Dup

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

"DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE AMIBIASIS"

OTTO LIMA SAMAYOA

Guatemala, Septiembre de 1973.

PLAN DE TESIS

A) *INTRODUCCION*

1– *Definición*
2– *Epidemiología*
3– *Diagnóstico*
4– *Objetivos*

B) *MATERIAL Y METODOS*

C) *RESULTADOS*

D) *DISCUSION*

E) *CONCLUSIONES*

F) *BIBLIOGRAFIA*

A) INTRODUCCION

1– DEFINICION:

La amibiasis es una enfermedad infecciosa, que constituye un problema médico de gran importancia en nuestro medio, dada su alta morbilidad y mortalidad. Esta enfermedad es causada por un protozoario, **Entamoeba histolytica,** *la cual produce una lesión primaria en el intestino, principalmente en el ciego y sigmoides, pudiéndose presentar además una invasión secundaria por vía directa o hematógena a hígado, bazo, pulmón, cerebro y a piel (7,16,17,18,30,32,33,34).*

2– EPIDEMIOLOGIA:

La infección amibiana no es un problema que se afronta únicamente en los climas tropicales, sino también se encuentra como problema mundial dependiendo casi exclusivamente de las condiciones higiénicas.

En datos obtenidos de la Encuesta Nutricional realizada por el INCAP (11) en 1965, en la ciudad de Guatemala fue hallada **Entamoeba histolytica** *en el 10.5o/o de las personas; los niños comprendidos entre los 5 y 9 años de edad fueron los más afectados, presentando el 19.4o/o.*

En el área rural se alcanza el 24o/o; la infección fue mayor en las personas comprendidas entre los 10 y 24 años de edad.

3– DIAGNOSTICO:

En 1875 Losch descubrió las amibas en las heces de un paciente con disentería y produjo experimentalmente lesiones

intestinales en un perro, pero no fue sino Kartulis en 1887 que consideró a la amiba como causa etiológica de la disentería.

El diagnóstico de la amibiasis, se hace principalmente por la sospecha clínica, el hallazgo de trofozoitos o quistes de **Entamoeba histolytica** *en frotes de heces en fresco, secreciones o tejidos infectados. Esta ha sido la forma más segura y confiable de hacer el diagnóstico de amibiasis. La forma de la obtención del material y los métodos para su mejor visualización han variado y hay numerosas técnicas descritas en la literatura. (1,2,5,7).*

Muchos han sido los investigadores que se han dedicado al estudio en este campo que han contribuido en gran parte a conocer la morfología, propiedades químicas, gérmenes concomitantes en las diferentes manifestaciones de las enfermedades amibianas.

Hasta hace pocos años han tomado auge las pruebas serológicas, aunque desde el primero y segundo decenios del presente siglo se intentó demostrar la presencia de anticuerpos serológicos en pacientes con amibiasis. Se utilizaron como antígenos, extractos de materia fecal o de pus de abscesos hepáticos amibianos. Sin embargo, persistió el problema de obtener cultivos de **Entamoeba histolytica** *para extraer un antígeno adecuado hasta que Cuttler, Boeck y Drobhlav lograron cultivar el parásito (6). La reproducción de la amiba la obtuvieron en cultivos con otros microorganismos simbióticos lo que impedía lograr una reacción serológica específica para la amibiasis, lo que motivó resultados variables y no concluyentes sobre todo causados por la imposibilidad de conseguir antígeno puro. En 1968 Diamont publicó su trabajo en cultivos axénicos de* **Entamoeba histolytica.** *(32)*

En mayo de 1970, Morris, Powell y Elsdon-Dew, publicaron un trabajo sobre una nueva prueba de aglutinación,

empleando partículas de látex cubiertas con antígeno obtenido de cultivos axénicos de **Entamoeba histolytica** *(6).*

