

33

2ij



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores  
"CUAUTITLAN"

BUSQUEDA DE ANTICUERPOS CONTRA Giardia  
lamblia EN SUERO DE CORDON UMBILICAL  
Y SANGRE PERIFERICA

## T E S I S

Que Para obtener el Título de:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
P R E S E N T A :  
**MARTHA EUGENIA MORA JAEN**

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1987



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## I N D I C E

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| ABREVIATURAS .....               | I  |
| RESUMEN .....                    | II |
| INTRODUCCION .....               | 1  |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA ..... | 14 |
| OBJETIVOS .....                  | 16 |
| HIPOTESIS .....                  | 17 |
| MATERIAL Y METODOS .....         | 18 |
| RESULTADOS .....                 | 26 |
| DISCUSION .....                  | 36 |
| CONCLUSIONES .....               | 40 |
| BIBLIOGRAFIA .....               | 41 |

## ABREVIATURAS

|  |           |
|--|-----------|
| Análisis Inmunoenzimático .....                  | ELISA     |
| Amortiguador salino fosfatos .....               | PBS       |
| Amortiguador salino fosfatos - Twcen 20 0.05% .. | PBS-TWEEN |
| Albúmina sérica bovina .....                     | ASB       |
| Globulos Rojos de Carnero .....                  | GRC       |
| Grados centígrados .....                         | °C        |
| Microlitro .....                                 | ul        |
| Litro .....                                      | l         |
| Miligramos .....                                 | mg        |
| Gramos .....                                     | g         |
| Minutos .....                                    | min.      |
| Horas .....                                      | hrs.      |
| Revoluciones por minuto .....                    | rpm       |
| milimolar .....                                  | mM        |
| Molar .....                                      | M         |
| Normal .....                                     | N         |

## RESUMEN.

Giardia lamblia es el parásito del intestino delgado más común en el humano, su distribución es cosmopolita y afecta principalmente a niños. Es probable que mujeres en edad fértil hayan sufrido la enfermedad, con la consecuente producción de anticuerpos contra G. lamblia de clase IgG y éstos sean transmitidos al producto a través de placenta confiriéndole protección al recién nacido. Para poder demostrar ésto, se analizaron 41 muestras de cordón umbilical y 41 de sangre periférica de las madres utilizando la técnica de ELISA, usando discos de poliestireno recubiertos con proteínas derivadas de trofozoítos de G. lamblia para la búsqueda de anticuerpos específicos. Se encontró que el 12% de las muestras de sangre periférica y el 14% de las muestras de cordón umbilical contenían anticuerpos específicos contra G. lamblia, lo que demuestra la transferencia transplacentaria de dichos anticuerpos.

## INTRODUCCION

Giardiasis es una enfermedad del intestino delgado producida por el protozoo flagelado Giardia lamblia (Van leewenhoek). El parásito lo descubrió Van leewenhoek en 1881, pero no fue hasta 1926 que Miller demostró que G. lamblia si era capaz de producir una enfermedad semejante al síndrome celiaco (1). Giardia lamblia se ha asociado con cuadros diarrreicos en donde se han documentado cambios patológicos en el duodeno y yeyuno y no se han demostrado agentes virales o bacterianos (2,3).

## TRANSMISIONES Y EPIDEMIOLOGIA.

Giardia lamblia es un parásito común en el humano y en la mayoría de los países la Giardiasis es endémica. La prevalencia de excreción de quistes de G. lamblia varía desde un 5 a 10% en los EUA y Europa, hasta proporciones de más del 50% en países tropicales (4). Esta prevalencia aumenta en sitios como guarderías, instituciones dedicadas al cuidado de personas con desordenes mentales, donde el contacto persona a persona favorece la diseminación del agente etiológico por la ruta fecal-oral (5,6).

A diferencia de la amibiasis, la giardiasis es más frecuente en niños que en adultos. En estudios realizados en un hospital de concentración de la ciudad de México, se encontró que de los niños menores de 6 años que acudieron a consulta externa y que presentaron coproparasitoscópico positivo para uno o más parásitos, el 47% de éstos fueron positivos para Giardia (7).

En un estudio global, se encontró que la frecuencia de giardiasis en México varía de un 10 a 20% dependiendo de la zona geográfica, fluctuando las cifras entre el 2 al 33%. La distribución que se ha encontrado en niños es: 23.7% en lactante, 20.7% en preescolares y 14.1% en escolares (8,9).

#### MORFOLOGIA.

Giardia lamblia existe en dos formas: el trofozoíto y el quiste. El trofozoíto es la forma vegetativa, tiene morfología piriforme, simétrico bilateralmente, la superficie dorsal es convexa y la ventral cóncava (10). En la región anterior de la cara ventral presenta una estructura circular, el disco suctorio. Presenta dos núcleos ovoides y exhibe cuatro pares de flagelos en sentido posterior, los cuales surgen de los organelos superficiales de la cara ventral (fig 1).

Los trofozoítos se desarrollan en el ambiente alcalino del duodeno y requieren como óptimo un pH entre 6.38 y 7.02 (11).

El quiste de morfología ovoide es la forma de resistencia e infectante. Los quistes inmaduros tienen dos nucleos y los maduros cuatro (fig 2), la pared quística le confiere resistencia a los cambios del medio ambiente, permitiéndoles permanecer viables por más de tres meses en condiciones húmedas; resisten a la congelación por más de 10 horas y a desinfectantes clorados, no sobreviven a temperaturas mayores de 50°C por 10 a 15 min. ni a la desecación (12).

#### CICLO DE VIDA.

La infestación se inicia por la ingestión de 10 a 100 quistes

BUSQUEDA DE ANTICUERPOS CONTRA Giardia lamblia  
EN SUERO DE CORDON UMBILICAL Y SANGRE PERIFERICA

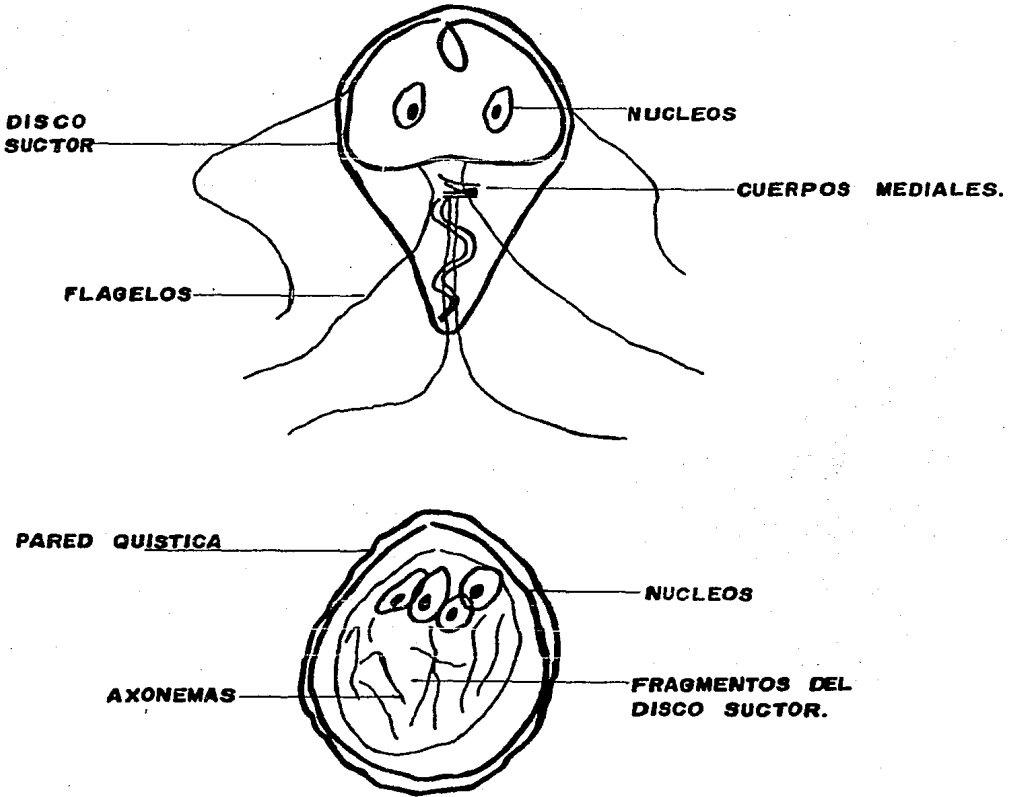


Fig. 1 y 2: Trofozoíto de G. lamblia y Quiste maduro de G. lamblia respectivamente. Tomado de Kulda J. y Nohyndo va E. Flagellates of the human intestine and intestine of the other species. En Protozoa of Veterinary and Medical Interest. Vol. III Kreier J. (ed) Academic pres. New York, London, 1978.



tes maduros y comienza su desenquistamiento en el estómago a un pH óptimo de 1.3 y 2.7 (13). Pero no sobrevive a este pH por lo que debe entrar rápidamente al intestino delgado donde finaliza su desenquistamiento (14). La división de G. lamblia es por fisión binaria y su tiempo de generación varía de 5 horas (in vivo) a 40 horas (in vitro) (12). Los trofozoítos son propelidos a la superficie de las vellosidades del duodeno, donde se adhieren. Existen diferentes teorías para la explicación de la adherencia del trofozoíto: la primera sostiene que la fuerza de succión se mantiene en el disco ventral, debido a los vigorosos movimientos del flagelo ventral; la segunda sugiere que el flanco ventrolateral posibilita la adhesión mediante un mecanismo contráctil; una tercera teoría propone que la conformación en espiral de la superficie del disco permite la adhesión por movimientos contráctiles helicoidales, en los que el diámetro del disco cambia. Recientemente se demostraron receptores para lectina en la membrana de G. lamblia que explica la adherencia a las células intestinales (14,15).

