

Optimización del cultivo de *Entamoeba histolytica*/dispar con el uso de Imipenem

Raquel Avila^{1*}, Manzur Hassanhi², Yennis Parra³, Zuhey Carrillo³,
Maritza Alvarez, Tania Romero A.² y Juan Ferrer¹

¹Cátedra de Farmacología, ²Cátedra de Inmunología. Facultad de Medicina.
Universidad del Zulia, ³Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia.
Maracaibo, Venezuela

Recibido: 28-04-05 Aceptado: 07-04-06

Resumen

Para el cultivo de amiba se utilizan diversos medios que emplean antibióticos para controlar el crecimiento bacteriano. El Imipenem, antibiótico betalactámico, actúa sobre la mayoría de los gérmenes presentes como flora fecal. Se optimizó el cultivo de *Entamoeba histolytica*/dispar (EH/ED) utilizando Imipenem, comprobar la viabilidad de la amiba con este antibiótico y extraer el ADN amibiano para tipificación. Se inocularon 22 tubos con el medio de Boeck y Drbohlav con 1 g de heces positivas para EH/ED, a 12 de ellos se agregó 200 μ L de Imipenem (25 mg/mL) al inicio y 50 μ L diarios y a los 10 restantes 150 μ L de una combinación de Penicilina, Amikacina y Eritromicina (50 μ L de cada uno). Se verificó el crecimiento y viabilidad parasitaria mediante tinción con eosina al 1% y conteo en cámara de Neubauer a las 24, 48, 72 horas y 7^{mo} día, con resiembra y lecturas en iguales intervalos. Se extrajo el ADN mediante Kit Wizar SV Genomic de Promega® y se amplificó con iniciadores genéricos. Se obtuvo una diferencia significativa entre el número de parásitos vivos de los cultivos con Imipenem = $6,6 \times 10^6$, 11×10^6 , 17×10^6 y 21×10^6 vs. la combinación de Penicilina, Amikacina y Eritromicina = 1×10^6 , $2,8 \times 10^6$, $3,3 \times 10^6$ y $3,3 \times 10^6$ a las 24, 48, 72 horas y 7^o día respectivamente ($p < 0,05$). Se realizó la extracción del ADN y se amplificó con iniciadores genéricos obteniendo una banda de 1076pb. El uso de Imipenem para el cultivo de EH/ED permite obtener un crecimiento óptimo, mantener la viabilidad del mismo por tiempo prolongado, y la obtención de ADN amibiano de óptima calidad para su uso en biología molecular, evitando el uso de combinaciones de antibióticos.

Palabras clave: ADN; cultivo; *Entamoeba dispar*; *Entamoeba histolytica*; Imipenem.

* Autor para la correspondencia. E-mail: rmavila@cantv.net

Entamoeba histolytica/dispar culture optimization using Imipenem

Abstract

Antibiotics are used to control bacterial growth when amoeba cultures are under study. Imipenem is a betalactamic antibiotic acting on the majority of faecal flora. To optimize culture of EH/ED by using Imipenem, to test its efficiency in amoeba's survival, and to extract the amoeba's DNA for tipification. 22 tubes containing Boek and Drbohav media were inoculated with 1 g of human faeces positive for EH/ED; 12 of them with 200 μ L of Imipenem (25 mg/mL) at the beginning and then a daily dose of 50 μ L and 10 tubes with or 150 μ L of a mixture of Penicillin, Amikacin and Erythromycin (50 μ L of each one) daily. Staining with 1% eosin and counting on a Newbaver chamber at 24, 48, 72 hours and 7th day were performed to check growing and viability of the parasites, followed and then by repeated incubation and lectures at equal intervals. DNA was extracted using a Wizar SV Genomic kit (Promega®) and amplified with generic primers. There was a significative difference between the number of live parasites in Imipenem-treated cultures = 6.6×10^6 , 11×10^6 , 17×10^6 and 21×10^6 , and the combination of Penicillin, Amikacin and Erythromycin = 1×10^6 , 2.8×10^6 , 3.3×10^6 and 3.3×10^6 at 24, 48, 72 hours and 7th day respectively ($p < 0.05$). In addition, a DNA extraction was performed and amplified with generic primers and a band of 1076pb was obtained. Imipenem in EH/ED cultures leads to an optimal grow and allows to keep its viability for a long time, in addition to the isolation of high quality DNA to be used in molecular biology, avoiding the use of antibiotics combinations.

