



11261 2eJ 13

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**DESARROLLO DE UN METODO DE ELISA EN PAPEL
PARA DETERMINAR ANTICUERPOS CONTRA
GIARDIA LAMBLIA E IDENTIFICACION DE ANTIGENOS
DEL PARASITO RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS
SERICOS DE NIÑOS CON GIARDIASIS**

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS
BIOMEDICAS
P R E S E N T A
RICARDO LASCURAIN LEDESMA

CIUDAD UNIVERSITARIA

1989

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	3
CAPITULO 1. INTRODUCCION	5
1.1. Giardiasis	5
1.2. Ciclo Biológico	14
1.3. Descripción del Parásito	17
1.3.1. Trofozoito	19
1.3.2. Quiste	21
CAPITULO 2. ANTECEDENTES GENERALES	21
2.1. Antecedentes Directos	27
2.2. Justificación	30
2.3. Objetivos	33
CAPITULO 3. MATERIAL Y METODOS	33
3.1. Selección de Individuos Infectados y de Testigos	33
3.2. Obtención de Trofozoitos de Cultivo Axónico	34
3.2.1. Cuantificación de Trofozoitos	35
3.2.2. Obtención de Antígeno Soluble	35
3.3. Obtención de Anticuerpos contra <i>G. lamblia</i> en Conejos para Desarrollar un Análisis Inmunoenzimático	36
3.3.1. Adsorción de Anticuerpos de Suero de Conejo Inaunizado	36

3.4.	Desarrollo de un ELISA con Discos de Papel en Microplaca	
3.4.1.	Sensibilización de Discos de Papel Filtro para el Análisis Inmunoenzimático	37
3.4.2.	Titulación de Anti-Inmunoglobulinas Conjugadas a Peroxidasa	38
3.5.	Separación de Proteínas Solubles de <u>Giardia lamblia</u> por Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio	39
3.5.1.	Preparación de Geles en Gradiente Continuo	40
3.5.2.	Preparación de Antígeno con Detergentes	41
3.5.3.	Electroforesis de Proteína Soluble	42
3.5.4.	Tinción del Gel de Poliacrilamida	42
3.6.	Electrotransferencia de Proteínas a Papel de Nitrocelulosa	43
3.6.1.	Tinción del Papel de Nitrocelulosa	44
3.6.2.	Desarrollo de la Inmuno-electrotransferencia	45
3.7.	Radioinmunoprecipitación de Antígeno de <u>Giardia lamblia</u> con Sueros Humanos	46
3.7.1.	Marcaje Radioactivo de Proteínas de Membrana de Trofozoitos	46
3.7.2.	Precipitación de Anticuerpos Séricos con Proteína Radiodiodinada	47
3.7.3.	Revelado por Auto-Radiografía	48

CAPITULO 4. RESULTADOS 49

- 4.1. Análisis de Datos de Individuos Infectados y de Testigos**
- 4.2. Cuantificación de Proteínas Solubles de Trofozoitos 50**
- 4.3. Estandarización del ELISA en Papel 50**
 - 4.3.1. Pruebas de Especificidad 52**
 - 4.3.1.1. Inhibición Competitiva 54**
 - 4.3.1.2. Reacciones Cruzadas 56**
 - 4.3.2. Pruebas de Reproducibilidad 58**
- 4.4. Análisis y Selección de Sueros de Niños por el Método Inmunoenzimático en Papel 58**
- 4.5. Análisis Electroforético de Proteínas de G. lamblia 63**
- 4.6. Identificación de Proteínas de Giardia lamblia por Inmunoelectrotransferencia con Sueros de Niños con giardiasis 64**
- 4.7. Identificación de Proteínas de Giardia lamblia por Radioinmunoprecipitación con Sueros de Niños con Giardiasis 69**

CAPITULO 5. DISCUSION 73

5.1 Conclusiones 86

Apéndice 87

Bibliografía 92

Abreviaturas

IA	grupo de sueros de niños con giardiasis, asintomáticos
IS	grupo de sueros de niños con giardiasis y con síntomas
T	grupo de sueros de niños sin giardiasis (testigos)
ELISA	análisis inmunoabsorbente acoplado a enzima
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de Sodio
IET	inmunolectrotransferencia (western blotting)
RIP	radioinmunoprecipitación
IEDD	inmunolectroforesis en dos dimensiones
IDR	inmunodifusión radial
IFI	inmunofluorescencia indirecta
IFD	inmunofluorescencia directa
CPS	análisis coproparasitológico
Ac	anticuerpo
Aq	antígeno
IgG	inmunoglobulina G
IgA	inmunoglobulina A
IgM	inmunoglobulina M
IgE	inmunoglobulina E
IgD	inmunoglobulina D
CCDA	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADN	ácido desoxirribonucleico
D-Glc-NAC	N-acetil-D-glucosamina

D-Gal -NAC	N-acetil-D-galactosamina
pH	potencial de Hidrógeno
µg	microgramos
KDa	kilodaltones
Mr	Movilidad relativa
M	molar
mM	milimolar
N	normal (concentración)
cm	centímetros
nm	nanómetros
µm	micrómetros (micras)
Å	angströms
ml	mililitros
µl	microlitros
mCi	millicurie
hr	hora
min	minuto
seg	segundo
rpm	revoluciones por minuto
cbp	cuanto baste para
CPM	cuentas por minuto
DO	densidad óptica
DE	desviación estándar
\bar{x}	media estándar
ASB	albúmina sérica bovina (BSA)
AFS	amortiguador fosfato-salino (PBS)

Resumen

La giardiasis, infección producida por Giardia lamblia, frecuentemente ocasiona enfermedad a individuos en edad pediátrica. Diversos autores han reportado que durante la infección se generan anticuerpos séricos en contra del parásito, los cuales pueden participar en la resolución de la enfermedad. Un aspecto importante en el estudio de la giardiasis es el identificar proteínas antigénicas de G. lamblia que son reconocidas por los sueros de individuos parasitados y poder emplearlas en el desarrollo de ensayos de diagnóstico o en métodos inmunoprolácticos.

En el presente trabajo se estandarizó inicialmente un método de ELISA en papel para detectar anticuerpos contra el parásito en sueros de 67 niños con giardiasis (9 asintomáticos y 58 con síntomas) y de 12 niños considerados testigos no infectados. Posteriormente fueron seleccionados 28 sueros con títulos altos de IgG anti-G. lamblia y analizados en los métodos de Inmunolectrotransferencia y Radioinmunoprecipitación para el reconocimiento de antígenos del parásito.

En el análisis de los sueros con el método de ELISA en papel se encontró que los valores de densidad óptica de los niños parasitados fueron significativamente más altos comparados con los del grupo testigo ($P < 0.0001$).

Los resultados obtenidos por inmunolectrotransferencia con los sueros seleccionados de individuos parasitados sintomáticos y asintomáticos mostraron en general, reactividad

contra un gran número de proteínas del parásito, mientras que la reacción observada con algunos sueros del grupo testigo fue menos marcada y con pocas proteínas. No obstante, se pudo observar un reconocimiento dominante de proteínas con pesos moleculares de 88, 46 y 35 KDa, incluso en los sueros del grupo testigo que presentaron reacción.

Con radioinmunoprecipitación y auto-radiografía se observó reacción de los sueros de los individuos parasitados sintomáticos y asintomáticos con 3 proteínas de trofozoitos radiomarcados con ¹²⁵I

I y lactoperoxidasa. Estas proteínas presentaron pesos moleculares de 82, 63 y 55 KDa y no fueron precipitadas por el suero del grupo testigo.

Los datos que resultaron de este trabajo mostraron que el método de ELISA en papel puede ser una alternativa para estudios serológicos a bajo costo, pues reduce el empleo de material de importación. Además mostraron que con este método los valores de densidad óptica obtenidos en los sueros de niños parasitados fueron equivalentes entre sintomáticos y asintomáticos. Del mismo modo el reconocimiento de proteínas por ambos grupos fue muy similar tanto en inmunoelectrotransferencia como en radioinmunoprecipitación. Sin embargo dentro del conjunto de proteínas del parásito, se detectaron proteínas de 82 KDa o de 46 KDa que fueron de las más reconocidas por los sueros, pudiendo ser candidatos potenciales para emplearse en estudios epidemiológicos.