En el trabajo presentado por Lee, Palacios y Sepúlveda, en el Segundo Seminario sobre Amibiasis en México (32), en el cual se estudiaron veinticinco sueros de pacientes con absceso hepático amibiano, donde se hizo el análisis inmuno electroforético del antígeno amibiano axénico, se observó que la movilidad electroforética estuvo comprendida entre las alfa y las beta globulinas. Este resultado que es similar a los obtenidos en otros estudios realizados, apoyan la existencia de un sistema antígeno múltiple a los trofozoitos de **Entamoeba histolytica** *de la cepa HK-9.*

En otro trabajo presentado en este Seminario por Perches, Kretschmer, Lee y Sepúlveda, en la determinación de inmuno globulinas del suero en pacientes con amibiasis invasora, concluyen que la inmuno globulina G y A del suero aumentan en pacientes con amibiasis invasora.

4– OBJETIVOS:

El objetivo del presente trabajo es el de evaluar la efectividad de los métodos serológicos Serameba y Amoebogen para el diagnóstico de amibiasis y establecer cual es la correlación que existe, entre estos métodos, el examen de heces en fresco, el examen de heces en PVA, las sospechas clínicas y la localización de la enfermedad.

B) MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo se investigaron 40 pacientes con amibiasis, de edades comprendidas entre 7 meses y 68 años de edad, como grupo control se estudio 57 pacientes con diarrea y abscesos de etiología no amibiana, con edades similares al grupo de estudio.

El diagnóstico de amibiasis se estableció, en el caso de amibiasis hepática, por los síntomas de la infección, la hepatomegalia dolorosa, los exámenes de laboratorio, centellogramas, rayos X, laparatomía, características del contenido del absceso y por la prueba terapéutica específica. En los casos de amibiasis intestinal, por la presencia de **Entamoeba histolytica** *en las heces en fresco o en PVA.*

A todas las muestras de suero para investigar anticuerpos contra las amibas se les practicó la prueba de látex y a 55 la prueba con amoebogen, esto se debió a que al inicio de esta investigación se carecía de reactivo Amoebogen. En todos se practicó, examen de heces en fresco y/o en PVA; en algunos casos se efectuaron otros exámenes como procedimientos complementarios para su diagnóstico, como: investigación de bilirrubinas, transaminasas, hematología, biopsia hepática, estudio radiológico, centellogramas y proctosigmoidoscopías.

INVESTIGACION DE ANTICUERPOS: AGLUTINACION PASIVA CON LATEX.(*)

Prueba serológica desarrollada para la detección específica de **Entamoeba histolytica** *en los tejidos.*

(*) Serameba, Laboratorios AMES.

Es una prueba serológica por aglutinación en látex, útil en el diagnóstico de amibiasis invasora. Un resultado negativo, prácticamente excluye el diagnóstico de amibiasis invasora.

Ningún otro tipo de amiba presente en el lumen del intestino, estimula la formación de anticuerpos. Esta característica de la **Entamoeba histolytica** *permite la especificidad de la prueba.*

El equipo de Serameba incluye:

1. *Una ampolleta de ANTIGENO AMIBIANO liofilizado, purificado y estandarizado en cantidad suficiente para 10 pruebas.*

2. *Una ampolleta con LATEX EN SUSPENSION.*

3. *Una ampolleta de SUERO CONTROL POSITIVO liofilizado.*

4. *Una ampolleta de SUERO CONTROL NEGATIVO liofilizado y dos pipetas de Pasteur.*

PREPARACION DE LOS SUEROS:

Reconstruir los sueros control positivo y negativo, mezclado con 0.2 ml de agua destilada o deionizada las ampolletas correspondientes.

El suero problema que se va a probar debe de estar claro. Cualquier partícula en el suero debe eliminarse por centrifugación. Ni la hemoglobina ni los pigmentos biliares interfieren.

El suero problema debe calentarse en baño maría a 56ºC durante 20 minutos antes de usarse.