Key words: DNA; cell culture; *Entamoeba dispar*; *Entamoeba histolytica*; imipenem.

Introducción

La amibiasis como enfermedad ha existido, con toda probabilidad, desde que el hombre empezó a poblar la corteza terrestre (1). Es ocasionada por protozoarios que pertenecen al Phylum *Rhizopoda*; Familia *Endamoebidae*, en la que están implicados los géneros *Entamoeba histolytica* (E.H) y *Entamoeba dispar* (E.D). En 1993, Diamond y Clark establecieron la existencia de estas dos especies, indistinguibles morfológicamente, pero con diferencias inmunológicas, bioquímicas y genéticas (2-4). Parasitan toda clase de vertebrados y viven como comensales en el intestino grueso, sin embargo, E.H puede llegar a invadir la mucosa intestinal produciendo ulceraciones y tener localizaciones extraintestinales. ED es descrita como no patógena (2, 3).

Anualmente en el mundo, se infectan con este parásito, alrededor de 500 millones de personas, 10% de las cuales presentan síntomas clí-

nicos intestinales en un 80% a 98% de los casos y del 2 al 20% extraintestinales, ocasionando una mortalidad que oscila entre 40.000 y 110.000 casos por año (5, 6). Los datos epidemiológicos de la amibiasis en muchas regiones no distinguen entre las dos especies, por lo que la prevalencia e incidencia debe reevaluarse y estar basada en métodos que permitan distinguir entre la EH y la ED, tales como antígenos, análisis isoenzimáticos o de ADN por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (2).

El descubridor del agente etiológico de la amibiasis fue Fedor A. Lösch en San Petersburgo, 1875, quien demostró que la diarrea disintérica en un campesino de 24 años era producida por unos microorganismos móviles que poseían endo y ectoplasma y contenían glóbulos rojos (2). La E.H se cultivó por primera vez en 1925 por Boeck y Drbohlay (7). El cultivo se efectuó en presencia de flora entérica humana de composición desconocida (cultivo xénico) en un medio

artificial con base en huevo. Con este tipo de cultivo, Craig en 1927 preparó un antígeno para fijación del complemento. En esa misma fecha, se describen diferentes medios de los cuales se recomendaron dos difásicos que consistían en un declive de huevo entero condensado cubierto con solución de Locke (LES) o albúmina de huevo fresco (LEA). En estos cultivos el desarrollo de las amibas se logró en presencia de la flora fecal que acompañaba al parásito. Cinco años después de este evento transcendental se registró el cultivo de amibas en presencia de una sola especie identificada de bacterias (cultivo monoxénico) (1,2), usualmente *E. coli*.

Dobell y Laidlaw (8) introdujeron diferentes medios de cultivo para EH, siendo su contribución más importante la incorporación de fécula de arroz en el medio como una fuente de carbohidratos. La fécula de arroz se agrega a todos los medios actuales que se usan para el cultivo xénico de la amibas. Dicha fécula, a diferencia de los carbohidratos solubles, no puede ser metabolizada por las bacterias tan fácilmente como por las amibas. Robinson (9) creó un medio difásico basado en el de Dobell y Laidlaw, que ha obtenido gran popularidad como una fuente de Entamoeba para estudios isoenzimáticos.