Estudios "in vitro" indican que el metabolismo de G. lamblia está basado en la glícólisis y en un transporte de electrones mediado por flavina (16), su forma de vida tiene características aeróbicas y anaeróbicas, metabolizan glucosa a lactato y CO<sub>2</sub> con producción de ATP y consumen oxígeno. "in vitro" inhiben la actividad de las lipasas sobre las grasas (12). Estudios en modelo animal sugieren que la vitamina B<sub>12</sub>, hidratos de carbono y sales biliares estimulan el crecimiento del parásito (14,17,18).

## PATOGENIA.

La infestación por G. lamblia ocasiona daño morfológico de la mucosa, los trofozoítos pueden invadir el epitelio intestinal causando daño a las microvellosidades intestinales. Las alteraciones morfológicas a la mucosa demostradas por microscopía electrónica y de luz son muy variables, éstas pueden ir desde infiltrado linfocítico y células plasmáticas en la lamina pròpia, hasta sévero daño al borde en cepillo del intestino observándose liso y corto (19,20).

Se proponen diferentes mecanismos del daño epitelial: los relacionados con el parásito, y los dependientes del hospedero.

I.- Mecanismos relacionados con el parásito.

a) Interferencia física.- debido al bloqueo mecánico por el gran número de trofozoítos adheridos a la superficie del intestino (21).

b) Toxinas solubles.- Se sugiere la secreción por los trofozoítos de una tóxima soluble que interacciona con las células epiteliales, pero ésto no ha podido ser demostrado hasta la fecha (12).

c) Daño por interacción directa.- las vellosidades bajo los trofozoítos adheridos pueden ser alteradas directamente por el disco suctor (10,22).

d) Competencia por nutrientes (23,24).

e) Infección coincidente.- se ha presentado evidencia de que la infección del intestino delgado con bacterias puede contribuir a la patogénesis de la infección por G. lamblia (25,26).

## PATOGENIA.

La infestación por G. lamblia ocasiona daño morfológico de la mucosa, los trofozoítos pueden invadir el epitelio in testinal causando daño a las microvellosidades intestinales. Las alteraciones morfológicas a la mucosa demostradas por mi croscofía electrónica y de luz son muy variables, éstas pue den ir desde infiltrado linfocítico y células plasmáticas en la lamina própia, hasta sévero daño al borde en cepillo del intestino observándose liso y corto (19,20).

Se proponen diferentes mecanismos del daño epitelial: los relacionados con el parásito, y los dependientes del hos pederero.

### I.- Mecanismos relacionados con el parásito.

a) Interferencia física.- debido al bloqueo mecani co por el gran número de trofozoítos adheridos a la superfi cie del intestino (21).

b) Toxinas solubles.- Se sugiere la secreción por los trofozoítos de una tóxima soluble que interacciona con las células epiteliales, pero ésto no ha podido ser demostra do hasta la fecha (12).

c) Daño por interacción directa.- las vellosidades bajo los trofozoítos adheridos pueden ser alteradas directamente por el disco suctor (10,22).

d) Competencia por nutrientes (23,24).

e) Infección coincidente.- se ha presentado evidencia de que la infección del intestino delgado con bacterias pue de contribuir a la patogénesis de la infección por G. lam blia (25,26).

## II.- Mecanismos relacionados con el hospedero.

a) Acidez Gástrica.- La alta frecuencia de Giardia sis sintomática en individuos con aclorhidia y gastrectomía sugiere que la disminución de la acidez gástrica predispone a la infestación (27).

b) Factores Genéticos.- Estudios preliminares indican una mayor frecuencia en pacientes de grupo sanguíneo A, postulándose una similitud antigénica entre el parásito y el antígeno del grupo sanguíneo A, lo cual impediría el reconocimiento inmunológico de la Giardia (28,29).

c) Respuesta inflamatoria.- A nivel de la submucosa del epitelio ocurre una respuesta inflamatoria que comprende polimorfonucleares y mononucleares. Es probable que estas células secreten mediadores de la inflamación como cininas que pueden alterar la estructura y función del epitelio (30).

Existe considerable evidencia del mal funcionamiento del epitelio intestinal en giardiasis, con deficiencia temporal de disacaridasas, las cuales son secretadas en la punta de las vellosidades intestinales. Tal deficiencia representa la contraparte funcional de las alteraciones morfológicas, otras alteraciones incluyen malabsorción de grasas y vitamina B<sub>12</sub> probablemente debido a la inhibición de las lipasas por G. lamblia (30,31).

### ASPECTOS CLINICOS.

La Giardiasis tiene un período de incubación de 8 días después de la ingestión de quistes. Los síntomas más comun

mente encontrados son: diarrea, distensión abdominal, retraso en el crecimiento o pérdida de peso, flatulencia, cólico abdominal, colon irritado, esteatorrea, vómito, eructos y heces mal olientes (32,33).

#### INTERACCION ENTRE G. lamblia Y EL SISTEMA INMUNE.

Existe evidencia clínica y epidemiológica que sugiere que la respuesta inmune del hospedero es primordial en el control de la infestación por G. lamblia.

La respuesta de los individuos contra el parásito puede ser muy variable, como lo demostraron experimentos hechos con voluntarios presos de los EUA a quienes se les administró un inóculo oral de quistes de G. lamblia provocando la infestación en 21 de los 49 voluntarios, 9 notaron cambio en el patrón de sus evacuaciones (en frecuencia y características). La infestación desapareció espontáneamente en 19 individuos, pero en los otros dos la evacuación de quistes persistió por más de 3 meses. Por otro lado los esfuerzos para reinfestar a estos individuos tuvieron éxito en pocos casos, sugiriendo estos hallazgos diferencias en la susceptibilidad de los individuos y el efecto protector de la infestación primaria (34).

La iniciación de la respuesta inmune requiere contacto entre el hospedero y el trofozoíto de G. lamblia. Dicho parásito entra en contacto primero con las células epiteliales del intestino delgado y posteriormente con el sistema inmune ya sea en la luz intestinal o en la mucosa (35).

La primera barrera inespecífica del hospedero a la que se enfrenta G. lamblia, es la acidez gástrica, la cual es obviada fácilmente debido a la protección que le confiere la pared quística. Además el efecto del jugo gástrico puede ser modificado por varios factores como: tamaño del inóculo, protección física por los alimentos y amortiguación del jugo gástrico. La importancia clínica de este hecho se basa en la observación de la alta frecuencia de Giardiasis en individuos con hipoclorhidia o aclorhidia como consecuencia de cirugía gástrica o desnutrición proteica-calórica e inmunodeficiencia (20). En países en condiciones similares al nuestro la mayor frecuencia de la infestación se presenta en niños que sufren de desnutrición (35,36).

El conocido papel de la flora intestinal residente en la protección del desarrollo del organismo patógeno, no parece participar en el control de la invasión por G. lamblia, debido al pequeño número de bacterias encontradas normalmente en el intestino delgado, por el contrario la relación bacteria-Giardia puede ser más bien sinérgica (G. lamblia se ha encontrado asociada a Salmonella y E. coli), probablemente a través de la desconjugación de sales biliares (26,37).

La motilidad del tubo digestivo, al parecer tampoco confiere protección al hospedero, ya que G. lamblia posee mecanismos de adherencia a las células epiteliales, que previenen su eliminación por peristaltismo, por otro lado su ubicación preferencial en la base de las microvellosidades y los pliegues de la mucosa le confiere protección mecánica al flujo del contenido duodenal (38).

Los estudios de inmunofluorescencia indirecta de biopsia de individuos con giardiasis, demostraron que la densidad de las células plasmáticas de la mucosa es predominantemente IgM siguiéndole IgG e IgA. Por inmunofluorescencia directa la densidad de las células productoras de IgA dentro de la mucosa parece normal, pero con antisuero contra cadenas alfa de IgA, una capa de fluorescencia puede ser detectada alrededor de los trofozoítos en la luz intestinal, lo que podría ser una respuesta local contra G. lamblia (39).

