

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE *ENTAMOEBIA HYSTOLITICA* VENEZOLANAS

IMMUNOCHEMICAL EVALUATION OF VENEZUELAN STRAINS OF *ENTAMOEBIA HYSTOLITICA*

Urdaneta, H.¹; Cava, J. A.²; Molina, S.³; Aguirre, A.⁴; y Hernández, M.⁵

1. Profesor titular. Laboratorio de Inmunoparasitología, Instituto de Inmunología Clínica. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes.

2. Profesor asistente. Laboratorio de Citometría de flujo. Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes.

3. Profesor instructor. Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical (CIMPAT), Universidad de Los Andes, Colombia.

4. Profesora titular. Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical (CIMPAT), Universidad de Los Andes, Colombia.

5. Profesor titular. Director. Instituto de Inmunología Clínica. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes.

RESUMEN

La identificación de la patogenicidad de la *Entamoeba histolytica* ha sido útil como punto de partida en la búsqueda de antígenos relevantes para el inmunodiagnóstico y la inmunopprofilaxia. Recientemente se describió el aislamiento y axenización de las dos primeras cepas de *E. histolytica venezolanos*: IULA: 1092:1 (MMM) e IULA: 0593:2 (NER). En el presente estudio evaluamos los siguientes parámetros: perfiles electroforéticos, reactividad frente a anticuerpos monoclonales y policlonales y la virulencia cuando son inoculadas en animales de laboratorio y los compararnos con la cepa patógena de referencia (HM-1). Los extractos amibianos fueron cromatografiados en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa y se enfrentaron a sueros humanos y de animales positivos y negativos. La capacidad de las cepas para producir abscesos, se evaluó, inoculándolas en el

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

hígado de hamsters. El análisis de los resultados nos permitieron concluir que las dos cepas en estudio presentan un perfil electroforético similar a la cepa patógena de referencia internacional (HMI); que son de alta virulencia, demostrada por la producción de abscesos hepáticos amibianos en todos los animales inoculados y que presentan un complejo patrón de reactividad frente a los sueros positivos y que en ellas está presente un antígeno marcador de patogenicidad reconocido por el monoclonal HU-511. Con base en estos criterios y los anteriormente evaluados podemos concluir que las dos cepas son de alto potencial patógeno, pudiendo ser usadas como antígeno en los ensayos de inmunodiagnóstico e inmunoprofilaxis.

Palabras claves: *E. histolytica*, amiba, axénica, patogenicidad, virulencia, antígenos.

ABSTRACT

Studies on pathogenicity of *Entamoeba histolytica* have been useful in the search of relevant antigens for immunoprofilaxis and immunodiagnosics. Recently, our laboratory achieved tire isolation and axenization of the first two Venezuelan strains of *Entamoeba histolytica* named: IULA: 1092:1 (MMM) and IULA:0593 :2 (NER). In order to further characterize these two strains, we have evaluated: the electrophoretic profile, polyclonal and monoclonal antibody reactivity and virulence in hamsters. All parameters were compared with the referential pathogenic strain (HM-1). *Entamoeba histolytica* antigens were examined by electrophoretic assay on polyacrilamide gels (SDS-PAGE). Crude extracts of both strains were used for tire demonstration of immunoreactivity by immunoblotting using positive and negative sera. Percutaneous liver inoculation of hamsters was used to assess virulence. The electrophoretic profile of Venezuelan strains were similar to the pathogenic strain (HM-1); high virulence was demonstrated by abscess production in all inoculated animals, positive sera yielded a complex pattern of reactivity, blots showed immunoreactivity with a monoclonal antibody (HU-511), used as a marker of pathogenicity. These results demonstrated that both Venezuelan strains have a high pathogenic profile and could be used as an antigen in immunoprofilaxis and

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

immunodiagnostic assays.

Key words: *Entamoeba hystolitica*, amoeba, axenic, pathogenicity, virulence, antigens.

INTRODUCCIÓN

La amibiasis es una enfermedad ocasionada por el protozooario *Entamoeba hystolitica*, con la mayor morbilidad y mortalidad después de la malaria⁴⁸. La revisión de los trabajos sobre el tema no introduce modificaciones en el conocimiento sobre altas prevalencias en países subdesarrollados^{7, 16, 24, 28} así como cifras persistentemente bajas en los países industrializados^{18, 19}.

Anualmente en el mundo, se infectan con este parásito, alrededor de 500 millones de personas⁴⁷, 10% de las cuales presentan síntomas clínicos intestinales en un 80% a 98% de los casos y del 2 al 20% extraintestinales⁶, ocasionando una mortalidad que oscila entre 40.000 y 110.000 casos por año⁴⁸.