Dobell (10) también descubrió la necesidad de equilibrar el crecimiento de las bacterias respecto a las amibas; con este propósito introdujo el uso de acriflavina para inhibirlas. El uso precoz de antibiótico para controlar el crecimiento fue reportado por Jacobs (11), quién utilizó Penicilina G, intentando eliminar las bacterias y prolongar la duración de los cultivos. La penicilina no tiene actividad contra muchas de las bacterias colónicas gram negativas, amibas, plasmidios, rickettsias, hongos, o virus. En base a esto, Spingarn y Edelman (12) adicionaron Estreptomicina, pero ella sola resultó no ser activa y debió combinarse con un compuesto activo sobre la pared bacteriana, como Penicilina o Vancomicina.

Treinta y seis años después del primer cultivo exitoso de E.H, Diamond (13), en 1961 describió su desarrollo en ausencia de cualquier otra célula con efectos metabólicos (cultivo axénico), el cual ha servido entre otros muchos usos, para

preparar antígenos con alto grado de pureza para diversas reacciones serológicas. (2). ED crece fácilmente en medio xénico, pero su cultivo en medio axénico ha sido difícil de lograr (14).

Los cultivos axénicos de E.H se han iniciado con amibas de cultivo monoxénicos. Éstos, a su vez, salvo raras excepciones, (13, 15, 16) se han derivados de cultivos xénicos preexistentes. Para lograrlo, se necesitan varios meses, hasta un año y más después del aislamiento de la amibas obtenida del hospedero. Por lo tanto, el número de generaciones resultantes entre los dos puntos puede ser enorme, considerando un tiempo de generación de seis a ocho horas, lo que permite ampliamente la posibilidad de que ocurra selección y /o mutación. Se deduce, entonces, que se debe reducir este intervalo si se desea conservar las cualidades presentadas en la población genuina en el momento de aislarla del hospedador (1).

Todos los medios mencionados han sido difásicos. También se han inventado medios monofásicos y mientras los difásicos constituyen el mejor método para el aislamiento de E.H/ED, los primeros producen mayor número de amibas que los segundos. Dos de los medios monofásicos que contienen antibióticos y que se usan ampliamente son el YE, desarrollado por Balamuth y Sandza (posteriormente modificado por Balamuth) (17), y el TYSGM-9 ideado por Diamond (18), el cual utiliza una mezcla de Amikacina, Cefotaxima y Eritromicina para reducir la flora bacteriana y lograr desarrollar los medios axénicos.

Debido a que los métodos tradicionales de cultivo de Entamoebas ameritan combinaciones de antibióticos para inhibir la multiplicación bacteriana, se decidió evaluar la adición a los cultivos del antibiótico Imipenem, betalactámico del grupo carbapenem con acción excelente *in vitro* contra diversos microorganismos propios de la flora bacteriana colónica, incluyendo aerobios y anaerobios como *Streptococos*, *Enterococos* (Excluido *E. faecium* y las cepas resistentes a penicilina que no producen β -Lactamasa), *Estafilococos* (incluidas las cepas que generan penicilinas), *Listeria*, enterobacteriaceas (excelente actividad) *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *B. fragilis* (19), bajo la hipótesis de que la presencia del mismo

permitirá la optimización de dichos métodos, comprobar la viabilidad de la amiba con este antibiótico y la obtención de ADN para confirmación del género de amiba mediante PCR.

Materiales y Métodos

Para cultivar los trofozoitos y/o quistes de EH/ED se utilizaron muestras de heces positivas al microscopio óptico por tinción con lugol obtenidas de diversos laboratorios de la ciudad de Maracaibo. Se prepararon 22 tubos con el medio de Boeck y Drbohlav modificado (2). A doce de ellos se les agregó 200 μ L de Imipenem (25mg/mL) al inicio seguido de 50 μ L diarios. En los diez restantes se agregaron 150 μ L diarios de una combinación de Penicilina cristalina (200.000 unidades/mL), Amikacina (250 mg/mL) y Eritromicina (50mg/mL) (50 μ L de cada uno).