Por otro lado, ratones recién nacidos alimentados con calostro de animales previamente inmunizados, fueron resistentes a la infestación después de un desafío oral con quistes de G. muris mientras fueron alimentados con leche inmune, en tanto que los ratones alimentados por calostro de animales no inmunizados adquirieron la infestación (40).

La presencia de anticuerpos de clase IgA e IgG contra Giardia en la leche de madres inmunes, sugiere la protección por estas inmunoglobulinas. Sin embargo, trofozoítos expuestos "in vitro" a la leche humana son inmobilizados y lisados independientemente de la presencia de IgA secretora.

La asociación de Giardiasis con hipogamaglobulinemia, ha despertado la sospecha de una relación causal entre el déficit de las inmunoglobulinas secretoras y la enfermedad de la población en general (41). Estos hallazgos no se han confirmado por otros autores, por lo que Giardiasis no está relacionada con deficiencia de inmunoglobulinas secretoras (42).

En los individuos con Giardiasis sintomática ocurre una respuesta humoral confirmada por la aparición de anticuerpos

circulantes específicos principalmente de clase IgG, los cuales persisten hasta por 15 meses, después de erradicada la infestación (43).

Ensayos "in vitro" sugieren que los anticuerpos contra G. lamblia en los sujetos infestados pueden participar en la resistencia a la infestación mediante fijación de complemento y opsonización, mediando la citotoxicidad por leucocitos polimorfonucleares. El mayor porcentaje de citotoxicidad ha sido observado al utilizar neutrófilos y el isotipo predominante de anticuerpos contra trofozoítos fue IgG. El hecho de que el suero humano depletado de IgG reduzca pero no elimine la citotoxicidad por los granulocitos, sugiere que otros isotipos de inmunoglobulinas puede facilitar la citotoxicidad mediada por granulocitos (35).

#### INMUNIDAD DEL RECIEN NACIDO.

El recién nacido posee un sistema inmune competente tanto humoral como celular, con capacidad para producir anticuerpos de clase IgM, IgG e IgA desde la gestación (44). Sin embargo en sus primeros días de vida va a depender de la inmunidad transmitida por la madre en forma pasiva por vía transplacentaria, ya que el sistema inmune del recién nacido no ha sido estimulado aún por el medio externo (45). Los mecanismos por los cuales la madre les confiere inmunidad pasiva al neonato son: transferencia transplacentaria de anticuerpos de clase IgG (46) y la adquirida por la ingestión de calostro del cual se conoce su contenido de macrófagos, linfocitos T y B, alto contenido de inmunoglobulinas, prin-



principalmente de clase IgA secretora, además de un mecanismo in dependiente de anticuerpos por el cual parásitos como G. lamblia y E. histolytica son destruidos al ponerlos en contacto con la leche humana, probablemente por su contenido de lipasas (47).

#### DIAGNOSTICO.

No hay síntomas ni signos específicos de la infestación que permita establecer un diagnóstico basado en el cuadro clínico exclusivamente (12). El diagnóstico se hace con la demostración de quistes en las deyecciones. Los exámenes coproparasitológicos son la forma más fácil y barata para la detección de quistes y/o trofozoítos, por desgracia su eficiencia va de un 50 a 70% (48,49). La técnica que da mejores resultados es la observación directa de formol éter (técnica de concentración de Ritchie) o el método de flotación con sulfato de cinc (técnica de Faust).

Recientemente se describió un método de contraelectroforesis para la detección de antígeno de G. lamblia en heces con una especificidad del 95% (50). Sin embargo, este método aún no se adapta a los laboratorios de diagnóstico y no diferencia una giardiasis sintomática de una asintomática.

Otra técnica alternativa con mayor eficacia que el coproparasitológico (90%) es obtener una muestra de contenido duodenal, ya sea por sondeo o con una cápsula de gelatina (técnica de Beal), examinando el contenido lo antes posible, aunque en nuestro país debido al costo aún no se lleva a cabo

como técnica de rutina para el diagnóstico de Giardiasis(51).

Las técnicas serológicas, pueden ser de gran utilidad para el diagnóstico de Giardiasis, Se han descrito diferentes métodos como inmunofluorescencia indirecta, ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos contra G. lamblia en suero, mostrando una mayor sensibilidad el método ELISA (52,53). Además de que la inmunofluorescencia descrita requiere de un microscopio equipado con luz ultravioleta, en tanto que la adaptación del ELISA facilita la cuantificación de anticuerpos contra G. lamblia en los laboratorios clínicos, debido a que su costo es más bajo y no requiere de equipo sofisticado.

El análisis inmunoenzimático (ELISA) de tipo indirecto, es un método común para la cuantificación de anticuerpos y antígenos caracterizado por ser sencillo, rápido y altamente sensible; varios tipos de materiales pueden ser empleados como fase sólida en el ELISA como: placas de poliestireno, esferas de nylon, discos de plástico o papel. Recientemente se ha estandarizado la técnica de ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra G. lamblia en suero, empleando placas de poliestireno como fase sólida (43). La utilización de disco de poliestireno ofrece ciertas ventajas en relación a las microplacas, ya que con los discos no se requiere de realizar diluciones, la lectura se lleva a cabo en un espectrofotómetro estandar por lo que su costo es más bajo y la adaptación al laboratorio clínico más fácil.

## TRATAMIENTO.

Las drogas de mayor elección para el tratamiento de la Giardiasis son: Quinacrina, que es la preparación más barata y probablemente la más efectiva, ésta tiene una efectividad del 95 al 100%; Metronidazol, es otra alternativa, pero tiene efectos indeseables que en ocasiones lo hacen intolerante; Furazolidona, que debido a que se vende como suspensión pediátrica, es la droga de elección para los niños (54).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La estandarización de una técnica sensible, reproducible y específica para la cuantificación de anticuerpos dirigidos contra G. lamblia ayudaría al estudio de la respuesta humoral sistémica contra este parásito. El ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA) para la detección de anticuerpos constituye un método sensible, altamente específico y de costo accesible. Se ha reportado la utilización de este método para la cuantificación de IgG anti-G lamblia en suero y calostro utilizando microplacas de poliestireno como soporte de antígeno (55). El empleo de este ensayo de discos de plástico como fase sólida en lugar de microplacas de poliestireno al mismo tiempo de conservar todas las ventajas anteriores lo beneficiaría haciéndolo más rápido ya que obvia la necesidad de hacer diluciones del material en estudio, no requiere de equipo lector de ELISA especial, pudiendo relizarse las lecturas con equipo de espectrofotometría estandar, reduciendo por tanto su costo y facilitando su adaptación a los laboratorios clínicos, de ahí la importancia de su estandarización.

De las distintas inmunoglobulinas, la IgG tiene la capacidad de atravesar placenta. Por lo tanto, es de esperar que los productos nacidos de madres con IgG anti-Giardia en sangre adquieran pasivamente tales anticuerpos específicos, los cuales podríamos demostrar utilizando la metodología antes descrita. Estos anticuerpos podrían tener importancia

en la limitación de la infestación por este protozoario en este grupo de alto riesgo, aún cuando esto no se ha demostrado.

Igualmente esta metodología, podría ser empleada para evaluar la respuesta humoral sistémica en niños portadores de quistes que constituyen el grupo etario más afectado.

## OBJETIVOS.

- ESTANDARIZACION DEL METODO ANALISIS INMUNOENZIMATICO (ELISA) DE TIPO INDIRECTO UTILIZANDO DISCOS DE POLIESTIRENO PARA LA CUANTIFICACION DE ANTICUERPOS TIPO IgG EN SUERO CONTRA G. lamblia.

- DEMOSTRACION CON ESTA METODOLOGIA DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS DE TIPO IgG CONTRA G. lamblia EN SUERO DE NIÑOS PORTADORES DE QUISTES INTESTINALES DE ESTE PROTOZOARIO.

- DEMOSTRACION DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS DE TIPO IgG CONTRA G. lamblia EN SANGRE DE CORDON UNBILICAL DE RECIEN NACIDOS.

## HIPOTESIS.

1.- La utilización de discos de poliestireno como soporte de antígeno en la técnica de análisis inmunoenzimático de tipo indirecto, permite la detección cualitativa y cuantitativa de anticuerpos contra G. lamblia en suero humano.

2.- Los niños portadores de quistes de G. lamblia presentan en suero inmunoglobulinas específicas de tipo IgG anti-G. lamblia, los cuales pueden detectarse por el método de ELISA de tipo indirecto con los discos de poliestireno como soporte de antígeno.

3.- Recien nacidos de madres portadoras de inmunoglobulinas tipo IgG anti-G. lamblia presentan anticuerpos de la misma clase y especificidad en sangre de cordón umbilical, los cuales pueden detectarse por la metodología anterior.

## MATERIAL Y METODOS.

### 1.- Obtención de trofozoítos de G. lamblia:

Los trofozoítos de G. lamblia cepa Portland<sup>1</sup> fueron obtenidos por cultivo axénico en medio TYI modificado por 72 horas.