CAPITULO 1. INTRODUCCION

1.1. Giardiasis

Giardiasis es una parasitosis de intestino delgado causada por el protozoo flagelado denominado Giardia lamblia. El parásito fue descubierto en heces por Antonj Van Leeuwenhoek en 1681. Durante muchos años, el microorganismo fue considerado como un comensal del intestino humano y hasta las primeras décadas del presente siglo, se reportaron padecimientos gastrointestinales asociados con la presencia de G.lamblia (1-4). Posteriormente Wanner y Col. (5) evidenciaron la patogenicidad del parásito al demostrar su relación con diarrea. A partir de entonces G.lamblia ha sido señalado como responsable de muchos padecimientos incluso colecistitis (6), colangitis (7), urticaria y asma (8,9). Algunos de ellos son poco frecuentes y difíciles de confirmar, pero otros casos como el síndrome de absorción intestinal deficiente, se presenta frecuentemente en individuos con síntomas (10-19).

La giardiasis se adquiere por la ingestión de agua contaminada con quistes, los cuales pueden provenir de heces humanas o tal vez de animales como ratas y perros u otros mamíferos susceptibles a la infección con G.lamblia (9,20-22). El papel del agua como vehículo de transmisión del parásito ha sido demostrado ampliamente (9,20,23-27). Aparte del agua otras vías de transmisión del parásito son la feco-bucal, particularmente donde el contacto interpersonal es más estrecho como grupos familiares (28) o de homosexuales (29), guarderías,

orfanatos y escuelas (30,31) y por ingestión de alimento contaminado con quistes (32).

La incidencia, prevalencia y morbilidad de giardiasis han sido asociadas a los siguientes factores: Dosis de quistes ingeridos cuya cantidad se relaciona con la aparición de manifestaciones clínicas (33) tanto en ratones de laboratorio (34) como en brotes epidémicos en poblaciones humanas (20); Susceptibilidad del hospedero sugerida en niños (35) y en personas del grupo sanguíneo A (36-39). Las diferencias en la susceptibilidad (33,40) pueden ser dadas por hipoclorhidria o aclorhidria gástrica (41-43), por deficiencias en inmunoglobulinas (43,44) y por influencia de factores genéticos en ratones (45) y en individuos con antígenos de Histocompatibilidad tales como HLA A1 y B12 y de los fenotipos A1/A2 y B12/27 (46).

Los brotes epidémicos han sugerido que la primera exposición al parásito produce enfermedad y que el periodo de incubación antes de que aparezcan los síntomas es de dos a tres semanas después de ingerir agua contaminada con quistes de Giardia lamblia (23,24,47).

Las infecciones con Giardia pueden ser de corta duración, por lo menos en adultos normales raramente exceden los 3 meses (9,23,24,40). El periodo de primoinfección se ha sugerido que se resuelve clínicamente en un promedio de 44 días (9,23,24,33,40). La administración experimental en ratones mostró que independientemente de la dosis infectante de quistes, la máxima población de

trofozoitos ocurrió a las dos semanas después del inóculo y luego disminuyó paulatinamente en un tiempo de 4 a 6 semanas hasta caer a bajos niveles o desaparecer (34).

La infección por G. lamblia tiene un espectro clínico bastante amplio (12,48,49): Se presenta desde un curso asintomático en un 39 % de los niños menores de 5 años, un 69 % de los niños mayores de 5 años y un 76 % de los adultos (18) hasta cuadros agudos de corta duración con autolimitación espontánea los cuales se presentan acompañados de una gama de síntomas; en niños son frecuentes las diarreas intermitentes o constipación, náuseas, anorexia, dolor epigástrico, detención del crecimiento y pérdida de peso (18,19,40,51) en cambio, en adultos prevalecen diarreas explosivas, semilíquidas, fétidas y grasosas; cólicos, distensión abdominal, flatulencia, cefalea y anorexia (9,20,23,24,49,52). También puede seguir un curso crónico que puede ser asintomático con episodios subclínicos esporádicos (17) que no siempre obligan a una atención médica o pueden presentarse los síntomas mencionados e incluso absorción intestinal deficiente (23).

No se han logrado esclarecer totalmente los mecanismos que intervienen en la patogénesis de giardiasis. Una etapa que se considera crucial en la patogénesis de muchas enfermedades infecciosas es la adherencia del parásito a células blanco. Sin un mecanismo efectivo de adherencia, los trofozoitos pueden ser expulsados rápidamente de la luz intestinal. Observaciones en la interacción entre Giardia y eritrocitos (53) plantean que el

parásito tiene en su superficie membranosa una actividad de tipo lectina (54,55). No obstante con la microscopía electrónica se ha mostrado marcas parecidas al disco adherente de trofozoitos, en el microvello de las células epiteliales del intestino delgado tanto en modelo animal (56,57) como en biopsias humanas (58) sugiriendo que dicha estructura tiene poder de succión y puede participar en la adherencia del parásito a células blanco.

Con respecto a los cambios morfológicos de las vellosidades del intestino delgado generalmente, no son severos siendo reversibles cuando se elimina el parásito (15). Esto sugiere que el daño no llega a la parte basal del epitelio. Las alteraciones pueden presentar diferentes grados y estos van desde simple proceso inflamatorio con presencia de leucocitos mononucleares, eosinófilos y polimorfonucleares en la lámina propia de criptas y vellosidades (59) hasta hiperplasia linfóide (15,19,63) debido a severa infiltración de linfocitos (60-62) y células plasmáticas; acortamiento, ensanchamiento, atrofia de las vellosidades (15,62) así como reducción en su número (10), elongación de las criptas (15,64), aumento en el índice mitótico epitelial (15, 39) ; cambios en la polaridad nuclear, vacuolización del citoplasma en la parte basal de los enterocitos (15) y aumento del tamaño del núcleo en relación al citoplasma (64). La severidad de éste espectro de lesiones es mayor proximalmente a la luz intestinal y se presenta alterno con segmentos normales de mucosa (65,66). Adicionalmente se ha reportado engrosamiento del patrón mucoso a nivel duodenal e

irregularidades en los pliegues (19).

De manera similar, en giardiasis murina se ha observado una reducción en la altura de las vellosidades (34), disminución de los niveles de disacaridasas tales como maltasa, lactasa y sacarasa y reemplazo de los enterocitos dañados por nuevas células provenientes de las criptas (67). Es por ello que se ha sugerido que la deficiencia de disacaridasas es debido a la recuperación de la vellosidad intestinal por los enterocitos inmaduros quienes característicamente tienen niveles mas bajos de disacaridasas (59), lo cual podría explicar la diarrea y la absorción intestinal deficiente (68). De igual modo, el simple daño morfológico de la superficie del enterocito sugiere la alteración funcional ya que la membrana celular que recubre las microvellosidades contiene complejos enzimáticos digestivos. Consecuentemente los mecanismos de transporte para monosacáridos, absorción de aminoácidos y absorción pinocítica de grasas pueden disminuir (10).

En otro aspecto, no se ha podido correlacionar estadísticamente la alteración morfológica de las células columnares de las vellosidades epiteliales con la severidad de los síntomas (15). Esto puede deberse a que los cambios histológicos de la mucosa intestinal se presentan alternos con zonas ilosas (44) y la alteración apreciada en la biopsia no cubre toda la superficie epitelial. Tampoco se ha podido relacionar la cantidad de quistes excretados con los cambios anatómicos del epitelio intestinal, ni con la aparición de

síntomas (69). Así por ejemplo pacientes asintomáticos expulsan grandes cantidades de quistes y opuestamente, individuos con enfermedad severa ha sido difícil detectar al parásito (23,70).

Los estudios de laboratorio en pacientes con giardiasis, reportan disminución de enzimas específicas para la digestión de carbohidratos, tales como lactasa, sacarasa, maltasa y amilasa (12,16,44,63,71); esteatorrea en un 12 a 64 % de los pacientes (11,12,16,19,48,63,65,71,72); disminución de lipasa pancreática relacionada con la pérdida de grasas y otras enzimas pancreáticas como tripsina y lipina (19,71); absorción anómala de D-xilosa en un 23 a 55 % de acuerdo al criterio de excreción urinaria (11, 19,48,63,71,72), trastornos en la absorción de glicina (18,71), vitamina B12 (15,19,44,48,63,71), lactosa (19) y niveles bajos de carotenos, folatos, tiamina, cobalamina, así como absorción deficiente de vitamina A (12,18,71); y disminución en la actividad de las enzimas peptido-hidrolasas, disacaridasas y enteropeptidasas (15).