La siembra de la materia fecal se realizó en el líquido sobrenadante, colocando 0,5 mL si la muestra era líquida o semilíquida y 1gr si era sólida. No se realizó un conteo de los parásitos en estos inóculos. Se incubaron los tubos a 37°C y se observaron al microscopio óptico a las 24, 48, 72 horas y al 7mo día. Para la observación al microscopio óptico se tomó 1 gota del tubo de cultivo, previo enfriamiento de sus paredes sumergiéndolo en un vaso de agua fría (para separar las amibas de las paredes del tubo) y agitación suave y se observó a 40X (Figura 1). Se verificó el crecimiento y viabilidad parasitaria en todos los tubos mediante tinción con eosina al 1% y observación en cámara de Neubauer, simultáneamente con el conteo del número de parásitos (Figura 2) separándolos en trofozoitos o quistes. El sedimento obtenido el día 7mo se utilizó para la resiembra, con la finalidad de aumentar la posibilidad de obtener un cultivo positivo, cuando no hubo crecimiento inicial y para mantener la cepa.

En el análisis molecular, se tomó una muestra del sobrenadante de los tubos del 7mo día de la siembra original o a las 48 horas en la resiembra; luego del enfriamiento y agitación del tubo, centrifugación y separación del botón formado por trofozoitos/quistes, para luego realizar la extracción de ADN mediante Kit de extracción

Wizar SV Genomic DNA de Promega® según su protocolo por centrifugación. La extracción se hizo en unos 20 minutos, pudiéndose procesar múltiples muestras simultáneamente. Luego de la extracción, el ADN se mantuvo en refrigeración a - 20°C hasta su análisis por PCR.

La amplificación del ADN se realizó con iniciadores diseñados por Evangelopoulos y col. (20), basados en la secuencia SSU-rDNA depositada en la base de datos genéticos (Genbank database): número de acceso gi 9283/emb X56991 (longitud de 1947 pb) para EH y número de acceso gi 1212896/emb Z49256 (longitud 1947 pb) para ED, denominados E1 (TGC TGT GAT TAA AACGCT) y E2 (TTA ACT ATRT TCA ATC TCG G) que amplifica un fragmento de 1076 pb que es común para ambas especies. La posibilidad de hibridación cruzada con ADN de otras fuentes es poco probable, puesto que han sido comparadas con otras secuencias con el programa BLAST. Posterior a la obtención del ADN y su amplificación según el protocolo del mismo autor, se efectuó la electroforesis en gel de agarosa con una concentración del 2% en TAE 1X con bromuro de etidio (0.5 μ L / mL SIGMA), corriendo paralelamente un marcador de peso molecular 1000 pb step ladder para determinar así el tamaño de los fragmentos de ADN. Se aplicó una corriente de 80 V por 90 minutos y se colocó en el transiluminador en presencia de luz UV.

El conteo diario de los parásitos de los tubos utilizando los diferentes antibióticos fue analizado mediante el test de Mann Whitney y análisis de varianza según el caso y se consideró significativa una $p < 0.05$.

Resultados

Todos los tubos de cultivo sembrados demostraron crecimiento, es decir un 100%, siendo el número promedio de parásitos vivos (trofozoitos) de los cultivos con Imipenem = 6.6×10^6 , 11×10^6 , 17×10^6 y 21×10^6 y de la combinación de Penicilina, Amikacina y Eritromicina = 1×10^6 , 2.8×10^6 , 3.3×10^6 y 3.3×10^6 a las 24, 48, 72 horas y 7° día respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 3). Los cultivos de resiembra del grupo de Imipenem demostraron un crecimiento de 23×10^6 , 28×10^6 , 38.5×10^6 y 45×10^6 a las 24, 48, 72 horas y 7° día. No