Los efectos patogénicos y la expresión clínica de la amibiasis dependen de factores relacionados con el sistema inmunológico del hospedero y con la virulencia del parásito²⁷, variando marcadamente en las diferentes áreas geográficas, condiciones sanitarias y socioeconómicas de la población.

Las infecciones amibianas podrían ser causadas por dos especies diferentes de amibas^{13,7, 31, 48} una capaz de producir la enfermedad invasora denominada *Entamoeba hystolitica*, Schaudinn 1903, y otra sin potencialidad patógena *Entamoeba dispar*, Brumpt 1925. Esta teoría estada sustentada por el estudio delos zimodemos^{5, 26, 29}, y por el uso de anticuerpos monoclonales específicos para cepas patógenas^{39, 40} y por los estudios de biología molecular^{22, 29} de RNA¹⁰, ya que han sido secuenciados varios fragmentos de DNA específicos de *E. hystolitica* patógenas y no patógenas⁸.

La caracterización de los diferentes elementos antigénicos del género *E. hystolitica*, así como sus propiedades inmunogénes y patogénicas han sido objeto de estudio por diferentes métodos, con miras a orientar y diseñar pautas y procedimientos diagnósticos, así como la producción de vacunas, estrategia clave en los programas de prevención de enfermedades infecciosas.

Los primeros estudios que definieron las principales características de *E.*

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

hystolitica usaron extractos totales del protozoario, obtenidos de cultivos polixénicos, contaminados con otros componentes de la flora fecal. Con el desarrollo de los cultivos axénicos ha sido posible producir antígenos sin tales contaminantes¹², lo que permite estudiar mejorías propiedades que definen a las cepas de *E. hystolitica*.

El entendimiento de las reacciones inmunológicas durante la amibiasis, se complica por el gran número de componentes que contiene este parásito, que evocan varios tipos de respuestas inmunológicas. La tendencia actual es hacia la identificación cuantitativa y cualitativa de los principales antígenos del parásito, para mejorar los métodos diagnósticos, para la inmunopprofilaxia y el entendimiento de la respuesta inmunológica.

Los perfiles electroforéticos de la amiba, en geles de poliacrilamida, han evidenciado hasta 32 componentes antigénicos distintos^{15, 30} Cepas diferentes de *E. hystolitica* pueden presentar algunas proteínas antigénicas diferentes³⁵. Así mismo, a través de las diferencias observadas en las corridas electroforéticas de las isoenzimas (zimodemos), se ha demostrado la existencia de cepas patógenas y no patógenas³⁴. El estudio de los zimodemos ha sido el parámetro de elección más utilizado para diferenciar cepas patogénicas de no patogénicas de *E. hystolitica*. No obstante, existen reportes controversiales que sugieren la reversión de zimodemos de algunas cepas, después de ser sometidas a las condiciones de cultivo in vitro^{3, 25}.

Recientemente se ha sugerido el uso de otras pruebas para establecer diferencias entre cepas de *E. hystolitica* aisladas de distintos hospedadores; entre ellas, técnicas de biología molecular que han permitido la identificación de secuencias de DNA, unas específicas para cepas patogénicas y otras para cepas no patogénicas, aportando con esto nuevos datos en la distinción de cepas⁴¹.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite la producción masiva de secuencias de DNA o RNA partiendo de una muestra clínica; el segmento amplificado puede ser luego identificado por algún ensayo inmunológico. Esta técnica permite diferenciar *E. hystolitica* de *E. dispar* en las heces de pacientes mediante el uso de sondas específicas cuya secuencia nucleotídica se conoce^{2, 5}. Varios trabajos han demostrado la utilidad y sensibilidad del PCR en la diferenciación de las dos formas de *E. hystolitica* de acuerdo con sus

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

propiedades patogénicas y no patogénicas^{5, 33}. Esta técnica puede ser efectiva hasta en muestras guardadas durante un mes a 4° C³³. Existe una variante de esta técnica, el PCR-SHELA que consiste en la identificación de los productos de hibridación por medio del ensayo inmunoenzimático².

En 1995, reportamos el aislamiento y axenización de dos cepas de *E. histolytica* procedentes de pacientes sintomáticos a las que se denominó IULA: 1092:1 e IULA:0593:2⁴⁵; en un análisis isoenzimático realizado en estudio más reciente, encontramos que las cepas en estudio tenían zimodemo patógeno tipo II¹. Los datos obtenidos del análisis isoenzimático de ese estudio demostraron correlación con el análisis genotípico, demostrado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-SHELA), revelando que estas cepas muestran una organización genómica propia de las cepas patógenas de referencia¹.

