

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

ESTANDARIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO AXENICOS *IN VITRO* DE *Giardia*



GLADYS FLOP 156. * 6ALlit ROINF' CAST I LLA

Para optar al título de

QUIMICO BIOLOGO

Guatemala, mayo de 1995.

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE

CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANO	LIC JORGE RODOLFO PEREZ.FOLGAR
SECRETAR 10	LICDA. ELEONORA GAITAN
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR. JORGE LUIS GALINDO AREVALO
VOCAL V	BR. EDGAR ANTONIO GARCIA DEL POZO

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

MAESTO Y FORTALEZA DE MI EXISTENCIA

A MIS PADRES

**EGIDIO CALDERON MONTERROSO (Q.E.P.D)
FRANCIS CASTILLA SHAUL DE CALDERON**

POR SU AMOR Y APOYO EN TODO MOMENTO

A MIS HERMANOS

GLORIA LISETH Y VILMA MAR IBEL

A MIS SOBRINAS

BARBARA Y MARIA JOSE

AGRADEC I M I ENTOS

A la Licda. Vivian Matta Rfos, por su asesorfa y consejos brindados en la elaboraci6nde esta tesis.

A la Licda. Beatriz L6pez y Lic. Gustavo Adolfo Gini por su valiosa colaboraci6n en la revisi6n de este trabajo.

Al Lic. Federico Nave por su valiosa asesoria estadfstica.

Al Departamento de Citohistologfa de la Facultad de Ciencias Qufmicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo de investigaciOn.

A la Familia Ramirez Escalante por el apoyo que en todo momento me brindaron.

A todas las personas que de una u otra forma colaboraron en la realizaciOn de este trabajo.

INDICE	PAG.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. ANTECEDENTES	
A. Datos Histbricos	4
B. Morfologfa, Ciclo de vida y Habitat	4
C. Caracterfsticas Bioqufmicas del parâsito	6
D. Inmunologfa del paresito	7
E. Patologfa	11
F. Epidemiologfa	15
G. Cultivos <i>in vitro</i>	17
H. Metodos de DiagnOstico	19
IV. JUSTIFICACIONES	26
V. OBJETIVOS	27
VI. HIPOTESIS	28
VII. MATERIALES Y METODOS	29
VIII. RESULTADOS	33
IX. DISCUSION DE RESULTADOS	35
X. CONCLUSIONES	37
XI. RECOMENDACIONES	38
XII. REFERENCIAS	39
XIII. ANEXOS	47

I. RESUMEN

En Guatemala se estima que la incidencia de *Giardia lamblia* oscila entre 2.4-5.6%, sin embargo estos datos no son tan certeros ya que muchas veces la presencia del parásito no es detectada.

Hasta la fecha el diagnóstico de la giardiasis se realiza por la demostración de los quistes y trofozoitos del parásito en las heces de pacientes sintomáticos y asintomáticos, sin embargo la sensibilidad de estas técnicas depende de la experiencia del observador, del tiempo empleado en cada observación y la cantidad de quistes excretados,

El propósito de esta investigación fue evaluar la efectividad del medio TYI-S-33 modificado de Diamond's para el cultivo *in vitro* de *Giardia*. — El contar con cultivo de este parásito permitiría la producción de antígenos que serán utilizados para implementar nuevas técnicas diagnósticas de la infección y determinar la presencia de anticuerpos específicos en pacientes asintomáticos y sintomáticos. De obtener resultados favorables se podría utilizar este método en estudios clínicos y epidemiológicos.

Para ello se colectaron 24 muestras de heces que presentaron más de 6 quistes por campo (40x). Cada muestra se purificó para eliminar el debris celular, con agua destilada se concentraron los quistes, los que posteriormente fueron desenquistados. Los trofozoitos obtenidos se inocularon en el medio TYI-S-33 modificado de Diamond's y se incubaron a 37°C.

De los ensayos realizados se pudo demostrar que el medio TYI-S-33 modificado de Diamond's no es efectivo para cultivar *Giardia lamblia* ya que únicamente en tres de los veinticuatro ensayos realizados, los trofozoitos permanecieron viables por 10 días, en los ensayos restantes estos se mantuvieron viables en un rango de 4 a 8 días. Además se le considera un método no reproducible por la variabilidad obtenida en cada uno de los ensayos.

Se concluye entonces que las técnicas de purificación, concentración y desenquistamiento son efectivas mientras que el medio TYI-S-33 bajo las condiciones en que se llevó a cabo el estudio, parece ser un medio no efectivo para cultivar *Brucella abortus* recomendándose continuar con las Investigaciones usando un mayor número de muestras, para poder contar con parámetros disponibles para preparar el antígeno que podrá ser utilizado para estandarizar nuevas técnicas como alternativa en el diagnóstico de la brucelosis en nuestro país.

II. INTRODUCCION

La giardiasis es una infección parasitaria, cuyo agente etiológico es *Giardia lamblia*, protozoo flagelado que se transmite por la ingestión de alimentos y agua fecalmente contaminada o bien por contacto feco-oral y adheriéndose posteriormente a la membrana epitelial del Intestino humano por medio del disco ventral que posee. Esta infección tiene las manifestaciones clínicas de diarrea, flatulencia, anorexia y síndrome de mala absorción. Generalmente afecta a niños, homosexuales, viajeros y personas hospitalizadas (1,2).

Hasta la fecha el diagnóstico se realiza por la demostración de los quistes y trofozoitos en las heces de los pacientes sintomáticos o asintomáticos. La observación del parásito se hace microscópicamente en dos preparaciones, una con solución salina y la otra con lugol. Existen además otras técnicas para colorear las heces que permiten observar de una forma más clara el parásito, sin embargo la sensibilidad de estas técnicas depende de la experiencia del observador y del tiempo empleado en cada observación. Es necesario también considerar poca cantidad de quistes que a veces se excretan, por lo que se complica aún más el diagnóstico de la infección.

Por ello se hace necesario implementar otros medios de diagnóstico entre ellos el medio de cultivo de *Giardia lamblia*, lo que permitiría la producción de antígenos que podrían ser utilizados para determinar la presencia de anticuerpos en pacientes sintomáticos y asintomáticos y otros estudios clínicos y epidemiológicos.

III. ANTECEDENTES

A. Datos Históricos:

La *Giardia lamblia* fue el primer protozoo que se describió como agente causal de enfermedad diarreica en humanos (1). Su presencia ha sido descrita por más de 300 años alrededor del mundo y su descubrimiento se le atribuye a Leeuwenhoek y que él fue el primero en observarla en sus propias heces en 1681 (1,2).

En 1915, Stiles lo describió como un protozoo flagelado, que habita el intestino delgado del hombre y que cause síntomas de diarrea, flatulencia, anorexia y síndrome de mala absorción, denominando portadores asintomáticos a quienes no presentan síntomas (3,4).

Se le ha encontrado en pacientes inmunosuprimidos, niños, adultos, viajeros, homosexuales y es el responsable de epidemia en hospitales y poblaciones completas (5,6).

B. Morfología, Ciclo de Vida y Hábitat:

La *Giardia lamblia* pertenece a la clase Mastigophora, es un patógeno intestinal, afecta principalmente el duodeno (3,7). El ciclo de vida de este parásito está dividido en dos fases: trofozoito y quiste. Los trofozoitos habitan en el intestino humano son bilateralmente simétricos y se observan en muestras de heces diarréicas (4). Su tamaño promedio es de 14 µm, tiene forma piriforme o de balón de fútbol americano y presenta un disco concavo ventral en la porción anterior (7,8). Presenta movimiento de hoja al caer sin dirección, presenta de 2-4 núcleos, flagelos y fibrillas, además de cuerpos parabasales y citoplasma retraído de la pared. En cada núcleo hay un endoplasma central grande, sin gránulos de cromatina, en la membrana nuclear presenta estructuras baciliformes que reciben el nombre de exastilos, los cuales se forman

por fusión de los flagelos ventrales y grupos asociados a microtúbulos, generalmente poseen 4 pares de flagelos (8). A cada uno de estos flagelos se les ha llamado según su ubicación anterior, posterior, ventral y caudal, y surgen de un axonema correspondiente que a su vez se origina un cuerpo basal o cinetosoma. En la parte posterior, con respecto al disco adhesivo se encuentran dos cuerpos medio curvados los cuales se unen intensamente y se confunden con granulos cromatóides o cuerpos parabasales y se cree que sirven de apoyo al organismo o bien que participan en procesos de metabolismo y energía. En el sentido dorsal es convexo mientras que en el sentido ventral es plano por lo que tiene aspecto de tetero cortado sagitalmente; en donde el disco adhesivo es la cavidad uterina y el extremo aguzado corresponde a la porción cervical (7).

La división tiene lugar en sentido longitudinal después de la duplicación de las organelas. El desenganamiento ocurre cuando los trofozoitos pasan al intestino grueso donde se pierden los flagelos. Los quistes son capaces de sobrevivir en agua hasta por tres meses, son susceptibles a la desecación a 50°C y sobreviven a la clorinación normal de agua potable urbana. Cuando se utiliza yodo para su observación los núcleos y fibrillas resaltan aún más, los que contienen almidón se colorean de azul, por lo que se les denomina "Giardias azules". Los quistes jóvenes pueden presentar reservas de glucógeno, **enmascarando algunas veces** las estructuras internas (4).

Al ser ingerido el quiste es eclosionado en el duodeno y el trofozoito se fija por medio de su disco succionador a las células epiteliales (7,8). Un pH de 6.0-7.0 es favorable para el desarrollo del patógeno, encontrándose este pH en las criptas del duodeno y porción superior del yeyuno, la infección es intensa y aumenta conforme se acerca al ciego. Cuando existen infecciones las paredes del intestino se encuentran

recubiertas por Giardias cuyos flagelos quedan libres (7).