Los trofozoítos se despegaron de la pared del tubo por enfriamiento en baño de agua helada 4°C durante 15 minutos. Se centrifugaron a 2500 rpm (RC-5 Refrigerated Centrifuge Sorval) durante 10 min. y se lavaron 3 veces con solución amortiguada de fosfatos salina pH 7.2 (PBS-7.2).

### 2.- Preparación de Extracto total de G. lamblia:

$6 \times 10^8$  trofozoítos se suspendieron en 5 ml. de agua destilada fría a pH 10 (el pH se ajustó con NaOH 1 N) y se mantuvo en baño de hielo durante 5 min. Se sonicó por 10 min. hasta tres ocasiones con ultrasonido (Ultrasonic Cleaner Bronson). Se restauró isotonicidad agregando un volumen igual de solución salina al 1.17%. La suspensión se centrifugó a 10 000 rpm 5 minutos, de esta manera las membranas nos quedaron en el paquete y sólo trabajamos con el sobrenadante, al cual se le determinaron proteínas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### 3.- Cuantificación de Proteínas:

La cuantificación de proteínas se realizó por la técnica de Lowry (56). El método colorimétrico es una modificación del método de Folin. Se basa en la determinación de tirosina y triptofano contenidos en la proteína. La proteína reacciona con el cobre de la solución alcalina (reacc. de Biuret) formándose el complejo colorido. Posteriormente la proteína tratada con cobre reduce el reactivo de Folin por los residuos de tirosina, triptofano y cisteína dando el complejo azul. Es



ta intensidad de color se incrementa al reducirse aún más el reactivo (contenido de tirosina y triptofano).

Reactivos: Estandar de proteínas, albúmina sérica bovina (ASB 0.2 mg/ml); 1) Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 N; 2) Sulfato de cobre al 2% en tartrato de sodio y potasio al 1%; 3) Mezclar 1 ml. de reactivo 2 con 50 ml. de reactivo 1; 4) Reactivo de Folin Ciocalteu (Sigma Chemical Co.) a una dilución de 1:3 con agua destilada.

A 0.4 ml. de la muestra problema (extracto de G. lamblia) se adicionaron 2 ml. de reactivo 3 y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min., después se agregaron 0.2 ml. de reactivo de Folin y se leyó la reacción después de media hora en Espectrofotómetro (Beckman Model 26) a 750 nm.

#### 4.- Obtención de suero de Conejo anti-G. lamblia.

Se inoculó un conejo (cepa Nueva zelandia) con extracto total de G. lamblia soluble a una concentración de 1 mg/ml de proteína (a intervalos de una semana durante tres ocasiones, el esquema de inmunización se llevó a cabo al azar), después de una semana se sangró por punción cardíaca. La sangre colectada sin anticoagulante se incubó a 37°C media hora y se centrifugó a 3 000 rpm 10 min. para separar el suero, el cual se almacenó a -20°C hasta su uso y se le determinaron anticuerpos por hemaglutinación (57).

#### 5.- Obtención de suero normal de conejo.

Se separó el suero de la misma forma que se hizo con el suero de conejo anti-G. lamblia. El suero se conservó a -20°C.

#### 6.- Hemaglutinación Indirecta.

Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Kessel Lewis, utilizando eritrocitos de carnero en solución alsever (GRC).

Los eritrocitos se lavaron 3 veces con PBS-7.2 y se preparó una substancia al 3% de GRC. Se hizo una solución de ácido tánico 1: 100 000 con PBS-7.2 y se enfrió a 4°C.

Dos ml. de la suspensión de GRC con 2 ml. de la solución de ácido tánico se conservaron en baño de hielo 15 min. agitando a intervalos de 5 min., se lavaron una vez con PBS-7.2 y se suspendieron en 2 ml. de solución salina fisiológica (SSF). Posteriormente se sensibilizaron los eritrocitos tanados incubándolos con 2 ml. del extracto total de G. lamblia (50 ug/ml de proteínas en PBS 6.4) durante una hora a 37°C. en baño maría (eritrocitos sensibilizados). En otro tubo se incubaron los eritrocitos tanados con 2 ml. de PBS-6.4 (eritrocitos insensibilizados) a 37°C. una hora. Se lavaron dos veces con diluyente (PBS-7.2-Suero normal de conejo al 1%). La suspensión de células fue llevada a un volumen final de 3 ml. con diluyente.

La hemaglutinación se efectuó adicionando 50 ul de la muestra problema (suero de conejo anti-G. lamblia) y se hicieron diluciones dobles a partir de una dilución de 1:2. Para cada suero se llenaron dos hileras; a la primera se adicionaron 25 ul de eritrocitos sensibilizados y a la segunda eritrocitos sin sensibilizar. Las placas se incubaron una hora a temperatura ambiente y se procedió a la lectura. El título hemaglutinante se consideró la máxima dilución donde hubo 100% de hemaglutinación.

7.- Acoplamiento del Extracto de G. lamblia a discos de plástico.

Quinientos discos de plástico con grupos isotiocinato libres (Cordis Inc. USA), se suspendieron en 50 ml. de extracto protéico de G. lamblia (0.05 mg/ml de proteína) en amortiguador de carbonatos a 0.01M pH 9.6, manteniéndose en agitación toda la no

che a 4°C. Se lavaron cuatro veces con PBS adicionado de Polioxietileno sorbital monolaurato (Tween 20) 0.05% (PBS-TWEEN). Después se adicionaron 50 ml. de ASB (2 mg/ml en amortiguador de fosfatos 0.01M pH 7.4) manteniéndose en agitación toda la noche a 4°C. Los discos se lavaron con PBS-TWEEN, se secaron por liofilización y se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

#### 8.- Ensayo Inmunoenzimático (ELISA).

En un frasco de vidrio se agregaron 40 ul de diluyente (PBS-TWEEN-ASB al 6%) y 15 ul de muestra problema, posteriormente se adicionó un disco de poliestireno sensibilizado con extracto de G.lamblia y se incubó tres horas a 37°C., se lavaron los discos con PBS-TWEEN ocho veces y se adicionaron 500 ul. de Anti-IgG conjugada a peroxidasa (Sigma Chemical Co.) a una dilución de 1:1000, se incubó media hora a 37°C; nuevamente se lavaron los discos y se cambiaron de frasco, donde se incubaron con 1 ml. de sustrato (40 ug/ml de O-fenilendiamina en amortiguador de citratos pH 5.0 adicionado de 40 ul de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), durante media hora, se paró la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5N y se leyó la reacción de sustrato a 490 nm en un espectrofotómetro (ELISA Reader). Para reportar los resultados de los sueros de cordón umbilical y sangre periférica las absorbancias se relacionaron con el testigo positivo expresándolo en porcentaje de absorbancia.

$$\% \text{ absorbancia} = \frac{\text{Absorbancia problema}}{\text{Absorbancia testigo}} \times 100$$

#### 9.- Obtención de muestras.

Se obtubieron 41 muestras de sangre periférica de mujeres hospitalizadas en el Hospital de la Mujer S.S. México D.F. en trabajo de parto así como muestra de cordón umbilical.

Las muestras de sangre periférica y cordón umbilical colectadas sin anticoagulantes se incubaron media hora a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3000 rpm 10 min. para se

BUSQUEDA DE ANTICUERPOS CONTRA Giardia lamblia  
EN SUERO DE CORDON UMBILICAL Y SANGRE PERIFERICA.

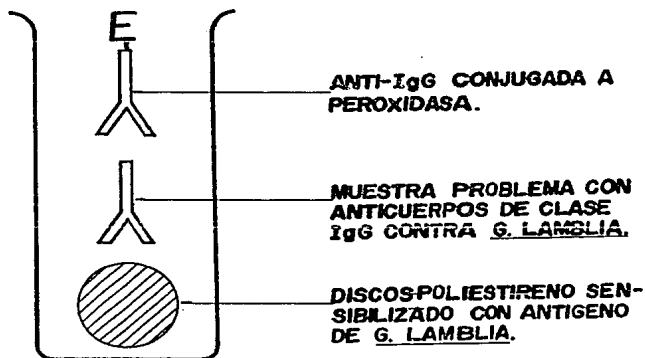


Fig. 3: Representación esquemática del análisis inmunoenzimático ELISA

parar el suero. Los sueros se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 10.- Análisis Estadístico.