SENSIBILIZACION DEL LATEX

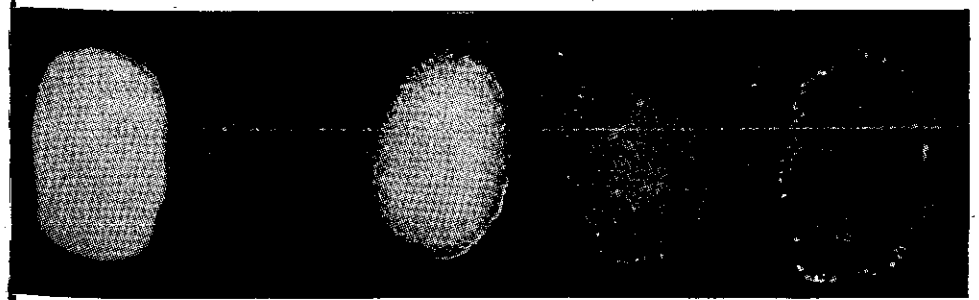
Usando una de las pipetas provistas, transferir la suspensión de látex a la ampolleta que contiene el antígeno amibiano liofilizado, mezclar hasta disolver el antígeno completamente y dejar reposar por lo menos 5 minutos antes de usarlo.

PLATINA DE REACCION

Dibuje en un cristal limpio, con un crayón grueso, 12 cuadros de 2 cm X 2 cm para cada serie de pruebas.

PRECAUCION

El uso correcto de la prueba de SERAMEBA requiere algo de práctica con sueros conocidos antes de utilizar el suero real del paciente, con objeto de familiarizarse con la reacción de aglutinación. Un control positivo y otro negativo deben probarse en paralelo con cada serie de sueros que se realice.



TECNICA PARA HACER LA PRUEBA

Aspirar el látex sensibilizado en una de las pipetas provistas. Dejar caer una gota por cada prueba, en cada uno de los cuadros dibujados en la platina; junto pero sin mezclar, depositar una gota del suero que se va a probar próxima a la gota de látex. Usando un aplicador apropiado, mezclar las dos gotas de cada cuadro completamente. Para mezclar los reactivos, imprimir un movimiento ondulatorio y suave a la platina durante 5 minutos.

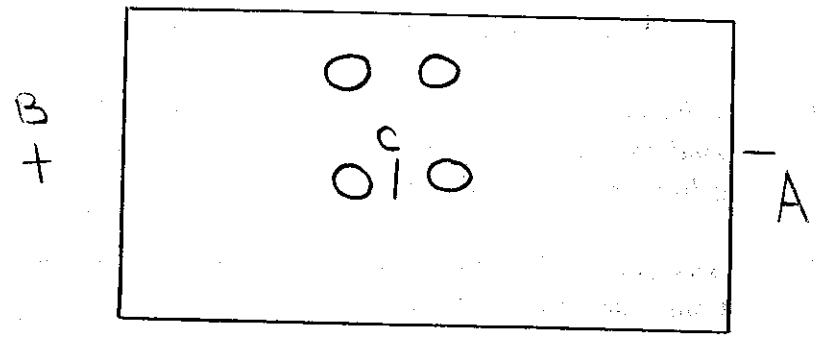
INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Una reacción positiva se obtiene cuando el látex se aglutina durante los cinco minutos posteriores a la mezcla (grumos).

Se obtiene un resultado negativo cuando el látex no se aglutina y se conserva como una suspensión OPACA Y HOMOGENEA cinco minutos después de la mezcla.