La capacidad de adhesión del disco succionador impide que los trofozoitos aparezcan en las heces por lo que aparecen cuando la diarrea es intensa (3,8).

C. Características Bioquímicas del Parasito:

La membrana externa del parásito es la interfase de las células huésped con el medio ambiente y esto implica el compromiso en la supervivencia del microorganismo en interacción con el huésped (9). Para estudiar la superficie de la pared del parásito intestinal se han estudiado lectinas, con proteínas asociadas o unidas específicamente a ciertos residuos de azúcares (10,11). En 1981, Hill y colaboradores demostraron la especificidad de la aglutinina del germen de trigo unido a la superficie de trofozoitos de *Giardia* por un ensayo de microaglutinación cuantitativa y microscopía fluorescente (12).

En 1985, Ward y colaboradores demostraron por medio de lectinas marcadas con aglutininas de germen de trigo que la quitina es el componente principal de la pared química. Se utilizaron 12 lectinas de las cuales solamente la N-acetilglucosamina y succinato fueron observadas en la pared del quiste. Se observó que las aglutininas marcadas son eliminadas completamente por el tratamiento de los quistes con la quitinasa purificada. Este efecto es específico dado que puede ser prevenido por la incubación de la enzima con la quitina antes de tratar el quiste. El tratamiento de quistes de N-acetil-B-glucosaminidasa inhibe parcialmente a las aglutininas del germen de trigo marcadas mientras que otras glicosidasas y proteasas no tienen efecto. Estos hallazgos que la quitina es el mayor componente de la pared de los quistes de *Giardia sp.* aumenta la posibilidad de que inhibidores de su síntesis puedan ser usados en la prevención del enquistamiento y así controlar la propagación de la enfermedad (13).

En 1990, Ortega-Barria y colaboradores sugirieron que los residuos de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) son el mayor componente de trofozoitos y quistes después de la quitina. Para ello utilizaron varios análisis, entre ellos lectina marcada, digestión de glicosidasa, galactotransferasa marcada, análisis inmunológico usando anticuerpos específicos para GlcNAc y oligómeros B1-4, y por cromatografía de gas/espectrofotometría de masas (GC/MS). Los resultados mostraron que la N-acetil-D-glucosamina es parte de la composición de los ancares de los quistes y trofozoitos de *Gardia lamblia* y sirve como un receptor de aglutininas de germen de trigo marcadas para el parásito (14).

Además de los estudios de la pared celular del parásito se ha estudiado el metabolismo de este, principalmente en lo que se refiere a la síntesis de los nucleótidos de las bases purínicas y pirimidínicas. Se pudo establecer que presentan deficiencias metabólicas para la síntesis de estas bases y adquieren esencialmente todos los nucleótidos de adenina por la función de la adenina-torribosil transferasa y los nucleótidos de guanina por la guanina-torribosil transferasa (15-17).

Estos hallazgos han permitido evaluar las enzimas blanco del parásito que son de vital importancia para el éxito del tratamiento. Para *G. lamblia* se encontró solo una enzima blanco que es la torribosil transferasa es homogénea y muestra un sustrato (laico y específico propio como un blanco terapéuticamente potencial, a partir de estos datos se consideró que la falta de efectividad de los tratamientos a sido atribuida a la presencia de múltiples vías purínicas difíciles de bloquear con un simple compuesto y la carencia de un potente inhibidor de la torribosil transferasa (15).

D. Inmunología del Parásito:

Existen varias respuestas inmunológicas al parásito, que sugieren que

en el curso de la Infección y su relación con el parásito tanto la respuesta inmune humoral como celular son importantes (3).

Esta respuesta inmune no ha sido bien estudiada, el desarrollo de cada respuesta es sugerido por la propia limitación de la infección, y por la aparente especificidad de anticuerpos anti-*lamblia* en el suero de pacientes infectados, por el aparente incremento en la susceptibilidad de la infección en personas hipogammaglobulinémicos y por la disminución de la sensibilidad a largo de los residentes en áreas endémicas comparadas con los visitantes (18-21).

La respuesta inmune puede ser modulada por varios factores, se sugiere que la primera exposición aumenta la resistencia a una segunda infección y que la deficiencia de inmunoglobulinas en estos pacientes puede incrementar la susceptibilidad a esta infección. Anticuerpos anti-*C. ismtills* circulantes y monocitos citotóxicos también participan en esta modulación (22,23).

En pacientes inmunológicamente normales se ha encontrado que los anticuerpos circulantes contra *Giardia sp.* son del tipo IgG, ya que este parásito se establece inicialmente en el lumen intestinal y se espera que los anticuerpos secretorios jueguen un rol en la respuesta inmune del parásito. Aunque se ha observado que el nivel de IgA secretoria está disminuida, el de IgM está deficiente y el de IgE circulante está elevado, la IgG e IgA secretoria han sido implicadas en la protección contra *Giardia lamblia* (19,20, 24).

Se ha observado que no hay diferencias significativas en las subpoblaciones de linfocitos T y B en sangre periférica con o sin Giardiasis, lo cual se cree que es la causa de producir cantidades normales de IgG e IgM. Existe una falla en la función de células T

- -ayudadores que no permiten que las células B terminales o células B acepten signos de maduración y diferenciación de células T-ayudadores (21).

La diferencia de susceptibilidad a la infección en humanos se debe en parte a su capacidad diferencial de producir anticuerpos y responder efectivamente a la invasión de trofozoitos de *G. lamblia*. Estos anticuerpos pueden eliminar a los trofozoitos por la unión con el antígeno e interferir así con la sobrevivencia del trofozoito en el intestino humano, aglutinar el parásito, unirse con el flagelo e impedir la movilidad o participación del complemento y/o células mediadas por toxicidad (monocitos citotóxicos) (21).

Las células T son necesarias para la producción de anticuerpos intestinales y los fagocitos mononucleares funcionan como células efectoras y reguladoras del sistema inmune (24,25).

En 1980, Owen y colaboradores observaron placas de Peyer's infectadas con este parásito con acúmulos de macrófagos entre las células del epitelio columnar y trofozoitos adheridos. La formación de linfocitos en roseta alrededor de los macrófagos que han ingerido los trofozoitos indican un importante proceso antigénico de los macrófagos (26). Los macrófagos con trofozoitos de *G. lamblia* derivan de monocitos humanos y están asociados con la respiración oxidativa y destrucción intracelular de los trofozoitos (24,25).

En 1987, Nash y colaboradores descubrieron que en la superficie de los trofozoitos de *G. lamblia* se encontraba el antígeno de superficie que es un polisacárido y que en SDS-PAGE su peso molecular se encuentra entre 94000-225000 Mr. Más adelante Einfeld-Stibs, determinaron que una proteína de 82000 Mr estaba presente en 4 cepas diferentes de *Gardle sp.* Edson y colaboradores posteriormente observaron por

medlo de yodlnacien, con lactoperoxidasa o 16dogeno, ambos con residuos de tirosIna yodlnada, que algunos paresltos poseen sotamente un antigen° mayor de superficie, y que este antigen° es una protefna molecular entre 82000-88000 Mr (18,27)

Un examen adicional de estas cuatro cepas y otros parasitos demostr6 que el epitope reconocido como GL-1 es especff ico para *6 /8mb/ie* y que no reconoce a *6 mur/s* . Sin embargo ratones BALB/c Inmunes *6 muris* inmunoprecipitan el inmunageno mayor de *6 muds* que es una proteins de 82000 Mr, lo que hace suponer que to protein° mayor de superf Icie es anéloga a la reportada pare *6 lamblia* (88000 Mr). Se ha establecido que el suero humano contiene anticuerpos e inmunidad protectora contra el paresito. En el sitio de replicaci6n, el intestino delgado, el paresito esta accesible unicamente a anticuerpos secretorios especialmente del tipo IgA. Los resultados de otros estudios han demostrado que los trofozoftos adheridos a celulas epiteliales del intestino, producen anticuerpos monoclonales GL-1 que impiden que se adhieran mas parasItos y slendo la parte efectora de este funcian le proteins 88000 Mr (18).

Se ha demostrado que existen tres tipos de anticuerpos especff icos a antigenos PM/GLSA-82 de *6 Iamb//a* en los suJetos con Glardiasls. Los titulos de los tres anticuerpos (CGE, PM, GLSA-82) son independientes de to edad y el sexo de los suJetos con infecciOn persistente los nivetes de anticuerpos anti-PM/GLSA-82 no son signif icativamente altos, mientras que la concentracien de anticuerpos anti-CGE si lo son. SuJetos con infeccian no persistente deserrollaron tftulos de anticuerpos a los tres antigenos. Despues de recibir quimioterapia adecuada se encontr6 que los pacientes con Infeccian no persistente respondieron bien a Ia terapia, mientras que los pacientes con infecci6n persistente no to hicieron. Se concluy6 que era necesario la presencia de los tres anticuerpos anti -PM/GLSA-82 y CGE pare atterar Ia funcien de la membrane del paresito

y que estos anticuerpos circulantes en pacientes con infección persistente pueden ser el resultado de la hipogammaglobulinemia (21).

E. Patología:

Las manifestaciones clínicas en la fase aguda de la Giardiasis son náuseas, anorexia, defecaciones acuosas y explosivas, esteatorrea, mala absorción y retortijones medio-epigástricos. Al principio puede confundirse con la disentería amebiana o bacteriana aguda, pero se diferencian por el mal olor de las heces, flatulencia, distensión abdominal, junto con la ausencia de pus y sangre. Además se sospecha de la presencia del parásito por los síntomas sub-agudos con episodios periódicos de defecación blanda y maloliente y con evidencia de esteatorrea (2,7).