Para explicar la patogénesis del parásito, se le han atribuido propiedades invasivas. Por medio de microscopía electrónica se han encontrado trofozoitos dentro de las células epiteliales en la biopsia de un caso de giardiasis crónica (73) así como en los espacios intersticiales de la submucosa, en la lámina propia y penetrando el epitelio en 6 biopsias de pacientes con diarrea y trofozoitos en las heces (64) pero el número de parásitos invasores fue muy escaso en relación a las multitudes de la luz intestinal.

Segun otros autores (65,74) los trofozoitos pueden invadir el epitelio dejando un espacio que marca la via de entrada sin anomalía en el borde luminal de la mucosa. Pero la vida de los trofozoitos invasores debe ser breve, como resultado de una participación inmediata de macrófagos tisulares. Se ha reportado fagocitosis de trofozoitos "in vitro" por parte de macrófagos peritoneales de conejo (75) y por monocitos humanos de sangre periférica (76). Otros autores no han confirmado las propiedades invasivas del parásito (15,63) tal vez porque los trofozoitos no están bien adaptados a sobrevivir en tejido sin sufrir cambios en su forma. Por lo tanto las observaciones pueden deberse a la alteración de la morfología de la mucosa por infiltrado celular de defensa. Así los espacios entre las células tanto en las vellosidades como en las criptas permiten que penetren algunos trofozoitos.

Otra proposición menos dudosa para explicar la patogénesis es la del sinergismo con bacterias en el intestino delgado. Se ha observado que con terapia específica para bacterias, han desaparecido los síntomas a pesar de la persistencia de la infección por G. lamblia (71), se ha encontrado colonización bacteriana anormal en el intestino delgado de individuos con giardiasis crónica (72,77) y se ha mostrado endosimbiosis de G. muris con bacterias (78).

Un aspecto importante en el manejo de la giardiasis es el diagnóstico el cual se basa en la demostración del parásito en heces, así como en el contenido o en la pared del duodeno. Para

detectar al parásito se tiene el método coproparasitoscópico (CPS). Pero hay autores que reportan periodos de negatividad en CPS debido a una disimilitud en las excreciones de quistes. Asi por ejemplo Dancinger (79) clasifica a niños infectados en tres grupos de excreción de quistes: grandes excretadores, con gran cantidad de quistes en casi todas las muestras; excretadores combinados, que alternan periodos de una a tres semanas sin eliminación, con otros de gran excreción; y excretadores mínimos que tienen pocos o ningún quiste detectable durante toda la infección. Otros métodos para demostrar al parásito son la extracción de líquido duodenal (80), la biopsia yeyunal (59), las pruebas serológicas para detectar anticuerpos (15,35,81-89) y los métodos para detectar antígenos en heces (90-93).

Con respecto a la epidemiología la giardiasis está ampliamente distribuida a nivel mundial (94). Generalmente en países desarrollados se considera de bajo nivel endémico, especialmente en centros urbanos como Glasgow y Liverpool en Inglaterra (95,96); Colorado (23), Utah, Oregon, Washintong (9), New Hampshire y New York en USA (20); Leningrado en la URSS (24)

Un examen hecho a 1419 turistas norteamericanos procedentes de la URSS, mostró que el 23 % habían adquirido giardiasis principalmente en Leningrado (24,26,27). En Inglaterra mas de 3200 infecciones por Giardia son reportadas anualmente en los laboratorios de Salud Pública (95,96). En USA, la baja endemicidad se ha revelado por los brotes epidémicos (9,20,23) lo cual se ha estimado por la población enferma en un 7-11 %.

Según Schultz (52) solo representan una pequeña porción de la verdadera incidencia ya que un gran número de portadores clínicamente mantienen un aspecto saludable con respecto a la capacidad de Giamblia para producir enfermedad.

En países tropicales y subtropicales, la endemicidad es mayor (49,94), las infecciones de viajeros indican que la giardiasis es muy común en el Sur y Sureste de Asia, Africa Central y Occidental y Latinoamérica. Sin embargo en la población residente de éstas regiones, la tasa de morbilidad es siempre baja en adultos (35) y la incidencia es mayor en niños mayores de 2 años de edad (49,50,62,97,98). En cambio en situaciones epidémicas, en poblaciones no expuestas, la tasa de morbilidad es del mismo nivel en todas las edades (20).

En México, las enfermedades parasitarias continúan siendo un problema de Salud Pública ya sea por la frecuencia en que se presentan como por los daños económicos que producen en la población afectada (99-102). Martuscelli (103) revisando la bibliografía nacional desde 1934 hasta 1964, presenta datos sobre la infección por Giamblia en niños. Obtiene el siguiente promedio de frecuencia de infección a nivel nacional; en lactantes de 23.7 %, en preescolares de 20.7 % y en escolares de 14.1 %. Estos datos varían según la población estudiada. Pero la mayoría de estos reportes tendientes a estimar tasas de prevalencia en la excreción de quistes no reflejan la epidemiología real de la giardiasis en México puesto que se han realizado en Hospitales donde acuden los niños que requieren de

atención médica (101,102). Considerando que la G. lamblia es potencialmente patógena en edades pediátricas particularmente en niños lactantes (51) es de esperar que la mayor frecuencia porcentual se presente en los menores de un año de edad como se ha reportado (102).

1.2. Ciclo Biológico

Giardia lamblia tiene un ciclo biológico sencillo. Se inicia con la ingesta de quistes, los cuales al desenquistarse dan lugar a trofozoitos que a su vez se reproducen en intestino delgado. Durante el periodo de latencia algunos trofozoitos son arrastrados por los movimientos peristálticos y se enquistan antes de ser excretados. El ciclo de vida se completa cuando los quistes expulsados con la materia fecal son ingeridos por otro hospedero (figura 1).

El desenquistamiento experimental "in vitro" con soluciones ácidas de un pH entre 1.3 a 2.7 ha sugerido que la acidez gástrica es el factor inductor de desenquistamiento (104), pero los trofozoitos no sobrevivieron en este medio. Después del desenquistamiento los trofozoitos se establecen en el yeyuno y duodeno donde el pH es mayor a 7 (es ésta porción anatómica, el habitat del parásito). Durante el desenquistamiento surge de cada quiste, un trofozoito tetranucleado que se divide inmediatamente en dos trofozoitos binucleados los cuales se separan después de varias horas. Los trofozoitos se adhieren por su cara ventral a

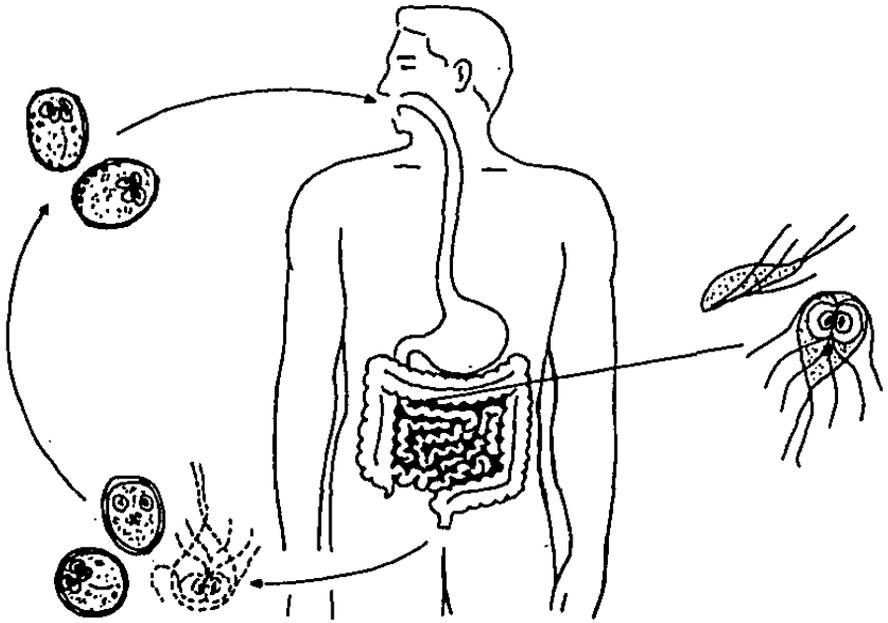


Figura 1. Ciclo biológico de *Giardia lamblia*

las microvellosidades de las células que constituyen el epitelio intestinal. Ahí adquieren nutrimentos del fluido intestinal posiblemente por pinocitosis o por absorción directa de su disco ventral. Los trofozoitos se reproducen por fisión binaria, el proceso se inicia con la duplicación de los núcleos. En el proceso los cuerpos medios y el disco adherente parecen desintegrarse cuando se duplican los cinetósomas. Finalmente en la célula madre, los organelos duplicados se reparten formando dos polos, los cuales se distancian paulatinamente hasta completar la división (78). Quizá por acción del Sistema Inmunitario del hospedero el trofozoito se desprende exponiéndose a ser arrastrado por el peristaltismo. Cuando sucede logran cambiar a su forma quística antes de ser expulsados. La síntesis de la pared quística parece ser un paso esencial en el enquistamiento (105). Una de las estructuras importantes en la formación de la pared es la N-Acetil-D glucosamina (D-Glc-NAC), la cual es común en la membrana del trofozoito. En levaduras, la quitina es sintetizada a partir de D-Glc-NAC por la acción de la quitina sintetasa (54). Billin y Col. (106) encuentran que cuando los trofozoitos se enquistan " in vitro " se presenta un aumento en la actividad de la quitina sintetasa en comparación con los cultivos que no se enquistan. Sin embargo aun no se han dilucidado los mecanismos involucrados en la diferenciación de trofozoito a quiste.