Varios tipos de reacción positiva pueden observarse, pero ni la rapidez ni la intensidad en la aglutinación, indican la severidad de la invasión amibiana (6). Un resultado positivo indica la presencia de anticuerpos amibianos, de una infección por **Entamoeba histolytica** *presente o pasada. Cualquier paciente una vez sensibilizado a la* **E. histolytica,** *demostrará aglutinaciones positivas por un período posterior de amplitud desconocida, aún cuando el tratamiento haya sido satisfactorio.*

PRECIPITACION EN GEL DE AGAR POR ELECTROFORESIS CRUZADA (*)



Durante la electroforesis en el gel cargado negativamente, las gammaglobinas (anticuerpo), debido a su insuficiente carga negativa, se desplazan hacia el cátodo A por el flujo endosmótico del amortiguador en el gel. Los antígenos que poseen suficiente carga negativa migran al ánodo B a pesar del flujo endosmótico del amortiguador. Mediante la disposición apropiada de las cavidades, se puede hacer que el anticuerpo y el antígeno se encuentren y reaccionen C. Las líneas de precipitación se desarrollan rápidamente y alcanzan su intensidad máxima en este sistema de electroforesis cruzada dnetro de 30 a 60 minutos, lo cual depende, a su vez, de la concentración y de la velocidad de la migración de los componentes que reaccionan.

MATERIALES Y CONSERVACION

1. *La Unidad de Electroforesis consta de los siguientes componentes:*

   a. *Una base de electroforesis (FUENTE DE ENERGIA).*

(*) AMOEBOGEN – AMICELCO

b. *Cuatro esponjas.*

c. *Placas de gel de agar prepunzonadas. Para evitar la deshidratación, conservar las placas de agar en la bolsa de plástico y conservar entre 2º y 8ºC.*

2. *Solución Amortiguadora, con timerosal (0.02o/o) añadido como conservador. Conservar entre 2º y 8ºC. Se debe usar amortiguador fresco en cada manipulación.*

3. *Antígeno de* **Entamoeba histolytica,** *liofilizado. Conservar entre 2º y 8ºC.*

Suero Testigo Positivo de Anticuerpo de **Entamoeba histolytica,** *0.5 ml, con ácido de sodio (0.1o/o) añadida como conservador. Conservar entre 2º y 8ºC.*

PREPARACION DE LOS SUEROS

Reconstituir el antígeno de **E. histolytica** *con 2.5 ml. de agua destilada. Girar suavemente el frasco para disolver el antígeno.*

Llenar una pipeta capilar con 7 a 8 ml. de la muestra del suero que se va a examinar. Insertar la pipeta capilar dentro de la cavidad para que la punta toque el fondo de la cavidad. Llenar la cavidad levantando despacio la pipeta capilar desde el fondo de la cavidad. La cavidad se debe llenar hasta su coronamiento. Usar una pipeta capilar para cada muestra y control.

De cada par de cavidades, la cavidad mas próxima al ánodo se debe llenar con las muestras del suero en estudio. La cavidad en cada par mas cercano al cátodo se debe llenar con antígeno de **E. histolytica.** *Se puede utilizar la misma pipeta capilar para todas las adiciones de antígeno a una placa.*

NOTA: *Todas las cavidades que se han de usar se deben llenar sin demora una vez que el llenado se ha iniciado y la electroforesis se debe empezar rápidamente cuando las cavidades estén llenas. Las interrupciones o demoras podrán ocasionar la difusión de las primeras cavidades llenadas, disminuyendo la concentración de los reactantes y sensibilidad de la prueba.*

INTERPRETACION

Un resultado positivo está indicado por una o mas líneas de precipitación entre las cavidades de las muestras del suero y del antígeno paralelas a las filas de cavidades. Una o mas líneas de precipitación entre las cavidades del antígeno y del control positivo indican que el sistema se ha ensamblado y manipulado correctamente. Si no se forma ninguna línea, no tiene valor los resultados de la prueba. Si la muestra del suero es lipémica, un precipitado no específico puede migrar desde la cavidad de la muestra hacia la cavidad del antígeno. Esta zona nublada no se debe interpretar como una reacción positiva.