Se aplicó una *t* de student para muestras no correlacionadas para comprobar si la diferencia de absorbancias es significativa entre los sueros de conejo anti-G. lamblia y sueros de conejo anti-Klebsiella, anti-E. histolytica y suero de conejo normal. La misma prueba se utilizó para los sueros de niños portadores de quistes de G. lamblia y niños no portadores.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{N_1 + N_2} - 2 \frac{1}{N_1} \frac{1}{N_2}}}$$

Donde:  $\sum x^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N}$

Para demostrar si la diferencia de absorbancias obtenidas para el suero hiprimmune anti-G. lamblia absorbido con trofozoítos y sin absorber, se utilizó la prueba t pareada para muestras correlacionadas.

$$t = \frac{\bar{D}}{S_{\bar{D}}}$$

Donde:

$\bar{D}$  = Media de las diferencias entre  $X_1$  y  $X_2$

$$S_{\bar{D}} = \frac{S_D}{\sqrt{N-1}}$$

$$S_D = \sqrt{\frac{\sum d^2}{N}}$$

$$\sum d^2 = \sum D^2 - \frac{(\sum D)^2}{N}$$

$\sum D$  = Sumatoria de las diferencias

La correlación de las muestras de sangre periférica y cordón umbilical de los productos se calculó empleando la r de pearson ( formula para calculadora)

## SOLUCIONES

## Solución salina fisiológica 0.85% (SSF).

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Cloruro de sodio .....   | 8.5 g. |
| Agua destilada ..... cbp | 1 l.   |

## Solución Alsever.

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| Dextrosa o Glucosa .....     | 2.05g  |
| Citrato de sodio .....       | 0.08g  |
| Cloruro de sodio .....       | 0.42g  |
| Acido cítrico .....          | 0.055g |
| Agua destilada ..... cbp     | 100 ml |
| Esterilizar a 10 lb. 10 min. |        |

## Amortiguador salino fosfato pH 7.2

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| Cloruro de sodio .....              | 8.5 g  |
| Fosfato de Potasio monobásico ..... | 0.2 g  |
| Fosfato de sodio dibásico .....     | 1.15g  |
| Cloruro de potasio .....            | 0.2 g  |
| Agua destilada ..... cbp            | 1.0 l. |

## Medio TYI-S-33 Modificado

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| Peptona Biotriptasa .....           | 2.6 g   |
| Dextrosa .....                      | 1.0 g   |
| Cloruro de sodio .....              | 0.2 g   |
| Fosfato de potasio monobásico ..... | 0.06g   |
| Fosfato de potasio dibásico .....   | 0.1 g   |
| Cisteína .....                      | 0.2 g   |
| Acido ascórbico .....               | 0.02g   |
| Citrato Ferrico de Amonio .....     | 0.0022g |

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Billis bovina .....  | 0.1 g   |
| Agua destilada ..... | 87.0ml. |

Ajustar el pH a 7.1-7.2 con hidróxido de sodio 1N  
esterilizar por filtración (membrana 0.22)  
completar el medio con 10% de suero bovino deccomplementado.

**Amortiguador de carbonatos pH 9.6**

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| Carbonato de sodio .....   | 1.59g      |
| Bicarbonato de sodio ..... | 2.93g      |
| Agua destilada .....       | cbp 1.0 l. |

**Amortiguador de Citratos pH 5.0 (para sustrato peroxidasa).**

|                                      |             |
|--------------------------------------|-------------|
| Acido cítrico 0.1M .....             | 24.3ml.     |
| Fosfato dibásico de sodio 0.2M ..... | 25.7ml.     |
| Agua destilada .....                 | cbp 100 ml. |

## RESULTADOS.

La concentración de proteínas del antígeno de G.lamblia se determinó por el método de Lowry, obteniéndose una concentración de 3.7 mg/ml.

El título hemaglutinante obtenido para el suero de conejo anti-G.lamblia fue de 1:1040 y el suero normal de conejo no presentó título hemaglutinante.

### Ensayo Inmunoenzimático.

a) Reproducibilidad. El suero de conejo anti G.lamblia y el suero de conejo normal, se probaron por octuplicado utilizando proteína A conjugada a peroxidasa (Poliscience, Inc.) a una dilución de 1:200 en PBS-7.2. Como puede observarse en la tabla I, las absorbancias del suero a 490 nm de conejo anti-G.lamblia son significativamente mayores que las del suero de conejo normal para  $p < 0.05$  (tabla I).

b) Especificidad. Se realizó un ensayo de especificidad para corroborar que no hubiera reacción cruzada probando un suero de conejo anti-Klebsiella y suero de conejo anti-E.histolytica.

No se detectaron absorbancias con suero de conejo anti-Klebsiella y suero de conejo anti-E.histolytica como puede observarse en la tabla II.

Por otro lado, un ensayo realizado por triplicado con una alícuota de suero hiperinmune (Donado por la Dra. Guadalupe Ortega CINVESTAV-IPN) y otra alícuota del mismo suero absorbida con  $5 \times 10^6$  trofozoítos de G.lamblia durante una hora a  $37^\circ\text{C}$ . Se observó una clara disminución de la absorbancia en relación al mismo suero sin absorber para  $p < 0.01$ . Tabla III.



BUSQUEDA DE ANTICUERPOS CONTRA Giardia lamblia  
 EN SUERO DE CORDON UMBILICAL Y SANGRE PERIFERICA

TABLA I. Ensayo de ELISA por octuplicado del suero de conejo anti-G. lamblia utilizando Proteína A. conjugada a Peroxidasa para determinar anticuerpos específicos de clase IgG

ABSORBANCIAS

| Suero de conejo<br>anti-G. <u>lamblia</u> | suero de conejo<br>normal |
|---|---------------------------|
| 0.207                                     | 0.002                     |
| 0.434                                     | 0.008                     |
| 0.245                                     | 0.001                     |
| 0.192                                     | 0.008                     |
| 0.224                                     | 0.000                     |
| 0.269                                     | 0.012                     |
| 0.244                                     | 0.003                     |
| 0.192                                     | 0.000                     |
| X = 0.251                                 | X = 0.004                 |
| DE = 0.078                                | DE = 0.004                |

$$t = 2.7 \quad p < 0.05$$

X = Media de las absorbancias  
 DE = Desviación estandard

BUSQUEDA DE ANTICUERPOS CONTRA Giardia lamblia  
 EN SUERO DE CORDON UMBILICAL Y SANGRE PERIFERICA

TABLA II. Determinación de anticuerpos contra Giardia lamblia en sueros de conejo anti-Klebsiella, E. histolytica y anti-G. lamblia probados por cuatruplicado mediante el método de ELISA (Absorbancias).

| Suero de conejo anti-G. <u>lamblia</u> | Suero de conejo anti-E. <u>histolytica</u> | Suero de conejo anti- <u>Klebsiella</u> |
|--|--|---|
| 0.102                                  | 0.015                                      | 0.036                                   |
| 0.140                                  | 0.033                                      | 0.021                                   |
| 0.138                                  | 0.048                                      | 0.012                                   |
| 0.127                                  | 0.032                                      | 0.023                                   |
| X = 0.127 ‡                            | 0.032*                                     | 0.023°                                  |
| DE = 0.017                             | 0.013                                      | 0.009                                   |

X = Media de las aboserbancias;  
 DE = Desviación estandard

\* t = 17.25 para  $p < 0.001$

° t = 14.46 para  $p < 0.001$

BUSQUEDA DE ANTICUERPOS CONTRA Giardia lamblia  
 EN SUERO DE CORDON UMBILICAL Y SANGRE PERIFERICA

TABLA III. Determinación de anticuerpos en suero de conejo hiperinmune contra G. lamblia absorbido con  $5 \times 10^6$  trofozoítos media hora a  $37^\circ$  C.

| SUERO DE CONEJO HIPERINMUNE<br>Anti- <u>G.lamblia</u> sin absorber | SUERO DE CONEJO HIPERINMUNE<br>Anti- <u>G.lamblia</u> absorbido |
|--|---|
| 1.044  | 0.293   |
| 0.587  | 0.372   |
| 0.905  | 0.305   |
| 0.592  | 0.253   |
| X = 0.782  | 0.330   |
| DE = 0.229   | 0.037   |

X = Media de las absorbancias  
 DE = Desviación estandar.

$$t = 3.37 \text{ para } p < 0.05$$

BUSQUEDA DE ANTICUERPOS CONTRA Giardia lamblia  
 EN SUERO DE CORDON UMBILICAL Y SANGRE PERIFERICA

TABLA IV. Determinación de anticuerpos contra G. lamblia de tipo IgG en suero de niños portadores de quistes de Giardia y no portadores.

| MUESTRA | NIÑOS PORTADORES* | NIÑOS NO. PORTADORES* |
|---------|-------------------|-----------------------|
| 1       | 0.592             | 0.146                 |
| 2       | 0.415             | 0.188                 |
| 3       | 0.456             | 0.136                 |
| 4       | 0.445             | 0.131                 |
| 5       | 0.460             | 0.188                 |
| 6       | 0.303             | 0.153                 |
| 7       | 0.501             | 0.138                 |
| 8       | 0.381             | 0.159                 |
| 9       | 0.465             | 0.100                 |
| 10      | 0.455             | 0.129                 |
| X       | 0.437             | 0.146                 |
| DE      | 0.055             | 0.026                 |

X = Media de las absorbancias  
 DE = Desviación estandard

t - 3.37 p < 0.05

\* Absorbancia media de ensayos por duplicado.

c) Determinación de anticuerpos contra G. lamblia de clase IgG en suero de niños portadores de quistes en heces.

