



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PROPUESTA PARA LA ELECCIÓN DE MEDIOS DE
CULTIVO Y CREACIÓN DE UN CEPARIO
DE PARÁSITOS PROTOZOARIOS EN LA
FACULTAD DE QUÍMICA”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA
ILIRIA MARÍA JIMÉNEZ HERNÁNDEZ**



MÉXICO, D.F.

AÑO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor: Lilia María Ernestina Vierna García
VOCAL:	Profesor: Abel Gutiérrez Ramos
SECRETARIO:	Profesor: José Cordero Hernández
1er. SUPLENTE:	Profesor: Eduardo Bonilla Espinosa
2° SUPLENTE:	Profesor: Norma Trejo Medina

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: JOSÉ CORDERO HERNÁNDEZ
(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):
(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): ILIRIA MARÍA JIMÉNEZ HERNÁNDEZ
(nombre (s) y firma (s))

Agradecimientos

A Dios por haberme permitido concluir con esta etapa de mi vida.

A mis padres, que a pesar de la distancia están siempre conmigo.

A José Cordero Hernández, por aceptar dirigirme en este trabajo.

Al jurado, por darse un poco de tiempo para la revisión de éste trabajo y las sugerencias.

A la familia Santibáñez Mejía, por permitirme ser parte de ella y por todo su apoyo incondicional.

A mis hermanos, porque en algún momento de mi vida han estado ahí para ayudarme.

A Fernando, por sus sugerencias y dedicarme un poco de su tiempo.

A todas mis amigas, que ya saben quienes son; por estar conmigo en las buenas y en las malas, por no dejarme caer y animarme en todo momento.

A Carlos, por su gran paciencia, su amor, su insistencia para la culminación de este trabajo y por soportarme tanto.

A todas y a cada una de las personas que no me han dejado y que me han enseñado.

Contenido

Objetivos	5
Introducción	6
CAPITULO I	
<i>Entamoeba histolytica</i>	13
Generalidades.....	13
Cultivo	14
Medio difásico LE	16
Medio de Robinson.....	17
Medio monofásico TYSGM-9.....	19
TYI-S-33.....	20
YI-S	22
LYI-S-2	24
Método para el cultivo de <i>Entamoeba histolytica</i>	24
CAPITULO II	
<i>Giardia intestinalis</i>	32
Generalidades.....	32
Medios de cultivo	33
Medio TPS-1 de Diamond.....	33
Medio TYI-S-33 (modificación de Keister).....	34
Medio YI-S.....	36
Establecimiento de cultivos.....	38
CAPITULO III	
<i>Trichomonas vaginalis</i>	43
Generalidades.....	43
Medio TYM (Modificación de Hollander)	45
TYI-S-33 y YI-S	46
Medio TB1	47
CAPITULO IV	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	49
Generalidades.....	49
Medio NNN (Medio de Novy-MacNeal-Nicolle)	51
Medio 4N para trypanosomas	52
Medio LIT de Yaeger	53
Discusión	57
Conclusiones	61
Referencias bibliograficas	62

Objetivos:

- ✓ Proponer los medios de cultivo para el mantenimiento "*in vitro*" de algunos de los protozoarios parásitos de interés médico.

- ✓ Describir y seleccionar las técnicas más adecuadas para el cultivo de protozoarios parásitos.

- ✓ Proponer la creación de un cepario de parásitos en la facultad de Química que fortalezca la formación de los profesionales de la salud

Introducción

Todas las formas animales y vegetales se originaron y desarrollaron como organismos de vida libre que fueron obligados a competir con otros para su existencia. Sólo aquellos que desarrollaron ajustes y adaptaciones satisfactorios fueron capaces de sobrevivir. En algunas ocasiones, las adaptaciones tan marcadas sugieren que estas interrelaciones han existido durante mucho tiempo. Otros grupos de organismos parece ser que han adquirido más recientemente el tipo de vida parasitaria, y unos cuantos de ellos todavía no se han adaptado a un parasitismo irreversible. Hay otros más que apenas están desarrollando las adaptaciones más tempranas al parasitismo.

La Parasitología es la parte de la Biología que tiene que ver con los fenómenos de dependencia entre dos seres vivosⁱ

Los parásitos son un grupo grande y complejo de microorganismos, entre ellos se incluyen los organismos unicelulares, como los protozoarios que carecen de las vías metabólicas necesarias para la síntesis de componentes que permiten la vida y una reproducción independiente y por lo tanto deben obtener del huésped los nutrientes que necesitan. Los organismos multicelulares (helmintos) de mayor complejidad tienen órganos y tejidos bien definidos. Algunos de estos parásitos son, en efecto, pequeños animales.

El parasitismo representa un tipo de relación entre organismos, en donde el hospedero es dañado por el organismo infeccioso, con beneficio de este último.

Pero existen otros tipos de relaciones hospedero-parásito como por ejemplo; Si el agente infeccioso y el hospedero obtienen un beneficio del encuentro, el proceso se denomina mutualismo. Otro tipo de asociación es el comensalismo en donde uno de los seres vivos funciona como hospedero sin recibir ni perjuicio ni beneficio; mientras que el otro asociado (comensal) se procura casa y sustento del hospedero.

Los agentes infecciosos también establecen numerosos tipos de relaciones a nivel celular con sus hospederos. Los microorganismos de vida libre (algunas bacterias, los hongos y los parásitos) viven en forma extracelular y pueden crecer *in vitro* en ausencia de células. Los microorganismos intracelulares facultativos pueden crecer *in vitro* en ausencia de células; *in vivo* crecen en forma intracelular o extracelular, pero a menudo tienen una relación especial con los macrófagos. Los agentes infecciosos intracelulares estrictos carecen de algunos mecanismos necesarios para una vida extracelular; por eso requieren una célula hospedera que les suministre los elementos requeridosⁱⁱ

Para el estudio, conocimiento y un mejor aprendizaje de los parásitos es necesario favorecer su adaptabilidad a las condiciones de laboratorio, para lograr su multiplicación *in vitro*, en ambientes especiales (medios de cultivo) que proporcionen las condiciones semejantes a las de sus hábitats naturales.

Las técnicas de cultivo constituyen una parte sustancial del estudio actual de los parásitos animales, sobre todo para las diferentes especies de protozoarios.ⁱ Una de las grandes ventajas del cultivo *in vitro*, especialmente el

cultivo axénico, es la obtención de un continuo suministro de organismos libres de contaminación en las cantidades necesarias.

El cultivo *in vitro* de parásitos protozoarios que causan enfermedades en el humano es invaluable, provee no sólo información en el desarrollo del parásito sino también abre caminos para nuevas aproximaciones en la erradicación del mismo.ⁱⁱⁱ

El propósito del cultivo *in vitro* es importante por un gran número de razones:^{i,iii}

- 1) Diagnóstico preciso del parásito, y/o su confirmación con otros métodos, cuando las técnicas habituales no han dado resultado;
- 2) Con fines didácticos, particularmente cuando el material clínico no está disponible;
- 3) Una fuente que facilita la inoculación para animales susceptibles en experimentación;
- 4) Prueba de sensibilidad a fármacos *in vitro*;
- 5) Nos proporciona el material necesario para la investigación de la fisiología, bioquímica y metabolismo de los parásitos,
- 6) Para la producción de vacunas;
- 7) Para entender la organización estructural del parásito;
- 8) Ensayos inmunológicos.

El cultivo *in vitro* de parásitos con propósitos prácticos o de investigación puede ser:

axénico: carente de seres vivos asociados.

Xénico: en el cual el parásito es cultivado en presencia de una flora indefinida.

Monoxénico: en el cual el parásito crece en presencia de una sola especie adicional.

El término polixénico algunas veces es usado erróneamente como sinónimo de xénico, este término debe referirse sólo a los cultivos en los cuáles es conocida la identidad de todas las especies presentes^{iv}.

Todas las formas de vida toman del ambiente las sustancias que requieren para sintetizar su material celular, generar energía y efectuar un funcionamiento adecuado siendo estas sustancias los nutrientes, pero cada forma de vida requiere diferentes nutrientes específicos para su óptimo desarrollo. De este modo se han diseñado múltiples medios de cultivo los cuales están constituidos por los nutrientes necesarios en cantidades apropiadas de acuerdo a los requerimientos específicos para el cultivo de cada microorganismo.

Para favorecer el desarrollo es necesario considerar no sólo el aspecto nutricional, sino también las condiciones ambientales de su micro hábitat, por lo que en el medio de cultivo se debe ajustar el pH, concentración de sales, condiciones tales como: la temperatura, la oxigenación, osmolaridad y luminosidad.

En el diagnóstico clínico, el cultivo de protozoarios parásitos no juega un papel importante, ya que la microscopía óptica sigue siendo la técnica de elección para la identificación de la mayoría de ellos.^{iv}

Aunque no es posible aún el cultivo *in vitro* de todos los parásitos protozoarios, algunos de ellos se pueden aislar y cultivar en un medio de cultivo.

Tabla 1.- Selección de medios y condiciones de cultivo para parásitos protozoarios

Organismo	Medio de cultivo xénico	Medio de cultivo monoxénico	Medio de cultivo axénico
<i>Entamoeba histolytica</i>	LE, Robinson, TYSGM-9	TYI-S-33, YI-S, LYI-S-2	TYI-S-33, YI-S, LYI-S-2
<i>Giardia intestinalis</i>	----	----	TYI-S-33, YI-S
<i>Trichomonas vaginalis</i>	----	----	TYI-S-33, YI-S

---- Métodos de cultivo no recomendados

La importancia del cultivo de protozoarios se relaciona principalmente en la enseñanza e investigación de las especies de dichos organismos. Actualmente, las técnicas de cultivo son utilizadas para el estudio *in vitro* de los parásitos desde diferentes puntos de vista, por lo que la instauración de un espacio dentro de nuestra facultad diseñado para este fin es prioritario.

PROTOZOARIOS INTESTINALES

Para su estudio los protozoarios se pueden agrupar en cuatro grandes grupos basándonos en su medio de locomoción:

1. Sarcodinos
2. Flagelados
3. Ciliados
4. Apicomplexa.

Algunas especies de importancia médica pueden ser cultivadas en el laboratorio. (Tabla 2)

TABLA 2.- Algunos protozoarios parásitos representativos

División	clase	parásitos humanos	Hospedero intermediario	Hospedero definitivo	Fase que se transmite al hombre	Enfermedad
Sarcodina	amebas	<i>Acanthamoeba</i>	_____	Hombre	Trofozoíto	Queratitis
		<i>Entamoeba histolytica</i>	_____	Hombre	Quiste	Disentería amebiana
		<i>Naegleria fowleri</i>	_____	Hombre	Trofozoíto	Microencefalitis
Mastigofora	flagelados	<i>Giardia lamblia</i>	_____	Hombre Intestino delgado	Quiste	Giardiosis
		<i>Trichomonas Vaginalis</i>	_____	Hombre	Trofozoíto	Uretritis, vaginitis
		<i>T.b. gambiense</i> <i>T.b. rhodesiense</i>	_____	Hombre		Tripanosomiasis africana
		<i>Trypanosoma cruzi</i>	triatóminos	Hombre	Tripomastigote metacíclico	Enfermedad de chagas
Ciliados	Ciliados	<i>Balantidium coli</i>	_____	Hombre	Quiste	Disentería balantidial
Esporozoos	Esporozoos	<i>Babesia microti</i>	_____	Hombre		Babesiosis
		<i>Cryptosporidium</i>	_____	Hombre	Ooquiste	Diarrea
		<i>Isospora</i>	_____	Hombre	Ooquistes	Coccidiosis
		<i>Plasmodium</i>	Hombre	mosquito	Esporozoíto	Malaria
		<i>Pneumocystis carinii</i>	_____	Hombre	Se desconoce	Neumonía
		<i>Toxoplasma gondii</i>	Gato	Hombre	Oocistos	Toxoplasmosis

___ No hay hospedero intermediario

TABLA 3.- Helmintos parásitos representativos.