Resultados típicos obtenidos con la electroforesis cruzada para la detección del anticuerpo contra la **Entamoeba histolytica** *que muestran reacciones intensas, moderadas, débiles y negativas.*

NOTAS

La inactivación al calor no es necesaria para esta prueba. Sin embargo los sueros inactivados a 56ºC durante 30 minutos se pueden usar dando igualmente buenos resultados. Esto puede ser útil al reducir o eliminar los precipitados no específicos.

Las líneas de precipitación se pueden intensificar dejando las placas a la temperatura ambiente durante 30 minutos o entre 2o y 8oC durante toda la noche. Alternativamente, las líneas de precipitación se pueden intensificar anegando las placas en una solución de ácido acético al 3o/o inmediatamente después de la electroforesis. La solución de ácido acético al 3o/o inmediatamente después de la electroforesis. La solución de ácido acético se tiene que eliminar después de un minuto y el gel de agar se tiene que enjuagar bien con agua de la llave. Si se sigue este procedimiento, las placas se tienen que leer entre 2 y 3 minutos después del enjuague.

También se puede aumentar la visibilidad de las reacciones coloreando el gel de agar con colorante de proteina S de Ponceau. Si se recurre a este procedimiento, las placas se tienen que colocar en una solución de cloruro de sodio al 0.85o/o durante 24 horas, lavar con agua destilada durante un período de otras 24 horas y secar antes de aplicar el colorante.

C) RESULTADOS

– En los 25 casos de amibiasis intestinal invasora, la prueba de látex resultó positiva en 23 casos, o sea el 90o/o y dos falsas negativas, o sea el 10o/o. (Cuadro 1).

De estos solo se practicó en 17 la prueba con Amoebogen resultando positiva en 3 (17.5o/o) y negativo en 14 (82.5o/o).

– De los **15** *casos con abscesos hepáticos amibianos la prueba de látex resultó positiva en 14 (93.3o/o) y negativo en uno (6.6o/o).*

En este grupo se hizo la prueba con Amoebogen en 8 casos, resultando positiva en 3 casos (37.5o/o) y negativo en 5 (62.5o/o).

– En el grupo testigo, siendo un total de 57 casos, se incluyeron cuadros de trastornos hepáticos como: hepatitis (2), insuficiencia hepática (3), infiltración grasa del hígado (1), colecistitis crónica calculosa (1). En este sub-grupo se obtuvieron resultados negativos con los dos reactivos.

En el sub-grupo de problemas pulmonares, siendo en total dos, se incluyó un caso de tuberculosis pulmonar y un caso de neumonía de etiología no amibiana, obteniéndose resultados negativos por ambos procedimientos.

En el grupo testigo de problemas gástricos siendo en total 39, se incluyeron, gastritis, colitis inespecíficas, shigelosis y salmonellosis.

De este último sub-grupo, solo en dos casos la prueba con látex dió resultados positivos, en los cuales no se hizo la reacción con Amoebogen.

Es interesante que el primer caso fue en un paciente en quien no se le encontró amibas en los exámenes de heces, pero presentaba el antecedente de diarrea sanguinolenta (pringas) un mes antes, no habiéndose comprobado su etiología. El segundo caso fue en un paciente con diagnóstico comprobado de Salmonellosis.

CUADRO 1

		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
– Colitis Amibiana				
	Látex	23 (90o/o)	2 (10o/o)	25
	Amoebogen	3 (17.5o/o)	14 (82.5o/o)	17
– Absceso Amibiano				
	Látex	14 (93.3o/o)	1 (6.6o/o)	15
	Amoebogen	3 (37.5o/o)	5 (62.5o/o)	8
– Controles				
	Látex	2 (3.5o/o)	55 (96.5o/o)	57
	Amoebogen	0	30 (100o/o)	30