El ensayo se probó con 10 sueros de niños portadores de quistes de G. lamblia en heces y 10 sueros de niños no portadores como testigos negativos. Ensayando las muestras por duplicado y utilizando anti-IgG conjugada a peroxidasa (Sigma Chemical Co.) 1:1000. Como puede observarse en la tabla IV, las absorbancias de los sueros de niños portadores son significativamente más altas que para los sueros de niños no portadores para  $p < 0.01$ .

d) Cuantificación de anticuerpos contra G. lamblia de tipo IgG en suero de sangre periférica y cordón umbilical.

Se determinaron anticuerpos contra G. lamblia de clase IgG utilizando anti-IgG conjugada a peroxidasa a una dilución de 1:1000 en 41 muestras de suero de sangre periférica y 41 muestras de suero de cordón umbilical. Las muestras se probaron por duplicado bajo las mismas condiciones de reacción, mostrándose los resultados en la tabla V y VI respectivamente. Junto con las muestras problema se analizó un suero testigo positivo que se obtuvo de un paciente con diagnóstico clínico de Giardiasis comprobado por la presencia de quistes de G. lamblia en heces, el cual siempre dió una absorbancia alta.

Las muestras problema se relacionaron en porcentaje con el testigo positivo.

Se consideraron positivas las muestras con una absorbancia del 55% en relación al testigo positivo, ésto tomado

de la media de las absorbancias de los sueros de niños portadores de quistes de G. lamblia.

El coeficiente de correlación encontrada para las muestras de cordón umbilical y sangre periférica utilizando la r de Pearson fue de 0.7 (Fig. 4).

Las muestras con un porcentaje mayor o igual al 55% (absorbancia mayor o igual a 0.2) se probaron después de incubar previamente la muestra con una concentración conocida de antígeno soluble de G. lamblia, para demostrar si se consideraban como muestras positivas o bien las absorbancias se debían a una reacción inespecífica observándose una disminución de casi el 50% en las muestras preincubadas con el extracto de G. lamblia.

De acuerdo a los resultados, 5 (12.9%) muestras de sangre periférica y 6 (14.63) muestras de cordón umbilical contienen anticuerpos específicos de G. lamblia de tipo IgG.

BUSQUEDA DE ANTICUERPOS CONTRA Giardia lamblia  
 EN SUERO DE CORDON UMBILICAL Y SANGRE PERIFERICA

TABLA V. Absorbancias de sueros de sangre periférica analiza  
 da por duplicado y expresados en porcentaje en rela  
 ción al testigo positivo que representa el 100%.

| MUESTRAS DE SANGRE PERIFERICA |              |       |           |       |
|-------------------------------|--------------|-------|-----------|-------|
| MTRA.                         | ABSORBANCIAS |       | $\bar{X}$ | %     |
| 1                             | 0.083        | 0.095 | 0.084     | 27.4  |
| 2                             | 0.136        | 0.186 | 0.165     | 45.30 |
| 3                             | 0.139        | 0.111 | 0.125     | 34.34 |
| 4                             | 0.168        | 0.261 | 0.214     | 58.79 |
| 5                             | 0.148        | 0.155 | 0.151     | 41.48 |
| 6                             | 0.153        | 0.099 | 0.126     | 34.6  |
| 7                             | 0.062        | 0.090 | 0.076     | 20.8  |
| 8                             | 0.184        | 0.244 | 0.214     | 58.79 |
| 9                             | 0.160        | 0.162 | 0.161     | 44.23 |
| 10                            | 0.099        | 0.120 | 0.109     | 29.94 |
| 11                            | 0.092        | 0.084 | 0.088     | 24.17 |
| 12                            | 0.102        | 0.124 | 0.113     | 37.4  |
| 13                            | 0.194        | 0.173 | 0.183     | 50.27 |
| 14                            | 0.109        | 0.099 | 0.104     | 53.43 |
| 15                            | 0.135        | 0.102 | 0.118     | 29.27 |
| 16                            | 0.122        | 0.089 | 0.105     | 34.76 |
| 17                            | 0.281        | 0.275 | 0.278     | 73.37 |
| 18                            | 0.069        | 0.054 | 0.061     | 16.75 |
| 19                            | 0.122        | 0.144 | 0.133     | 36.53 |
| 20                            | 0.117        | 0.120 | 0.118     | 32.4  |
| 21                            | 0.062        | 0.051 | 0.056     | 15.30 |
| 22                            | 0.056        | 0.060 | 0.057     | 15.9  |
| 23                            | 0.069        | 0.082 | 0.075     | 20.60 |
| 24                            | 0.053        | 0.060 | 0.056     | 15.38 |
| 25                            | 0.145        | 0.148 | 0.146     | 40.10 |
| 26                            | 0.057        | 0.097 | 0.077     | 21.15 |
| 27                            | 0.125        | 0.132 | 0.128     | 35.16 |
| 28                            | 0.065        | 0.048 | 0.056     | 15.38 |
| 29                            | 0.027        | 0.029 | 0.028     | 7.69  |
| 30                            | 0.107        | 0.171 | 0.134     | 36.8  |
| 31                            | 0.077        | 0.088 | 0.082     | 22.5  |
| 32                            | 0.415        | 0.446 | 0.430     | 118   |
| 33                            | 0.238        | 0.236 | 0.237     | 65.10 |
| 34                            | 0.090        | 0.113 | 0.102     | 28.02 |
| 35                            | 0.158        | 0.158 | 0.158     | 43.4  |
| 36                            | 0.016        | 0.037 | 0.026     | 7.14  |
| 37                            | 0.011        | 0.011 | 0.011     | 3.02  |
| 38                            | 0.094        | 0.074 | 0.084     | 23.07 |
| 39                            | 0.021        | 0.020 | 0.020     | 5.49  |
| 40                            | 0.033        | 0.038 | 0.035     | 9.61  |
| 41                            | 0.018        | 0.027 | 0.022     | 6.04  |
| Testigo+                      | 0.359        | 0.370 | 0.364     | 100   |

BUSQUEDA DE ANTICUERPOS CONTRA Giardia lamblia  
EN SUERO DE CORDON UMBILICAL Y SANGRE PERIFERICA

TABLA VI. Absorbancias de sueros de cordón umbilical analiza-  
dos por duplicado y expresados en porcentaje en re-  
lación al testigo positivo.

| MUESTRAS DE CORDON UMBILICAL |              |       |           |        |
|------------------------------|--------------|-------|-----------|--------|
| MTRA.                        | ABSORBANCIAS |       | $\bar{X}$ | %      |
| 1                            | 0.093        | 0.140 | 0.165     | 45.3   |
| 2                            | 0.141        | 0.141 | 0.141     | 38.73  |
| 3                            | 0.072        | 0.095 | 0.083     | 22.8   |
| 4                            | 0.169        | 0.190 | 0.179     | 49.1   |
| 5                            | 0.121        | 0.090 | 0.105     | 28.83  |
| 6                            | 0.361        | 0.300 | 0.330     | 90.65  |
| 7                            | 0.173        | 0.128 | 0.150     | 41.20  |
| 8                            | 0.090        | 0.076 | 0.081     | 22.25  |
| 9                            | 0.160        | 0.162 | 0.161     | 44.20  |
| 10                           | 0.072        | 0.095 | 0.073     | 20.05  |
| 11                           | 0.073        | 0.071 | 0.072     | 19.78  |
| 12                           | 0.127        | 0.193 | 0.160     | 43.90  |
| 13                           | 0.130        | 0.165 | 0.147     | 40.30  |
| 14                           | 0.262        | 0.234 | 0.284     | 78.82  |
| 15                           | 0.170        | 0.186 | 0.178     | 48.90  |
| 16                           | 0.183        | 0.243 | 0.213     | 58.5   |
| 17                           | 0.092        | 0.055 | 0.073     | 7.67   |
| 18                           | 0.181        | 0.178 | 0.179     | 49.17  |
| 19                           | 0.106        | 0.085 | 0.095     | 36.28  |
| 20                           | 0.047        | 0.043 | 0.045     | 12.36  |
| 21                           | 0.129        | 0.127 | 0.128     | 35.16  |
| 22                           | 0.051        | 0.041 | 0.075     | 20.64  |
| 23                           | 0.052        | 0.050 | 0.051     | 14.01  |
| 24                           | 0.144        | 0.120 | 0.123     | 33.74  |
| 25                           | 0.174        | 0.108 | 0.141     | 38.7   |
| 26                           | 0.226        | 0.205 | 0.215     | 59.06  |
| 27                           | 0.073        | 0.119 | 0.096     | 26.37  |
| 28                           | 0.071        | 0.088 | 0.079     | 21.70  |
| 29                           | 0.035        | 0.047 | 0.041     | 11.27  |
| 30                           | 0.142        | 0.079 | 0.110     | 30.21  |
| 31                           | 0.169        | 0.119 | 0.144     | 39.56½ |
| 32                           | 0.260        | 0.265 | 0.267     | 73.35  |
| 33                           | 0.298        | 0.210 | 0.249     | 68.40  |
| 34                           | 0.117        | 0.089 | 0.103     | 28.29  |
| 35                           | 0.050        | 0.038 | 0.044     | 12.08  |
| 36                           | 0.075        | 0.041 | 0.058     | 15.93  |
| 37                           | 0.079        | 0.091 | 0.085     | 23.35  |
| 38                           | 0.065        | 0.097 | 0.081     | 22.25  |
| 39                           | 0.041        | 0.059 | 0.050     | 13.73  |
| 40                           | 0.043        | 0.037 | 0.040     | 10.98  |
| Testigo+                     | 0.359        | 0.370 | 0.364     | 100.00 |