División	clase	parásitos humanos	Hospedero intermediario	Hospedero definitivo	Fase que se transmite al hombre	enfermedad
Platelmintos	trematodos	<i>Fasciola hepatica</i>	Caracoles	Hombre	Metacercaria	Fasciolosis
		<i>paragonimus westermanni</i>	Caracoles y crustáceos de agua dulce	Hombre	Metacercarias en crustáceos	Paragonimiasis (vermes pulmonar)
		<i>Schistosoma</i>	Caracoles de agua dulce	Hombre	Cercarias a través de la piel	Esquistosomiasis
	Cestodos	<i>Taenia solium</i>	Porcino	Hombre	Cisticercos en la carne de cerdo.	Cisticercosis
		<i>Taenia saginata</i>	Vacuno	Hombre; Intestino delgado	Cisticercos en la carne.	Teniasis
		<i>Echinococcus Granulosus</i>	Hombre	Perro y otros animales	Huevos procedentes de animales	hidatidosis
Nematelmintos	Nematodos	<i>Ascaris lumbricoides</i>	—	Hombre	Ingestión de huevos	Ascariasis
		<i>Enterobius vermicularis</i>	—	Hombre	Ingestión de huevos	Enterobiasis
		<i>Necator americanus</i>	—	Hombre	Penetración de larvas a través de la piel	Anquilostomiasis
		<i>Trichinella spiralis</i>	—	Hombre	Ingestión de carne(cerdo)	Triquinosis

CAPITULO I

Entamoeba histolytica

Generalidades

Algunos géneros de amebas pueden habitar el intestino de los seres humanos, por ejemplo: *Entamoeba*, *Blastocystis*, *Iodamoeba* y *Endolimax*. Los miembros de los últimos tres géneros suelen considerarse no patógenos; **Error! Marcador no definido..**

Entamoeba histolytica es un protozooario de la clase *Rhizopoda*, momonuclear, párasito espontaneo exclusivo del hombre y ciertos primates en cautiverio.ⁱ

Entamoeba histolytica se considera patógena para los seres humanos, es el agente causal de la amibiasis y representa una de las tres causas más comunes de muerte de enfermedad parasitaria. Es un parásito patógeno invasivo, clínicamente causa colitis y absceso hepático.ⁱⁱ Presenta dos fases principales en su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste.

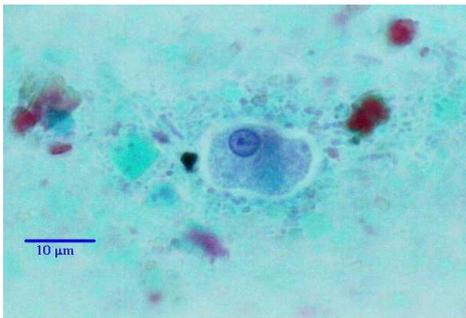


Figura 1. Trofozoito de *Entamoeba histolytica*



Figura 2. Trofozoito de *Entamoeba histolytica* con eritrocitos fagocitados (x 1000)



Figura 3. Quistes de *Entamoeba histolytica*



Figura 4. Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* a partir de cultivo

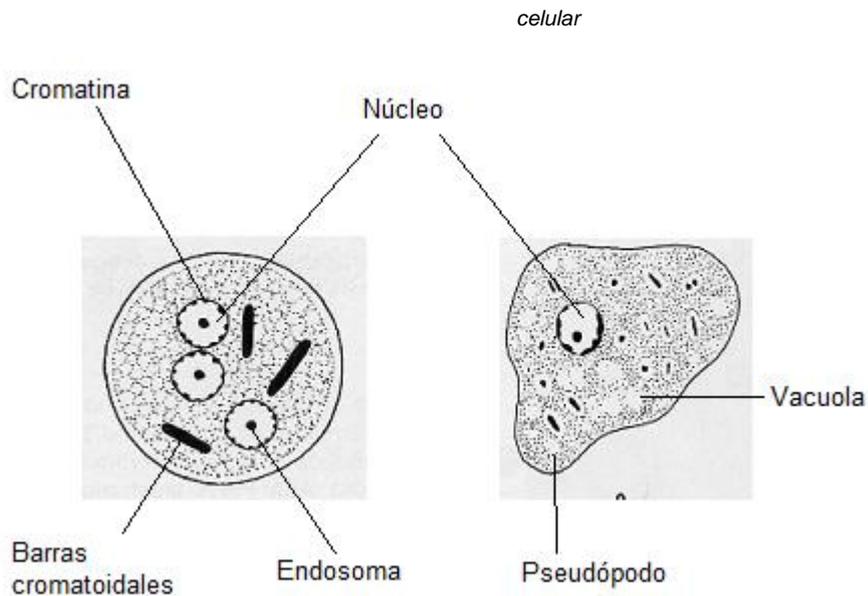


Figura 5. Quiste de *Entamoeba histolytica*

Figura 6. Trofozoito de *Entamoeba histolytica*

Cultivo

Este parásito fue cultivado por primera vez por Boeck y Drbohlav en 1925 en medio bifásico de huevo en tubo inclinado, una modificación de este medio (Locke-egg [LE]) aún es utilizado hoy en día. Dobell y Laidlawⁱⁱⁱ introdujeron el uso del almidón de arroz como fuente de carbohidratos, y forma parte de todos los medios de cultivo xénico.

Los medios monofásicos fueron desarrollados incluyendo el medio de infusión de yema de huevo de Balamuth^{iv}, medio de Jones^v y TYSGM-9 de Diamond^{vi}.

Actualmente los medios de cultivo más utilizados para el cultivo xénico de *Entamoeba histolytica* son el bifásico LE y Robinson y el monofásico TYSGM-9, además estos medios pueden ser utilizados para el cultivo de otras especies de *Entamoeba* y *Endolimax nana*.

Cultivos monoxénicos de *Entamoeba histolytica* en presencia de una especie adicional fueron logrados por Cleveland y Sanders^{vii} en medio difásico, siendo el medio más utilizado para este tipo de cultivo el medio modificado Shaffer-Frye (MS-F)^{viii}. El uso del cultivo monoxénico es limitado.

El cultivo axénico de *Entamoeba histolytica* fue logrado finalmente por Diamond en 1961^{ix}, el medio bifásico utilizado fue complejo y no fue sino hasta que Diamond introdujo el medio monofásico TP-S-1^x que los cultivos axénicos de *E. histolytica* empezaron a ser utilizados por todas partes. El medio TP-S-1 fue sustituido por TYI-S-33^{xi} siendo actualmente este último el medio más utilizado para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*. Más tarde Diamond describió YI-S como una alternativa del TYI-S-33^{xii}.

Los principales componentes del medio de cultivo axénico de *Entamoeba histolytica* son: tripticasa o peptona digerida de caseína que son una fuente de péptidos y aminoácidos, ácidos nucleídos (extracto de levadura), carbohidratos (glucosa), lípidos (suero) y vitaminas. La mayoría de estos componentes también son parte de medios de cultivo axénico para otros parásitos;**Error!**
Marcador no definido..

MEDIO DE CULTIVO XÉNICO

Aislamiento de *Entamoeba histolytica* de materia fecal en

Medio difásico LE

Fórmula cuantitativa

Solución de Locke:

Disolver los siguientes reactivos en un litro de agua destilada

8.0g de cloruro de sodio

0.2g de cloruro de calcio

0.2g de cloruro de potasio

0.01g de cloruro de magnesio

2.0g de fosfato de sodio dibásico

0.4g de bicarbonato de sodio

0.3g de fosfato de potasio monobásico

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 C° y 15 lb/in². Enfriar a temperatura ambiente, si hay precipitado remover por filtración en papel Whatman n° 1 y volver a esterilizar en autoclave.

Para preparar la fase sólida con huevo esterilizar el cascarón de huevos frescos de gallina mediante flameado con etanol al 70%, romperlo y dejar caer en una probeta graduada de 100 ml. Agregar 12.5 ml de solución de Locke por cada 45 ml de huevo, se emulsifica en la licuadora y filtrar a través de una gasa utilizando vacío para eliminar las burbujas de aire. Agregar cantidades de 5 ml de huevo emulsificado en tubos de cultivo de 16 x 125mm con tapón de rosca

aflojado, y se esterilizan a 100°C por 10 minutos en autoclave, colocando los tubos en un ángulo que produzca de 12 a 15mm de huevo en el fondo.

el medio inclinado resultante debe de quedar libre de burbujas, enfriar a temperatura ambiente y el huevo solidificado cubrirlo con 6 ml de solución de Locke, esterilizar a 121 °C durante 15 minutos a una presión de 15lb/in².

Después de enfriar los medios inclinados a temperatura ambiente, apretar las tapas y se pueden refrigerar hasta 6 meses.

Medio de Robinson

Este medio es un medio complejo, sin embargo la bibliografía menciona su uso frecuente para el aislamiento de cultivos de amebas entéricas.

Fórmula cuantitativa

Para llevar a cabo su preparación, preparar las siguientes seis soluciones stock.

- (1) Eritromicina 0.5 %: preparar 0.5 % de eritromicina en agua destilada y esterilizar por filtración. Refrigerar.
- (2) Bacto peptona 20 %: preparar una disolución de 20 g/100 ml. Esterilizar y refrigerar.
- (3) Solución stock de biftalato 10X: para preparar la solución stock, mezclar 102 g de biftalato de potasio hidrogenado y 50 ml de hidróxido de sodio y llevarlo a 1 litro a pH de 6.3, esterilizar por 15 minutos a 121 °C a una presión de 15 lb/in². Almacenar a temperatura ambiente. Diluir 1:10 con agua estéril antes de su uso.

(4) medio stock 10X R: disolver los siguientes componentes en agua destilada:

25 g de cloruro de sodio

10 g de ácido cítrico

25 g de fosfato de potasio monobásico

5 g de sulfato de amonio

0.25 g de sulfato de magnesio heptahidratado

20 ml de solución de ácido láctico al 85 %.

Llevarlo a 500 ml, diluir la solución 1:10 ajustando a pH de 7 y esterilizar durante 15 min a 121°C a una presión de 15lb/in² en porciones de 20 ml.

(5) medio BR: inocular 1X medio R con una cepa estándar de *E. coli*, incubar a 37°C durante 48 horas y almacenar a temperatura ambiente. (Puede ser almacenado por varios meses)

(6) Medio BRS: agregar un volumen igual de suero bovino inactivado por calentamiento al medio BR e incubar a 37°C por 24 horas, almacenar a temperatura ambiente. (Puede ser almacenado por varios meses).

Para preparar el agar inclinado, esterilizar una solución de agar noble al 1.5 % en cloruro de sodio 0.7 % con agua destilada durante 15 minutos a 121°C a una presión de 15lb/in². Dispensar en cantidades de 5 ml en tubos, volver a esterilizar e inclinarlos hasta enfriar y solidificar. Almacenar a temperatura ambiente o refrigerar.

Para cada tubo agregar lo siguiente:

3 ml de biftalato-Bacto peptona

1 ml de medio RBS

50 µl de eritromicina.

Esto debe de realizarse el mismo día de la inoculación.

La solución que cubre el medio de Robinson también puede ser utilizada como medio de crecimiento monofásico.

Medio monofásico TYSGM-9

Fórmula cuantitativa

Para preparar TYSGM-9 disolver lo siguiente:

2.8g de fosfato de potasio dibásico

0.4g de fosfato de potasio monobásico

7.5g de cloruro de sodio

2.0g de peptona digerida de caseína

1.0g de extracto de levadura

Llevar hasta 950 ml con agua destilada, dispensar en cantidades de 95 ml y agregar 0.2 g de mucina gástrica porcina en cada botella.