El presente trabajo comprende el estudio de los perfiles proteicos de esas dos cepas de *E. histolytica*, la evaluación de su reactividad frente a anticuerpos monoclonales y policlonales, así como determinar su potencial al inocularlas en animales de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de amibas

Las cepas IULA:1092, IULA:0593:2⁴⁵ y como patrón de referencia, otra cepa de *E. histolytica* existente en el cepario del Instituto de Inmunología Clínica de La Universidad de Los Andes, todas son mantenidas en cultivos axénicos en el medio de Diamond TYI-S-33¹².

Cepa IULA:1092:1 (MMM): aislada en el laboratorio de inmunoparasitología del Instituto de Inmunología Clínica de La Universidad de Los Andes, de heces de un paciente con disentería amibiana⁴⁵. Esta cepa es de alta virulencia en hamsters.

Cepa IULA:0593:2 (NER): aislada en el mismo instituto de otro paciente con la misma patología⁴⁵.

Cepa HM-1: aislada en México de un paciente con disentería amibiana, de alta virulencia para animales y para monocapas de células¹¹.

Obtención del antígeno

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

Se utilizaron los trofozoitos de las cepas arriba mencionadas, mantenidas en condiciones axénicas en el medio TYI-S-33¹² a concentraciones de 2×10^6 por tubo de cultivo (16 x 150 mm) a 37° C. Las masas de amibas fueron lavadas tres veces (3X) con una solución salina tamponada pH 7.2 (PBS) y centrifugadas a 500 g por 10 min, a 4° C. El sobrenadante fue descartado y el sedimento resuspendido en 2 ml de PBS y tratado con 2 mM de los siguientes inhibidores de proteasas: p-hidroximercuribenzoato (pHMB), fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF) y N-L-P-tosil-1-fenilalanina clorometil cetona (TLCK). La masa de parásitos se fraccionó por ultrasonido a una frecuencia de 40 Hertz por 3 ciclos de 1 min. cada uno e intervalos de 1 min. El homogeneizado obtenido fue centrifugado a 15.000 g por 1 hora a 4° C. Se descartó el sedimento, y el sobrenadante fue alícuotado en tubos de eppendorf a 100 ml por tubo y almacenado a -70° C. El contenido de proteínas fue determinado por el método de Lowry y col.²³

Anticuerpos monoclonales y policlonales

Los antígenos de las cepas en estudio fueron evaluados usando anticuerpos monoclonales y policlonales de humanos y de animales.

El anticuerpo monoclonal usado fue el HUS-11, dirigido contra un antígeno de 96 kDa de membrana externa de *E. histolytica*, purificado mediante cromatografía de afinidad en columna de Sepharosa Proteína A, a partir de líquido ascítico de ratones Balb-c.⁴⁴

También fueron usados anticuerpos policlonales humanos purificados por afinidad, provenientes de pacientes con absceso hepático amibiano y amibiasis intestinal comprobada, por medio de estudios coproparasitológicos realizados por tres investigadores expertos en el procedimiento y por el método COPROELISA-Eh⁴⁶.

Los sueros policlonales de animales fueron obtenidos por inmunización de conejos albinos (Nueva Zelandia), con cuatro dosis del antígeno de cada cepa, a intervalos de 15 días entre cada dosis. En la primera dosis se inyectaron 1 mg del antígeno diluido v/v con adjuvante completo de Freund por vía intraperitoneal, en la segunda dosis se utilizó igual concentración del antígeno en adjuvante incompleto de Freund por vía intramuscular, y la tercera dosis consistió en 0,1 mg de proteína en solución salina vía subcutánea.

Todos los sueros fueron evaluados mediante el ensayo inmunoenzimático

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

(ELISA), alicuotados en porciones de 1 ml y almacenados a -70° C.