BUSQUEDA DE ANTICUERPOS CONTRA Giardia lamblia  
EN SUERO DE CORDON UMBILICAL Y SANGRE PERIFERICA

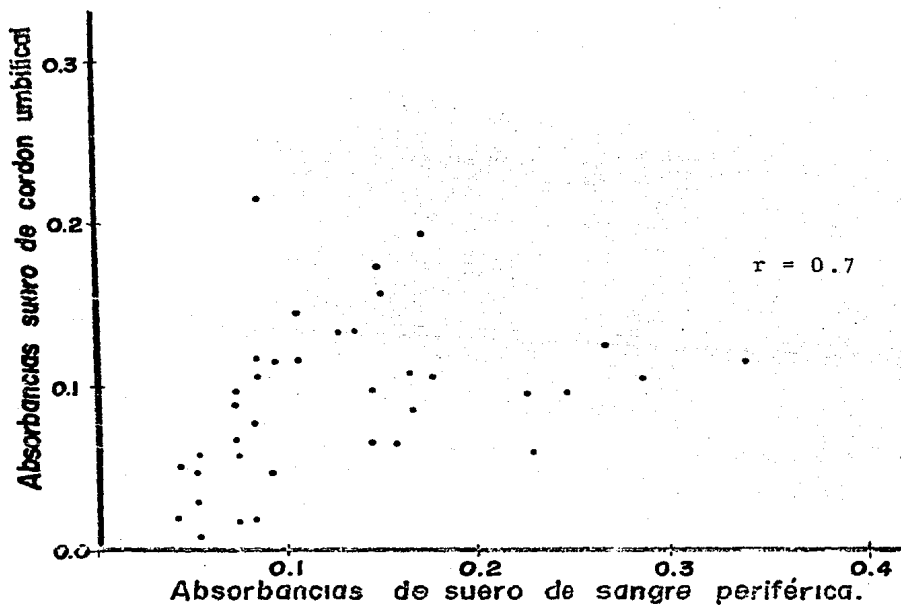


Fig 4: Correlación lineal entre el suero de sangre periférica de las madres y el suero de cordón umbilical de recién nacidos.

## DISCUSION.

Giardia lamblia es el parásito más común en el humano y se encuentra en todas las regiones de clima templado y tropical del mundo. En las últimas décadas su estudio ha adquirido mucha importancia en lo que respecta a mecanismos de colonización, patogenia, transmisión, tratamiento y prevención. En este contexto es que la relación hospedero parásito en el sentido de respuesta humoral al mismo ocupa un papel preeminente en el campo de la investigación en Giardiasis, el cual se ha visto favorecido por el desarrollo de técnicas serológicas como ELISA e inmunofluorescencia para la cuantificación de anticuerpos específicos contra este protozooario.

El propósito de nuestro trabajo fue desarrollar un ensayo inmunoenzimático indirecto para cuantificación de anticuerpos específicos contra G.lamblia de clase IgG en suero, utilizando discos de poliestireno como fase sólida, cuya eficacia y ventajas como soporte de diversos antígenos ya ha sido demostrada (58), aunque no con G. lamblia.

La efectividad del método la demostramos utilizando como material problema suero proveniente de conejos inmunizados con G.lamblia, con los cuales obtuvimos títulos de absorbancia significativamente más altas que las absorbancias <sup>con</sup> suero de conejos no inmunizados ( $p < 0.01$ ).

La especificidad del método, la evidenciamos utilizando suero de conejo hiperinmune anti-Klebsiella y suero de conejo hiperinmune anti-E.histolytica como muestra de contraste, con los cuales los títulos de absorbancia obtenidos fueron significativamente más bajos ( $p < 0.001$ ). De esta manera des-

cartamos que las absorbancias obtenidas con sueros de conejos inmunizados con G.lamblia fueron debidas a fijación inespecífica de IgG a los discos de poliestireno. También esta posibilidad la descartamos absorbiendo previamente los sueros hiperinmunes anti-G.lamblia con trofozoítos de Giardia, lo cual redujo significativamente los títulos de absorbancias obtenidos con sueros no absorbidos ( $p < 0.05$ ).

Este ensayo inmunoenzimático, efectivo, reproducible, y específico en la detección de anticuerpos contra G.lamblia en sueros de conejo, posteriormente demostramos que es igualmente eficaz con suero humano para lo cual, utilizamos como muestra problema suero de niños portadores de quistes de G.lamblia, población en la cual el método resultó ser eficaz para la detección de anticuerpos específicos y como muestras testigo sueros de niños no portadores, en los cuales los títulos de absorbancia fueron significativamente menores al comparar con los anteriores ( $p < 0.01$ ). Este hallazgo indica la presencia de respuesta humoral sistémica al protozoario en niños portadores de quistes de G.lamblia y detectables por esta técnica serológica.

Posteriormente el método lo utilizamos, para demostrar la transferencia transplacentaria de anticuerpos específicos contra G.lamblia de clase IgG, ensayando muestras de sangre periférica de mujeres en trabajo de parto y muestras de suero de cordón umbilical de los productos respectivos.

En el 15% de los sueros maternos y en el 15% de los sueros de los productos se detectaron con esta metodología anticuerpos de tipo IgG contra G.lamblia, lo que demuestra la trans

ferencia transplacentaria de estos anticuerpos maternos específicos a los recién nacidos (correlación de los sueros de sangre periférica y cordón umbilical de  $r=0.7$ ), lo cual es esperable debido a la capacidad de la inmunoglobulina G. de atravesar placenta a diferencia de los otros tipos de inmunoglobulinas.

Esta transferencia pasiva de anticuerpos maternos anti-G. lamblia podría ser de trascendencia para los recién nacidos, ya que podría limitar la infestación intestinal por este parásito, aún cuando esta hipótesis requiere de demostración.

No se llevó a cabo la evaluación de las madres en cuanto a manifestaciones clínicas con respecto de Giardiasis, ni la búsqueda de quistes de Giardia en heces, ya que no formaba parte de nuestros objetivos, aunque hubiera sido deseable disponer de esta información.

No se comparó la técnica con otras (standard de oro) para comprobar su sensibilidad; sin embargo, existen referencias de que el método de ELISA para la detección de anticuerpos sería más sensible que la hemaglutinación, inmunodifusión, con trainmunolectroforesis; tendría la misma sensibilidad que la inmunofluorescencia indirecta y menor que el radioinmunoensayo (59). Consideramos que esta contrastación es importante y debería de llevarse a cabo.

Consideramos que nuestras observaciones deben complementarse con estudios dirigidos a establecer la correlación existente entre niveles de IgG sérica e IgA en calostro -ambas específicas contra G. lamblia- en madres provenientes de diferentes estratos socioeconómicos; determinar las implicaciones clínicas de la presencia de IgG sérica anti-G. lam

blia en el recién nacido; definir la frecuencia y edad de seroconversión con respecto a Giardiasis y persistencia de dichos anticuerpos en la población mexicana; y finalmente corroborar la utilidad y practicidad del empleo de métodos serológicos para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con Giardiasis.

## CONCLUSIONES.

El ensayo inmunoenzimático, utilizando discos de polies tireno como fase sólida, demostró ser efectivo, reproducible y específico para la cuantificación de anticuerpos contra G. lamblia y podría ser utilizado para cuantificar anticuerpos en otros fluidos como saliva, calostro, aspirado duodenal, y puede contribuir de esta manera al estudio de la respuesta humoral local contra dicho protozoario.

Esta metodología la utilizamos para la demostración de la presencia en suero de anticuerpos de tipo IgG en niños con Giardiasis, lo que evidencia la presencia de respuesta humoral sistémica en la infestación por este parásito.

Igualmente demostramos la presencia de anticuerpos de tipo IgG contra G. lamblia en suero de cordón umbilical de recién nacidos; esta transferencia pasiva de anticuerpos específicos podría ser importante en la limitación de la infestación por este parásito en este grupo etario.