Esterilizar a 121 C° durante 15 minutos a una presión de 15lb y refrigerar.

Antes de utilizar agregar 0.1 ml de una solución stock al 5% de tween 80 y 5 ml de suero bovino adulto inactivado por calor. Colocar cantidades de 8 ml en los tubos de cultivo.

MEDIO DE CULTIVO AXENICO

TYI-S-33

BASE TYI

Fórmula cuantitativa

Para la preparación de este medio disolver lo siguiente en este orden en 600 ml de agua destilada:

1.0g de fosfato de potasio dibásico

0.6 g de fosfato de potasio monobásico

2.0 g de cloruro de sodio

20 g de peptona digerida de caseína

10 g de extracto de levadura

10 g de glucosa

1.0g de cloruro de L- cisteína

0.2g de ácido ascórbico

1 ml de citrato de amonio férrico, forma café (22.8 mg/ml)

Llevar a un volumen final de 880 ml y ajuste a pH de 6.8 utilizando una solución de hidróxido de sodio 1 N. Colocar cantidades de 88 ml en matraces y esterilizar durante 15 minutos a 121°C a una presión de 15 lb/in². La base **TYI** puede ser almacenada a -20°C por varios meses.

Mezcla 18 de Vitaminas

Paso 1

Preparar las cuatro siguientes soluciones y después combinarlas

- i) Disolver 45 mg de niacinamida, 4 mg de cloruro de piridoxal, 23 mg de pantotenato de calcio, 5 mg de cloruro de tiamina y 1.2 mg de vitamina B12 en un volumen final de 25 ml de agua.
- ii) Disolver 7 mg de riboflavina en agua utilizando una cantidad mínima de hidróxido de sodio 0.1 N llevar a un volumen final de 45 ml.
- iii) Disolver 5.5 mg de ácido fólico en agua utilizando una cantidad mínima de hidróxido de sodio 0.1 N llevando a un volumen final de 45 ml.
- iv) Disolver 2 mg de D-biotina en agua y llevar a un volumen de de 45 ml.

Si la solución combinada es nubosa, eso indica que el pH es alto debido a la gran cantidad de hidróxido de sodio utilizado en la preparación de las soluciones i y ii y la mezcla debe ser desechada.

Paso 2

Disolver 1 mg de D-L-6-8- ácido tioctico (en su forma oxidada) en 5 ml de etanol al 95 %. Agregar 500 mg de tween 80 y llevar a un volumen de 30 ml con agua.

Combinar las soluciones del paso 1 y 2 llevándolas a un volumen final de 200 ml con agua destilada y esterilizar por filtración a través de un filtro con poro de 0.22 μm . se puede almacenar en cantidades de 100 ml a 4 °C por más de 6 meses. La mezcla es sensible a la luz.

Para completar el medio TYI-S-33 para su uso como cultivo axénico agregar 2.0 ml de la mezcla 18 de vitaminas y de 10 a 15 ml de suero bovino adulto

inactivado por cada 88 ml de caldo TYI. Utilizar el medio dentro de las siguientes 96 hrs.

NOTA. El suero bovino fetal no es recomendable ya que la fetuina es toxica para los parásitos.

Colocar dentro de tubos de cultivo de borosilicato.

YI-S^{xii}

Fue desarrollado como una alternativa de TYI-S-33 debido a las dificultades para obtener mucha peptona digerida de caseína que pudieran apoyar el adecuado crecimiento de *Entamoeba histolytica*. En este caso la peptona es reemplazada por extracto de levadura. El desarrollo de este medio tuvo un inesperado beneficio, el primer aislamiento de Entamoeba dispar pudo ser obtenida en condiciones axénicas cuando creció sólo en YI-S y no creció en TYI-S-33; **Error! Marcador no definido..**

El medio YI-S consiste de caldo nutritivo, YI, una mezcla de vitamina y suero bovino.

Caldo YI. Disolver los siguientes ingredientes en 600 ml de agua destilada y llevar a un volumen final de 880 ml.

Fórmula Cuantitativa

1.0g de fosfato de potasio dibasico

0.6 g de fosfato de potasio monobásico

1.0 g de cloruro de sodio

30.0 g de extracto de levadura (BBL)

10.0 g de glucosa

1.0 g de cloruro de L- cisteína (sigma)

0.2 g de ácido ascórbico (sigma)

22.8 mg de citrato de amonio férrico en su forma café

Ajustar el pH a 6.8 con NaOH 1N, osmolaridad de 380 miliosmol/Kg (ajustar por incremento y disminución de cloruro de sodio).

Esterilizar en autoclave en unidades de 88 ml durante 15 minutos a 121° C, 15 lb. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

Puede ser almacenado hasta por seis meses.

Mezcla 18 de Vitaminas

Solución 1. a) Disolver 45 mg de niacinamida, 4 mg de cloruro de piridoxal, 23 mg de pantotenato de calcio, 5 mg de cloruro de tiamina y 1.2 mg de vitamina B12 en un volumen final de 25 ml de agua.

b) Disolver 7 mg de riboflavina en agua utilizando una cantidad mínima de hidróxido de sodio 0.1 N llevar a un volumen final de 45 ml.

c) Disolver 5.5 mg de ácido fólico en agua utilizando una cantidad mínima de hidróxido de sodio 0.1 N llevando a un volumen final de 45 ml.

d) Disolver 2 mg de D-biotina en agua y llevar a un volumen de de 45 ml.

Combinar la solución a en d, b y c son solubilizadas utilizando cantidades mínimas de NaOH 0.1N. La nubosidad en la solución final indica el uso excesivo de NaOH.

Solución 2. Disolver 1 mg de D-L-6-8- ácido tioctico (en su forma oxidada) en 5 ml de etanol al 95 %. Agregar 500 mg de tween 80 y llevar a un volumen de 20 ml con agua.

Combinar la solución 1 y 2 y llevar a un volumen final de 200 ml con agua destilada, esterilizar por filtración a través de un filtro con poro de 0.22 µm.

La mezcla es sensible a la luz, almacenar a 4°C en la oscuridad hasta por seis meses.

Medio completo

Para una unidad del medio, agregar asépticamente 88 ml de caldo YI, 2 ml de mezcla 18 de vitaminas y 10 ml de suero bovino, osmolaridad final de 360 miliosmol/Kg, almacenar en la oscuridad a 4° C y usar dentro de las 96 horas siguientes.

Colocar en tubos de borosilicato para iniciar el cultivo.

LYI-S-2

Contiene hígado digerido, extracto de levadura, hierro y suero. Se encontró un resultado de crecimiento igual que en el medio de TYI-S-33.

Este medio es recomendado cuando de antemano se espera un crecimiento pobre de *Entamoeba histolytica*.

Método para el cultivo de *Entamoeba histolytica*

Para iniciar un cultivo de *Entamoeba histolytica* y otras amebas intestinales se requieren heces frescas no contaminadas con orina. Pueden emplearse heces formadas que contengan quistes o muestras líquidas con trofozoítos vivos; **Error! Marcador no definido..**

Las heces son la fuente más común de material a utilizar, y en raras ocasiones especímenes de biopsias rectales o aspirados de abscesos hepáticos son utilizados.

Uno de los problemas que se tiene en el cultivo xénico es la probabilidad de crecimiento de organismos indeseables siendo el más frecuente *Blastocystis hominis*, este organismo es a menudo encontrado en cantidades abundantes en todos los medios utilizados para el cultivo xénico de *Entamoeba histolytica*.

Hay dos métodos para la eliminación de *Blastocystis hominis* de los cultivos, en el primer método los quistes son tratados con HCl 0.1 N a temperatura ambiente durante 10 minutos, se lavan completamente con agua destilada y se reinoculan dentro del medio de cultivo. El ácido mata a las bacterias, algunos hongos, *Blastocystis hominis*, *Trichomonas hominis* y algunas amebas no enquistadas, quedando los quistes viables e intactos.

El segundo método es el de Smedley y es utilizado cuando *Blastocystis hominis* aparece en los cultivos después de la inoculación. Sin embargo este método tendría que ser repetido varias veces antes de que *Blastocystis hominis* sea eliminado.

Los cultivos son centrifugados y el concentrado que contiene una mezcla de todos los organismos presentes, es resuspendido en agua destilada a temperatura ambiente por 15 minutos. El material es entonces centrifugado nuevamente e inoculado dentro de un medio de cultivo fresco, a menudo las células o quistes de *Blastocystis hominis* pueden sobrevivir e iniciar su crecimiento por lo cual el procedimiento necesita ser repetido. La ventaja de este método es la simplicidad.

Otros microorganismos indeseables tales como hongos usualmente desaparecen de los cultivos xénicos después de varios pases, por lo que no es necesario hacer maniobra alguna.

Aislamiento

El medio LE ha demostrado ser el mejor medio para el aislamiento primario de las especies de Entamoeba; **Error! Marcador no definido.**, el TYSGM-9 también

puede ser utilizado para el aislamiento, pero su utilidad primaria es el de generar grandes cantidades de amebas de cultivos establecidos.

En todos los casos el almidón de arroz es agregado al medio antes de la inoculación así como los antibióticos necesarios.

Inoculación de los medios:

Las muestras de heces se suspenden en solución salina y se filtran a través de una gasa para eliminar partículas gruesas antes de la inoculación del medio; sin embargo puede añadirse directamente al medio una cantidad de heces del tamaño de un chícharo. Es bueno incluir porciones de heces con sangre y moco.

La penicilina, estreptomycin y eritromicina son los antibióticos de elección, ya que parecen tener un pequeño efecto directo en la ameba.

Los tubos de cultivo conteniendo el medio e inoculados con las heces, se incuban verticalmente a 35.5 C° durante 48 horas y se examinan.

Puede extraerse una gota del sedimento del tubo de cultivo y se examina al microscopio. Alternativamente los tubos de cultivo se pueden examinar en un microscopio invertido, las amebas se observan adheridas a la pared del tubo. Si no hay crecimiento a las 48 horas se hace una resiembra, la mayor parte del líquido se descarta y se deja menos de 1 ml en el tubo, el sedimento se resuspende en el poco líquido que quedó y se transfiere a un tubo con medio nuevo, se incuba por 48 horas y se vuelve a examinar y si a este plazo no se observan se da por negativo.