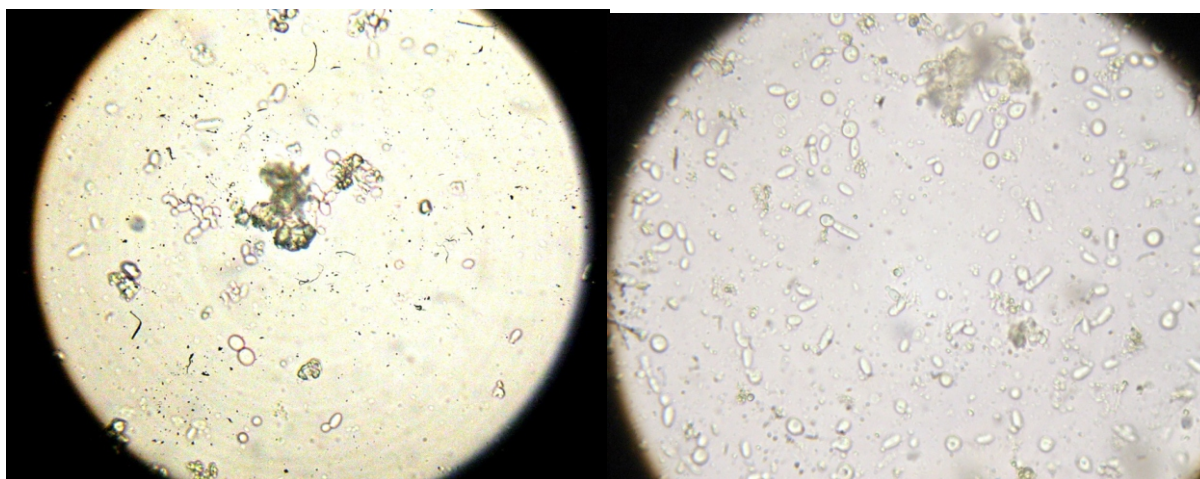


Figura 1. Fotografía ilustrativa del cultivo De EH/ED con Imipenem a las 24 y 48 horas respectivamente en el medio de Boeck y Drbohlav modificado. Muestra al fresco. Aumento 40X.

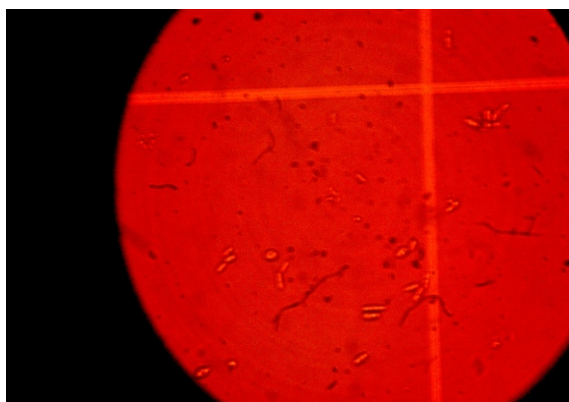


Figura 2. Fotografía ilustrativa de conteo en cámara de Neubauer, teñidos con eosina al 1%. Aumento 40X.

se realizó resiembra de los cultivos con combinación de antibióticos. Se observó un menor número de quistes en las muestras tratadas con Imipenem= 2.3×10^6 , 2.5×10^6 , 1.1×10^6 y 2×10^6 vs. 2.4×10^6 , 2.7×10^6 , 4.7×10^6 y 4.5×10^6 a las 24, 48, 72 horas y 7^o día de las muestras tratadas con la combinación de antibióticos, siendo esta diferencia significativa a las 72 horas ($p < 0,01$) y a la semana de cultivo ($p < 0,05$) (Figura 4). También se observó una presencia mucho menor de bacterias en los cultivos con Imipenem.