Los quistes expulsados pueden encontrarse en diferentes estadios de maduración y sobrevivir en condiciones húmedas por

periodos mas o menos prolongados (21) hasta que son ingeridos por otro hospedero. Los quistes binucleados pueden madurar en el exterior en un periodo de 3 a 7 dias, consistiendo en una sola división de cada núcleo (69). Se ha reportado que quistes expuestos a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas presentaron deterioro morfológico que los privaron de su viabilidad. El daño se caracterizó por contracción y distorsión de los núcleos, turbidez del citoplasma e irregularidad de la membrana celular (9).

En cuadros diarréicos el parásito no se enquista debido a que los movimientos peristálticos son muy rápidos. Así los trofozoitos son expulsados y no logran sobrevivir, ni enquistarse fuera de su hospedero desintegrandose fácilmente (69).

1.3. Descripción del parásito.

Taxonómicamente Giardia lamblia pertenece al Reino Protista Subreino Protozoa, Phylum Sarcomastigophorea, Subphylum Mastigophorea, Orden Diplomonadida, Género Giardia y Especie G. lamblia (107). El protozoario presenta dos fases morfológicas: una trofozoítica o vegetativa y otra quística o de resistencia. El trofozoito es una forma flagelada móvil que coloniza la porción proximal del intestino delgado. El quiste es la forma infectiva que se expulsa al ambiente externo por medio de las heces.

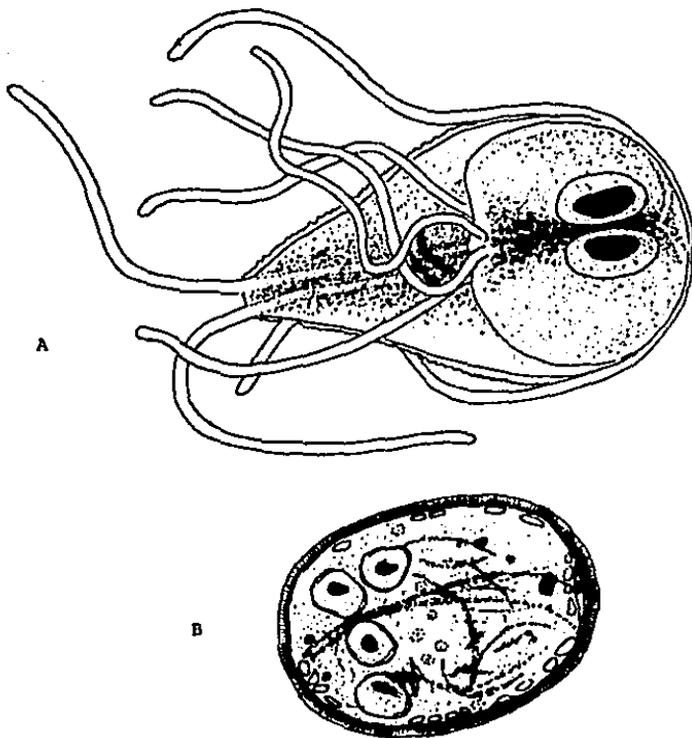


Figura 2. Representación de trofozoito (A) y quiste (B) de Giardia lamblia.

1.3.1. Trofozoito

En el microscopio de luz directa, se observa que el trofozoito es piriforme con simetría bilateral. Su dimensión varía de 10 a 14 μm de largo por 6 a 10 de ancho y de 2 a 4 μm de espesor. Presenta 4 pares de flagelos; 2 anteriores, 2 laterales, 2 ventrales y 2 caudales. Tiene 2 núcleos, situados a los lados del eje de simetría, a veces se observa cada núcleo con un cariósoma central grande (10). Asimismo posee una estructura circular denominada disco adherente o estriado que ocupa casi la mitad de la superficie superior (108,109). La superficie inferior es el área desnuda y termina en un vértice (figura 2). En el límite inferior del disco adhesivo se encuentra el cuerpo medio, que es una de las características morfológicas que permite distinguir a otras especies dentro del género Giardia. Estudios a nivel ultraestructural muestran una superficie dorsal convexa y una ventral ligeramente cóncava en donde se halla el disco adherente (109). Dicha estructura se encuentra constituida por dos lóbulos con numerosas estrias en espiral (108). Tiene dos canales; uno es el surco marginal, formado por las crestas laterales y por un borde ventrolateral; el otro canal es el surco ventrocaudal y a éste lo forman los dos lóbulos del disco adherente. El citoesqueleto del disco es complejo, está formado por microtúbulos y microfibrillas (108-110).

La mayor parte de la superficie del trofozoito se observa revestida de una membrana trilaminar de 100 Å de espesor. La

configuración de sus flagelos es la clásica de 2 fibrillas centrales y 9 pares de fibrillas periféricas (111). Los flagelos surgen de los axonemas o cinetosomas. Dos de ellos están en la parte superior del parásito y los demás forman un complejo en la línea media entre los dos núcleos (78,108,111). Su citoplasma muestra pequeñas partículas dispersas de 150-200 Å de diámetro y múltiples gránulos de glucógeno de 300 Å, así como estructuras parecidas a ribonucleoproteínas. El área desnuda parece no tener citoesqueleto. Tiene gran cantidad de vacuolas repartidas en el área central y por debajo de toda la membrana plasmática dorsal (10,65).

Los núcleos exhiben un nucleoplasma con múltiples gránulos. Su membrana nuclear es doble y porosa. La estructura del cuerpo medio muestra una composición a base de agregados microtubulares que se extienden a lo largo de los axonemas de los flagelos caudales. No se han observado en el trofozoito, estructuras semejantes a mitocondrias, lisosomas, ni retículo endoplásmico liso (65,112).

En cuanto a composición proteica del trofozoito se ha mostrado que la tubulina es la principal proteína de la estructura microtubular del disco (108). También se han identificado proteínas contráctiles como la actina, alfa-actinina, miosina y protomiosina formando parte de la región periférica del disco ventral (109).

1.3.2. Quiste

El quiste es generalmente de forma ovoide aunque se le puede observar redondo, alargado, triangular e irregular. Las dimensiones también varían, aunque en promedio son de 10 a 14 μm de largo por 6 a 10 μm de ancho. No cuenta con flagelos, ni disco adherente. Posee 4 núcleos, numerosas vacuolas, fibrillas y una pared celular fibrosa de 0.3 μm de espesor, la cual envuelve a la membrana plasmática. Cuando el quiste es inmaduro solamente se ven 2 núcleos. En ocasiones se observan dentro del quiste, cuerpos basales y microtúbulos asociados a microfilamentos en filas paralelas, probablemente son porciones del disco adherente (113).

CAPITULO 2. ANTECEDENTES GENERALES

Se ha comprendido que para el establecimiento de una infección, son factores críticos del hospedero: a) la integridad de la resistencia inespecífica; b) de la defensa específica; y c) el equilibrio en la intensidad de las respuestas.

En cuanto a la resistencia inespecífica, se tienen pocos estudios. El contacto entre trofozoitos con defensas celulares inespecíficas puede iniciarse desde la adherencia. El estímulo de un gran número de trofozoitos adheridos puede ser suficiente para producir irritación intensa de la mucosa intestinal y propiciar el reclutamiento de células mononucleares y polimorfonucleares.

En modelos experimentales se ha visto debajo del epitelio intestinal de ratones, a macrófagos provenientes de Placas de Peyer's portando fragmentos de trofozoitos de G. muris y rodeados por linfoblastos (114). También se ha reportado fagocitosis "in vitro" de trofozoitos por parte de macrófagos peritoneales de conejo (75).