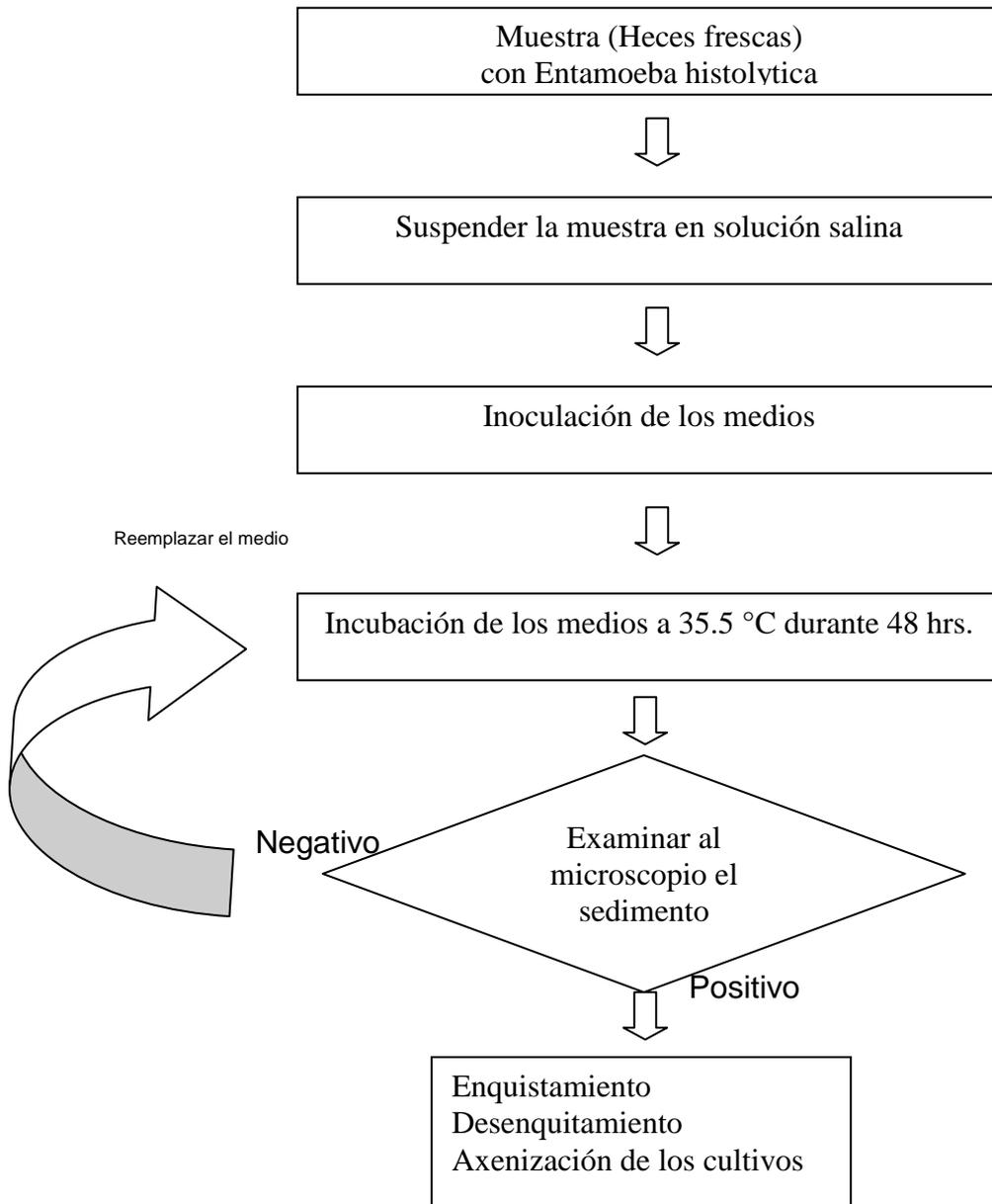
Si los cultivos son positivos y se observan amebas el cultivo es dividido en otros tubos; con los cuales se puede trabajar para la realización de otro tipo de pruebas ya sea para la fase de enquistamiento, desenquistamiento, etc.

Axenización

Este procedimiento es largo y laborioso ya que involucra la adaptación gradual del parásito a un nuevo estilo de vida.

El primer paso puede ser el crecimiento del organismo en cultivo monoxénico y así lograr por medio de lavados del cultivo xénico en PBS para remover la mayoría de bacterias posibles y colocar los trofozoítos en un medio rico con un nuevo organismo y antibióticos. El medio puede ser un medio de cultivo monoxénico especializado o puede utilizarse un medio de cultivo axénico tal como TYI-S-33.

Diagrama general de las fases para el establecimiento de un cultivo



En algunas ocasiones se ha logrado obtener directamente el cultivo axenico a partir del cultivo xenico, por lo que puede ser considerada como otra alternativa de axenización.

Los antibióticos utilizados varían en tipo y cantidades dependiendo de la sensibilidad de la flora con la cual la ameba crecerá.

La concentración inicial a menudo es alta, después de 24 horas las células son concentradas por centrifugación y el medio es reemplazado. El número de células incrementa y éstas pueden ser divididas en 2 tubos. Por reducción gradual de la concentración de antibióticos en uno de los 2 de tubos de prueba para el crecimiento bacteriano, la axenización puede ser alcanzada gradualmente al mismo tiempo el número de amebas incrementa.

Dos últimos subcultivos en ausencia de antibióticos pueden ser realizados antes de considerar los cultivos libres de bacterias.

Inducción del enquistamiento de *Entamoeba histolytica*

La inducción del enquistamiento puede ser realizada por tres razones:

- si al obtener el aislamiento primario, los trofozoítos son escasos,
- para la eliminación de organismos indeseables (axenización)
- y para la obtención de quistes *in vitro*.

Hay tres cosas de especial preocupación en la obtención de quistes: el medio, la flora bacteriana y el almidón de arroz.

El medio LE es uno de los medios con el cual se obtiene excelentes resultados.

La flora bacteriana presente en el cultivo xénico juega un papel importante en el proceso de enquistamiento.

Protocolo de enquistamiento

En medio de cultivo LE

Día 1

Iniciar el proceso con tres cultivos de 48 horas ricos en amebas. Cosecharlos por enfriamiento de los tubos de cultivo en un baño de agua helada durante 5 minutos, invertir los tubos 10 veces para mezclar el contenido y liberar las amebas adheridas a las paredes y centrifugar por 3 minutos. Remover y decantar dejando 1 ml, resuspender el concentrado de amebas, juntar, y transferir en cantidades iguales en seis tubos de medio LE sin arroz. Incubar en posición vertical durante 72 horas.

Día 4

Cosechar los seis tubos: enfriar, remover y decantar dejando aproximadamente 1 ml y mezclar el tubo de cada cultivo y transferir en cantidades iguales en dos tubos de medio LE sin arroz. Habrá 12 tubos, incubar durante 48 horas.

Día 6

Cultivar los 12 cultivos y subcultivarlos como en el día 4, incubar los 24 tubos durante 48 horas.

Día 8

Cuidadosamente remover el remanente de cada cultivo, dejando sólo lo suficiente que cubra el sedimento en la interfase del huevo

Colectar los sedimentos de los tres cultivos y transferir a un tubo con medio en el cual es agregado arroz. Repetir con los cultivos restantes, Incubar los ocho cultivos resultantes por 48 horas.

Día 10

Remover una pequeña gota de sedimento de cada cultivo, teñir con solución de lugol y registrar la presencia de quistes cuadrinucleados. Si son encontrados, cosechar como en el día 1. Remover el sobrenadante dejando sólo el sedimento. Juntar los sedimentos y lavar dos veces con agua destilada. Los quistes quedarán viables de 10 a 14 días almacenados a 4°C. Si los quistes no son encontrados incubar durante 24 horas más.

Desenquistamiento inducido in vitro

Inducir el desenquistamiento de *Entamoeba histolytica* es un paso relativamente fácil comparado con la obtención de quistes, la inducción de este se utiliza como prueba de viabilidad.

Si el objetivo es propagar la ameba en ambiente xénico, el medio utilizado es el medio en el cual la amiba fue inducida, en este caso es el medio LE. Si el objetivo es desenquistarla en un ambiente libre de bacterias algunos de los medios monofásicos líquidos ideados para cultivo axénico puede ser utilizado.

Para inducir el desenquistamiento, los quistes son primero tratados para remover organismos indeseables como se recomendó anteriormente.

Entamoeba histolytica crece generalmente en cultivo con otros organismos, usualmente con un complejo indefinido de flora bacteriana y muy pocas veces lo hace de manera axénica.

Para el mantenimiento de los cultivos, estos son resembrados en intervalos de 48 a 72 horas.

CAPITULO II

Giardia intestinalis

Generalidades

La giardiosis es una infección común que se presenta en el intestino delgado de los humanos, particularmente en los niños, el agente causal es el parásito protozoario *Giardia intestinalis* (sin. *Giardia lamblia* y *Giardia duodenalis*). El curso clínico puede variar de infecciones asintomáticas, diarrea aguda o crónica la cual puede ser asociada con malabsorción^{i,ii,iii} *Giardia* es un protozoario flagelado perteneciente al orden *Diplomonadida* que parasita el tracto digestivo de humanos y otros mamíferos, presenta dos fases en la naturaleza; el trofozoito y el quiste.



Figura 7. Trofozoito de *Giardia intestinalis*



Figura 8. Esquema de Trofozoito de *Giardia intestinalis*



Figura 9. Quiste de *Giardia intestinalis*



Figura 10. Esquema de un Quiste de *Giardia intestinalis*

Los trofozoítos pueden colonizar el intestino delgado por semanas o años unidos al epitelio intestinal, sin embargo; una vez que ellos entran al compartimento luminal en donde son expuestos al pH alcalino, elevadas concentraciones de bilis y productos lipolíticos, por todo esto tienden a enquistarse para salir del hospedero^{iv}.

El cultivo xenico y monoxénico no es requerido para su aislamiento.

Karapetyan, en 1960, mantuvo por primera vez *Giardia intestinalis* en cultivo en asociación con una levadura (*Candida guilliermondii*);**Error! Marcador no definido.**, más tarde reportó el cultivo monoxénico de aislados de conejo en asociación con *Saccharomyces cerevisiae*. En 1970, Meyer informó acerca del cultivo axénico de *Giardia*^{v,vi}, Visvesvara^{vii} encontró que *Giardia intestinalis* crecía abundantemente en el medio TP-S-1 medio para Entamoeba el cual fue esterilizado por filtración en lugar de esterilizar en autoclave.

El medio TP-S-1 fue sustituido por el medio TYI-S-33, en el cual la cantidad de cisteína fue duplicada y se le agregó bilis bovina.;**Error! Marcador no definido.**^{viii} Este medio es el más utilizado actualmente para el cultivo de *Giardia intestinalis*, aunque también puede crecer en el medio YI-S;**Error! Marcador no definido.**, con modificaciones similares.

Medios de cultivo

Medio TPS-1 de Diamond

El cual consiste en un pool de suero bovino al 10 %, inactivado a 56 °C durante 30 minutos, caldo TP esterilizado por filtración y medio NCTC-109 (25/1000ml).

Medio TYI-S-33 (modificación de Keister)^{viii}

Se prepara el caldo TYI exactamente como el de *E. histolytica* con los siguientes cambios: incrementar la cantidad de cloruro de L- cisteína a 2.0g/litro, agregar 500 mg de bilis bovina deshidratada por litro y ajustar el pH a 7.0.

Fórmula cuantitativa

Se disuelven los reactivos en el orden descrito a continuación:

600ml de agua desionizada o destilada

1.0g de fosfato de potasio dibásico

0.6 g de fosfato de potasio monobásico

2.0 g de cloruro de sodio

20.0 g de peptona digerido de caseína

10.0 g de extracto de levadura

10.0 g de glucosa

2.0 g de cloruro de L- cisteína

0.2 g de ácido ascórbico

1.0 ml de citrato de amonio férrico, forma café (22.8 mg/ml)

Añada 500 mg de bilis bovina deshidratada por litro.

Lleve a un volumen final de 880 ml y ajuste a pH de 7.0 usando una solución de hidróxido de sodio 1N.

Esterilice por filtración a través de un filtro con poro de 0.22 µm, no se esteriliza en autoclave y se reparte en cantidades de 13 ml en tubos de 16 X 150 mm.

El medio estéril TYI- base puede ser almacenado a -20 °C durante varios meses.

Aunque los cultivos pueden ser iniciados con trofozoítos obtenidos de biopsias duodenales, es mucho más común ser iniciados con quistes colectados de heces.

En primer lugar se procede a la purificación de los quistes de las heces.

Las muestras de heces son diluidas 1:12 (vol/vol) en agua destilada, se toman 20 ml y se colocan en un vaso con perlas de vidrio, homogenizando en un vortex por 5 minutos, filtrando después a través de una malla de nylon estéril.