Ensayo Inmunoenzimático ELISA

Los antígenos amibianos fueron absorbidos a placas de poliestireno en concentraciones de 2 mg/pozo en 100 ml de tampón carbonato a pH 9,6 a 4° C durante toda la noche. Las placas fueron lavadas 5x con PBS más Tween 20 al 0,05% (PBS-T) y bloqueadas con 200 ml de PBS-Caseína al 2% (PBS-C) durante 1 hora a T ambiente. Luego fueron adicionados a cada pozo loo AI de los sueros en diluciones crecientes (1:20 hasta 1:40.000) incubándose por 1 hora a T ambiente seguido de 5x lavados. Seguidamente 100 ml del conjugado (anti-IgG específico marcado con peroxidasa) en dilución 1:1000 fueron adicionados a cada pozo y se incubaron por 1 hora. Después de nuevos lavados, se agregaron 100 ml del sustrato (OPD en buffer fosfato citrato 0,1 mM; pH 5,0 y H₂O₂ 0,012%), y se incubaron nuevamente por 30 min; al cabo de ese tiempo, se detuvo la reacción con H₂SO₄4N y se midieron las absorvancias en un espectrofotómetro (Reader 510 Microwell Systems) a 492 nm.

Electroforesis

La electroforesis fue realizada según Laemmli²⁰, los extractos solubles de cada cepa en concentraciones de 30 mg diluidos v/v en tampón de muestra (Tris-HCl 1M; pH 6,8; SDS al 10%; 2-mercaptoetanol al 5%, azul de bromofenol) fueron desnaturados a 97° C por 3 min., adicionados a cada una de las canaletas del gel de poliarilamida al 10% con SDS y corridos a 40 mA (mili Amper) a 4° C; un patrón de peso molecular (Bio-md N° 161-0303) fue usado como referencia. Después de la corrida electroforética, un gel fue coloreado con azul de Coomassie al 0,04% para verificar la corrida, y los otros fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa.

Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas del gel fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,45 mm (Bio-rad) a 40 mA a 4° C durante toda la noche. Dos tiras de nitrocelulosa fueron coloreadas con tinta china al 30% y rojo de Ponceau al 1% respectivamente, y las restantes fueron usadas en la realización del inmunoblot.

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

Inmunoblot

Las membranas de nitrocelulosa previamente bloqueadas con albúmina bovina al 1% en Tris 10 mM, pH 7.4, fueron incubadas con los sueros negativos y positivos en diluciones de 1:1000 en PBS a T ambiente y en agitación constante por 2 horas. Se lavaron 4x con PBS-T para luego incubarlas con el conjugado IgG-peroxidasa específico (dilución 1:1000) por 1 hora, después de tres nuevos lavados con PBS-T y uno con PBS, se revelaron con una solución de diaminobenzinadina-chloronaftol (10 mgs de 3-3 diaminobenmidina, 30 mgs de 1-4 cloro-naftol, 5 ml de metanol, 50 ml de buffer-fosfato-salino y 15 ml de H₂O₂ al 30%).

Pruebas de virulencia

Se usaron 4 hamsters dorados *Cricetus auratus* de 15 días de nacidos para estudiar la virulencia de las cepas de *E. histolytica* recién aisladas. A cada animal le fue inoculada una suspensión de 2×10^5 amibas en un volumen estimado de 0.03 ml en el parénquima hepático mediante punción percutánea. Como control fueron usados hamsters de la misma edad, inoculados con la misma cantidad de amibas de la cepa mexicana HMI de reconocido poder patogénico. Diez días después de la inoculación intrahepática, se hicieron laparotomías para realizar el examen macroscópico y microscópico de los hígados, para observar la presencia de lesiones hepáticas amibianas y para investigar la presencia de trofozoitos de *E. histolytica* en los hígados. En condiciones de esterilidad fueron extraídos fragmentos de hígado de los bordes de las lesiones para ser sembrados en medio de cultivo TI-S-33, y microbiológicos, y se observaron al microscopio macerados de fragmentos de las lesiones hepáticas para evidenciar la presencia de trofozoitos de *E.*

histolytica.

Antes de sacrificar los animales les fueron extraídas muestras sanguíneas para evaluar la producción de anticuerpos anti-amiba por medio del ensayo inmunoenzimático (ELISA).

RESULTADOS

Caracterización electroforética de antígenos solubles

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

Las dos cepas en estudio mostraron un complejo perfil de bandas proteicas con pesos moleculares variando desde 200 kDa a menos de 45 kDa. Se encontraron proteínas que son comunes a todas las cepas en estudio. Las cepas venezolanas IULA:1092:1 e IULA:0593:2 mostraron perfiles proteicos similares a la cepa mexicana de referencia (Figura 1).