El efecto de la infección en la mucosa del intestino delgado puede ser detectado por la evaluación de síntomas por la prueba de absorción, medición de enzimas de la mucosa y por examen histopatológico de una o más biopsias donde se evalúa la arquitectura alterada de la mucosa con acortamiento o ausencia de las microvellosidades lo cual produce el síndrome de mala absorción. Además, el daño a nivel de cepillo en el aspecto luminal del epitelio de columnares da como resultado la deficiencia de enzimas como la lactasa (disacaridasa), la cual puede ocasionar una diarrea osmótica después de la ingestión de leche (23, 28). La alteración del transporte de sodio puede ocasionar una secreción neta de agua y sodio ocasionando una diarrea secretora. Finalmente los efectos histopatológicos de la infección incluyen cambios en el número, tipo y distribución de células linfoides en la mucosa, abarcando parte de la evidencia de la presencia de reacciones de inmunidad y/o hipersensibilidad. Las técnicas utilizadas para examinar las anomalías intestinales en ratones con giardiasis podrán ser aplicadas en el examen de biopsia del intestino delgado de pacientes con

este enfermedad, estas Incluyen le medIclen de Ia arquitectura de in mucosa (microvellosidades de las criptas y proliferacion de celulas en las criptas), cuantificacion en el borde de cepillo de enzimas disacéridasas y conteo de linfocitos intraepitellales. Los efectos de la infeccienrenicafueron establecidos al comparar resultados de una cepa de racion Infectados con *6 muris* con una no infectada (28,29).

Se ha asociado Ia presencia de *6 faz011e* con s(ndrome de mala-absorcion lo cuól conlleva una deficiencia en el transporte de glicina y glucose, los que son activamente absorbidos, edemas de los mecanismos de transporte que se han visto afectados por el deo en las celulas de maduracl6n. La cantidad de lesiones que hay en la mucosa se han relacionado con el grado de severidad del s(ndrone de mala-absorcion, siendo estas lesiones causadas por el disco ventral que se fija a Ia mucosa (29).

En 1982, Amend y colaboradores estudiaron 6 ratones de cuatro semanas de edad y de diferente sexo Infectados con *GUardia* y 6 ratones como grupo control. Se les extrajo el intestino el cual se lavo con soluclen saline frfa y el contenido intestinal se evalu6 inmediatamente bajo el mIcrosoplo observandose la movilidad de los trofozoftos del parésIto. Despues de evaluar microscopicamente el contenido Intestinal se le mId16 el trasporte de glicina, glucose y alanina, asi como ensayos enzinnaticos de in lactose, sucrose, glucosa-oxIdasa-peroxIdasa, lactato deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, transaminasa gluternico oxelacitica y transaminasa gluternIco pirUvica. Se concluy6 que en los ratones Infectados el transporte de glicina, glucosa y alanina estaba dismimuido, mientras que en los ensayos enzinnaticos In fosfatasa alcalina,,sucrosa y lactose estaban disminuidas mientras que las otras enzimas no variaron (30,31).

En 1979, L6pez-Brea y colaboradores realizaron un trabajo donde

estudiaron 164 niños con asma bronquial y 35 niños normales como grupo control, la edad de los niños fluctuó entre 1-14 años. Se les evaluó 2 muestras de heces a cada uno Investigándose la presencia del parásito con la técnica de concentración formol-Oter modificado. En 22 muestras fue confirmada la presencia del parásito (5.71%), por lo que se concluyó que a Lamb/ia se puede asociar con asma bronquial. En forma paralela se estudió a niños de 17 meses de edad con diarrea crónica de 4 meses de evolución, utilizando la técnica de IFAT (técnica de inmunofluorescencia Indirecta para antígenos) encontrándose 15 positivos a un título de 1:320. Los niños fueron tratados con metronidazol, a los meses fueron evaluados nuevamente por el método de IFAT (técnica de inmunofluorescencia indirecta para antígenos) y los títulos encontrados fueron 1:40 como resultado negativo (32).

En 1991, Al-Tuklel y colaboradores estudiaron 5 ratones BALB/c donde se les evaluó diferentes secciones del yeyuno, duodeno e ileón. La mayor cantidad de trofozoitos fue observada en el yeyuno. Al examen histológico otros dos ratones no presentaron cambios muy marcados, mientras que a los otros tres ratones se les observó la presencia de células inflamatorias (linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos) en la región donde se encuentran microvellosidades y las criptas. Las observaciones por microscopía electrónica revelaron que los trofozoitos de *G. lamblia* se encontraban en la región de las microvellosidades y criptas, y además se observarían lesiones producidas por la adhesión del disco ventral de los trofozoitos (33).

Existen varios factores que predisponen a la sintomatología y entre ellos la aclorhidria y la hipogammaglobulinemia y es por ello que personas infectadas con pocos parásitos presentan síntomas severos, mientras que los que presentan numerosos parásitos no tienen síntomas. Otros dos factores importantes son la desnutrición de niños,

especialmente por la falta de alimentos con proteínas y carbohidratos, y en adultos después de una gastrectomía y que aumenta la sensibilidad a la infección (23). Otros factores no se encuentran propiamente relacionados con la persona infectada sino que con el parásito en sí y estos son el tipo de cepa aislada y el tipo de isoenzimas que se encuentren presentes en el parásito. En 1989, Cedillo-Rivera y colaboradores aislaron 19 cepas de pacientes sintomáticos y asintomáticos en Ciudad de México. A las cepas aisladas a partir de cultivo axénico se les demostró por electroforesis la presencia de 8 de las 10 isoenzimas estudiadas, estas enzimas incluyen lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, enzima malica, glucosa deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, fosfoglucomutasa y glucosa-6-fosfato isomerasa. Se encontró que la lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, enzima malica, glucosa deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato isomerasa muestran solo una banda, es decir un zimodemo. Mientras que la fosfoglucomutasa muestra tres bandas es decir tres zimodemos diferentes (34).

En 1991, Abaza y colaboradores realizaron un estudio donde analizaron las enzimas de 4 cepas: cepa WB (Nebraska, USA), cepa UNO (Ismailia, Egipto), cepa EGY y cepa VA (Georgia, USA), esta última aislada de pacientes asintomáticos. Las cepas WB y UNO fueron aisladas de aspirados duodenales, mientras que VA y EGY fueron de una especie de ratas (*Meriones unguiculatus*) a las que se les inoculó el parásito. Las cepas fueron mantenidas en medio de Keister's en el CDC de Atlanta y se encontraron múltiples isoenzimas de enzima malice (ME), esterasa (ES), fosfoglucomutasa (PGM), glucoisomerasa (GPI). Las cepas de WB y VA fueron asignadas al zimodemo I, las de EGY al zimodemo II, y las de UNO al zimodemo III ya que se encontraron bandas traslapadas del zimodemo I y II. La cepa EGY es de baja infectividad y produce bajo número de quistes comparado con WA y VA, la infectividad y excreción de quistes de

Ia cepa UNO es intermedio entre los dos grupos (35).

F. Epidemiología:

La incidencia de *Giardia sp.* en el mundo no se conoce con exactitud. Su distribución es cosmopolita tanto en áreas templadas como tropicales y se ha encontrado asociado a epidemias que se han originado a partir de agua contaminada, entre los viajeros, turistas y residentes de las poblaciones. Los turistas que retornan de Rusia, Portugal y cualquier parte del mundo han sufrido los efectos nocivos de este parásito. La distribución de *Giardia sp.* es mundial y la incidencia en los Estados Unidos es de 4-7 % de todas las muestras de heces observadas, siendo observado mayormente en niños y homosexuales (hombres) (27,36).

Se ha visto que el agua está implicada como origen común de epidemias en varios lugares, siguiéndole la transmisión mano-alimento-boca y mano-boca (36).

En 1966 en Camas, Washington se confirmaron 128 casos con infección por *Giardia lamblia* durante la primavera. En 1970 en el refugio de esquiadores de Aspen, Colorado también se reportó una epidemia que se originó a partir de la contaminación del agua del pozo que abastecía la ciudad y se encontró el 11% de los vacationistas y el 2% de los residentes infectados. En 1978, se estudiaron a 100 pacientes cubanos cuyas manifestaciones clínicas fueron compatibles con síndrome de ulceración y con el 56 % presentando el parásito en la muestra de heces. En ese mismo año en Vail, Colorado se reportó un brote que resultó de la obstrucción de un drenaje, cuyo escurrimiento contaminó el arroyo que dote de agua a la ciudad (7,23).

Como es sabido es una enfermedad protozoaria que afecta tanto al hombre como a una variedad de vertebrados salvajes y domésticos. En

1985, Kirpatrick-Green IV y colaboradores en un primer experimento infectaron 6 gatos con trofozoitos de *Giardia lamblia* provenientes de humanos los que fueron observados durante 80 días. El parásito fue observado únicamente en las muestras de heces el primer día. En un Segundo experimento Inocularon 8 gatos con quistes de *Giardia lamblia* aislados de humanos y los observaron por un periodo de 8 semanas, dos de los ocho gatos presentaron quistes de *Giardia lamblia* en sus heces únicamente los dos primeros días, negativizándose después. Las observaciones en el Intestino no revelaron la presencia de trofozoitos por lo que se concluyó que los gatos no son probables reservorios de *Giardia lamblia* (36,37).