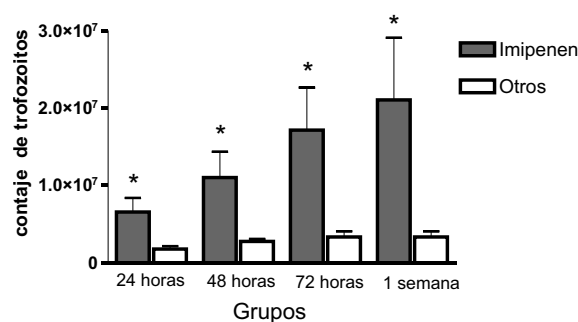


Figura 3. Comparación del crecimiento de Trofozoitos utilizando Imipenem vs. otros antibióticos a las 24, 48, 72 horas y una semana. * = $p < 0,05$.

De la extracción y amplificación del ADN de todos los tubos se obtuvo una banda de 1076pb en gel de agarosa al 2% (Figura 5).

Discusión

El cultivo *in vitro* de los protozoos parásitos generalmente involucra procedimientos complejos, que los hace poco prácticos para el uso rutinario, sin embargo, su importancia radica en la utilidad para muchos tipos de investigación biológica y médica, que incluyen el diagnóstico en casos donde el bajo número de parásitos no permite su detección por métodos de rutina (14).

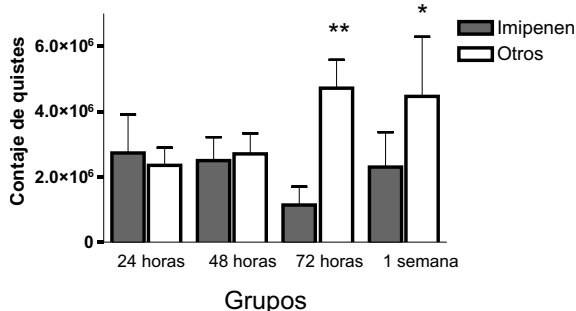


Figura 4. Comparación de la presencia de quistes en cultivo con Imipenem y otros antibióticos a las 24, 48, 72 horas y una semana; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

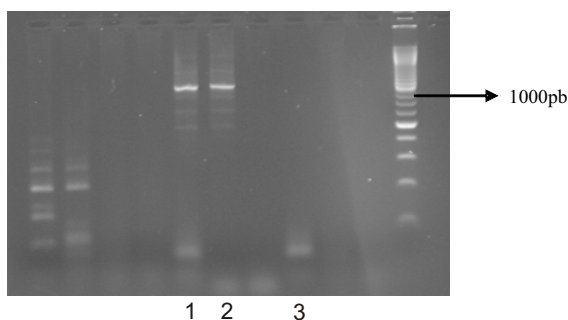


Figura 5. ADN amibiano con banda de 1079pb, en gel de agarosa al 2%. Step-ladder de 1000pb. Bandas 1 y 2= muestras de amiba; 3= control negativo.

La reproducción *in vitro* de EH/ED permite un mejor entendimiento de sus características biológicas, patogenicidad y la adaptación a las condiciones ambientales. Muchas de las ramas de investigación de protozoarios involucran el manejo de un gran número de parásitos con o sin bacterias contaminantes o materiales del hospedero. A partir de estos cultivos es posible obtener información sobre su desarrollo y diseñar nuevas formas para el combate o erradicación del mismo (21, 22). Las siguientes son todas razones por las cuales la optimización del cultivo de protozoarios es sumamente valiosa: a) Contribuir al diagnóstico definitivo, aunque no de rutina, b) Aportar información del desarrollo y metabo-

lismo del parásito, c) Obtener antígenos para la producción de anticuerpos mono y policlonales a utilizar en los test inmunológicos, d) Identificar proteínas específicas que pueden aumentar la patogenicidad del parásito, e) Desarrollo de anticuerpos e inmunidad celular, f) Probar nuevos medicamentos, g) Identificar especies susceptibles y/o resistentes a los medicamentos disponibles, h) Identificar diferentes especies con técnicas de biología molecular, i) Producción de vacunas, j) Sistemas para evaluar vacunas, con parásitos intactos, k) Obtención de inóculos de parásitos para desarrollo de modelos de enfermedad, l) Estudiar la bioquímica, fisiología y metabolismo de los parásitos para determinar sus requerimientos nutricionales, m) Comprender su organización ultraestructural, n) Desarrollo de citocinas que puedan bloquear la invasión del parásito, entre otros (21).