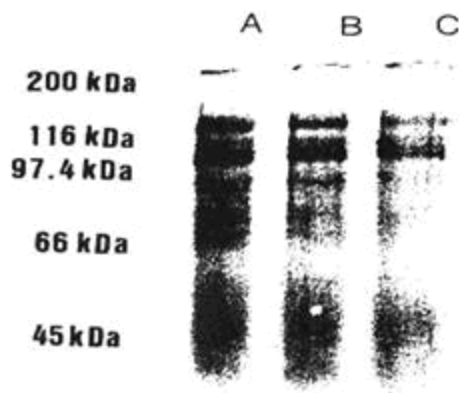


Figura No. 1

Patrón electroforético de las cepas de *E. histolytica* en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%. A: cepa IULA:1092:1, B: cepa IULA:0593:2 y C: cepa HM-1 de referencia internacional.

Immunoblotting

Para identificar las proteínas reconocidas por los anticuerpos, fue utilizada la técnica Western Blot con sueros policlonales humanos de origen animal, producidos en conejos, y un monoclonal producido en ratón. Numerosas bandas proteicas fueron reconocidas por los sueros policlonales de conejo (canaleta A, Figura 2). El monoclonal HU-511 reconoció fundamentalmente el antígeno de 96 kDa conocido marcador de patogenicidad (canaleta B, Figura 2).

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

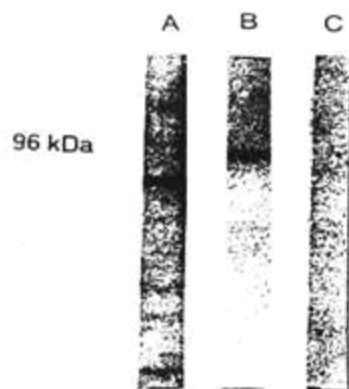


Figura No. 2

Western Blot de la cepa IULA:1092:1 *E. histolytica* frente a varios sueros. A: suero policlonal de conejo, B: monoclonal (HU5-11) producido en ratón y C: suero de conejo normal.

Los sueros policlonales frente a la cepa IULA:0593:2, en general reconocieron un complejo perfil proteico, suero de conejo (canaleta A, Figura 3), suero de pacientes con colitis disintérica (canaleta B, Figura 3), suero de pacientes con abscesos hepáticos amibianos (canaleta C, Figura 3), suero de pacientes con colitis no disintérica (canaleta D, Figura 3) y suero humano normal (canaleta E, Figura 3).

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE



Figura No. 3

Antígenos inmunoprecipitados por los diferentes sueros frente a la cepa IULA:0593:2. A: sueros de conejo, B: suero de paciente con colitis disentérica, C: suero de paciente con abscesos hepáticos amibianos, D: suero de paciente con colitis no disentérica, y E: suero humano normal.

Pruebas de virulencia

El examen macroscópico de los hígados de los hamsters inoculados reveló lesiones hepáticas en todos los animales inoculados (Figuras 4 y 5). La presencia de amibas fue comprobada microscópicamente en los macerados de la región periférica de las lesiones y en los cultivos de los fragmentos de hígado en el medio de cultivo TYI-S-33. Se observó correspondencia entre la dimensión de las lesiones y la densidad parasitaria.

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE



Figura No. 4

Hígado de hamster inoculado con 2×10^6 trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa IULA:1092:1

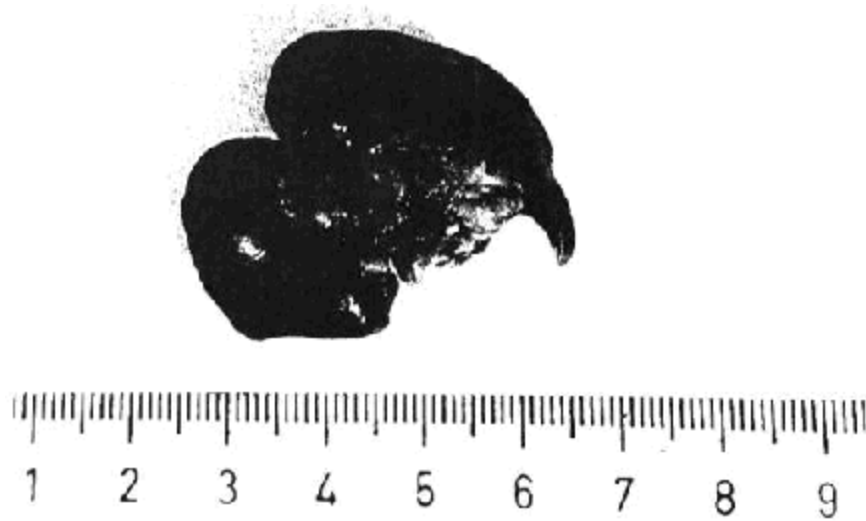


Figura No. 5

Hígado de hamster inoculado con 2×10^6 trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa IULA:0593:2.