Con respecto a la defensa específica hay mas estudios y se justifican por las evidencias alentadoras de inmunidad contra la enfermedad. Se ha demostrado experimentalmente que los ratones resuelven la infección con G. muris y son resistentes a la reinfección (115). Aunque en humanos, la inmunidad a G. lamblia no ha sido demostrada estadísticamente. La evidencia del efecto protector de la primoinfección fue mostrada por Rentdorff (33) quién trató de reinfectar con la misma dosis a los individuos que resultaron infectados por primera vez. En este estudio se encontró que 8 de los 22 casos presentaron resistencia a la reinfección. Otra evidencia surgió en el estudio de una epidemia de giardiasis, donde se notó que un gran porcentaje de los individuos visitantes tuvieron manifestaciones clínicas agudas y mayor susceptibilidad a la infección en comparación con los pobladores del área epidémica (23).

Hay estudios que parecen señalar que la inmunidad está dada por elementos celulares. Por ejemplo en un modelo animal, se observó que los ratones atímicos infectados experimentalmente con G. muris, lograron resolver la infección en un tiempo mas prolongado que los ratones íntegros pero no adquirieron

protección a la reinfección. Y cuando se les administró células T los animales resolvieron la infección a un tiempo normal. Esta resolución ocurrió aun si las células T se daban al mismo tiempo que el inóculo (34). En otros estudios se ha observado que ratones con respuesta inmunitaria deprimida por irradiación o por administración de corticosteroides presentan giardiasis con manifestaciones clínicas persistentes (116). Asimismo se ha observado un aumento en el número de linfocitos en biopsias yeyunales de pacientes con giardiasis clínica aguda (60,61) así como adherencia de pequeños linfocitos a la membrana dorsal de trofozoitos en biopsias de intestino humano (18) y en modelos animales de giardiasis (117). Otro tipo de actividad celular fue señalada por Smith y Col. (118) quienes en un estudio "in vitro" mostraron citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). Los granulocitos de individuos sanos fueron citotóxicos para G. lamblia a una relación de 30:1 en presencia de anticuerpos anti-giardia. El efecto no dependió del Complemento ya que el antisuero (IgG de conejo inmunizado) mas Complemento en ausencia del granulocito no afectó al parásito. De igual forma el granulocito en ausencia del antisuero no mostró citotoxicidad. Los neutrófilos y los eosinófilos también mostraron CCDA aunque en un grado mas bajo, en cambio la actividad no se presentó en los linfocitos.

Otros estudios parecen indicar que la inmunidad está dada por elementos humorales. La importancia de los anticuerpos en giardiasis, se refleja por la severidad de manifestaciones

clínicas que presentan los pacientes hipogamaglobulinémicos (43,44,63). Smith y Col. (86) detectaron en algunos pacientes, títulos de Ac séricos anti~~giardia~~ hasta 15 meses después de la infección. Sin embargo en otro estudio, se observó que en el 58 % de un grupo de pacientes convalescentes, los niveles de Ac IgG serológicamente positivos no se mantuvieron mas allá de 4 semanas después de la erradicación del parásito (15). Tal vez el mecanismo inmunitario humoral esté basado sobre los Ac de secreción. En un sistema murino, ratones lactantes de madres inmunes fueron resistentes a la infección con G.muris; la resistencia la perdieron cuando fueron desdotados (119). En otro modelo murino, se indujo la infección con G.muris y solo los ratones amamantados con leche de madres inmunizadas, resolvieron la giardiasis (120). En ambos casos, los resultados con inmunofluorescencia indirecta (IFI) sugirieron que la protección pudo ser proporcionada por títulos de IgA e IgG contenidos en la leche. También se ha sugerido que la protección podría ser debido a la acción de linfocitos y macrófagos que fueron estimulados antigénicamente en intestino materno y que emigraron hasta la glándula mamaria para ser ingeridos por el ratón (18). Por otra parte en biopsias yeyunales de pacientes con giardiasis crónica, mediante el método de inmunofluorescencia directa (IFD) se descubrió en la mucosa, una reacción alrededor de la membrana dorsal de los trofozoitos de G.lamblia cuando se aplicaron antisueros contra cadenas alfa, kappa y lambda de Ig humanas. La ausencia de reacción con los antisueros contra albúmina,

fibrinógeno y componente 3 de Complemento descartaron la posibilidad de adsorción inespecífica (121). Las posibilidades de acción de los Ac pueden ser mediante la ya mencionada CCOA, por neutralización de lectinas, impidiendo la adhesión a la mucosa intestinal y por opsonización de trofozoitos. Owen (119) plantea que los Ac pueden evitar la unión del parásito a la pared intestinal mediante el reconocimiento y bloqueo de receptores en las microvellosidades.

Antagónicamente el parásito debe tener mecanismos para alterar las respuestas inmunitarias. Se ha encontrado ligera disminución de IgA local en pacientes con giardiasis crónica asociada a absorción intestinal deficiente (117) o en convalecencia (122). En pacientes con giardiasis sintomática, se ha observado por medio de IFD a nivel de mucosa intestinal, un aumento en el número de linfocitos portadores de IgM (15), IgE e IgD en su superficie y disminución de portadoras de IgA (123). La relación se invirtió después de erradicar al parásito (123). En otros casos, no se ha encontrado que la densidad de las células productoras de IgA dentro de la mucosa intestinal fuese anormal (15,121). En modelos animales se ha descubierto que no siempre se elimina al parásito, quizá porque se establece una relación de equilibrio parásito-hospedero, sin que se detecten evidencias de la parasitosis. En un modelo experimental los ratones que estuvieron parasitados con *G. muris*, dejaron de excretar quistes en el periodo establecido que señalaba la eliminación del parásito. Pero al analizar porciones intestinales se halló que la

resolución fue incompleta en mas de la mitad de los animales (67). Por lo tanto es necesario esclarecer esa relación y buscar antígenos de excreción, secreción o somáticos del parásito que tengan capacidad para modificar los eventos inmunitarios. Al respecto se ha propuesto que la respuesta inflamatoria de la mucosa intestinal ante la infección con Giardia posiblemente tiene un papel importante en la génesis de la enfermedad. Antes de que el enterocito manifieste signos de daño morfológico hay aumento en el número de linfocitos interepiteliales, debido quizá a una respuesta contra antígenos relacionados con el parásito. Asimismo la magnitud de la infiltración está asociada con el grado de disfunción de acuerdo a las observaciones hechas mediante pruebas de absorción intestinal (60). Un signo mas de que el daño a la mucosa en giardiasis puede estar mediado por mecanismos inmunopatogénicos es el propuesto por Gilion y Col. (67). Los autores señalan que el daño celular es el resultado de reacciones inmunológicas similares a la reacción de injerto contra hospedero descritas en el ratón (124), donde la presencia del aloantígeno activa la hipersensibilidad. De esta manera los enterocitos son dañados por las linfocinas citotóxicas liberadas por las células T. La hipótesis es apoyada por la ausencia de lesiones en la mucosa del ratón atímico infectado con G.muris. Además cuando los ratones fueron restituidos con poblaciones celulares obtenidas del bazo de sus ratones singénicos infectados con anterioridad, se presentaron alteraciones histológicas en su mucosa intestinal (142).

En resumen, se continúan éstos estudios sobre las interacciones de los elementos del sistema de defensa del hospedero con el parásito y poco a poco se va entendiendo la complejidad de los mecanismos inmunitarios. Por lo tanto es preponderante realizar estudios sobre la identificación de Ag del parásito que pueden jugar un papel importante en la patogenia así como aquellos que pueden servir para un diagnóstico certero o para la búsqueda de componentes del parásito que favorezcan la inmunidad del hospedero.

2.1 Antecedentes Directos

Smith y Col. (125) fueron los primeros en tratar de identificar Ag del trofozoito. Usaron inmunolectroforésis en dos dimensiones (IEDD), electroforésis en geles de poliácridamida con dodecil sulfato de Sodio (SDS-PAGE) y análisis inmunoenzimático (ELISA) para comparar Ag de 4 cepas de G. lamblia. En IEDD con suero de conejo anti-cepa WB se encontraron en las 4 cepas, diferencias antigénicas cualitativas y algunas cuantitativas. Los investigadores notaron ausencia de grupos antigénicos en el perfil inmunolectroforético bidimensional de la cepa Portland 1 (P-1) así como diferencias significativas en los valores de densidad óptica de un ELISA cuando se enfrentaron 10 sueros humanos con Ag de las distintas cepas.