Estudios epidemiológicos han identificado aspectos de la inmunidad y su papel en la protección de la enfermedad. La edad relacionada con una alta prevalencia de *Giardia lamblia* en los grupos endémicos es la infancia (25).

Las variaciones geográficas podrían explicar aparentemente los hallazgos discrepantes. En Finlandia los casos de infección por *Giardia lamblia* son raros excepto en personas que han viajado fuera de este ciudad (38).

Se ha demostrado que los quistes de *Giardia lamblia* sobreviven más tiempo en agua fría que en agua caliente por lo que se le considera de importancia epidemiológica y además explica el porqué de muchas epidemias como en el caso de Leningrado, U.R.S.S. (1974), Camas, (1977) Washington (1977), Rome, New York (1977) y Berlin New Hampshire (1977) (39).

Los estudios sobre la incidencia de esta infección en Guatemala no existen, más bien los pocos estudios que existen se tratan a nivel clínico.

En base a las estadísticas realizadas en Hospitales Nacionales se ha encontrado una incidencia que oscila entre 2.4 % a 5.6 %.

G. Cultivos *in vitro*:

Los estudios de medio de cultivo *In vitro* para *Amoeba* data de 1927, más sin embargo fue hasta en 1960 cuando Karapetyan logró cultivar trofozoitos del parásito simbióticamente con fibroblastos de pollo y *Candida/Hermondis* o fibroblastos de conejo* y *Saccharomyces cerevisiae* (1,2).

Para llevar a cabo la realización del medio de cultivo y su inoculación existen dos pasos previos que son claves para el éxito del cultivo y que son la purificación de los quistes y el desenquistamiento. Para la purificación de los quistes se han probado varias técnicas una de ellas fue descrita en 1979 por Bigham and Meyer quienes purificaron las heces por medio de un gradiente de concentración con sacarosa, con muy buenos resultados por lo que concluyeron que es un método efectivo y reproducible (4, 40). En 1983, Spaulding y colaboradores usaron membranas Gelman Metricak, MA-1 25 mm y mallas de dacron de spacers (millipore Tipo AP-32) las que son removidas después de la filtración, fijadas en caliente con una solución fijadora de Schaudin (50°C) y teñidas con tinción tricrómica. Después son hidratadas y se aclaran con xileno y puesta en un portaobjetos, cubierta con otro portaobjetos y lista para hacer conteo de quistes. Este método permite distinguir las características internas de los quistes; es un método preciso y reproducible (41).

En 1987, Douglas y colaboradores utilizaron como técnica de separación una columna de Sephadex G-50, concluyendo que es una buena técnica de purificación de quistes a pesar de ser una técnica tediosa (42)

Para la etapa de desenquistamiento se han descrito varias técnicas como la de Bigham-Meyer, donde los quistes purificados son expuestos a jugo gástrico sintético (4). La técnica descrita por Rice-Schaefer III está dividida en dos pasos importantes, el primero es por medio de la inducción a pH bajo y segundo usar un medio exclusivo para desenquistar el cual contiene solución de Hanks, L-cisteína-HCl y glutatión y bicarbonato de sodio, pH 2.0, todas estas soluciones a 37°C (43,44).

Los trofozoitos han sido cultivados exitosamente en el medio HSP-1 descrito por Meyer en 1976, subsecuentemente en TPS-1 (tripticasa-triptin casein digest, panmede-digest I iver-suero) desarrollado inicialmente para *E. histolytica* (45).

En 1980, Vlsvesvara utilizó el medio TPS-1 desarrollado por Diamond's en 1968, el cual contiene suero bovino inactivado, medio NCTC-109 en lugar de la mezcla de vitaminas, el caldo de tripticasa es esterilizado por filtración en lugar de ser autoclaveado. El número de trofozoitos se mantuvo en aumento los primeros siete días, mientras que a partir del octavo estos descendían (45,46). En 1980, Giffin-Diamond usaron el medio TPS-1 modificado y esterilizado por filtración, determinando que los porcentajes de eficiencia de formación de colonias con trofozoitos de *E. histolytica* fue de 20-40 % (47).

En 1981, Bathla-Warhurst usaron el medio TPS-1 con 10% de suero de caballo, 40 µg/ul de gentamicina e incubado en posición horizontal a 37°C por una hora, con suave rotación pasado este tiempo se coloca en posición vertical. Al criopreservarse en ampollas con nitrógeno líquido y por 5 meses se comprobó que conservan el 50 % de su movilidad (3,40,48).

En 1984, Gordts y colaboradores utilizaron el medio TPS-1 con las modificaciones, de adicionar suero fetal de ternera al 10% y una solución de NCTC-135 al 10% con solución de L-glutamina y 100 IU/ml de

Penicilina G, 100 mg/I Streptomina, 20 mg/I de Vancomicina y 20 mg/I de Clindamicina. Observando durante los primeros 8 días un aumento en el número de los trofozoitos los que descendían a partir del 9o. día (49).

En 1983, Keister utilizó la versión modificada del medio TYI-S-33 (tripticase-extracto de levadura-hierro-suero) que contiene bilis y cistina como reactivos adicionales. Cada medio contiene: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , tripticase, extracto de levadura, glucosa, citrato ferrico amónico, bilis bovina y suero bovino inactivado (56°C por 30 min.), el pH 7.0-7.2 con NaOH 1 N (45,50-52). En 1983, Wallis-Wallis describieron el uso del medio TYI-S-33, e inocularon este con trofozoitos provenientes de *Meriones unguiculatus* con heces provenientes de perros y humanos. Los únicos que se lograron cultivar fueron los que se inocularon con heces de humanos (53).

En 1987, Meloni-Thompson realizaron un estudio comparativo de cultivos exógenos *in vitro* con *Giardia sp.* de origen humano y canino, el medio de cultivo que utilizaron para aislar el parásito fue el medio BI-S-33 (Biosate-Suero inactivado) el cual contiene peptone biosate, glucosa, NaCl, L-cistina-HCl, ácido ascórbico, bilis bovina, citrato ferrico amónico, NCTC-135, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , suero fetal de ternera inactivado, 1×10^4 U de Penicilina G, 10 mg de estreptomina, 5 mg. de gentamicina y agua destilada. Los trofozoitos de *Giardia sp.* provenientes de humano fueron los únicos que fueron aislados (54). Hautus y colaboradores también describieron el uso del medio BI-S-33 para aislar *A. lemblia* de origen humano (3).

H. Métodos de Diagnóstico:

El diagnóstico de Giardiasis se base en la historia clínica del paciente y la confirmación de la presencia del parásito en las heces del paciente.

1. Diagn6stico CI fnico:

En primer lugar el diagn6stico clinico de esti+ infecci6n se debe diferenciar entre Ia disenterfa amebiana o bacilar aguda. Este diagn6stico se base en Is historia clinics del paclente signos y sfntomas tfpicos de la infecci6n si es que los presents, ya que existen pacientes sintomaticos y asintomaticos. Las manifestaciones agudas son nadseas, anorexia, defecaciones acuosas y explosives, esteatorrea, sindrome de mala-absorci6n y retorti Jones medio-epigastrIcos. Se diferencia con disenterfa amebiana o bacilar aguda por el mel olor de las heces, flatulencia, distensi6n abdominal, ausencia de pus y sangre (7).

2. Diagn6stico de Laboratorio:

El diagn6stico de laboratorio se realice por medio de la IdentificaciOn microsc6pica del paresito en heces, Ia cual va a depender de Is experlencia del observador, el tiempo que dedique en observer cede muestra y cantidad de quistes presentes en In misma.

3. Diagn6stico Serol6gico:

Debido a lo dificfl que es diagnosticar esta infecci6n tanto en pacientes sintomaticos como asintometicos se hace necesario el estandarizar tknicas especff Ices que puedan detectar anticuerpos y antfgenos, tanto en suero como en muestra de heces. Las ticnIcas que se hen estandarizado son Inmunofluorescencia (IFI), ELISA y Electroforesis en gel de pollacrilamIda.

En 1980, Visvesvara y colaboradores usaron Is tcnica de Ill pare detectar anticuerpos anti 6. *Iamb//a* en suero, utilizando como antfgeno trofozofto de *G. Aembllle* . En 29 de los 30 pacientes con Giardiasis

sintomáticos los títulos encontrados fueron de 1:16 a 1:1024, comparado con el grupo control de pacientes sanos que presentaron títulos de 1:2 a 1:4. Los títulos en 15 pacientes infectados con *A. lumbricoides*, *E. histolytica* o cualquier bacteria intestinal fueron menores de 1:16. El test de IFI para anticuerpos anti- a *Iamb/ia* es específico y reproducible, siendo kit en estudios epidemiológicos e inmunológicos de Giardiasis. Los títulos sericos en individuos es 93.9% reproducible (55).

En 1982, Moody y colaboradores realizaron un estudio comparativo en pacientes infectados con y con enterobacterias aisladas de la parte alta del intestino de pacientes con Giardiasis severa, a quienes se les determine los anticuerpos sericos por medio de inmunofluorescencia. Fueron evaluados 51 pacientes los que estaban divididos en 8 grupos: Giardiasis con severa mala-absorción y anomalías histológicas de la mucosa yeyunal, Giardiasis sin mala-absorción y con morfología yeyunal normal, Sprue tropical, enfermedad celíaca, amebiasis intestinal invasiva, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn's y el grupo control. A cada paciente se les determine anticuerpos contra *Giardia sp.* y contra algunas enterobacterias, encontrándose anticuerpos contra *Giardia sp.* en 8 casos del grupo con Giardiasis con severa mala-absorción y anomalías histológicas de la mucosa yeyunal y ausente en 5 casos del grupo con amebiasis intestinal invasiva y en 6 casos del grupo control. Anticuerpos bacteriales y anticuerpos contra a *Iamb/ia* se encontraron solamente en 2 grupos, 2 casos del grupo Sprue-tropical y 2 casos del grupo con enfermedad celíaca. En base a lo observado se concluye que estos dos tipos de anticuerpos no presentan reacciones cruzadas y que la técnica de inmunofluorescencia es una buena técnica para diagnosticar esta infección (56).