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

Los estudios microbiológicos de las lesiones hepáticas ocasionadas por las cepas IULA:1092:1 e IULA:0593:2 mostraron la ausencia de infección bacteriana concomitante. La prueba de ELISA demostró una respuesta humoral con altos títulos de anticuerpos antiamebianos en los animales inoculados.

DISCUSIÓN

Además del análisis isoenzimático y la reacción en cadena de la polimerasa ya realizados¹, en el presente trabajo, completamos el estudio de las primeras dos cepas de *E. histolytica* aisladas en Venezuela, mediante la evaluación de sus perfiles antigénicos en geles de poliacrilamida, de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales y policlonales, y de su virulencia en animales de experimentación.

El análisis en SDS-PAGE de los extractos solubles de las cepas de *E. histolytica* reveló que estas dos cepas venezolanas muestran perfiles electroforéticos similares entre sí y que no difieren de la cepa de referencia HM-1. Muchos de los péptidos detectados en el SDS-PAGE mostraron pesos moleculares idénticos o muy próximos a los reportados por Guimares y cols. 1991¹⁵.

El reconocimiento de las bandas proteicas transferidas a las membranas de nitrocelulosa por los sueros humanos, de conejos y por el anticuerpo monoclonal HUS-11, no demostró diferencias entre las cepas en estudio y la referencia internacional. La mayor reactividad de los anticuerpos fue contra las proteínas de mayor peso molecular dentro de las cuales se encuentran varias de las proteínas marcadoras de patogenicidad localizadas en la superficie de la ameba entre otras de 170 kDa y 112kDa con actividad de adhesión^{4, 9}, la de 96 kDa asociada con patogenicidad^{21, 43, 44} y la de 60 kDa con actividad de cistein proteasa³².

Además de los zimodemos y del PCR, otras evidencias en favor de la patogenicidad de las cepas en estudio es que producen grandes abscesos cuando son inoculadas en hamsters. Los trofozoitos de las dos cepas evaluadas demostraron alto grado de virulencia, debido a que produjeron abscesos hepáticos típicos en todos los animales.

En la mayoría de los animales inoculados se observó la presencia de anticuerpos antiamebianos como demostración de la capacidad de estas amebas para inducir respuesta inmunológica humoral; la respuesta celular no fue

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

investigada.

En conclusión, las cepas IULA:1092:1 e IULA:0593:2 evaluadas en el presente estudio demostraron todos los criterios para ser consideradas de alto potencial patógeno, pudiendo ser usadas como cepas nativas de referencia en ensayos inmunodiagnósticos e inmunoprolácticos.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico por el financiamiento del proyecto CDCHT No. M517-95-B.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUIRRE, A. ; MOLINA, S. ; URDANETA, H.; COVA, J. ; GUHL, F. *Characterization of two Venezuelan Entamoeba histolytica strains using electrophoretic isoenzyme patterns and PCR-SHELA*. Arch. Med. Res. 1997; 28:285-287.
2. AGUIRRE, A.; WARHURST, D.; GUHL, F.; FRAME, I. *Polymerase chain reaction solution hybridization enzyme-linked immunoassay (PCR-SHELA) for the differential diagnosis of pathogenic and non-pathogenic Entamoeba histolytica*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1994; 89-187.
3. ANDREWS, B.; MENTZONI, L.; BJORVATN, B. *Zymodeme conversion of isolates of Entamoeba histolytica*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1990; 84: 63-65.
4. ARROLLO, R. y OROZCO, E. *Localización e identificación de adhesina. Una proteína que participa en la adhesión de la Entamoeba histolytica a eritrocitos humanos y células epiteliales*. Arch. Invest. Med. Mex. 1986; 17(1): 135-139.
5. BRITTEN, D.; WILSON, S.; MCNERNEY, R.; MOODY, A.; CHIODINI, P.; ACKERS, J. *An improved colorimetric PCR-based method for detection and differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar en feces*. J. Lin. Microbiol. 1997; 35(5): 1108-1111.
6. BRUCKNER, D. *Amebiasis*. Clin. Microbiol. Rev. 1992; 5(4): 356.
7. CABALLERO, S.; VIVEROS, R.; SALVATIERRA, B.; TAPIA, C.; SEPÚLVEDA, A.; GUTIÉRREZ, G.; ORTIZ ORITZ, L. *Seroepidemiology of Amebiasis in Mexico*. Am. J. Trop. Hyg. 1994; 50: 412-419.
8. CARRERO, J.; LACLETTE, J. *Molecular biology of Entamoeba Histolytica: a*

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

review. *Arch. Med. Res.* 1996; 27(3)1 403-412.