EH/ED necesitan establecerse en un cultivo xénico, sin embargo, para garantizar el éxito del cultivo y su mantenimiento, es fundamental el control del desarrollo bacteriano (11). Tradicionalmente se han empleado antibióticos tipo Penicilina G, Estreptomycin y Eritromicina y para la axenización Rifampicina, Amikacina, Oxitetraciclina y Cefotaxima, siempre en combinación (14). La mezcla de antibióticos *in vitro* puede dar lugar a interacciones de incompatibilidad, mol a mol, con la consiguiente precipitación e inactivación de los antibióticos presentes en menor concentración (19). Adicionalmente, la resistencia bacteriana actual hace imposible generalizar sobre el tipo y dosis de antibiótico necesarios y limita el empleo de los que se han utilizado.

En este trabajo se obtuvo un 100% de éxito en el crecimiento de los cultivos, comparado con el reporte de Clark (14), quien menciona un porcentaje entre 50-70% en la mayoría de los laboratorios. Se demostró el mejor desarrollo en términos de número de parásitos (trofozoitos) y en tiempo de viabilidad del cultivo (días) utilizando Imipenem en lugar de una combinación de antibióticos. El análisis de comparación demostró una diferencia significativa en la tasa de crecimiento de los trofozoitos en los cultivos con Imipenem (Figura 3). Adicionalmente, en los cultivos donde se utilizó la combinación de antibióticos = Penici-

lina G, Amikacina y Eritromicina, se observó mayor número de bacterias y quistes y menor número de trofozoitos, así como menor tiempo de viabilidad del mismo (Figura 4). Esto corrobora que un control superior del desarrollo bacteriano permite un mejor crecimiento de la amiba, probablemente ante la menor competencia por el sustrato y demora en el agotamiento del cultivo. Las razones previamente esgrimidas acerca de incompatibilidad y resistencia a antibióticos pudieran explicar el déficit en el control de las bacterias que se obtuvo en las muestras con combinaciones. También se demuestra la falta de efecto lesivo del Imipenem sobre el trofozoito.

Por otro lado, se ha determinado que para que la amiba se enquiste en medio de cultivo, es necesaria la presencia de bacterias (14). Los resultados de este estudio sugieren que el escaso control del crecimiento bacteriano favorece el enquistamiento o la permanencia de la amiba en este estado, particularmente luego de varios días. El enquistamiento es un proceso que se produce en forma natural para garantizar una mayor resistencia ante las condiciones ambientales menos favorables, lo que probablemente ocurrió en las muestras en que se utilizaron varios antibióticos.

Adicionalmente, tomando en consideración la importancia de lograr la axenización de los cultivos para muchas de las investigaciones en este campo y las limitaciones de los procedimientos tradicionales (largo período de adaptación del parásito y uso de varios de antibióticos para abarcar el espectro de la flora colónica), el empleo de Imipenem pudiera permitir alcanzarla en un tiempo más breve.

El estudio del ADN con los iniciadores genéricos permitió verificar que en todos los cultivos procesados se logró el crecimiento de EH/ED (Figura 5), utilizando una técnica de extracción rápida (20min), lo que pudiera significar que la misma este disponible en el futuro para diagnóstico de rutina. En estudios posteriores a partir de estas muestras de ADN puede determinarse la especie amibiana para establecer la verdadera prevalencia de ambas especies en nuestra población.

Conclusiones

El cultivo de EH/ED en presencia de Imipenem tiene un alto índice de éxito.