Algunas desventajas de la técnica de IFI es que debe ser observada en microscopio fluorescente y luego tiene que ser interpretada, y es difícil de cuantificar. Por lo tanto se hace necesario usar otro tipo de técnicas que

permitan cuantificar anticuerpos. En 1981, Smith y colaboradores usaron el método ELISA el cual no necesita fijación y utiliza como antígenos trofozoitos intactos de *Giardia lamblia*. Al emplear este ensayo demostraron que 81 % de los 59 pacientes con Giardiasis sintomática y 12 % de sujetos del grupo control presentaban anticuerpos IgG circulantes de *Giardia lamblia*. 11 de 15 pacientes que fueron evaluados seriadamente presentaron anticuerpos desde 2 semanas hasta 15 meses después de la terapia para infección aguda. La prevalencia de anticuerpos en 197 individuos no seleccionados en Washington, D.C. fue de 14 % y títulos altos de anticuerpos fueron detectados en 3 de 7 pacientes con infección recurrente. ELISA es un ensayo que puede ayudar para futuras caracterizaciones de anticuerpos como respuesta a la infección de *Giardia lamblia* (57).

En 1987, Nash y colaboradores usaron un test de ELISA que detecta antígenos de *Giardia lamblia* en heces de humanos infectados con dos cepas diferentes de *Giardia*, GS/M e (Sr. Fueron evaluados un total de 277 muestras de heces de voluntarios 74 fueron infectados con la cepa 'sr y 203 con la cepa GS/M. Del primer grupo 72 tenían quistes y a 69 (94.5%) se les detectó el antígeno. De los 203 infectados con la cepa GS/M a 108 se les detectó el antígeno y solamente 73 presentaron quistes. En otro grupo de 18 voluntarios, ninguno de los 5 inoculados con la cepa 'sr presentó la infección, no se les detectó el antígeno. De los 13 restantes inoculados con GS/M todos presentaron quistes y se les detectó el antígeno. Se concluyó que para el diagnóstico de la infección de *Giardia sp.* el test de ELISA es un ensayo tan sensible como el examen microscópico y es fácil de ejecutar (5).

En 1988 Knislye y colaboradores usaron la técnica de ELISA para detectar antígenos y anticuerpos, utilizando suero de conejos y cabras inmunizadas con trofozoitos de *Giardia sp.* comparándola con la

detección de antígenos de *Giardia* en heces, 80 de las cuales fueron positivas para el parásito por el examen microscópico. La sensibilidad y especificidad del ensayo fue confirmada por los resultados negativos de 10 muestras de neonatos y 27 pacientes con infección entérica, se pudo determinar que el congelamiento y descongelamiento repetitivo, tiempo prolongado de almacenaje, tratamiento antidiarreico no interfieren con los resultados. Para el diagnóstico de *Giardia sp.*, ELISA es sensible, específico y no es influenciado por factores del medio ambiente o por otros enteropatógenos. Este test provee un método práctico y confiable para evaluación de gran número de muestras (58).

Varios métodos de detección pueden facilitar el diagnóstico de *Giardia lamblia* en muestra de heces. Se han utilizado técnicas como electroforesis con gel de poliacrilamida de sulfato de sodio e inmunotransferencia. Tanto la forma de quiste como de trofozoito presentan varios antígenos, especialmente en regiones de 65 kd y entre 30-40 kd. En 1989, Janoff y colaboradores usaron métodos para examinar 118 muestras de heces provenientes de un laboratorio Clínico Microbiológico (53 con presencia de *Giardia*) y 239 muestras provenientes de un Hospital (39 con presencia de *Giardia*). Usando la microscopía como estándar establecieron para CIE y ELISA una sensibilidad de 88 % y 94 %, especificidad 94 % y 95 %, valores positivos 86 % y 76 %, valores negativos 98 % y 97 % y una concordancia del 89 % respectivamente. El porcentaje de falsos-positivos para ELISA fue de 24% (10 de 42) en los pacientes del Hospital y solamente 3% (1 de 32) en adultos sanos, datos corroborados por microscopía. Esta discrepancia sugiere que ELISA puede ser más sensible que un examen microscópico que es considerado estándar de referencia, y que en parte los resultados dependen de la epidemiología de la infección (59).

Se han utilizado anticuerpos monoclonales específicos para quistes

generados *in vitro* de Giardia (GCSA-1). Los anticuerpos reconocen 4 polipeptidos de 24-45 kd de peso molecular como parte de los componentes de las paredes de los quistes. Los antígenos reconocidos por GCSA-1 aparecen dentro de las primeras 8 horas que han sido expuestos a un medio de desenquistamiento siendo sintetizados por parásitos enquistados puesto que ellos pueden ser marcados metabólicamente con S³⁵-cisteína e inmunoprecipitan por GCSA-1 y reaccionan con quistes *in vitro* de la cepa WB de . Estos hallazgos sugieren que los determinantes antigénicos reconocidos por GCSA-1 se desarrollan regularmente por lo que se cree que pueden formar estrategias designadas a inhibir esta síntesis previniendo el enquistamiento y controlar así la difusión de la enfermedad (60).

En 1982, Smith y colaboradores iniciaron estudios de caracterización de antígenos de cepas de *A. lamblia* de Afganistán, Oregon, Ecuador y Puerto Rico con electroforesis y ELISA. Con la técnica de electroforesis se encontró que el peso de las proteínas presentaban bandas entre 12000-140000. Al observar los resultados por electroforesis se encontró que la cepa Oregon presentaba un set anódico de antígenos mientras que las otras cepas muestran un antígeno simple neutral. Otros antígenos menores diferentes fueron encontrados entre las 4 cepas. Cuando usaron trofozoitos de varias cepas como antígeno en ELISA, se detectaron diferencias en los títulos a usar sueros de humanos, lo que sugiere la existencia de importantes diferencias antigénicas entre cepas (22).

En 1989, Rosoff y colaboradores compararon el test diagnóstico ProSpecT/Giardia (Alexon Inc. Mountain, View, Calif.), con el examen microscópico (O&P). Un total de 325 muestras fueron evaluadas, de las cuales 93 correspondían a pacientes positivos por O&P y 232 colectadas al azar de pacientes, 16 fueron positivas por O&P e inmunoensayo, 6 son negativas por O&P pero positivas para el inmunoensayo y 1 positivo por

O&P y negativo para el inmunoensayo. El inmunoensayo es sensible y específico 96 % y 100 % respectivamente, mientras que la sensibilidad y especificidad de O&P es 74 % y 100 % respectivamente. **Los inmunoensayos también ejecutados en muestras tratadas con formalina neutral al 10 %, fijadas por acetato de Sodio-Formalina y medio de transporte con alcohol-Polivinílico. El test ProSpecT/Giardia es sensible y específico y fácil de interpretar (61,62).**

IV. JUSTIFICACION

Hasta la fecha el método diagnóstico más utilizado para la giardiasis es la demostración de los quistes y los trofozoitos a partir de heces de pacientes sintomáticos y asintomáticos. Este no es tan específico ya que es alto el número de pacientes que muestran sintomatología sugestiva de giardiasis y un examen de heces negativo, ya que excretan poca cantidad de quistes. Es necesario también considerar que la experiencia del microscopista y el tiempo empleado en la observación de cada preparación son importantes para observar quistes o trofozoitos del parásito causante de la infección. Por ello, se hace necesario implementar nuevas técnicas de diagnóstico de la infección y determinar la presencia de anticuerpos en pacientes sintomáticos y asintomáticos. Estas nuevas técnicas podrán ser aplicadas en estudios clínicos y epidemiológicos para determinar la incidencia del parásito.

V. OBJETIVOS

A. Estandarizar la técnica de purificación de quistes de *Giardia lamblia* a partir de heces frescas

B. Estandarizar la técnica de desenquistamiento de *Giardia lamblia*.

C. Estandarizar el medio de cultivo para *Giardia lamblia* en el medio TYI-S-33 modificado según Diamond's a partir de heces de diferentes pacientes con esta infección.

VI. HIPOTESIS

El medio de cultivo TYI-S-33 modificaciOn en Diamond's es un medio efectivo pare cultivar *Giardla*

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de Trabajo:

Muestras de heces de pacientes con presencia de *6 temblia* (66 mas quistes por campo). Estas muestras de heces fueron utilizadas para el cultivo del parásito en el medio específico.

B. Medios:

1. Recursos Humanos:

a. Estudiante tesista:

Br. Gladys Calderon Castilla.

b. Asesor:

Licda. Vivian Matta Rios.

2. Recursos Institucionales:

a. Instituto de Investigaciones Químicas Biológicas-IIQB-

b. Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

c. Laboratorio Multidisciplinario, Facultad de Medicina, USAC.