En un recipiente con hielo se colocan 5 ml del filtrado en un tubo de centrifuga de 50 ml conteniendo 10 ml de sacarosa 1M, Centrifugar a 450xg por 5 minutos, separar el sobrenadante con una pipeta diluir a 50 ml con agua y centrifugar a 450 durante 5 minutos, decantar y descartar el líquido, se resuspende el sedimento en un tubo de centrifuga de 15 ml conteniendo 2.5 ml de agua destilada colocado sobre hielo, y coloque en la superficie con mucho cuidado una capa de 10 ml de sacarosa 0.5 M centrifugar durante 5 minutos a 450 x g. Con una pipeta pasteur separe 1 ml del líquido del fondo y colocar en un tubo de centrifuga de 15 ml limpio. Examinar este material para comprobar la presencia de quistes de Giardia. Diluir en 10 ml con agua destilada y centrifugar a 450 x g durante 5 minutos, decantar y eliminar el sobrenadante. Resuspender el sedimento y utilizar para inocular los medios de cultivo.

Los cultivos son iniciados en tubos de cultivo conteniendo 13 ml de medio TYI-S-33, el cual debe contener antibióticos y antimicóticos.

Una combinación adecuada incluye lo siguiente, por mililitro: 1µg de anfotericina B (solución patrón 1mg/ml), 1 mg de moxolactamo (solución patrón 300 mg/ml), 1 mg de ticarcilina (solución patrón 400 mg/ml), 40µg de gentamicina (solución patrón 40 mg/ml) y 200 U de penicilina (solución patrón 100,000 U/ml).

Los tubos de cultivo son incubados verticalmente a 35.5°C y examinados en un microscopio invertido diariamente. El medio debe ser decantado y reemplazado con medio fresco y antibióticos diariamente durante la primera semana y cada tercer día las siguientes dos semanas. Si no se observan trofozoítos a este tiempo el cultivo es considerado negativo. La mayoría de los trofozoítos se adhieren a la pared de vidrio.

Medio YI-S

Se requiere de la modificación en el caldo base YI y se realiza de la misma manera que en el medio TYI-S-33

Incrementar la cantidad de cloruro de L- cisteína a 2.0g/litro, agregar 500 mg de bilis bovina deshidratada por litro y ajustar el pH a 7.0. Esterilizar por filtración (tamaño de poro de 22 µm).

El medio es completado por la adición de 2 ml de la Mezcla 18 de Vitaminas y 10 ml de suero bovino a 88 ml del caldo modificado.

“String Test” (Cápsula de Beal)

Mostró ser un método de diagnóstico confiable para la detección de *Giardia intestinalis* obtenida de fluido intestinal. Se describe como una técnica simple, no invasiva y que rutinariamente permite el cultivo axénico exitoso de *Giardia intestinalis*.^{ix}

Para el aislamiento de *Giardia intestinalis* fue utilizado el medio TYI-S-33 con la adición de sales biliares y antibióticos.

Una capsula de gelatina unida a una tira de nylon de 90 a 140 cm de largo, es tragada por el paciente y permanece por cuatro horas o durante toda la noche, posteriormente la tira es recuperada, y el contenido se coloca en una caja petri, se le agrega medio de cultivo (2 ml), el cual es aspirado inmediatamente con una jeringa y es colocado en 2 tubos de borosilicato los cuales contienen 12.5 ml de medio precalentado a 37 °C. Los tubos son incubados y mantenidos verticalmente a 37 ° C, son examinados periódicamente con un microscopio invertido.

En días alternos, el medio es aspirado de los tubos y es reemplazado con medio fresco precalentado.

Las capsulas son económicas y pueden ser manipuladas fácilmente, además el cultivo se inicia con trofozoítos obtenidos directamente de muestra duodenal sin tener que llevar a cabo una axenización.

Aislamiento y axenización ⁱⁱⁱ

El procedimiento de **aislamiento** involucra:

- Concentración y purificación de los quistes a través de la centrifugación en gradientes de sacarosa.
- Inducción del desenquistamiento en solución ácida.
- Cultivo en medio TYI-S-33 modificado
- Axenización de aislados utilizando ceftriaxona y anfotericina B.

Muestras de heces que contienen quistes de *Giardia intestinalis* son procesadas para el aislamiento de quistes.

Establecimiento de cultivos

Todos los quistes de *Giardia* de heces frescas son purificados y concentrados utilizando un gradiente de sacarosa 0.85M.

El sedimento resultante es resuspendido en buffer de fosfato salino a pH 7.0, conteniendo 200 µg/ml de ceftriaxona, 10 µg/ml de anfotericina B y es almacenado a temperatura ambiente de 1-5 días.

Método de desenquistamiento

1ml de la preparación de quistes purificados se diluyen en 9 ml de solución de ácido clorhídrico a pH de 0.5 e incubada a 37 °C con agitación constante durante 15 min.

Se centrifuga por 5 minutos a 250 X g, el sedimento es resuspendido en PBS y centrifugado nuevamente por 5 min.

Los quistes son inoculados inmediatamente en tubos con tapón de rosca que contienen 16 ml de medio TYI-S-33 modificado (Keister)^{viii} con 10% de suero de ternera, ceftriaxona 100µg/ml y anfotericina B 1 µg/ml. Se almacenan a 37 °C y se observan cada 24 horas con microscopio invertido.

Cuando aparecen trofozoítos adheridos a las paredes de los tubos, el medio es decantado y reemplazado cada 2-5 días hasta que se forma una monocapa de trofozoítos.

Después de 4-5 subcultivos los antibióticos son interrumpidos y pueden ser realizadas las pruebas microbiológicas para confirmar la obtención de un cultivo axénico.

Los cultivos pueden ser preservados en nitrógeno líquido después de la adición de 10% de dimetilsulfóxido.

Método para la obtención de gran cantidad de quistes in vitro de *Giardia intestinalis*

Cultivo de Trofozoítos

Cepas de trofozoítos de *Giardia intestinalis* son mantenidos en medio de cultivo axénico TYI-S-33 que contiene 10% de suero bovino, 0.5 mg/ml de bilis bovina grado bacteriológico, 100 u/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomicina y ajustar a pH de 7.1.

Los cultivos se colocan en tubos de borosilicato a 37°C de 66-72 horas.

Enquistamiento in vitro

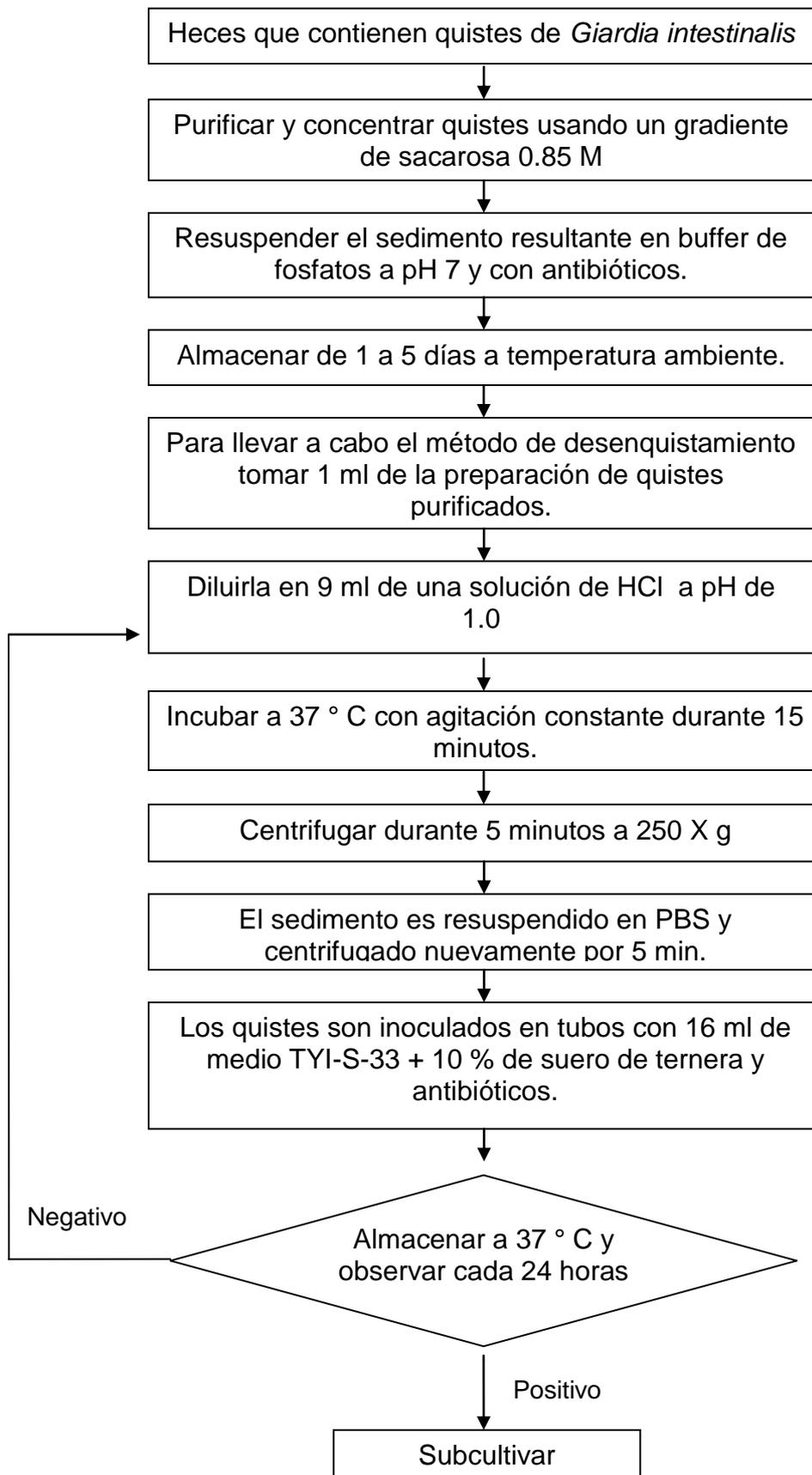
Después del crecimiento de trofozoítos, los tubos son invertidos varias veces y el medio de crecimiento junto con los trofozoítos no adheridos se desecha. Los tubos se llenan con medio de enquistamiento el cual consiste en medio de crecimiento ajustado a pH de 7.8, conteniendo 10mg/ml de bilis bovina de grado bacteriológico. Los tubos se regresan a incubación de 37 °C.

Los trofozoítos son incubados en medio de enquistamiento hasta su cosecha (96 hrs), después de este tiempo los cultivos son enfriados después de 24 hrs.

El medio de enquistamiento se centrifuga a 500 g x 10 min y el botón resultante es resuspendido en medio de crecimiento e incubado a 37°C hasta su cosecha.

Los trofozoítos son cosechados por enfriamiento de los tubos, se continúa con una centrifugación a 500g por 10 min, los parásitos se lavan dos veces en fosfato de sodio 20 mM, pH de 7.1, conteniendo cloruro de sodio 150 mM y se realiza un conteo con un hemocitometro. Para la obtención de quistes puros, los trofozoítos son removidos con lisis hipotónica en agua destilada de 1-24 hrs. A 4°C, seguido de un lavado sucesivo con agua destilada para eliminar los restos. Los quistes resistentes a la lisis hipotónica deben de ser contados.

