuevo León, México (IV). Rev. Invest. Salud Pub. 31: 191-200.
14. Vargas-Mena, J. y E. Montes. 1971. Frecuencia de Parasitosis intestinales en el estado de Nuevo León, México (V). Rev. Invest. Salud Pub. 31: 201-207.
15. Vargas-Mena, J., M. E. Rodríguez y E. Montes. 1970. Frecuencia de parasitosis intestinales en el estado de Nuevo León, México (II). Rev. Lat-amer. Microbiol. 12: 35-39.
16. Vargas-Mena, J., J. Vázquez y E. Montes. 1971. Frecuencia de parasitosis intestinales en el estado de Nuevo León, México (III). Rev. Lat-amer. Microbiol. 13: 213-219.
17. Vargas-Mena, J., C. Villarreal y E. Montes. 1970.



Frecuencia de parasitosis intestinales en el estado de Nuevo León, México (I). Rev. Lat-amer. Microbiol. 12: 27-33.

18. Beck, J. W. y J. E. Davies. 1983. Parasitología Médica. 3a. Ed. Nueva Editorial Interamericana, México. pp. 11-29.
19. Smith, D. T. y N. F. Conant. 1968. Microbiología de Zinsser. 14a. Ed. Appleton-Century-Crofts, Nueva York. pp. 1323-1351.
20. Finegold, S. M. and E. J. Baron. 1990. Bailey and --- Scott's Diagnostic Microbiology. 8th. Ed. The --- C. V. Mosby, Co., Saint Louis, Mo. pp. 776-861.
21. Jawetz, E., J. L. Melnick y E. A. Alberg. 1987. Microbiología Médica. 12a. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México. pp. 568-570.
22. Cheng, T. C. 1973. General Parasitology. Ed. Academic Press, London. pp. 215-219.
23. Sepúlveda, B. 1982. Amebiasis: Host-Pathogen Biology. Rev. Inf. Dis. 4: 836-839.



24. Gallego, J. 1984. Atlas de Parasitología. Ed. Jover, S. A., España. pp. 3-4.
25. Baker, J. R. 1988. Cryptosporidiosis in perspective, mechanisms of diarrhoea. Adv. Parasitol. 27: 99-100.
26. Báez-Mendoza, J. and E. J. Ramírez-Barba. 1986. -- Cutaneous Amebiasis of the Face: A case report. Am. J. Trop. Hyg. 35: 69-71.
27. Warren, K. S. and J. Z. Bowers. Parasitology, a global perspective. Ed. Springer-Verlag, New York. pp. 53.
28. Beaver, P. C. and R. C. Jung. 1984. Clinical Parasitology. 9th. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia. pp. 26-29.
29. Guevara, D. C. 1983. Otros agentes productores de -- gastroenteritis papel de E. histolytica en las -- infecciones intestinales. Laboratorio 449: 587-601.
30. Jiménez-Cardoso, E. 1990. Un método para cultivar amibas. Bioquímica 15: M-18.



31. Aguirre-Pequeño, E. 1946. Técnicas de Cultivo en el -  
Diagnóstico de la Amibiasis. Universidad de Nuevo  
León. pp. 7-28.
  
32. Diamond, L. S. 1983. In vitro cultivation of Protozoan  
Parasites. Ed. J. B. Jensen, CRC Press, Boca Raton.  
pp. 65-109.

902357