3. Recursos Materiales:

a. Materiales y Equipo:

- Tubos de ensayo con tapón de rosca.
- Tubos canicos de plástico de 15cc.
- Pipetas graduadas
- Pipetas Pasteur
- Balanza analítica
- Microscopio
- Centrifuga
- Bari° de Marfa
- Mechero

- Incubadora
- VOrtex
- Gass
- Embudo
- Papel micropore 45 um
- Medidor de pH
- Muestras de heces con quistes de *thardia Iamb/ia* (6 6 mes quistes por campo).

b. Reactivos (Anexo No.1):

- Sacarosa 0.85 M
- Solución Salina 8.5 %
- Formalina al 10%
- HCl pH 0.5
- NaOH 2N
- Formalina
- Lugol
- NaH₂CO₃
- PBS pH 7
- K₂HPO₄
- Suero Bovino Fetal
- Casein Digest (BBL tote 97023)
- Bovine Bilis (SIGMA-B-8381)
- Dextrosa
- NaCl
- Acido asc6rbico
- Citrato Ferrico amOnico
- Cistefna
- Solución de Hanks
- Medio de Eagle
- Ceftriaxone 200 ug/ml. (Rocephin, Roche)

4. Procedimiento:

a. Purificación de quistes de *Gardth lamb/Ia* a partir de heces:

- Se diluyeron las heces recientemente obtenidas en agua destilada (1 gr. de heces por 100 ml de agua destilada), y se filtraron a través de una gaza colocada sobre un embudo, para remover partículas grandes.
- Se colocaron 3 ml de sacarosa fríg 0.85 M en un tubo cónico de 15 ml, dejando resbalar por las paredes 3 ml de filtrado (se efectuó este procedimiento sobre hielo).
- Se centrifugó a 1000 rpm por 5 min a temperatura ambiente recuperando la interfase sacarosa-agua, aquí se forma un colchoncito y es donde están más concentrados los quistes. Se diluyó en agua destilada to recuperado de Ia interfase y se centrifugó a 1000 RPM por 5 min a temperatura ambiente.
- Se repitió el procedimiento anterior 2-3 veces más, los lavados siempre se llevaron a cabo en agua destilada.

b. Método de Desenquistamiento:

- A partir del precipitado del procedimiento anterior se adicionó 2.2 ml de solución de ácido ascárbico-cisteína (anexo No. 5), 5 ml de solución de Hanks (anexo No.1) y 3 ml de HCl pH 0.5
- Se mezcló suave y constantemente e incubó a 37°C por 15 min.
- Se adicionó unas gotas de bicarbonato de sodio. Se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. a temperatura ambiente.
- Se decantó la solución.
- Se observó al microscopio los cambios que tienen los quistes para corroborar que el desenquistamiento tuvo éxito.

c. Cultivo de *Gardth lamb/i8* :

- Se colocó en un tubo con tapon de rosca 7 ml de medio de cultivo TYI-S-33 (anexo 6), suplementado con 1 ml de suero bovino, 0.2 ml de

Ceftriaxone (200 ug/ml), 1 ml de L-cisterna y 7 gotas de NaOH para mantener el pH.

- **Se incubó a 37 °C en posición horizontal.**
- **Se observó la presencia de trofozoitos adheridos a las paredes del tubo a los 45 min. y a las horas. Se cambió el medio de cultivo todos los días, durante los primeros 15 días, pasado este tiempo se cambió el medio 2 veces por semana.**

5. Diseño Estadístico:

Se utilizó la Prueba de Hipótesis Binomial para 24 ensayos, se esperaba tener un mínimo de 7 fracasos y 17 éxitos para rechazar H_0 . con una probabilidad de error tipo I " p " = 0.032 ($p < 0.05$). Donde " p ". éxito = viabilidad por 10 días, observada como trofozoitos pegados al tubo. No importando el número; y " q " = fracaso = viabilidad menor de 10 días.

VIII. RESULTADOS

A fin de determinar las mejores condiciones para la purificación de los quistes a partir de las heces frescas se realizaron varios ensayos, pudiendo establecerse que la presencia de 6 o más quistes por campo (40X) de *Giardia lamblia* permiten una adecuada purificación; las heces deben ser diluidas con agua destilada y filtrarlas a través de una gasa. Se estableció que era mejor utilizar heces frescas porque cuando se procedió a desenquistar se obtenía mayor cantidad de trofozoitos viables, mientras que con muestras de heces no frescas se disminuía marcadamente la cantidad de trofozoitos obtenidos en el desenquistamiento así como su movilidad (Table No.1) Además se realizaron ensayos con muestras de heces con menos de 6 quistes por campo (uno, dos, tres, etc.) y se observó que al momento de concentrar los quistes se obtenía un número escaso de quistes, siendo estos insuficientes para realizar el desenquistamiento ya que con esta técnica se mueren algunos quistes y quedan pocos para ser cultivados. Por el contrario con muestras con más de 6 quistes por campo al momento de realizar la concentración se obtuvo un 75-90% más de quistes, siendo este un porcentaje adecuado para poder realizar el desenquistamiento y así obtener mayor cantidad de trofozoitos que permitieran realizar el cultivo (Table No. 2).

A partir de la solución obtenida al purificar los quistes se concentraron los quistes de *Giardia lamblia* para ello se usó un gradiente de concentración con sacarosa 0.85 M. Cuando los ensayos se realizaron a temperatura ambiente se perdieron muchos quistes y estos no se mantenían en la interfase entre la sacarosa y la solución de heces sino que se depositaban en el fondo del tubo. Al realizar estos colocando los tubos de ensayo y la sacarosa en recipientes con hielo se obtuvo una mayor cantidad de quistes ya que estos sí permanecían en la interfase entre la sacarosa y solución de heces (3 ml de sacarosa 3 ml de solución de heces resbalada por las paredes para que se formen dos fases); estos ensayos se hicieron simultáneamente ya que se quería

comprobar si la temperatura influye, además se comprobó que con diferentes cantidades de solución de heces más 3 ml. de esta se perdían muchos quistes (Table No. 2).

Posteriormente se procedió al desenquistamiento, para ello al sedimento obtenido en el paso anterior se incubó en medio de Eagle por 45 minutos en posición horizontal, pasado este tiempo se centrifugó y se observó una gota del sedimento obtenido en el microscopio, pudiendo observarse que los quistes en proceso de desenquistamiento presentan movimiento rápido y son de color amarillo o café, mientras que los quistes que se mueren tienen un movimiento lento y no presentan ninguna coloración, la mayoría de trofozoitos obtenidos con las muestras del estudio presentaron un movimiento rápido.

Los trofozoitos obtenidos fueron inoculados en el medio TYI-S-33 modificación de Diamond's. Para ello se utilizaron reactivos de las casas comerciales Merck y BBL. Al evaluar los cultivos a los 45 min, 1, 2, y 24 h, se observó que sí había diferencia en el crecimiento, obteniéndose mejores resultados con los reactivos de la casa BBL. El pH de las soluciones utilizadas fue de 6.8-7.0, se incubó a 37°C y realizó el cambio de medio a los cultivos todos los días (Table No.3). Los tubos fueron observados a diario para observar la adaptación de los trofozoitos al medio. Los trofozoitos que lograban adaptarse se adhieren a las paredes del tubo, mientras que los que no se ambientan quedan flotando en el medio hasta que mueren.

De los veinticuatro ensayos realizados en sólo tres se observó que se adaptaron los trofozoitos al medio permaneciendo viables por 10 días, en los ensayos restantes sólo se mantuvieron viables en un rango de 4 a 8 días (Tabla No4)

IX. DISCUS ION DE RESULTADOS

La giardiasis es una infeccion parasitica producida por *Giardia lamblia* que afecta principalmente al intestino y que se presenta en ninos, homosexuales y personas hospitalizadas. Hasta el momento el diagnostico se ha realizado por la demostraci6n de quistes y trofozoitos en las muestras de heces, siendo este un metodo bastante inespecifico ya que se ve afectado por factores como la experiencia del observador, el tiempo empleado en la observaci6n de cada preparaci6n y la cantidad de quistes excretados. Por tal motivo, se hace necesario realizar ensayos que permitan implementar otras t6cnicas diagnosticas para dicha infecci6n. T6cnicas alternativas como el inmunodiagnostico a trav6s del metodo de ELISA permitira detectar anticuerpos anti *G. lamblia* tanto en pacientes sintomaticos como asintomaticos y conocer con exactitud la prevalencia de esta enfermedad en el pa6s. Para estandarizar esta t6cnica se necesita producir el antigeno con una cepa guatemalteca de *Giardia lamblia* cultivada *in vitro*.

Para ello se realiz6 el presente estudio y se utiliz6 muestras de heces frescas con m6s de 6 quistes por campo (40X) a las cuales se les purific6, siendo necesario llevar a cabo este paso para eliminar el debris celular y asi poder obtener quistes m6s facilmente. Los quistes obtenidos en la soluci6n anterior fueron posteriormente concentrados. Ambas t6cnicas presentan las ventajas de ser faciles de realizar, reproducibles, econ6micas y efectivas. Entre las desventajas que presenta la concentraci6n es que hay que trabajar con recipientes con hielo para colocar los tubos de ensayo y la sacarosa fr6a, si no se trabaja bajo estas condiciones se pierden los quistes, adem6s se debe tener cuidado que la soluci6n de heces se deje caer resbalada por las paredes del tubo de ensayo de manera de conservar las dos fases, ya que en la interfase es donde se conservan los quistes.

El siguiente paso fue el desenquistamiento, esta t6cnica presenta muchas desventajas que se deben de tomar en cuenta y que son muy

importantes para obtener kit^o en el medio de cultivo. En este paso es necesario mantener estable el pH del HCl entre 0.5-1.0 y la temperatura de las soluciones a 37°C y que las mismas sean de preparación reciente no más de una semana y que pasado este tiempo varía el pH de las soluciones.