Nash y Col. (126) reportaron la existencia de componentes de superficie de trofozoitos WB y P-1 que fueron fácilmente iodados en células vivas y luego gradualmente liberados en el medio de cultivo en un periodo de 24 horas. Hallaron que la principal molécula liberada de la superficie fue una proteína hidrofóbica polidispersa de 94-225 KDa sensible a periodato e insoluble a cloroformo-metanol. Dicho material no se unió a manosa, glucosa, glucosamina o galactosa. También hallaron mediante IEDD y revelando por auto-radiografía que el principal producto secretorio de la cepa WB estaba ausente en la cepa P-1. En el análisis electroforético del gel de poliacrilamida 5-15 % y por auto-radiografía notaron otras bandas, desde 16.5 hasta 94 KDa y una banda de 15-21 KDa. Los componentes radioiodados del sobrenadante del cultivo fueron antigénicos ya que pudieron precipitarse hasta un 92 % con suero de conejo anti-cepa WB de G.lamblia.

Einfeld y Stibbs (127) identificaron y caracterizaron parcialmente un Ag de superficie presente en 4 cepas de G.lamblia. Para el estudio utilizaron IEDD, inmunoelectrotransferencia (IET) y radioinmunoprecipitación (RIP) con suero de conejo hiperinmune e incorporaron solubilizadores de membrana a la técnica para preparar el Ag de trofozoitos. Con IEDD usando antisueros contra cepas P-1 y WB no encontraron las diferencias antigénicas reportadas por Balh y Col. (125). En cambio encontraron que un arco prominente de precipitación desapareció al adsorber el antisuero con trofozoitos íntegros o fijados en preparación. El

hecho sugirió que se trataba de un Ag de superficie. Por medio de IET se halló que el arco de precipitación correspondía a un Ag de 82 KDa. En el análisis electroforético de Ag de trofozoitos de la cepa P-1 radiomarcados en su superficie, se verificó una molécula iodinada de 82 KDa. La molécula fue inmunoprecipitada con el antisuero monoespecífico. Asimismo se detectaron otros componentes radiiodinados de menor intensidad cuyos pesos moleculares fueron 180, 105, 63, 55, 37, 30 y 24 KDa. Por medio de RIP con antisuero monoespecífico contra el componente de 82 KDa, los autores notaron bandas de 105, 30 y 24 KDa. Sin embargo las cepas LT, WB y RS tuvieron mayor intensidad en las bandas de 30 y 24 KDa. La caracterización preliminar reveló que la molécula de 82 KDa fue hidrofóbica y parcialmente sensible a periodato, señalando la presencia de carbohidratos. Posiblemente se trate de una glicoproteína (127).

Otro aspecto importante fue la identificación de Ag en sueros de infecciones humanas. Al respecto Edson y Col. (128) hallaron en 2 pacientes mediante RIP, que los Ac anti giardia reconocieron una proteína de 88 KDa presente en la superficie de trofozoitos de cultivo axénico. Además prepararon Ac monoclonales murinos contra Ag de superficie de trofozoitos y mostraron que una de las clonas reconoció una proteína de 88 KDa en las cepas P-1, WB y aislados clínicos. La proteína fue la misma que reaccionó con los sueros humanos puesto que fue adsorbida completamente por el Ac monoclonal. Cuando conjugaron el Ac monoclonal con fluoresceína y lo probaron con las dos cepas,

observaron una tinción uniforme en toda la superficie celular incluyendo flagelos. El Ac monoclonal no reaccionó con *G. muris*, *E. histolytica*, *T. vaginalis* ni con *T. hominis*. Lo anterior señaló que el epítopo de la molécula de 88 kDa fue específica de *G. lamblia* y estuvo presente en los aislados clínicos frescos.

El otro reporte fue de Taylor y Wenman (129) quienes mediante IET estudiaron el suero de 16 pacientes con giardiasis activa, 3 de ellos con hipogamaglobulinemia. En sus resultados encontraron que el Ag dominante reconocido por 11 de los 16 sueros de pacientes y por 2 de los sueros testigos fue una banda de proteína de 31 kDa. Los autores mostraron un patrón electroforético de proteínas de superficie de trofozoitos WB donde el principal componente radioiodinado fue una banda de 31-33 kDa.

2.2. Justificación

En la introducción de la presente tesis se han descrito alteraciones morfológicas y funcionales de la mucosa intestinal asociadas a la presencia de *G. lamblia*. Asimismo en los antecedentes se describen brevemente estudios que tratan de encontrar el mecanismo de resistencia a *G. lamblia*. Los hallazgos justifican la búsqueda de métodos de diagnóstico que permitan realizar estudios epidemiológicos. Estos estudios podrían proveer datos para entender la aparente ausencia de morbilidad en individuos asintomáticos.

Un método generalizado para detectar al parásito, tanto en el portador asintomático como en el paciente con cuadro agudo sugestivo de giardiasis, es el análisis coproparasitológico (CPS). La eficacia del CPS depende del seriado de muestras. Se reporta que en individuos sintomáticos, el CPS es positivo en 76 % de las veces en la primera muestra, el 90 % con dos muestras y el 97.6 % con 3 muestras (96). No obstante hay autores que mencionan periodos de negatividad en CPS por lo menos de 20 a 30 días (79) así como en las primeras etapas de infección (23,47). En el caso de individuos con manifestaciones clínicas agudas es importante demostrar la presencia del parásito ya que no hay síntomas, ni signos específicos de la giardiasis que permitan sostener un diagnóstico basado exclusivamente en la sintomatología (69). Además del CPS, el parásito se detecta mediante la extracción y análisis de fluido duodenal con sonda nasogástrica o con Enterocápsula (80) y en caso extremo con la biopsia yeyunal (59). Pero en ocasiones el paciente puede ser objeto de pruebas de laboratorio innecesarias incluyendo la hospitalización (70). Debido a ello y a que algunos de los métodos mencionados son costosos y complicados, en los últimos años se ha propuesto el uso de pruebas serológicas para determinar títulos de Ac contra el parásito. Esta opción es más sencilla, económica y menos traumática para demostrar la presencia del parásito en pacientes con deficiencias en la absorción intestinal. Así mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) o inmunodifusión radial (IDR), se han detectado

títulos de 1:10 a 1:160 de IgG sérica contra quistes de G. lamblia en individuos sintomáticos comparados con títulos de 1:10 en individuos no infectados (85,82,84). En años posteriores se detectaron por IFI y ELISA, títulos de Ac contra trofozoitos de 1:16 a 1:2048 en individuos infectados comparados con títulos de 1:2 a 1:8 en testigos sanos (85-87). Otra alternativa que se ha propuesto, es la detección de Ag del parásito en heces por medio de los métodos de contraelectroforésis (90,91) e inmunoenzimático (92,93). Las alternativas podrían ser útiles para identificar individuos asintomáticos. Sin embargo para obtener resultados confiables se requiere en la primera de las alternativas, seleccionar el Ag del parásito. En la segunda alternativa se requiere además de seleccionar, preparar el Ag para obtener los Ac que se usan en contraelectroforésis y análisis inmunoenzimático de tipo "emparedado".

Con respecto a los individuos con giardiasis asintomáticos, se ha mostrado que presentan títulos de Ac contra G. lamblia, comparables al de los individuos con síntomas (87). Lo cual sugiere que la diferencia entre ambos tipos de infección no se deben a la concentración de Ac séricos contra el parásito. Se desconoce si los individuos asintomáticos tienen Ac contra determinantes antigénicos específicos de G. lamblia, relacionados con la protección. En base a lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos:

2.3. Objetivos

- 1.-Desarrollar un métodos de ELISA que permita optimizar la detección de anticuerpos contra G.lamblia en individuos con giardiasis así como seleccionar aquellos sueros con títulos altos de anticuerpos en contra del parásito.
- 2.-Identificación de proteínas de G.lamblia que son reconocidas por anticuerpos presentes en los sueros seleccionados por inmunolectrotransferencia y radioinmunoprecipitación
- 3.-Determinación de diferencias en el reconocimiento de proteínas por sueros de individuos con giardiasis sintomática y el obtenido de individuos asintomáticos

CAPITULO 3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Selección de Individuos Infectados y de Testigos

Las muestras de suero que se emplearon en este trabajo fueron obtenidas de 67 niños quienes acudieron a consulta por diferentes motivos en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez" S.S. y cuyos resultados clínicos fueron positivos a G.lamblia en uno o mas de los 3 coproparasitoscópicos (CPS) realizados.