D) DISCUSION

La prueba de aglutinación de látex demuestra ser útil en el diagnóstico de enfermedad amibiana, sobre todo cuando su localización es extraintestinal donde se dificulta su identificación directa y los métodos habituales de diagnóstico no son lo suficientemente específicos. Así también en los casos de su localización intraintestinal en los cuales no se identifica a **Entamoeba histolytica** *pero existe la fuerte sospecha clínica de amibiasis. En estos casos la prueba de aglutinación de látex puede ayudar al clínico a inclinarse a un diagnóstico por ser una prueba bastante sensible. En nuestro estudio resultó positiva en 14 de 15 casos de absceso hepático amibiano o sea en el 93.3o/o. En contraste con el Amoebogen que resultó positiva en 3 de 8 casos o sea el 37.5o/o.*

Así también en los casos de Amibiasis intraintestinal la prueba con látex dió resultados positivos en 23 de 25 casos, es decir en el 90o/o. En el Amoebogen los resultados positivos fueron en 3 de 14 casos, es decir en el 17.5o/o.

En el grupo control la prueba con látex dió 2 falsas positivas en 57 casos o sea el 3.5o/o de los cuales en 1 caso existía el antecedente de diarrea sanguinolenta y el otro caso en un paciente con salmonellosis. Con la prueba Amoebogen se efectuó la prueba en 30 pacientes del grupo control, sin que se encontrara una respuesta positiva, o sea que el porcentaje de falsas positivas fue del 0o/o.

Podríamos agregar que la prueba de aglutinación de látex, es un método rápido, sencillo y que no necesita de una persona experimentada para su ejecución.

Cabe recordar que un resultado positivo no necesariamente indica una enfermedad presente o activa, sino existe la posibilidad de que se deba a un ataque previo de amibiasis, ya que los anticuerpos pueden permanecer circulantes por varios meses después de la curación.

La prueba de electroforesis cruzada tiene sus principios en que el anticuerpo antiamibiano se localiza en la inmunoglobulina G y debe por lo tanto desplazarse hacia el cátodo bajo los efectos de la electroendosmosis y que el antígeno amibiano debe movilizarse hacia el ánodo, por influencia de la corriente electroforética. Cabe suponer que en un medio apropiado estas circunstancias aumentarían la rapidez y la sensibilidad de la reacción.

No obstante de que la inmuno electroforesis cruzada se ha usado con muy buenos resultados en la identificación del antígeno australiano, existe gran controversia en los resultados obrenidos en diferentes estudios para la identificación de anticuerpos antiamibianos; asi los valores han oscilado entre cifras muy bajas y hasta el 98o/o de positividad (33). Se hace hincapié que en nuestro estudio se obtuvieron resultados muy inferiores al compararlos con los obtenidos en la prueba de látex.

Otra de las diferencias en cuanto a procedimiento de ambas pruebas podríamos resumirlas así:

1. *El Amoebogen necesita una base de electroforesis. La Serameba únicamente un baño maría.*

2. *El tiempo empleado para desarrollar la prueba con Amoebogen es el doble que el empleado en la Serameba.*

3. *En la Serameba la lectura de las reacciones es franca, fácilmente visible y en términos generales no existe gran*

margen de error. En el Amoebogen la reacción es poco visible, fácilmente se presta a un error de lectura y eventualmente se tiene que recurrir a otros procedimientos como baños en ácido acético, solución salina, tinciones (33) o lupas.

E) CONCLUSIONES

1. *La identificación de las amibas en las heces en fresco es el método más seguro y más económico de hacer el diagnóstico de amibiasis intestinal, pero por las dificultades que se presentan en su localización e identificación en un gran porcentaje de casos, es necesario recurrir a otros procedimientos de diagnóstico, como los Serológicos en los que se ha comprobado ser útiles por su sensibilidad.*

2. *El empleo de fijadores a base de sublimado y alcohol polivinílico, permiten preservar las muestras en buenas condiciones para su ulterior coloración e identificación.*

3. *Se ha demostrado que la amibiasis invasora es capaz de provocar una reacción de antígeno anticuerpo, como resultado de su penetración a los tejidos del huésped.*