La literatura indica que en el medio TYI-S-33 modificación de Diamond's los trofozoitos que se adaptan al medio se adhieren a las paredes del tubo de ensayo y permanecen viables entre 10-14 días a 37°C, tomando en cuenta estos datos se efectuó la observación en cada ensayo que se llevó a cabo. A partir de los trofozoitos obtenidos se procedió a inocularlos en el medio TYI-S-33 modificación de Diamond's y así evaluar la efectividad del medio por medio de la viabilidad de los trofozoitos en el medio.

Con los resultados obtenidos se realizó el análisis binomial, el cual con 3 éxitos y 21 fracasos demuestra que el medio no es efectivo para cultivar el parásito (p.0.999).

Para obtener mejores resultados hay que tomar en cuenta factores como un pH, temperatura, tiempo de incubación en cada uno de los pesos que se llevan a cabo especialmente en la concentración, desengastamiento y cultivo. Y que al contar con el parásito permitir la producción de antígenos que serán utilizados para implementar nuevas técnicas diagnósticas de la infección y determinar la presencia de anticuerpos específicos en pacientes sintomáticos y asintomáticos.

X. CONCLUSIONES

A. Las técnicas de purificación y concentración de quistes de *Giardia lamblia* a partir de heces fecales frescas con más de 6 quistes por campo (40X) son efectivas.

B. La técnica de desenquistamiento de *Giardia lamblia* es efectiva para obtener trofozoitos del parásito.

C. En los diferentes ensayos que se llevaron a cabo se observó variación en los días que se mantenían viables los trofozoitos de *Giardia lamblia* por lo que se concluye que el medio TYI-S-33 modificado de Diamond's en las condiciones en que se efectuó el estudio demostró no ser efectivo para cultivar al parásito.

XI. RECOMENDACIONES

Continuar con las investigaciones, con un mayor número de ensayos y tener en cuenta los factores como pH, temperatura y tiempo de incubación, así como los reactivos adecuados para preparar el medio TYI-5-33 y así poder obtener parásitos disponibles para preparar el antígeno que podrá ser utilizado para estandarizar nuevas técnicas como una alternativa para mejorar el diagnóstico de la giardiasis en Guatemala.

XII. REFERENCIAS:

- 1. Gordts B, et al/. Evaluation of a New Method for Routine *in vitro* cultivation of *Giardia lamblia* from human duodenal fluid. *J Clin Microbiol* . 1985; 22(5):702-704.**

- 2. Meyer EA, Pope BL. Culture *in vitro* of Giardiasis trophozoites from the Rabbit and Chinchilla. *Nature*. 1965; 207:1417-1418.**

- 3. Hautus MA, et al. *In vitro* excystation and subsequent axenic growth of *Giardia lamblia*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* . 1988; 82:858-861.**

- 4. Bigham AK, Meyer EA. *Giardia* Excystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. *Nature*. 1979; 277:301-302.**

- 5. Nash TE, Herrington DA, Levine MM. Usefulness of an Enzyme-Linked immunosorbent Assay for detection of *Giardia* Antigen in faeces. *J Clin Microbiol* 1987; 25(7):1169-1171.**

- 6. Nash TE, et al . Antigenic variation in *Giardia lamblia* *J Immunol* 1988; 141 (2): 636-641.**

- T. Beck JW , Davies JE. Parasitologia Medica. Mexico: Interamericana S.A. de C.V., 1984. p 41-46.**

- 8. Torian BE, et al/. Tubulin and High-Molecular-Weight polypeptides as *Giardia lamblia* antigens. *Infect Immunol* . 1984; 46(1):152-158.**

- 9. Bloom BR. Games parasites play: How parasites evade immune surveillance. *Science* . 1979; 204:21 -26.**

10. Goldstein IJ, Hayes CE. The Lectins: Carbohydrate-binding of plants and animals. *Adv Carbohydr Chem Biochem* . 1978; 35:127-140.

11. Perein MEA, Kabat EA. Immunochemical Studies on Lectins and their application to the fractionation of blood group substance and cells. *Cat Rev immune/*. 1979; 1:33-78

12. Hill DR, Hewlett I, Pearson RD. Lectin binding by *Giardia lamblia* *Infect immun* . 1981; 33:733-738.

13. Ward HD, et al. Identification of chitin as structural component of *Giardia* cyst. *Infect Immun* . 1985; 49(3):629-634.

14. Ortega-Barria E, et al. N-acetyl-D-glucosamine is present in cyst and trophozoites of *Giardia lamblia* and serves as a receptor for Wheat Germ agglutinin. *Div. Geogr Med Infect Dis* . 1990; 1:1-40

15. England DT, Sher A. The Biology of parasitism; a molecular and immunological approach. New York: Alan R. Liss 1988; 422-426.

16. Aldritt SM, Tien P, Wang CC. Pyrimidine salvage in *Giardia lamblia*. *L Esp Med 8faq*. 1985; 161:437-445.

17. Aldritt SM, Wang CC. Purification and characterization of guanine phosphoribosyltransferase from *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*. 1986; 261:8528-8533.

18. Edson CM, et al. An 88000-Mr *Giardia lamblia* surface protein which is immunogenic in humans. *Infect Immun*. 1986; 54(3):621-625

- 19. Webster ADB. Giardiasis and Immunodeficiency diseases. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* . 1980; 74(4): 440-443.**
- 20. Owen RL. The immune Response in clinical and experimental Giardiasis. *Trans Roy Soc Trop Med and Hyg* . 1980; 74(4):443-445.**
- 21. Kumkum et al. Depressed Humoral immune responses to surface antigens of *Giardia lamblia* in persistent Giardiasis. *J Ped infect Dis* . 1988; 7(7):492-498.**
- 22. Smith RD, et al. Antigenic Analysis of *Giardia lamblia* from Afganistan, Puerto Rico, Ecuador and Ore * - *infect /maw* . 1982; 36:714-719.**
- 23. Roberts-Thomson IC, et al. Acquired resistance to infection in a Animal model to Giardiasis. *J immunol* . 1976; 117(5) parte 2:2036-2037.**
- 24. Hill DR, Poh R. Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by Murine Peyer's Patch Macrophages. *infect /mmun* . 1990; 58(10):3202-3207.**
- 25. Hill DR, Pearson RD. Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by Human Mononuclear Phagocytes. *Infect /mmun*. 1987; 55(12):3155-3161.**
- 26. Owen RL, Allen CL, Stevens DP. Phagocytosis of *Giardia lamblia* by Macrophages In Peyer's Patch epithelium in mice. *Infect /mmun*. 1981; 33:591-601**
- 27. Einfeld DA, Stibbs HH. identification and Characterization of Major antigen of *Giardia lamblia*: *infect /mmun*. 1984; 46(2):377-383.**

28. Ferguson A, GilIIn J, Al-Thamery D. Intestinal abnormalities in murine giardiasis. *Trans Roy Sac Trap Med Hyg* . 1980; 74(4):440-443.
29. Moreckl R, Parker JG. Ultra-Structural studies of the human *Giardia Iamb//a* and subjacent yeyunal mucosa in a subject with steatorrhea. *Gastroentero/* . 1967; 52(2) parte 1:151-164.
30. Anand BS, at a/. Pathogenesis of mala-absortion in *Giardia* infection: an experimental study in rats. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1989; 74(5):565-569.
31. Anand BS, at 8/. Transport studies and enzyme assays in mice infected with Human *Giardia Iamb//9*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1982; 76(5):616-619.
32. LOpez-Brea M, at al . 67ardia *Iamb//a* associated with bronchial asthma and serum antibodies and chronic diarrhoea in child with Giardiasis. *Trans Roy Sac Trop Med Hyg* . 1979; 73(5):600.
33. Al-Tukhi M, et a/. Pathogenicity and antigenic components of excysted 6/ardia *Iamb//a* isolated from patients in Riyadh, Saudi Arabia. *Am ✓ Trop Med Hy.9* 1991,45(5):442-452.
34. Cedi I lo-Rivera R, et a/ . *Glard/a* isoenzyme analysis of 19 axenic strains isolated from symptomatic and asintomatic patients in Mexico. *Trans Roy Sec Trap Med Hyg* . 1989; 83:644-646.
35. Abaza SM, Suilvan JJ, Visvesvara GS. Isoenzyme profiles of four strains of 6/ardia *Iamb//a* and their infectivity to Birds. *Am ✓ Trop Med Hyg* . 1991; 44(1):63-68.

36. Lopez-Brea M. *Giardia lamblia*: incidence in man and dogs. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* . 1982; 76(4):565.
37. Kirkpatrick CE, Green IV GA. Susceptibility of Domestic Cats to infections with *Giardia lamblia* cysts and trophozoites from Human Sources. *J Clin Microbiol* . 1985; 21(5):678-680.
38. Jokipii L, Miettinen A, Jokipii AMM. Antibodies to cysts of *Giardia lamblia* in primary and in the absence of Giardiasis. *J Clin Microbiol* . 1988; 26(1):121-125.
39. Bingham AK, Jarrol EL, Meyer EA. *Giardia sp*: Physical factors of excystation *in vitro* and excystation vrs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp Parasitol* . 1979; 47:284-291.
40. Bathia VN, Warhust DC. Hatching subsequent cultivation of cyst of *Giardia Mtestinalis* in Diamond's medium. *J Trop Med Hyg* . 1981; 84:45.
41. Spaulding JJ, Pacha RE, Clark GW. Quantitation of Giardia cysts by Membrana filtration. *J Clin Microbiol* . 1983; 18(3):713-715.
42. Douglas H, Recinos DS, Gillin FD. A new method for purification of *Giardia lamblia* cysts. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* . 1987; 81:315-316.
43. Rice EW, Schaefer III FW. Improved *in vitro* Excystation Procedure for *Giardia lamblia* cysts. *J Can Microbiol*. 1981; 14:709-710.
44. Isaac-Renton J, et al/. A method of excystation and culture of *Giardia lamblia*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* . 1986; 80:989.

45. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* In TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans Roy Soc Trop /Wed Hyg* . 1983; 77(4):487-488.
46. Visvesvara GS. Axenic growth of *Giardia lamblia* in Diamond's TPS-1 medium. *Trans Roy Soc Med Hyg* . 1980; 74(2):213-215.
47. Gillin FD, Diamond LS. Clonal Growth of *Giardia lamblia* trophozoites in a Semisolid Agarose Medium. *J Parasitology* . 1980; 66(2):350-352.
48. Warhurst DC, Wright SG. Cryopreservation of *Giardia intestine/is*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* . 1979; 73(5):601.
49. Gordts B, et al. Routine culture of *Giardia lamblia* trophozoites from Human Duodenal Aspirates. *Lancet*. 1984; 137.
50. Meyer EA. Culture of *Giardia lamblia*. *Lancet*. 1984; 527.
51. Wieder SC, Keister DB, Reiner DS. Mass cultivation of *Giardia lamblia* in a serum-free medium. *J Parasitology* . 1983; 69(6):1181-1182.
52. Gillin FD, et al. Encystation and Expression of cysts Antigens by *Giardia lamblia* in vitro. *Science* . 1986; 235:1040-1043.
53. Wallis PM, Wallis HM. Excystation and culturing of Human and Animal *Giardia spp.* by using Gerbils and TYI-S-33 medium. *Appl Environ Microbiol*. 1986; 51(3):647-651.

54. Meloni BP, Thompson RCA. Comparative Studies on the axenic *In vitro* a cultivation of *Giardia* of Human and Canine origen: evidence for intraespecific variation. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* . 1987; 81:637-640.
55. Visvesvara GS, et al/. An Immunofluorescence test to detect serum Antibodies to *Giardia lamblia* *Ann Intern Med* . 1980; 93: 802-805.
56. Moody AH, et al/. The Specific of serum antibodies to *Giardia lamblia* and to enterobacteria in gastrointestinal disease. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* . 1982; 76(5): 630-632.
57. Smith PD, et al/. IgG Antibody to *Giardia lamblia* detected by Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay. *68stroentera* . 1981; 80(6):1476-1480.
58. Knisley CV. Rapid Detection of *Giardia* antigen in stool with the use of Enzyme Immunoassays. *E Scient Rep*. 1988; 91(61):704-705
59. Janoff EN, et al/. Diagnosis of *Giardia lamblia* infections by Detections of Parasite-Specific Antigens. *✓ C/in Microbic/* . 1989. 27(3):431-435.
60. Ward HD. et al/. Identification of Developmentally regulated *Giardia lamblia* /8mb/18 Antigens Using GCSA-1, a cysts Specific Monoclonal Antibody. *Div Geogr /Ned Infect Dis* . 1990; 1-30.
61. Rosoff JD, et al/. Stool Diagnosis of giardiasis Using a Commercially Available Enzyme Immunoassays to detect *Giardia*-Specific antigen 65 (GSA-65). *✓ ain Alicrobio/* . 1989; 27(9)1 997-2002.

62. Rosoff JD, O'Hanley PD. Coprodiagnosis of Giardiasis Using a Commercially Available Enzyme-Immunoassay. Alexon, Biomedical, Reprint Series. New York: *Aion R Liss Inc* 1988; 1(1):1-7.

XIII. ANEXOS

PREPARACION DE REACTIVOS:

Anexo No. 1: Solución de Hanks:

Pesar: 8 gr de NaCl

0.4 gr de KCl

0.14 gr de CaCl_2

0.2 gr de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.15 gr de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

0.06 gr de KH_2PO_4

0.35 gr de Bicarbonato de Sodio

1.0 gr de Glucosa

Aforar a 1000 ml. Esterilizar por filtración, guardar en frasco de vidrio obscuro.

Anexo No. 2: Solución salina at 85 %:

Pesar: 8.5 gr de NaCl.

Aforar a 1000 ml de agua destilada. Mezclar y guardar en recipiente de plástico.

Anexo No. 3: Lugol:

Pesar: 3.3 gr de yodo cristal I_2

6.6 gr de Yoduro de potasio

Aforar a 1000 ml de agua destilada. Mezclar y guardar en frasco de vidrio y colocar en frasco ámbar.

Anexo No. 4: Formalina at 10%:

A partir de Formaldehído al 37%, medir 100 ml de este y aforar a 1000 ml de agua destilada. Mezclar y guardar en frasco plástico.

Anexo No. 5: SoluciOn de L-cistefna-acido-ascOrbico:

Pesar: 0.35 gr de L-cistefna

0.25 gr de acid° asarbico

Aforar a 20 ml de agua desti lade. Mezclar bien.

Anexo No. 6: Medio de Cultivo TYI-S-33:

Para preparar el medio decultivo TY1-5-33 se preparan 3 soluciones cada una por separado.

SOLUCION A:

Pesar: Casein Digest (BBL lote 97023) 22.2 gr

Yeast Extract 11.1 gr

Dextrose 11.1 gr

Bovine Bile (SIGMA) 0.55 gr

NaCl 2.22 gr

Acido Asc6rbico 0.22 gr

K₂HPO₄ 1 - 1 1 gr

KH₂PO₄ 0 - 6 7 gr

Ferric Amonium Citrate 0.025 gr

Estos ingredientes se les adiciona 890 ml de agua destilada ajustando pH a 6.8-7.0 con NaOH 2N. Est6 soluci6n se esteriliza por filtraci6n. Dispenser esta soluci6n en frascos de 50 ml esteriles y guardar a 20°0.

SOLUCION B:

Pesar: L-cistefna 0.1 gr

Aforar a 50 mi con agua destilada. Esterilizar por filtraci6n y guardar a 20°c.

SOLUCION C:

Pesar: NaOH 0.8 gr.

Aforar a 100 ml con ague destilada. Esterilizar en autoclave,

guardar en fresco plástico.

Preparar para el (Ira del use:

- 1. 50 ml de la solución A a 37°C**
- 2. Adicionar 6 ml de suero Bovine Fetal inactivado (56°C per 30 min)**
- 3. Adicionar 6 ml de L-cistefna-HCl.(solución B)**
- 4. Adicionar Ceftriaxona 200 mg/ml**
- 5. Ajustar pH 6.8-7.0 con NaOH 2N.**

TABLA No. 1

OBTENCION DE QUISTES A PARTIR DE HECES FRESCAS Y NO FRESCAS.

1 tiempo de Obtenida la muestra	< de 24 hrs	24 hrs	48 hrs
Cantidad de quistes	+++	++	+10
Desenquistamiento	+++	+	0
Movilidad	+++	+	+/0

Cantidad de quistes iniciales: +++= más de 6 quistes por campo (40x)

++= 3-5 quistes por campo (40x)

= 1-2 quistes por campo (40x)

0= cero quistes por campo (40x)

Desenquistamiento:

+++= más de 6 quistes por campo

++= 3-5 quistes por campo

= 1-2 quistes por campo

Movimiento:

+++= se mueven rápidamente

++= movimiento moderado

= movimiento lento

0= no se mueven

TABLA No.2
TEMPERATURA Y CANTIDAD DE QUISTES OBTENIDOS.

Ensayo	Cantidad de quistes inicialmente											
	1-2 qxc			3-4 qxc			5-6 qxc			mas 6 qxc		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Temperatura ambiente	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+
Hielo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	3

0= ningun quiste

1-3 quistes por campo (40x)

++ . 4-6 quistes por campo (40x)

mas de 6 quistes por campo (40x)

TABLA No. 3
COMPARACION DE MEDIO DE CULTIVO REALIZADO CON REACTIVOS DE
DIFERENTES CASAS COMERCIALES.

CASA COMERCIAL	TIEMPO DE OBSERVACION			
	45 min.	1 hr.	2 hrs.	24 hrs.
Merck	0			0
BBL		++	++	+++

+= Escasos trofozoftos adheridos a la pared del tubo de ensayo.

++= Regular cantidad de trofozoftos pegados a la pared del tubo de ensayo

+++ = Abundante cantidad de trofozoftos pegados a la pared del tubo de ensayo.

TABLA No. 4
VIABILIDAD DE LOS TROFOZOITOS DE *Giardia Lamb/ia* EN EL MEDIO DE
CULTIVO *in vitro* TYI-S-33.

No de ensayo	No. de Tubos	Viabilidad (dies)
1	2	4
2	2	4
3	2	4
4	2	5
5	2	6
6	2	8
7	2	5
8	2	7
9	2	6
10	2	5
11	2	5
12	2	5
13	2	6
14	2	6
15	2	5
16	2	7
17	2	5
18	2	6
19	2	10
20	2	7
21	2	10
22	2	8
23	2	7
24	2	10



Gladys Floriselde Calder* Castilla
TESISTA



Lida. Vivian'L. Matte Rfos
ASESOR



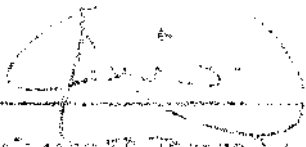
Lc. erar o Walk
DIRECTOR,



Lc. Jorge Rodolfo Pérez Folger
DECANO

h i l

Jr k V


n6ts1e3 stv TA 20 vs 192 2 1 3



16Lp 41 SOO 1 VP1 i', 1 k) 01 ;, 0 t 0*, ■ -

Vill 6 241