AISLAMIENTO Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS *Giardia*



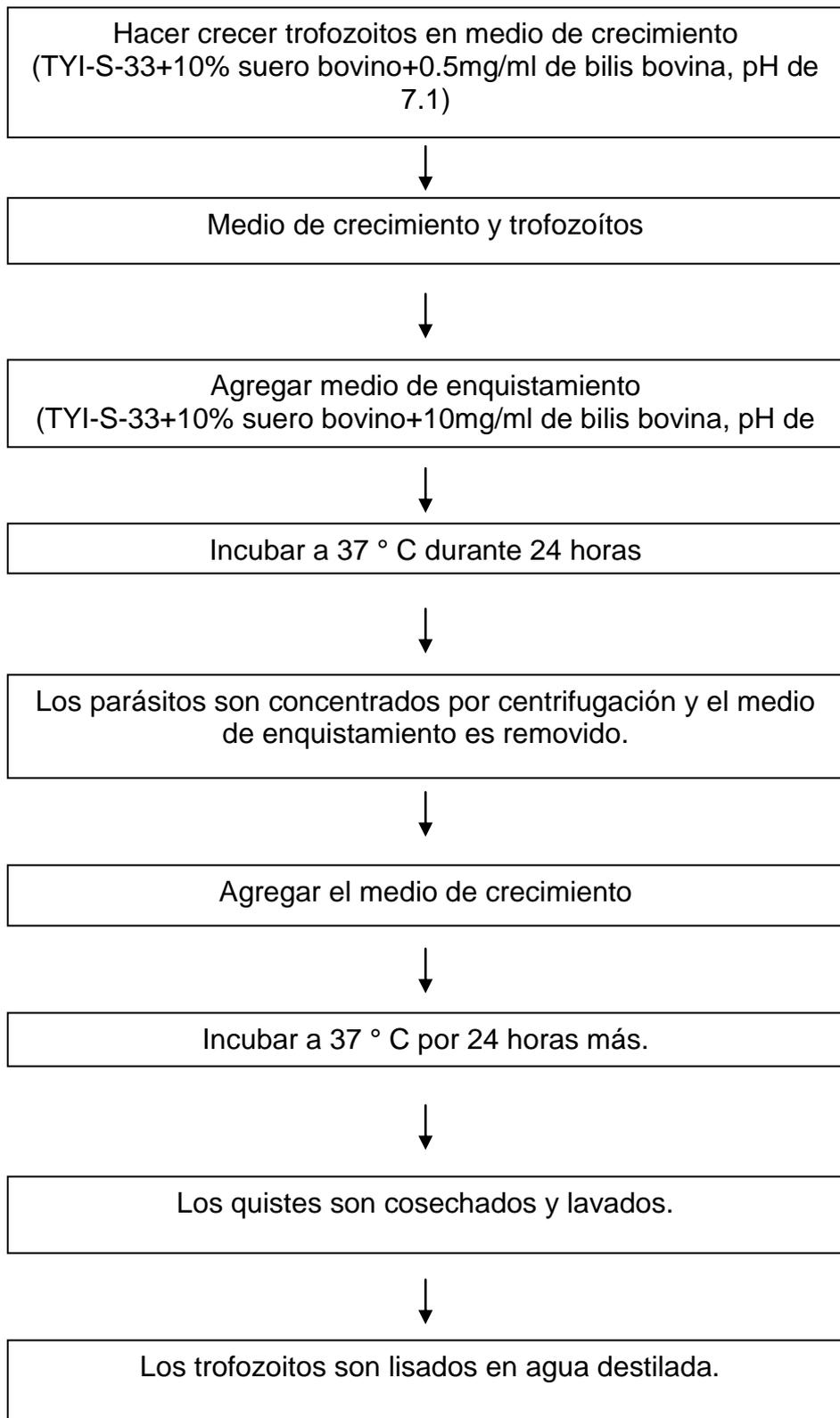
Desenquistamiento

Tubos de cultivo que contienen 6 ml de medio de desenquistamiento (cisteína HCl 12 mM/ácido ascórbico en solución salina de Hanks que contiene 1500 U de pepsina / ml) son inoculados con 4×10^5 - 1×10^6 quistes producidos in vitro, se incuban a 37°C por 30 min. Se neutralizan por la adición de 1.0 ml de NaHCO_3 1N y se centrifuga a 1000 g X 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante es aspirado y los tubos son llenados con medio de crecimiento fresco, e incubados a 37 ° C.

Una variación de este método consiste en: los quistes son expuestos a una solución de ácido ascórbico/cisteína (con o sin pepsina) subsecuentemente son incubados a 37°C por 30 minutos con 1mg/ml de α -crimotripsina I-S en solución Tyrode a pH de 8.0, el medio de enquistamiento es reemplazado con medio de crecimiento y los tubos son incubados a 37°C y examinados periódicamente para observar la presencia de trofozoítos.

El estudio en el proceso de enquistamiento y desenquistamiento es esencial no solo desde el punto de vista de determinar el desarrollo biológico del parásito

Protocolo para la obtención *in vitro* de quistes viables



CAPITULO III

Trichomonas vaginalis

Generalidades

La tricomoniasis es una enfermedad parasitaria transmitida sexualmente, siendo el agente causal *Trichomonas vaginalis*, afectando a hombres y mujeres, las infecciones en la mujer causa vaginitis, cervicitis y uretritis; en los hombres causa uretritis y prostatitisⁱ. Esta enfermedad es usualmente diagnosticada en pacientes sintomáticos o asintomáticos por identificación microscópica de organismos móviles de exudados vaginalesⁱⁱ y uretrales.

Trichomonas vaginalis es un protozoo flagelado, móvil, parásito del ser humano cuya posición taxonómica se basa en la clasificación de Dyer; perteneciendo al Phylum Zoomastigina, Clase parabasalia, orden Trichomonadida, familia Trichomonadidae, género *Trichomonas*, especie *Trichomonas vaginalis* (Donné,1836).

El ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis* es simple, no tiene reservorios ni variantes quísticas; sólo existe en forma de trofozoíto.



Figura 11. Trofozoito de *Trichomonas vaginalis*

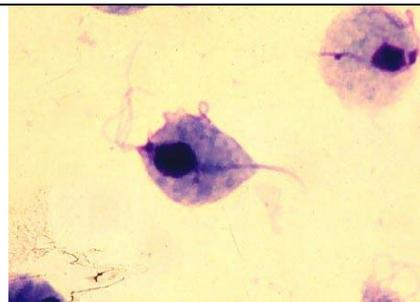


Figura 12. Trofozoitos de *Trichomonas vaginalis*



Figura 13. Esquema de un Trofozoito de *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis fue obtenida en cultivo xénico por Trussel en 1940ⁱⁱⁱ, dos medios son ampliamente utilizados para el aislamiento y cultivo axénico de *Trichomonas vaginalis*- el medio TYM^{iv,v} así como sus modificaciones y TYI-S-33, este último el cual es modificado de su formulación original.

El medio YI-S también apoya el crecimiento abundante de *Trichomonas vaginalis* con algunas modificaciones del medio; **Error! Marcador no definido.** pero no ha sido probado como un medio de aislamiento; **Error! Marcador no definido.**

Cultivo de *Trichomonas vaginalis* en medio TYM^{iv,v}

Muchas especies de tricomonas crecen axénicamente en medio TYM que en algún otro medio.

Disolver en 600 ml de agua destilada lo siguiente:

20 g de peptona digerido de caseína (trypticasa)

10 g de extracto de levadura

5.0g de maltosa

1.0 g de cloruro de L- cisteína

0.2 de ácido ascórbico

0.8 g de fosfato de potasio dibasico

0.8 g de fosfato de potasio monobásico

Ajuste a pH 6.0

Se lleva a 900 ml con agua destilada y se reparten cantidades de 90 ml en frascos, esterilizar en autoclave 15 min a 121°C y 15 lb/in² de presión. Puede almacenarse por varios meses a -20. Para completar el medio agregar 10 ml de suero bovino inactivado con calor en condiciones de esterilidad.

Medio TYM (Modificación de Hollander)^{vi}

A este medio se le realizan ciertas modificaciones, se sustituye la cisteína con un incremento en la cantidad de ácido ascórbico y la adición de cloruro de potasio, carbonato de potasio y sulfato ferroso.

Su preparación es la siguiente:

Disolver los ingredientes en 600 ml de agua destilada

20.0 g de peptona digerida de caseína (tripticasa)

10.0 g de extracto de levadura

5.0 g de maltosa

1.0 g de ácido ascórbico

1.0 g de cloruro de potasio

1.0 g de bicarbonato de potasio

1.0 g de fosfato de potasio monobásico

0.5 g de fosfato de potasio dibasico

0.1 g de sulfato ferroso.

Continuar como se describe en la preparación del medio TYM

TYI-S-33 y YI-S

Para la preparación de estos medios, se prepara el medio basal TYI y YI exactamente como para *Entamoeba histolytica* con la excepción de que se ajusta a un pH de 6 antes de esterilizar.

Para el medio YI-S se lleva a cabo un ajuste de pH del caldo estándar YI de 6.0 – 6.2 antes de esterilizar, una concentración de suero al 10% es adecuada.

YI-S es un medio libre de caseína, siendo la caseína un ingrediente con dificultad para obtenerse, ya que no ha estado disponible desde la década de los 80's **¡Error! Marcador no definido.**

Aislados adaptados a este medio y en cultivos establecidos tuvieron un crecimiento como en el medio TYI-S-33 o mejor, a las mismas concentraciones de suero. La capacidad del medio para iniciar cultivos axénicos de *Trichomonas vaginalis* no ha sido probada.

Aislamiento

Para su aislamiento no son requeridos cultivos xénicos y monoxénicos, los cultivos axénicos son iniciados en tubos de cultivo con el medio por alguna de las dos maneras siguientes:

- i) material obtenido de vagina o uretra con hisopos de rayón.
- ii) con sedimento de lavados vaginales centrifugados.

Antibióticos y antifúngicos deben ser incluidos, es efectiva una combinación de penicilina, estreptomycin y kanamicina, más micostatina o nistatina en concentraciones de 100µg/ml.

Inoculación de los medios:

Para el cultivo se inoculan tubos de medio con un exudado vaginal sospechoso del parásito. Los tubos se incuban verticalmente a 35.5°C y se examinan diariamente durante 4 días en un microscopio invertido. Si después de ese tiempo no se observa crecimiento se considera negativo.

Medio TB1

Es un medio libre de suero, se comprobó su eficacia tanto para el aislamiento como para el mantenimiento del cultivo in vitro de éste parásito.

Su eficacia en el aislamiento de *Trichomonas vaginalis* de muestras de pacientes fue comparada con el medio ya conocido, TYM.

Preparación:

Tripticasa 1.00 g

Extracto de carne 1.00 g

Extracto de levadura 1.00g

Peptona 1.00 g

Hígado disecado 1.00 g

Glucosa 0.5 g

Cloruro de sodio 0.8 g

L- prolina 0.5 g

NaHCO₃ 0.13 g

Na₂HPO₄ 0.26 g

KH₂PO₄ 0.65 g

Hierro (Fe ⁺⁺⁺) 100 µg

Agua destilada 100 ml

La mezcla se homogeniza durante 30 minutos en un vortex, se filtra en tubos estériles y se ajusta el pH a 6.0, se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos.

Solución de antibióticos (penicilina, estreptomina y fluconazol, 0.2 ml de cada uno) es agregado a cada tubo que contenga 4 ml de medio y se conserva a 4C° antes de su uso.

Inoculación del medio:

Muestras de exudados vaginales son tomadas con hisopo de rayón y se inocula directamente en el medio, los tubos son incubados a 37 °C y examinados cada día durante 7 días.

A diferencia de otros medios que utilizan suero el cual es muy caro, además de requerir condiciones especiales para su preservación y tener un alto riesgo de contaminación, este medio es fácilmente disponible, no es muy caro, es sensible para el aislamiento de *Trichomonas vaginalis* y además se obtiene una gran cantidad de trofozoítos viables.