4. *La reacción de látex dió resultados positivos en proporción elevada de los pacientes con amibiasis invasora; en cambio, dió resultados negativos en la gran mayoría de las personas sin evidencia de amibiasis.*

5. *La reacción con Amoebogen dió resultados sumamente inferiores a los obtenidos con Serameba, por lo que desde el punto de vista clínico se le confiere a la Serameba una utilidad indiscutible en el diagnóstico de enfermedad amibiana, en donde no se puede demostrar la presencia de* **Entamoeba histolytica** *con fuerte sospecha clínica. La menor sensibilidad de Amoebogen limita considerablemente su utilidad.*

F) BIBLIOGRAFIA

1. *Acevedo Olvera, Alfonso et al. Panorama amibiano. Rev. Med. Hosp. Gral. (México) 23 (3): 199 - 204, 1960.*

2. *Arango Portillo, José Leon Antonio. Consideraciones sobre el diagnóstico de la amibiasis. Tesis. Guatemala, Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas, Agosto 1965. 31 p.*

3. *Barrett-Connor, Elizabeth. Amebiasis, today, in the United States. Calif. Med. 114: 1 - 6, March 1971.*

4. *Biagi F., Francisco; Ruben Alvarez y Clementina González. Estudio de la reacción de floculación en el diagnóstico de la amibiasis. Alergia. 19 (2): 61 - 66, 1971.*

5. *Biagi F., Francisco et al. Observaciones sobre diagnóstico y frecuencia de la amibiasis y otros parasitosis en ninos con diarrea, de la ciudad de México. Bol. Med. Hosp. Inf. Mex. 14 (6): 617 - 226, 1968.*

6. *Borges C., Cipriano, et al. Valoración diagnóstica de la prueba de latex en el absceso hepático amibiano. Rev. Gastroenterol. Mex. 36: 284 - 287, 1971.*

7. *Brown, Harold W. y David L. Belding. Parasitología clínica. Traducido al español por Roberto Folch Fabre y Hugo Arechiga. 2a. ed. México, Editorial Interamericana, 1967. pp. 20 - 35.*

8. *Craig, Charles F., Complement fixation in the diagnosis of infection with* **Endamoeba histolytica.** *Amer. J. Trop. Med. Hyg. 8 (1): 29 - 37, January 1959.*

9. *Diagnóstico inmunólogico de la amibiasis. Correlación clínica de los datos de laboratorio. Prensa Med. Mex. 35 (1 y 2): 36- 40, 1970.*

10. *Elsdon-Dew, Roland. Recientes hallazgos en la amebiasis. Triangulo. 4 (5): 180 - 184, Junio 1960.*

11. *Evaluación nutricional de la población de C.A. y Panamá, Guatemala. INCAP. 1969. p. 109. (INCAP V-25).*

12. *Faust, Ernest C. Protozoan infections of the human digestive tract. World Wide Abs. 7 (6): 8 - 18, June 1964.*

13. *Healy, George R. Laboratory diagnosis of amebiasis. Bull. N. Y. Acad. Med. 47 (5): 478 - 493, May 1971.*

14. *Healy, George R., et al. The serology of amebiasis. Bull. N. Y. Acad. Med. 47 (5): 494 - 507, May 1971.*

15. *Heiblum S., Manuel; Cipriano Borges C. y Jaime Montiel R. Prueba de aglutinación de latex en el diagnóstico de la amibiasis intestinal invasora. Rev. Gastroenterol. Mex. 36: 281 - 283, Sep. - Oct. 1971.*

16. *Herrera Llerandi, Rodolfo. Acute abdomen of amoebic origin. Bull. Soc. Inter. Chirurg. 3: 10, 1968.*

17. *Herrera Llerandi, Rodolfo. Thoracic repercussions of amebiasis. Thorac. Cardiovasc. Surg. 52 (3): 361 - 375, Sep. 1966.*