9. CHADEE, K. ; PETRI, W.; INNES, D. J. ; RADVIN, J. *Rat and human colonic mucins and inhibit adherence lectin in Entamoeba hystolitica.* *Clin. Invest.* 1987; 80: 1245-1248.

10. CLARK, C.; DIAMOND, L. *Pathogenicity. Virulence and Entamoeba hystolitica.* *Parasitology Today.* 1994; 10(2)1 46-47.

11. DE LA TORRE, M. ; DE LA HOZ, R.; LANDA, L.; SEPÚLVEDA, B. *Cultivos axénicos de Entamoeba hystolitica.* *Arch. Invest. Med. (Mex).* 1971; 2: 165-169.

12. DIAMOND, L. *Techniques of anoxic cultivation of Entamoeba hystolitica Schaudinn, 1903 and E. hystolitica like amebae.* *J. Parasitol.* 1968 ; 54: 1047-1056.

13. DIAMOND, L.; CLARK, C. *A redescription of Entamoeba hystolitica Schaudinn 1903 separating it from Entamoeba dispar Brumpt 1925.* *J. EUK. Microbiol.* 1993; 40: 340-44.

14. FRYE, W.; MELENEY, H. *Liver extract as a substitute for serum in the culture for Entamoeba hystolitica.* *Science.* 1939; 89: 564-565.

15. GUIMARAES, S.; URDANETA, H.; SILVA, E.; TAVARES, C. *Entamoeba hystolitica: Antigenic characterization of axenic strains from Brazil.* *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1991; 33(1): 6-11.

16. ISIBASI, A.; GONZÁLEZ, C.; ORTIZ, B.; MUY, M.; PANIAGUA, J.; BLANCO, F., PELAYO, R.; MAGDALENO, B.; RAMÍREZ, A.; KUMATE, J. *Seroepidemiología de la amibiasis en la región norte de la República Mexicana.* *Arch. Invest. Med. (Mex)* 1990; 21 (supl.1): 163-174.

17. JACKSON, T.; RAVDIN, J. *Differentiation of and Entamoeba dispar infections.* *Parasitology Today.* 1996; 12(10): 406-409.

18. KAPPUS, K. ; LUNDGREN, R. ; JURANEK, D.; ROBERTS, J. ; SPENCER, H. *Intestinal parasitism in the United States: update on a continuing problem.* *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 50: 705-713.

19. KYRONSEPPA, H. *The occurrence of intestinal parasites in Finland.* *Scand. J. Infec. Dis.* 1993; 25: 671-673.

20. LAEMMLI, U. *Cleavage of structural protein during the assemble of the head of bacteriophage.* *T Nature.* 1970; 227: 680-685.

21. LEON G.; TOVAR, R.; MUÑOZ, M. *A monoclonal antibody specific for a 40*

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

kDa polypeptide recognizes pathogenic strains of Entamoeba histolytica. Arch. Med. Res. 1994; 25: 223-228.

22. LI, E.; STANLEY, S. Jr. Protozoa. Amebiasis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 1996; 25(3): 471-492.

23. LOWRY O.; ROSENBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. *Protein measurement with the Folin agent. J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.

24. MANGALI, A.; SASABONE, P.; SYAFRUDDIN; ABADI, K.; HASEGAWA, H.; TOMA, T.; KAMIMURA, K.; MIGAYI, I. *Intestinal parasitic infections in Campalagian district, South Sulawesi, Indonesia Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 1993; 24: 313-320.

25. MIRELMAN, D. *Effect of culture conditions and bacterial associates on the zymodemes of Entamoeba histolytica. Parasitol. Today.* 1987; 3: 37-40.

26. MIRELMAN, D.; NUCHAMOWITZ, Y.; STOLARSKY, T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35(9): 2405-2407.

27. MOODY, S.; BECKER, S.; NUCHAMOWITZ, Y.; MIRELMAN, D. *Virulent and avirulent Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar differ in their cell surface phosphorilated glycolipids. Parasitology.* 1997; 114: 95-104.