CAPITULO IV

Trypanosoma cruzi

Generalidades

Trypanosoma cruzi es un protozooario hemoflagelado perteneciente al subphylum Mastigophora del phylum Sarcomastigophora, orden Kinetoplastida. Es el parásito del humano responsable de la enfermedad de Chagasⁱ. Este protozooario necesita de un insecto hematófago y diferentes especies de mamíferos para cumplir su ciclo vitalⁱⁱ.

Tres estadios morfológicos se presentan durante dicho cicloⁱⁱⁱ, siendo estos: el epimastigote, que es móvil y se desarrolla en el intestino del insecto vector y en los medios de cultivo en el laboratorio; el trypomastigote, que se puede encontrar al final del intestino del triatomino y en la sangre del hospedero vertebrado, es muy móvil; y el amastigote que es el tipo intracelular, inmóvil, se presenta en forma de nidos en el hospedero vertebrado^{iv,v}.

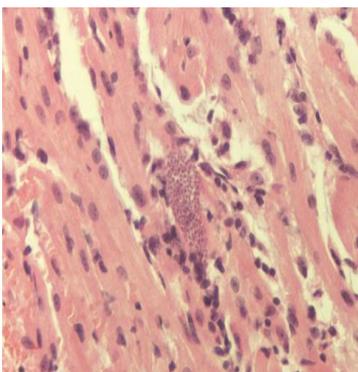


Figura 14. Amastigotes de *Trypanosoma cruzi*

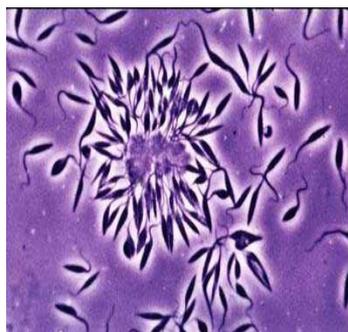


Figura 15. Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

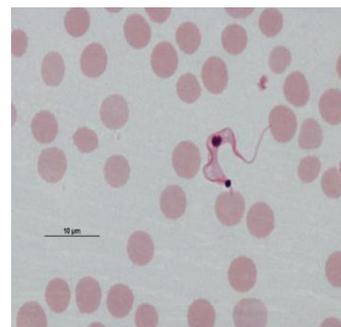


Figura 16. Tripomastigote sanguíneo de *Trypanosoma cruzi*

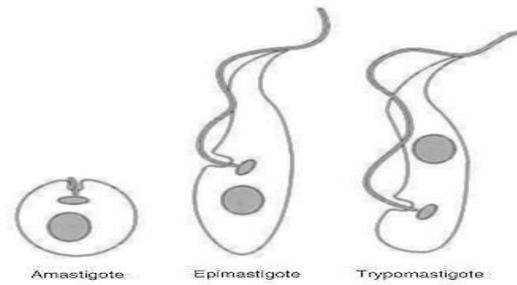


Figura 17. Estadios de *Trypanosoma cruzi*

Se agrupa dentro de los protozoos que tienen como mecanismo de transmisión fundamental a un artrópodo^{vi} del género *Triatoma* (en México).

Los protozoarios hemotisulares se investigan en la sangre, en los aspirados de medula osea o en otros tejidos parasitados y pueden ser cultivados en medios artificiales tales como el medio N.N.N. El cultivo de este flagelado sanguíneo exige medios libres de bacterias.

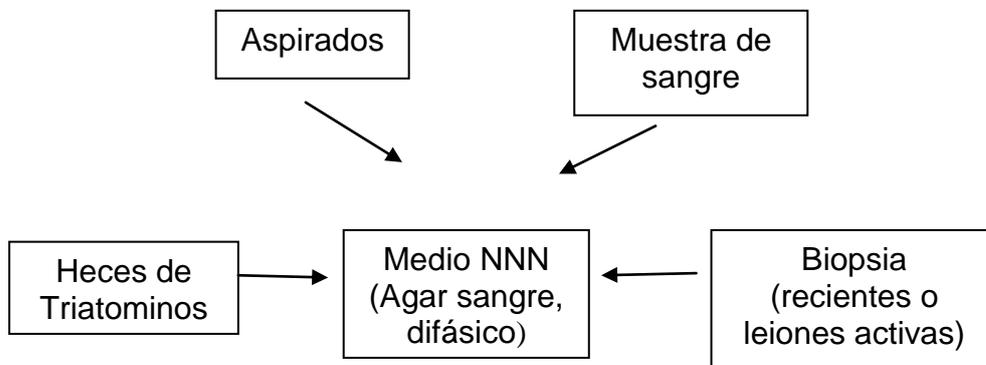


Figura 24. Esquema para el aislamiento de *Trypanosoma cruzi* de sangre y otros tejidos. Las muestras son tomadas de sangre o bien de tejido linfoide y es transferida a medio NNN.

Los especímenes para el cultivo de *Trypanosoma cruzi* puede consistir de sangre o el contenido del intestino del triatomo. Es aconsejable utilizar dos medios diferentes tales como infusión de Hígado- triptosa (LIT) y NNN para el aislamiento inicial de *Trypanosoma cruzi*^{vii}.

La forma de cultivo principal es el epimastigote; ocasionalmente, sin embargo, los trypomastigotes también pueden ser observados.

Medio NNN (Medio de Novy-MacNeal-Nicolle)

Este medio es muy eficaz para la recuperación de *Trypanosoma cruzi*.

Bacto Agar (difco)	1.4 g
Cloruro de sodio	0.6 g
Agua destilada	90 ml

- 1) Mezclar en un matraz erlenmeyer el cloruro de sodio y el agar en el agua destilada.
- 2) Calentar la mezcla hasta que el agar se disuelva.
- 3) Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- 4) Enfriar más o menos a 50°C.
- 5) Agregar 10 ml de sangre de conejo desfibrinada y colectada asépticamente.
- 6) Dispensar 4 ml dentro de tubos de 16x125 estériles con tapa de rosca.
- 7) Colocar los tubos en un ángulo de 10 ° hasta que el agar solidifique.
- 8) Inmediatamente transferir los tubos dentro
- 9) Etiquetar los tubos con la fecha de su preparación (expira 3 semanas después de su fecha de preparación).
- 10) Almacenar a 10°C

Fase líquida

Cloruro de sodio 4.5 g

Agua bidestilada 500 ml

- 1) Esterilizar en autoclave a 121°C
- 2) Dispensar asépticamente 4 ml dentro de tubos estériles de 16x125 mm.
- 3) Etiquetar como solución salina 0.9 % con la fecha de preparación y la fecha de caducidad la cual será 3 semanas después de su preparación.
- 4) Almacenar a 4°C

Medio 4N para tripanosoma

Agar base	
Agar sangre Oxoid base N° 2	40 g
Agua destilada	1000 ml

- 1) Mezclar el agar y el agua, disolver por autoclave o al vapor.
- 2) Dispensar el agar líquido en alícuotas de 5ml dentro de tubos con tapa de rosca de 30 ml.
- 3) Esterilizar en autoclave si fuese necesario.
- 4) Cuando el medio se haya enfriado a 45 °C, agregar asépticamente aproximadamente 1 ml de sangre fresca de conejo a cada tubo y dejar solidificar el agar de forma inclinada.

Fase líquida para el medio 4N

- 1) Agregar 1ml de la solución de Locke en cada tubo que contiene 5 ml de agar.
- 2) Incubar a 37 °C de 12 a 24 horas para verificar su esterilidad.
- 3) Almacenar los tubos a 4 °C por 24 horas o más antes de su uso.

Solución de Locke

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
CaCl ₂	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
Dextrosa	2.5 g
Agua destilada	1000 ml

Medio LIT de Yaeger

Infusión de hígado	35 g
Tryptosa	0.5 g
Cloruro de sodio	4.0 g
Cloruro de potasio	0.4 g
Fosfato de sodio dibásico	8.0 g
Glucosa	2.0 g
Hemina (solución stock)	4.0 ml
Agua bidestilada	1000 ml

- 1) Agregar todos los ingredientes al agua destilada y mezclar bien con un agitador magnético hasta disolver. Calentar si fuera necesario para disolver todos los ingredientes.
- 2) Utilizar un filtro Whatman # 42 y colocar en un embudo de Büchner, filtrar por vacío, repetir esta filtración por más de una vez.

- 3) Ajustar a pH de 7.2 con NaOH 1N o HCl 1N.
- 4) Esterilizar por filtración a través de un filtro de membrana de 0.22µm.
- 5) Dispensar 4.5 ml dentro de cada tubo.
- 6) Etiquetar como medio LIT, así como su fecha de preparación y fecha de caducidad de un mes.

Solución Stock de Hemina

Hemina	100 mg
Trietanolamina	10 ml
Agua bidestilada estéril	10 ml

- 1) Mezcla la trietanolamina con el agua, agregar la mezcla a un tubo que contenga hemina, agitar bien y dejar disolver.
- 2) Para completar el medio, sólo antes de la inoculación, agregar 0.5 ml de suero bovino fetal inactivado y 0.25 ml de solución con antibiótico. La concentración final de los antibióticos es de 100 U de penicilina por ml, 100 µg de estreptomina por ml y 0.2 µg de fungizona por ml.

Solución stock de antibióticos

Penicilina G sódica	1, 000,000 U
Sulfato de estreptomina	1, 000,000 µg
Fungizona	2 000 µg
Agua bidestilada estéril	50 ml

1) Mezclar todos los componentes uniformemente, la concentración de la solución stock es:

Penicilina	20, 000 U/ml
Estreptomycin	20, 000 µg/ml
Fungizona	40 µg/ml

- 2) Dispensar 1 ml de la mezcla de antibióticos dentro de viales o crioviales estériles con tapa de rosca.
- 3) Etiquetar como solución de antibióticos con fecha de preparación y fecha de caducidad de un año después de preparado.
- 4) Almacenar a -20 °C en criocajas.

Cultivo axénico

- 1) Remover los tubos almacenados a 4 °C que contienen medio de cultivo, agregar suero bovino fetal y antibióticos si son requeridos e incubar de 20 a 23 °C de una a dos horas.
- 2) Inocular el espécimen (aspirado, muestra de sangre) dentro de los tubos de cultivo.
- 3) Agregar 0.5 ml de fase líquida (solución salina u otra fase líquida dependiendo del medio). Los organismos pueden crecer en el fluido condensado cubriendo así la fase sólida.
- 4) Incubar los tubos de 20-24 °C
- 5) Cada tercer día, remover una gota del medio y examinar al microscopio.
- 6) Si se observan los epimastigotes, inocular un par de gotas del medio dentro de tubos de cultivo fresco. Agregar un par de gotas de solución salina 0.85% o solución para cubrir (dependiendo del medio de cultivo empleado) en el tubo anterior.

- 7) Si existe contaminación, agregar antibióticos (que contenga 200U de penicilina/ml y 200 µg de estreptomina/ml). Los parásitos no proliferan si la contaminación bacteriana está presente.
- 8) Incubar los tubos que contienen el espécimen por al menos dos semanas a 28 °C o a temperatura ambiente.
- 9) Si ningún organismo es observado después de 2 semanas de incubación, examinar varias gotas de fluido al microscopio en busca de epimastigotes, si no se encuentra se cambia la fase líquida y se revisa por otros siete días más.

Discusión

En el presente trabajo se propuso la elección de los medios de cultivo más apropiados para poder llevar a cabo la creación de un cepario de parásitos protozoarios, realizándose la comparación entre diversos medios de cultivo seleccionados.

Algunos parásitos pueden ser cultivados exitosamente y muchas de las técnicas se emplean sólo con propósitos de investigación o de enseñanza, pocos parásitos pueden ser cultivados rutinariamente y solo los procedimientos de uso general son para el aislamiento de *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* y *Trypanosoma cruzi* usualmente disponibles en instancias especiales.