18. *Herrera Llerandi, Rodolfo. et al. Repercusiones torácicas de la amebiasis. Rev. Col. Med. (Guatemala). 15 (3): 95 - 99, Sep. 1964.*

19. *Kessel, John F., et al. Indirect hemagglutination and complement fixation tests in amibiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 14 (4): 540 - 550, July 1965.*

20. *Kirkpatrick, Charles H., et al. Cutaneous responses of normal subjects to histolyticin from* **Entamoeba histolytica.** *Amer. J. Trop. Med. Hyg. 21 (1): 18 - 21, January 1972.*

21. *Krupp, Iris M. Antibody response in intestinal and extraintestinal amibiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 19 (1): 57 - 62, January 1970.*

22. *Krupp, Iris M. Glutaraldehyde-treated cells in the indirect hemagglutination test for amebiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 18 (5): 666 - 669, Sep. 1969.*

23. *Krupp, Iris M. Modification of the indirect haemagglutination test for Amoebiasis. J. Clin. Path. 22: 530 - 533, January 1969.*

24. *Krupp, Iris M. and S.J. Powell. Antibody response to invasive amebiasis in Durban, South Africa. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 20 (3): 414 - 420, May 1971.*

25. *Krupp, Iris M. and S.J. Powell. Comparative study of the antibody response in amibiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 20 (3): 421 - 424, May 1971.*

26. *Maddison, S.E., et al. Application of serology to the epidemiology of amebiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 14 (4): 554 - 557, July 1965.*

27. *Maddison, S. E., et al. Comparison of hemagglutinins and precipitins in amebiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 14 (4): 551 - 553, July 1965.*

28. *Morris, M. N., et al. Latex Agglutination test for invasive amoebiasis. Lancet. I: 1362 - 1363, Jun. 27, 1970.*

29. *Ortiz de Leon, Horacio. Incidencia de la amibiasis intestinal en el Hospital Infantil "María Teresa". Tesis. Guatemala, Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas, Mayo 1961, 40 p.*

30. *Robledo, Efigenia, et al. Diagnostico de laboratorio de la amebiasis y otras protozoosis intestinales. Rev. Med. Mex. 34 (820): 209 - 214, Mayo 25, 1959.*

31. *Ruiloba, Jose y Beatriz Zavala. Reacciones serológicas en el diagnóstico de la amibiasis. Gaceta Med. Mex. 103 (4): 321 - 328, Abril 1972.*

32. *Segundo Seminario sobre Amibiasis. Patrocinado por el IMSS y UNAM. México, D.F. 25 - 27 Feb., 1970. Archivos de investigación Médica. 1 (Sep. 1970): 1 - 252, 1970.*

33. *Tercer Seminario sobre Amebiasis. Patrocinado por el IMSS y UNAM. México, D.F. 24 - 26 Feb. 1971. Archivos de investigación Médica. 2(Sup. 1): 155 - 452, 1971.*

34. *Tratado de medicina interna de Cecil - Loeb. Ed. por Paul Beeson y Walsh McDermott. Traducido al español por Alberto Folch y Pi. 12a. ed. México. Editorial Interamericana, 1968. pp. 349 - 353.*

35. *Topasi, Thelma E. and George R. Healy. Adaptation of the bozicevich trichinella bentonite flocculation test for the diagnosis of amebiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 19 (1): 43 - 48, January 1970.*

36. *Turner, Jerrold A., et al. Amebiasis; a symposium. Calif. Med. 114 (3): 44 - 55, March 1971.*

Vo. Bo. Ruth R. Amaya
Bibliotecaria.

Br. Otto Lima Samayoa

Dr . Fancisco J. Aguilar
Asesor

Dr. Roberto Masselli
Revisor

Dr. José Quiñonez A..
Director de Fase III

Dr.. Carlos Bernhard
Secretario

IMPRIMASE:

Dr. César Augusto Vargas M.
Decano