28. NZEAKO, B. *Seasonal prevalence of protozoan parasites in Nsukka, Nigeria. J. Commun. Dis.* 1992; 24: 224-230.

29. ORTEN, S.; CLARK, C.; BINDER, M.; SCHEINER, O.; WIEDERMANN, G.; DUCHENE, M. *Molecular biology of the hexokinase isoenzyme pattern that distinguishes pathogenic Entamoeba histolytica from non-pathogenic E. Dispar. Mol. Biochem. Parasitol.* 1997; 86(1): 85-94.

30. PARKHOUSE, M.; CID, M. Y CALDERON, J. *Identificación de antígenos de membrana de Entamoeba histolytica con anticuerpos de pacientes con amebiasis. Arch. Invest. Med (Mex).* 1978; 9 (Supl. 1): 211-218.

31. PETRI, W. Jr. *Recent advances in amebiasis. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1996.; 33(1) 1-37.

32. RANGEL, A.; SPINELLA, S.; URDANETA, H.; GAYRAL, P.; RIGOTHIER, C. *Entamoeba histolytica 60 kDa cysteine proteinase and its relationship with the humor al immune response. Arch, Med. Res.* 1997; 28: 262-263.

33. SANUKI, J.; ASAI, T.; OKUZAWA, E.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T.

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

Identification of Entamoeba histolytica and E. dispar cysts in stool by polymerase chain reaction. Parasitol Res. 1997; 83(1): 96-98.

34. SARGEANT, P.; WILLIAMS, J.; GREENE, J. The differentiation of invasive and non invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1978, 72: 519-521.

35. SEPÚLVEDA, B.; MARTÍNEZ PALOMO, A. *Immunology of amoebiasis by Entamoeba histolytica.* 1980. pp 174.

36. SILVA, E.; CARVALHO, M.; BRANDAO, M. *Monoaxenizacao e cultivo de amostras de Entamoeba histolytica isoladas no Brasil de pacientes sintomáticos. VI Congreso Brasileiro de Parasitología.* 299, 1981, Belo Horizonte, Brasil.

37. SRIVASTAVA, M.; HABIBULLAH, C.; DAS, S. *Isoenzyme patterns of clones of Entamoeba histolytica. Indian J. Med. Res.* 1993 ; 97: 179-181.

38. TACHIBANA, H.; IHARA, S.; KOBAYASHI, S.; KANEDA, Y.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, Y. Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 2234-2239.

39. TACHIBANA, H.; KOBAYASHI, S.; CHENG, X.; HIWATASHI, E. *Differentiation of Entamoeba histolytica from E. dispar facilitated by monoclonal antibodies against a 150 kDa surface antigen. Parasitol. Res.* 1997; 83: 435-439.

40. TACHIBANA, H.; KOBAYASHI, S.; KANEDA, Y.; TAKEUCHI, T.; FUJIWARA, T. *Preparation of a monoclonal antibody specific for Entamoeba dispar and its ability to distinguish E. dispar from E. histolytica. Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1997; 4(4): 409-414.

41. TANNICH, E.; HORSTMANN, R.; KNOBLOCH, J.; ARNOLD, H. *Genomic DNA differences between pathogenic and non-pathogenic Entamoeba histolytica. Proc. natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 5118-5122.

42. THAMMAPALERD, N.; THARAVANIJ, S.; WATTANAGOON, Y. *Axenic cultivation of Entamoeba histolytica from liver abscess and its zymodeme. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 1993; 24: 480-483.

43. TORIAN, B.; LUKEHART, S. *Use of monoclonal antibodies to identify, characterize and purify a 96,000-Dalton surface antigen of pathogenic Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis.* 1987; 156(2): 384-343.

44. URDANETA, H.; MARTINS, S.; SILVA, E.; TAVARES, C. *Identification and*

EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE CEPAS DE

purification of an isolated-specific 95 kDa antigen of Entamoeba histolytica by using a monoclonal antibody. Mem. Inst. "Oswaldo Cruz". 1991; 86(Pz-28): 276.

45. RONDÓN, M.; MUÑOZ, M.; HERNÁNDEZ, M. *Isolation and characterization of two Entamoeba histolytica strains. GEN. 1995 ; 49: 23-28.*

46. URDANETA, H.; RANGEL, A.; MARTINS, S.; MUÑOZ, J.; HERNÁNDEZ, M. *Entamoeba histolytica: fecal antigen capture immunoassay for the diagnosis of enteric amebiasis by a monoclonal antibody. Rev Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 1996; 38(1): 39-44.*

47. WALSH, J. *Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality Rev. Infec. Dis. 1986; 8:228.*

48. WHO/PAHO/UNESCO. *Report of a consultation of experts on amoebiasis. XIII Seminar on Amebiasis. México. 1997; 1-4.*