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Cortner J.A.: Giardiasis; a cause of celiac syndrome Am. J. Dis. Child 98: 311-315, 1959.
- 2.- Veghey P. Giardiasis in Children AM. J. Dis. Child. 56: 1231-1241, 1938.
- 3.- Yardley J. Bazyless T.M.: Clinical Giardiasis and Intestinal Malabsorption. Gastroent. 53; 265-277, 1967.
- 4.- Farthing M.: Giardia lamblia; mecanismos de colonización y patogénesis de la enfermedad diarreica, infectología 379, 1983.
- 5.- Black Robert E., Dikes C., Sincleir C. Weels Joy A.: Giardiasis on daycare centers. Evidence of person to person transmission. Pediatrics. 522-526, 1984.
- 7.- Telch. J., Vega L., Lara R.; Parasitosis intestinal en un hospital de concentración. Bol. Med. Hosp. Mex. 31;4: 733;745, 1974.
- 8.- Tay J., Lazar P.M., Haro I., Ruiz A.L.L.; Frecuencia de las protozoosis intestinales en México. Sal. Pub. Mex. 20: 297-377, 1979.
- 9.- Martuccelli A.: Las parasitosis más comunes en México Rev. Fac. Med. 11:3; 21-40, 1968.
- 10.- Owen R.L.: The ultrastructural basis of Giardia fuction Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg. 74;429, 1980.
- 11.- Haiba M.H.: The pH of the alimentary tract in normal and Giardia infected culture mice. Parasitology. 44: 387-391, 1954.
- 12.- Meyer E. Radulesco S.: Giardia and giardiasis Adv. Parasitol 17:1; 1979
- 13.- Gingman A., Meyer E. Giardia excystation can be induced "in vitro" in acidic solutions Nature. 273-361, 1979.
- 14.- Hill D.R., Hewelt E.L.; Pearson R. Lectin Binding by Giardia lamblia infect. Immunity. 34;3: 733-781, 1981.
- 15.- Lind Mark D.: Metabolism of Giardia lamblia J. Protozool. 26:11A, 1979.
- 16.- Bemrick E.: The effect of bile flow on Giardia duodenalis race simoni in the intestine of a laboratory strain of Ratus Norvegicus. J. Parasitol. 49, 959, 1963.
- 17.- Scholens R.A.: The effect of vitamin deficient rations on giardiasis in the mouse AM. J. Vet. res. 1084-1088, 1962.
- 19.- Ridley M.J. and Ridley D.S.: Serum antibodies and jejunal histology in giardiasis asociated wigh malabsorption. J. clin path. 29: 30-34, 1976.

- 20.- Wrought S.G.: Giardiasis and malabsorption Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg 74:4; 436, 1976.
- 21.- Morck R., Rakes S.G.: Ultrastructural studies of the human Giardia lamblia and subyacent jejunal mucosa in a subject with steatorrea. Gastroent. 52: 151-164, 1967.
- 22.- Erlandsen S. and Shase D.: Morphological alterations in the microvillus border of villus epithelial produced by microorganisms. A. J. Clin. Nutr. 27; 1277, 1974
- 23.- Solomons N.: Giardiasis nutritional implications Rev. Infect. Dis. 4:859, 1982.
- 24.- Hoskins L., Winawer S. et al.: Clinical Giardiasis and malabsorption. Gastroent. 53: 265, 1976.
- 25.- Tomkins A.M., Brasar B.S., Bradley A.K. and Williams W.A., Bacterial colonization of jejunal mucosa in giardiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg. 72: 33-36; 1978.
- 26.- Tamdon B.N. Satpath N.K. and Shiriniwas: Mechanism of malabsorption in giardiasis. A study of bacterial flora and bile salt desconjugation in upper jejun. Gut. 18: 176-181, 1977.
- 27.- Gianella Ralph A., Broitman Selwyn A., and Zamcheck N.: Influence of gastric acidity on bacterial and parasitic enteric infections Annals of Internal Med. 79: 271-276, 1973.
- 28.- Barnes G.L. Kay Rosa: Blood Groups in Giardiasis. The lancet. 9: 808, 1977.
- 29.- Zisman Meraldo.: Blood group A and giardiasis. The lancet 17:1285, 1977.
- 30.- Steven D.P.: Giardiasis host. pathogen biology. Rev. Infect. Dis. 4: 851-868, 1982.
- 31.- Webster A.S.B.: Giardiasis and immunodeficiency disease. Trans. R. trop med. hyg. 74: 4; 440-442, 1980.
- 32.- Bransborg A.B., Tankersley Charlkette B., Gottieeb Stuart., Baracik M. and Startor V.E.: Histological demonstration of mucosal invasion by Giardia lamblia in man. Gastroent. 52: 2(1) 143-150, 1967.
- 33.- Ramirez J.A. Rivera M., Y Saucedo L.: Principales manifestaciones gastrointestinales de la giardiasis en México. Bol. Med. Hosp. Inf. Mex. 40:10; 571-576, 1983.
- 34.- Randtorff R.: The experimental Transmission of human intestinal protozoa parasites II. Giardia lamblia given in capsule. Am. J. Hyg. 59: 220, 1954.



- 35.- Smith P.D. Keister D.B. and Charles O.: Human host response to Giardia lamblia. Antibody Dependent killing "in vitro". Cellular Immunology. 308-315, 1982.
- 36.- Kumate J. Gutiérrez G.: Manual de Infectología 7<sup>a</sup> Ed. Mex. Ediciones Médicas del Hosp. Inf. Mex. 1981, 34-44.
- 37.- Solomons N. W.: Giardiasis: nutritional implications Rev. Infect. Dis. 4: 870, 1982.
- 38.- Steve H. Monroy A.: Giardia II. Infectologia 14:1; 16-22, 1984.
- 39.- Hartong A.W., Gorrely E.K. and Arvanitakis C.: Giardiasis clinical spectrum and functional structural abnormalities of the small intestine mucosa, Gastroent. 77; 61-69, 1979.
- 40.- Andrew J.S. Hewelt E.: Protection against infections with Giardia muris by milk containing antibodies to Giardia. J. Infect. Dis. 17:9; 793-797, 1972.
- 42.- Samson R.R. McClelland and Shearman J.C.: Studies of the quantitation of immunoglobulin in human intestinal secretions. Gut. 1973, 14, 616-626.
- 43.- Smith P.A. Gillin F.A. Brown R. and Mash Theodore E.: IgG antibodies to Giardia lamblia detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Gastroent. 80: 1476-1840, 1980.
- 44.- Hanson L.A. Brinto C., Carrisson B.: The mucosal immune in neonato. Acta Ped. Scand. (suppl.) 296:53d, 1983.
- 45.- Ogra P.L. Ontogeny of the focal immune system Pediatrics. 64:765, 1980.
- 46.- Tajerina J. Lasso L. Aubonet M., Gutiérrez G.: Transmission transplacentary of antibodies to E. histolytica. Invest. Med. 4 (suppl. 1), 1980.
- 47.- Gillin F.D., Reiner D.S.: Human milk, Kills Parasitic intestinal protozoa Science. 221: 1290, 1983.
- 48.- Saha R., Gosh T.: Invasion of small intestine mucosa by Giardia in man Gastroent. 72:402, 1977.
- 49.- Kamath K.R.: A Comparative study of four methods for detecting Giardia lamblia in children with diarrheal disease and malabsorption Gastroent. 66: 16-20, 1974.
- 50.- Craff S. and Nelson J.: Diagnosis of giardiasis by counter-immunoelectrophoresis on feces. Rev. Infect. Dis. 145; 499, 1982.
- 51.- Rosenthal P. Liebman W.M.: Comparative study of stool examination and pediatric enterotest of giardiasis in children. The J. Ped. 278-279, 1980.

- 52.- Visvesvara G.S. Smith P.D., Healy G.R. and Brown R.W.: An immunofluorescence test to detected serum antibodies to G. lamblia. Anal. of internal med. 93: 802-805, 1980.
- 53.- Witner M. Mayans S., Farrer W., Tanowitz H.B.: Diagnosis of giardiasis by two methods. Arch. Pathol. Lab. Med. 107: 524-527, 1983.
- 54.- Dupont L., Sullivan P.: Giardiasis the clinical spectrum, diagnosis and therapy. Ped. Infect. Dis. 5:1; 131-138(s) 1986.
- 55.- Miotti P.G., Gilman RH, Pickering L.K., Ruiz-Palacio G., Pard H.S. and Yolken R.H.: Prevalence of Serum and Milk antibodies to Giardia lamblia in diferent Populations of lactating women. J. Infec. Dis. 125:5; 1025-1031, 1985.
- 56.- Lowry N.J. Rosebourg L.L., Randal R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 255-275.
- 57.- Kessel J.E., Lewis P., Turner J.A.: Indirect Haemagglutination and complement fixation test in amebiasis. Am. J. Med. Hyg. 14: 540-550.
- 58.- Lin T.M., Holbert S.P., Chiu C.T. and Zarco R.: Simple standardized Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for human antibodies to E. Histolytica J. of clin, microb. 13;4: 646-654, 1981.