Una variedad de medios de cultivo para *E. histolytica* fueron considerados y comparados, el medio LE es un medio difásico, siendo un medio para el aislamiento primario de las especies de *Entamoeba*, asimismo es uno de los medios con el cual se obtiene excelentes resultados para inducir el enquistamiento.

El medio Robinson se ha utilizado para el aislamiento de amebas entéricas, pero es un medio complejo y de no muy fácil elaboración.

El medio TYSGM-9 es un medio monofásico y líquido elaborado inicialmente para la transición de *E. histolytica* de condiciones xénicas a condiciones axénicas, es un medio valioso para la iniciación y mantenimiento de *E. histolytica*, *E. coli*, *E. gingivalis* y *Diantamoeba fragilis*, utilizado para el aislamiento, así como el de generar grandes cantidades de amebas de cultivos

establecidos. Además puede ser utilizado para el cultivo de otras especies de *Entamoeba* y *Endolimax nana*. La preparación del medio se realiza en pocas horas, los ingredientes utilizados se encuentran fácilmente disponibles y se puede almacenar por más de un mes. El rendimiento es consistentemente mejor que los obtenidos con LES (Boeck & Drbohlav) e igual o mejor que el obtenido con el de infusión de yema de huevo.

YI-S es un medio que fue desarrollado como una alternativa para el medio TYI-S-33, la fórmula para el medio YI-S es casi idéntica a la del medio TYI-S-33 exceptuando que la peptona digerida de caseína es reemplazada por extracto de levadura, y dando buenos resultados en el mantenimiento de los cultivos.

El medio TYI-S-33 es el medio más utilizado actualmente para el cultivo axénico de *E. histolytica*, no sólo por apoyar el crecimiento si no por ser el estándar de oro para comprobar la eficacia de los medios de cultivo.

Tomando en cuenta las ventajas y desventajas de cada medio de cultivo, los medios a utilizar en el laboratorio son el medio LE debido a su fácil preparación, es un medio con el cual obtenemos el aislamiento primario, además de ser el medio de elección para inducir el enquistamiento y otro medio considerado es el TYI-S-33 por ser uno de los más utilizados para el cultivo axénico, además de utilizarse para lograr aislamientos con fines diagnósticos se ha empleado con buenos resultados para realizar ensayos *in vitro* de susceptibilidad a diversas drogas, cubriendo con estos la obtención de quistes y trofozoítos.

De los medios presentados para el aislamiento y mantenimiento de *Giardia intestinalis*, el medio YI-S apoya al crecimiento de *Giardia* adaptándose bien a éste, pero no ha sido probado para iniciar la axenización. La cápsula de Beal es una técnica muy sencilla, la cual permite la obtención directa de trofozoítos y con ello el cultivo axénico de *G. intestinalis* además de que puede servir como un método de diagnóstico rápido y para poder realizar el aislamiento se requiere de un medio de cultivo siendo el más utilizado el medio TYI-S-33.

Por los resultados mostrados en la mayoría de los ensayos reportados este medio sería el más adecuado no sólo para llevar a cabo el aislamiento y mantenimiento de *Giardia intestinalis* si no también para llevarse a cabo el enquistamiento y desenquistamiento con ciertos cambios en el medio de cultivo, adecuándolo a nuestras posibilidades.

En cuanto a los medios propuestos para el aislamiento de *Trichomonas vaginalis* el medio YI-S ha demostrado establecer un buen crecimiento, sin embargo no ha sido probado para iniciar cultivos axénicos, el medio TB1 además de ser un medio fácilmente disponible y económico, da buenos resultados tanto para el aislamiento como para el establecimiento de cultivos in vitro de *Trichomonas vaginalis*, pero sólo siendo comparado con uno de los medios más utilizados (medio TYM) y no realizándose la comparación con el medio estándar TYI-S-33, los más utilizados por su eficacia son el medio TYM y TYI-S-33, optando por la utilización de éste último por ser un medio de referencia, además de ser un medio casi idéntico para el aislamiento de *Entamoeba histolytica* y *Giardia intestinalis* con ligeras modificaciones.

En el caso del hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* el medio NNN es uno de los medios más utilizados y el más conveniente, además de ser un medio de fácil preparación y con la utilización de pocos ingredientes, podemos recuperar al parásito.

Conclusiones

Aunque los protozoarios parásitos es un grupo diverso de organismos, algunos medios pueden ser utilizados para diferentes géneros de protozoarios. Por ejemplo el medio TYI-S-33, el cual puede ser un buen inicio para trabajar, por ser un medio que demuestra buenos resultados.

Con la revisión y análisis de los medios de cultivo, logramos comprobar que es posible la creación de un cepario de Parásitos protozoarios en la facultad. El material necesario para su elaboración es accesible y la preparación no requiere un excesivo cuidado.

Una vez seleccionados los medios de cultivo adecuados, la siguiente etapa es la preparación y el aislamiento de los protozoarios. Una vez establecido permitiría contar con material biológico necesario para el aprendizaje de la materia con aplicación clínica, además de apoyar a otras materias de formación básica. El contar con este tipo de material nos permitiría también tener una visión más amplia acerca de estos protozoarios parásitos, de sus requerimientos, diferencias morfológicas, su ciclo de vida y sobre todo podremos desarrollar diferentes trabajos en apoyo a la comunidad estudiantil.

Referencias bibliográficas

- ¹ Chester Beaver, P.; Clifton Jung, R.; Wayne Cupp, E. 1986. Parasitología clínica, Edit. Salvat, Segunda ed.
- ² Koneman W. E., Winn, C. W., Allen, D. S., Janda, W. M., Procop, W. G., Schreckenberger, C. P., Woods, L.G. 2008. Diagnóstico microbiológico, Texto y Atlas en color. Edit. Panamericana, Sexta ed.
- ³ Govinda S. Visvesvara and Lynne S. Garcia. 2002. Guest commentary, Culture of protozoan parasites. Clin Microbiol rev. vol.15, N°:3:327-328
- ⁴ C.Graham Clark and Louis S. Diamond. 2002. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. Clin Microbiol Rev. 15: 329-341
- ⁵ Flisser Steinbruch A y Pérez Tamayo R. 2006. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Editores de textos Mexicanos. p322
- ⁶ Mehmet Tanyuksel and William A. Petri, Jr. 2003. Laboratory Diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev. 16:713-729.
- ⁷ Dobell, C., and P,P, Laidlaw. 1926. On the Cultivation of Entamoeba histolytica and some other entozoic amoebae. Parasitology 18:283-318
- ⁸ Balamuth.W. 1946. Improved egg yolk medium for cultivation of Entamoeba histolytica and other intestinal protozoa. Am. J. Clin. Pathol. 16:380-384
- ⁹ Jones, W. R. 1946. The Experimental Infection of rats with Entamoeba histolytica; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. Ann. Trop. Med. Parasitol. 40:130-140
- ¹⁰ Diamond, L. S. 1982. A new liquid medium for xenic cultivation of Entamoeba histolytica and other lumen dwelling protozoa. J. Parasitol. 68:958-959
- ¹¹ Cleveland, L. R., and E. P. Sanders. 1930. The production of bacteria-free amoebic abscesses in the liver of cats and observations on the amoebae in various media with and without bacteria. Science. 77:149-151
- ¹² Reeves, R. E., H. E. Meleney, and W. W. Frye. 1957. A modified Shaffer-Frye technique for the cultivation of Entamoeba histolytica and some observations on its carbohydrate requirements. Am. J. Hyg. 66:56-62
- ¹³ Diamond, L. S. 1961. Axenic cultivation of Entamoeba histolytica. Science. 134:336-337
- ¹⁴ Diamond, L. S. 1968. Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 and Entamoeba histolytica-like amoebae. J. Parasitol. 54:1047-1056
- ¹⁵ Diamond, L. S., D. R. Harlow, and C. C. Cunnick. 1978. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg. 72:431-432
- ¹⁶ Diamond, L. S., C. G. Clark, and C. C. Cunnick. 1995. YI-S, a casein-free medium for axenic cultivation of Entamoeba histolytica, related Entamoeba, Giardia Intestinalis and Trichomonas vaginalis. J. Eukaryot. Microbiol. 42:277-278
- ¹⁷ Meyer, E. A., Giardiasis. 1980. Amer. J. Epidemiol. 111:1.
- ¹⁸ Craft, J. C. Giardia and Giardiasis in childhood. 1982. Pediat. Infect. Dis.:1:196.

- ¹⁹ Cedillo-Rivera, R., Enciso-Moreno, J. A., Martínez – Palomo, A., Ortega- Pierres, G. 1991. Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in México. 22:79-85
- ²⁰ Gillin, F. D., S. E. Boucher, S. S. Rossi, and D. S. Reiner. 1989. *Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle in vitro. *Exp. Parasitol.* 69: 164-174.
- ²¹ Meyer, E. A. 1970. Isolation and axenic cultivation of *Giardia* trophozoites from the rabbit and chinchilla. *Nature (London)* 207: 1417-1418.
- ²² Meyer, E. A. 1976. *Giardia lamblia*: isolation and axenic cultivation. *Exp. Parasitol.* 39: 101-105.
- ²³ Visvesvara, G. S. 1980. Axenic growth of *Giardia lamblia* in Diamond's TPS-1 medium. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74: 213-215.
- ²⁴ Keister, D. B. 1983. Axenic cultivation of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77:487-488
- ²⁵ Stanley, H. Korman, Edna Hais, and Dan T. Spira. 1990. Routine in vitro cultivation of *Giardia lamblia* by using the string test. *J. Clin. Microbiol.* 28: 368-369.
- ²⁶ Limoncu, M. E., Kilimcioglu, A. A., Kurt, Ö., Östan, İ., Özkütük, N., Özbilgin, A. 2007. Two novel serum-free media for the culture of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Res.* 100:599-602.
- ²⁷ Castro-Garza J., Anaya-Velazquez F., Said-Fernández S., González-Garza M. 1996. Comparable growth of a *Trichomonas vaginalis* strain in PEHPS and TYI-S-33 media. *Archives of Medical Research.* 27:567-569.
- ²⁸ Trussel, R. E. 1940. Experimental and clinical *Trichomonas* vaginitis. *J. Iowa State Med. Soc.* 30: 66-70.
- ²⁹ Diamond, L. S. 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 43: 488-490.
- ³⁰ Diamond, L. S. 1983. Lumen dwelling protozoa: Entamoeba, Trichomonads, and *Giardia*, p. 67-109. In J. B. Jensen (ed.), *in vitro* cultivation of protozoan parasites, CRC Press, Boca Raton, Fla.
- ³¹ Hollander, D. H. 1976. Colonial morphology of *Trichomonas vaginalis* in agar. *J. Parasitol.* 62:826-828
- ³² Flisser Steinbruch A y Pérez Tamayo R. 2006. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Editores de textos Mexicanos. p 412.
- ³³ Zaidenberg, A., Tournier, H. A., Schinella, G. R., Buschiazzi, H. O. 2000. *Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 42:21-26
- ³⁴ de Souza, W. 1984. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytol.* 86:197-283.
- ³⁵ Vega S, Náquira C. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la tripanomomiosis americana (Enfermedad de Chagas). 2ª ed. Lima: instituto nacional de salud; 2006. Serie de normas técnicas N° 26.
- ³⁶ Saldaña, C. C., Córdova, P. O., Vargas, V. F. 2006. Utilización de *Lepidium peruvianum* MACA, como medio de cultivo para el crecimiento de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 23(2): 137-140.
- ³⁷ Tay-Zavala J, Lara-Aguilera R, Velasco-Castrejón O, Gutierrez-Quiroz M. 2002. Parasitología médica. pp123-124.

³⁸ Schuster, F. L., and Sullivan, J. J. 2002. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Am. Soc. Microbiol.* 15: 374-389.