Imipenem carece de efecto amebicida

Imipenem puede ser utilizado para el control bacteriano en los cultivos de EH/ED y otros protozoarios.

Un mayor control del crecimiento bacteriano permite un mejor desarrollo de trofozoitos.

EH/ED se desarrolla mejor en presencia de Imipenem que en presencia de combinación de antibióticos Penicilina G, Amikacina y Eritromicina.

Es posible obtener ADN de calidad a partir de las muestras del cultivo con el Kit de extracción Wizar SV Genomic DNA de Promega® y en un futuro pudiera generalizarse su uso como herramienta de investigación y diagnóstico.

Recomendaciones

Debido a su utilidad como herramienta de investigación, extender el uso de cultivo de protozoarios en los laboratorios de investigación en el área.

Insistir en el mantenimiento de los cultivos hasta lograr la axenización

Identificar, a partir del ADN amibiano amplificado, las diferentes especies de amiba.

Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) por el financiamiento para la realización para este trabajo, proyecto No.: CC-125-02.

Referencias Bibliográficas

1. KRETSCHMER R. **Amibiasis; Infección y Enfermedad por Entamoeba histolytica**. Editorial. Trillas. D.F. pp: 15-36, 1994.
2. BOTERO D., RESTREPO M., **Parasitosis Humana** 4^o Edición, Medellín Colombia,

- Corporación para Investigación Biológicas (CIB) pp: 30-52, 468-470, 2003.
3. ESPINOSA M., GONZALES A., CHAVEZ B., CASTEÑON G.; ARGUELLO C., LAZARO A., MARTINEZ A. **J Euk Microbiol** 45(3): 265-272, 1998.
 4. URDANETA H., COVA J.A., MOLINA S., AGUIRRE A., HERNÁNDEZ M. **Kasmera** 26(1): 36-45, 1998.
 5. WALSH J.A. **Rev Infec Dis** 8: 228-238, 1986.
 6. **WHO/PAHO/UNESCO**. A consultation with experts on amoebiasis. **Epidem Bull PAHO** 18:13-14, 1997.
 7. BOECK W.C., DRBOHLAV J. **Am J Hyg** 5: 371-407, 1925.
 8. DOBELL C., LAIDLAW P.P. **J Pathol Bacteriol** 22:18-24, 1918.
 9. ROBINSON G.L. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 62: 285-294, 1968.
 10. DOBELL C., LAIDLAW P.P. **Parasitology** 18: 283-318, 1926.
 11. JACOBS L. **Am J Hyg** 46: 172-175, 1947.
 12. SPINGARN C.L., EDELMAN MH. **Am J Trop Med Hyg** 1(3): 412-416, 1952.
 13. DIAMOND L.S. **Science** 134: 336-337, 1961.
 14. CLARK G., DIAMOND L. **Clin Microbial Rew** 15(3): 329-341, 2002.
 15. WANG L.T., JEN G., CROSS J.H. **South-east asian J Trop Med Public Health** 5: 365-367, 1974.
 16. DOUGHERTTY E.C. **Ann NY Acad Sci** 77: 27-54, 1959.
 17. BALAMUTH W. **J Infect Dis** 88(3): 230-236, 1951.
 18. DIAMOND L.S. **J Parasitol** 68: 958-959, 1982.
 19. GOODMAN & GILMAN: **The pharmacological basis of therapeutics**. Tenth edition. McGraw-Hill, New York (USA) pp:1143-1271, 2001.
 20. EVANGELOPOULOS A., SPANAKIS G., PATSOULA E., VAKALIS N. **Ann Trop Med Parasitol** 94(3): 233-240, 2000.
 21. AKSOY U., USTUN S., DAGCI H., YAZAR S. **World J Gastroenterol**. 10(3): 449-451, 2004.
 22. VISVESVARA G., GARCIA L. **Clin Microbial Rew** 15(3): 327-328, 2002.