Los sueros fueron divididos en dos grupos: El primer grupo denominado sintomático estuvo constituido por 58 sueros de niños que presentaron uno o mas de los siguientes signos y síntomas: cuadros diarréicos o constipación en las últimas semanas previas a la consulta, dolor epigástrico, talla o peso disminuidos y

anorexia. El otro grupo fue denominado asintomático y estuvo formado por 9 sueros de niños que no presentaron dicha sintomatología. Asimismo fue seleccionado un grupo denominado testigo el cual quedó integrado por 12 sueros que provenían de niños sin antecedentes clínicos de giardiasis, con 3 CFS negativos y asintomáticos en lo que se refiere al criterio descrito para el grupo de sintomáticos.

3.2. Obtención de Trofozoitos de Cultivo Axénico

Para la obtención de trofozoitos, se utilizaron frascos de cultivo de 50 cm² (Nunc, Danemark), microscopio de luz invertida (Olympus, Japan), centrifuga refrigerada (Sorvall RC-5, DuPont Co. USA), balanza semianalítica (Sartorius 2442, Germany), un potenciómetro (Internal Sci, Switzerland) y tubos de poliestireno (Corning Co. USA). Los trofozoitos de G. lamblia crecieron en cultivo axénico en medio TYI-S-33 modificado (130). En la fase exponencial de crecimiento, los frascos de cultivo se sumergieron en un baño de hielo (0°C) durante 15 min para separar los trofozoitos de las paredes. Enseguida se concentraron por centrifugación en tubos de poliestireno de 50 ml de capacidad a 2500 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante. El procedimiento se repitió tres veces adicionando en cada ocasión, 40 ml de amortiguador fosfato-salino (AFS) pH 7.4 para resuspender los trofozoitos. Después de la última centrifugación los trofozoitos fueron suspendidos en 5 ml de AFS.

3.2.1. Cuantificación de Trofozoitos

Para la determinación del número de trofozoitos se tomaron 0.5 μ l de la suspensión de trofozoitos con una pipeta de Thoma (Intramedic, USA) y se llevaron a un volumen de 1.1 μ l con ASF. La mezcla se homogenizó por un minuto, se descartaron las primeras 3 gotas y en una Cámara de Neubauer (Bright line, USA) se colocó una gota para llenar la Cámara por perfusión. Se contaron las células en los 4 cuadrantes por medio del microscopio de luz directa en objetivo 40x (Carl Zeiss, Germany). El número de trofozoitos multiplicado por el factor 50 de la pipeta de Thoma, dió como resultado el número de trofozoitos/ μ m cuadrado, que multiplicado por 1000 fue igual al número de trofozoitos /ml de solución.

3.2.2. Obtención de Antígeno Soluble

Para la obtención de Ag soluble, fueron utilizados aproximadamente 200 millones de trofozoitos resuspendidos en ASF, los cuales fueron colocados en baño de hielo y sometidos a 160 amplitudes en un Aparato de Ultrasonido (Lab-line Inc. USA) durante 60 seg con 3 min de descanso. El proceso se repitió 3 veces. Se verificó el fraccionamiento de las células, se centrifugó la suspensión a 8,000 rpm en una centrifuga Sorvall (RC-5 DuPont Co. USA) y se recuperó la fase soluble para cuantificar proteínas de acuerdo al método de Lowry y Col. (131).

3.3. Obtención de Anticuerpos contra G. lamblia en Conejos para Desarrollar un Análisis Inmunoenzimático

Para la obtención de sueros anti-G. lamblia se utilizaron 2 conejos blancos Nueva Zelanda de 3 kg de peso. Estos animales fueron inoculados 4 veces por vía subcutánea en diferentes sitios, empleando una emulsión antigénica de trofozoitos de la cepa P-1 de G. lamblia. La emulsión antigénica se preparó empleando un volumen con 500 µg de proteína soluble de trofozoitos mezclados con igual volumen de adyuvante. Inicialmente se inocularon los conejos con adyuvante completo de Freund (Sigma, Co. USA), después dos veces con adyuvante incompleto y en la última, solo la solución antigénica. El esquema de inmunización comprendió un periodo de 4 semanas con intervalos semanales. Los animales descansaron 1 mes y posteriormente a uno de ellos se le repitió el el procedimiento. El título hemaglutinante del suero fue de 1:1024 para el primer conejo y de 1:16384 para el segundo.

3.3.1. Adsorción de Anticuerpos de Suero de Conejo Inoculado con G. lamblia

Para la adsorción de anticuerpos séricos de conejo inoculado con G. lamblia se empleó 1 ml del suero diluido 1:10 y se le adicionó 100 millones de trofozoitos suspendidos en 1 ml de AFS pH 7.2. La mezcla se incubó a 37°C/hr. Se centrifugó a 8000 rpm/10 min/ 4°C (Sorvall RC-5, DuPont, USA) y el sobrenadante se filtró en membrana millipore 0.22 µm (Millipore Co.USA).

3.4. Desarrollo de un ELISA con Discos de Papel en Microplaca

Para realizar el primer objetivo del presente trabajo, se desarrolló un análisis inmunoenzimático con discos de papel. Para ello, se emplearon sueros de conejos inculados con G. lamblia, sueros adsorbidos con antígeno, sueros normales y antisueros conjugados a peroxidasa. Todas las pruebas se efectuaron en microplacas de poliestireno de 96 pozos (Nunc, Denmark) en donde fueron colocados discos de papel sensibilizados con proteína soluble de trofozoitos de G. lamblia. Cada prueba llevó como testigo AFS para descartar adsorciones inespecíficas o reacciones indeseables. Cada valor de Densidad Óptica (DO) registrado, fue el promedio por lo menos de triplicados y cada ensayo se realizó varias veces hasta que fue convincente su reproductibilidad. Asimismo se probó la especificidad del método.

3.4.1. Sensibilización de Discos de Papel para el Análisis Inmunoenzimático

Para el desarrollo del análisis inmunoenzimático se utilizaron como fase sólida, discos de papel filtro de 7 mm de diámetro (Schiecher and Schuell No.597, RFA) a los que se les acopló proteína soluble de trofozoitos de G. lamblia, de acuerdo con el procedimiento descrito por Acosta y Col. (132). Para ello fue incubado un gramo de discos de papel con NaOH 3 N, posteriormente fueron lavados con agua y resuspendidos en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6. Luego se les adicionó

BrCN disuelto en acetonitrilo (Merck Inc. USA) en relación 1:1 (p/v) y se incubaron con 30 µl de una solución de proteína de Gl. Lambija (0.5 mg/ml) disuelta en amortiguador de boratos boratos 25 mM. Después de incubar a 4°C durante toda la noche, los discos fueron suspendidos en solución de glicina 5 mM (Sigma Co. USA) y en amortiguador Tris 0.05 M pH 8.0 con albúmina sérica bovina (0.1 mg / ml). Por último los discos fueron liofilizados (Labconco 4451F, USA) y conservados a 4°C hasta su uso.

3.4.2. Titulación de Anti-Inmunoglobulinas Conjugadas a Peroxidasa

Para la titulación de conjugados anti-IgG humana-peroxidasa (Cappel Co. USA) o Proteína A-peroxidasa (Polysciences, Inc. USA) se colocaron 100 µl de amortiguador de citrato-fosfatos 0.1 M pH 5.0 a cada pozo de una microplaca de poliestireno de fondo plano (Nunc, Denmark), exceptuando la primera línea horizontal donde se colocaron 200 µl de la solución de conjugado anti-Ig-peroxidasa con dilución inicial de 1:100, luego se hicieron diluciones sucesivas en sentido vertical tomando 100 µl de cada pozo y homogenizando en el siguiente a partir de los pozos de la primera línea horizontal. Posteriormente se agregaron 50 µl de solución de sustrato de la peroxidasa (ver apéndice) a cada pozo y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Al final la reacción se inhibió mediante la adición de 25 µl de ácido sulfúrico 2.5 N (Beckman, USA) y se registró la DO en un lector de ELISA (Behring, Germany) con filtro de 490 nm. El criterio fue utilizar en los ensayos la dilución más baja con una absorbancia cercana a 1.0

3.5. Separación de Proteínas Solubles de Giardia lamblia por Electroforésis en Geles de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio

La preparación de geles de poliacrilamida se realizó de acuerdo al método de Laemmli (133). Se utilizaron placas de vidrio de 20 x 16 cm y 20 x 19 cm, separadores de plástico de 1.5 mm de espesor, cámara de lucita para electroforésis vertical (Bethesda Res Lab, Inc. USA) y una "fuente de poder" (Isco 493, Co. USA). Para la formación del gel, se limpiaron las placas de vidrio y los separadores con gasa previamente sumergida en alcohol. Se colocaron los separadores entre las placas de vidrio, engrasando con poca vaselina. Se sujetaron con pinzas metálicas, se nivelaron y se probaron para impedir fugas. Al hacer la mezcla del gel separador (ver apéndice) se agitó y se colocó cuidadosamente entre los vidrios e inmediatamente se adicionaron 2 ml de isopropanol (Beckman, USA) para evitar que al polimerizar se forme el menisco. La polimerización de gel concluyó a los 30 minutos. Al término de ella se retiró el isopropanol y se enjuagó varias veces con agua destilada para eliminar residuos. Se colocaron entre las placas de vidrio separadores de plástico para marcar los carriles verticales de corrida a una distancia de 1 cm del gel separador. Los separadores se limpiaron previamente con gasa alcoholizada. Enseguida se preparó el gel concentrador (ver apéndice), se homogenizó la mezcla y se aplicó entre las placas de vidrio hasta llegar al borde de la placa mas corta. La

polimerización se realizó a los 30 min. Luego se retiraron los espaciadores para carriles y el espaciador horizontal inferior, dejando solo los espaciadores verticales. El gel contenido entre las dos placas fue colocado en una cámara para efectuar la electroforesis en forma vertical. Se utilizaron pinzas para sujetar las placas a la cámara y se probó con agua destilada para corregir las fugas de líquido. La cámara se llenó con 1 litro de amortiguador para electroforesis tanto en la cavidad anódica como en la catódica. También se eliminaron las burbujas de aire que quedaron atrapadas en el gel en su borde inferior.

3.5.1. Preparación de Geles en Gradiente Continuo

Para la formación de geles en gradiente continuo se utilizó una bomba peristáltica (Sage 375 A Ins, USA) un magneto pequeño y una cámara formadora de gradiente continuo. En la salida de dicha cámara se conectó a un capilar flexible, éste a la bomba peristáltica y la salida a las placas de soporte para el gel. Se prepararon las soluciones al 5 y al 15 % (ver apéndice) y se depositaron en los dos recipientes de la cámara formadora de gradiente continuo. La de mayor concentración se colocó en el recipiente del extremo de salida con un magneto en agitación constante. Luego ambos recipientes de la cámara se conectaron entre sí, para permitir la mezcla previa a la salida. El flujo de salida en la bomba peristáltica fue progresivo hasta que llegar a 750 ml/hora. Se tuvo cuidado en evitar la formación de burbujas

de aire. Cuando el gel espaciador llegó a una altura de 11.5 cm se interrumpió el llenado y se adicionó 1 ml de isopropanol para impedir la formación del menisco. La gelificación fue de 2 horas. Al término de este lapso se retiró el isopropanol, se enjuagó con agua destilada y con amortiguador de electroforésis. Enseguida se colocó un separador con carriles y se aplicó el gel concentrador en la forma descrita en la sección anterior.

3.5.2. Preparación de Antígeno con Detergentes

Para la preparación de antígeno soluble en presencia de detergentes, se emplearon trofozoitos, los cuales fueron resuspendidos en 1 ml de amortiguador Tris-Inhibidores de proteasas (ver apéndice) y se sometieron en ultrasonido (MSE, USA) por 3 veces a 12 micrones/ 15 seg/ 0°C con intervalos de 30 seg de descanso. Con el objeto de solubilizar membranas se agregó Triton X-100 hasta una concentración final de 0.5 % o Desoxicolato de Sodio hasta una concentración final de 2 % y se repitió el procedimiento de sonicación. Se centrifugó el material solubilizado a 12,000 rpm/ 15 min/ 4°C en centrifuga clínica (Damon/IEC, Div. USA) y se separó el sobrenadante que fue conservado en congelación a -20°C. Las proteínas solubles con detergente se cuantificaron de acuerdo al método de Lowry modificado por Dulley (134). En el procedimiento las muestras se diluyeron 1:50, 1:100 y 1:200 o 1:250 con agua bidestilada.

3.5.3. Electroforesis de Proteina Soluble

Para el análisis electroforético del antígeno se utilizó un volumen de la solución final descrita en la sección anterior, la cual contenía 2 mg de proteína soluble de trofocitos sonicados con detergente y se le agregó igual volumen de amortiguador de muestra 2x (ver apéndice). Por otro lado, los marcadores de bajo peso molecular (Pharmacia, USA) fueron suspendidos en AFS pH 7.2. El homogenizado y la solución de marcadores de bajo peso molecular se sometieron a ebullición en baño de agua, por 5 min. Enseguida, se les adicionó Beta-mercaptoetanol (Bio-Rad, USA) hasta una concentración final de 5 % y se sometieron a ebullición en baño de agua durante 1 min. Posteriormente, ambas muestras fueron colocadas en carriles del gel; el Ag se colocó en el carril formado por un "paine ciego" de 13 cm y la solución con marcadores de peso molecular en un carril de 0.8 cm. Finalmente se conectaron los electrodos a la fuente de poder (Isco 493 Co. USA), dando una salida de 100 voltios hasta que entró la proteína a 1 cm del gel concentrador. La electroforesis se mantuvo a un voltaje constante de 40 hasta que la proteína llegó a 0.5 cm del borde inferior.

3.5.4. Tinción del Gel de Poliacrilamida

Para la tinción del gel de poliacrilamida se utilizaron las soluciones Azul de Coomassie (Sigma, Co. USA) al 0.1 % y la solución para desteñir geles (ver apéndice). Al finalizar la electroforesis, el gel de poliacrilamida se colocó en solución de Azul de Coomassie durante 1 hora. El exceso de colorante se pudo remover con varios cambios de solución para desteñir geles hasta que se manifestaron las bandas de proteínas.

3.6. Electrotransferencia de Proteínas a Papel de Nitrocelulosa

Para realizar la electrotransferencia de proteínas, se empleó el método descrito por Towbin y Col. (135). Para ello se colocó la solución de proteínas (ver sección 3.5.2.) en el carril formado por un "peine ciego" de 13 cm en un gel de poliacrilamida. Luego de la electroforesis (ver la sección anterior) se cortaron 2 tiras del gel de 1.5 cm de ancho; una con los marcadores de peso molecular (Pharmacia Inc. USA) y otra con la distribución de proteínas. Las tiras se tiñeron para comprobar la reproductibilidad del ensayo. Simultáneamente el gel no teñido fue colocado en amortiguador para transferencia (ver apéndice) con leve agitación durante una hora y con un cambio a los 30 minutos. Posteriormente en una placa para transferencia, se colocó el gel, enseguida el papel de nitrocelulosa de poro 0.45 μm (BA-B5, Schleicher and Schuell, Germany) y ambos se protegieron externamente con papel Whatman 3 MM y fibra (Scotch

Brite). Todo esto se sujetó a la placa para electrotransferencia. Se cuidó que la emigración de proteínas hacia el cátodo estuviera hacia el papel de nitrocelulosa. La placa con el gel se colocó dentro de una cámara (Bio-Rad, Model Proteam 16CM, USA) a la cual se añadió amortiguador para electrotransferencia. Se conectaron los electrodos a la fuente de poder (Bio Rad, Model 250/2.5, USA) y se aplicó una corriente eléctrica de 70 voltios/ 16 horas/4°C.

3.6.1. Tinción del Papel de Nitrocelulosa

Para verificar la transferencia de proteínas al papel de nitrocelulosa, éste fue teñido, utilizando dos técnicas:

Técnica empleando Negro de Azul de Naftol.-Se cortaron dos tiras de papel de nitrocelulosa de 5 mm de ancho; una con los marcadores de peso molecular y otra con la distribución de proteínas. Las tiras se tñieron con 5 ml de la solución de Negro de Amido al 0.1 % (ver apéndice) con ligera agitación. Cuando las bandas fueron evidentes (aproximadamente 5 min) se removió el exceso de colorante con solución de metanol 5 % - ácido acético 10 % en agua destilada durante 15 min en agitación. Después de secar las tiras a temperatura ambiente se comparó con el perfil electroforético de las tiras del gel con el propósito de evaluar la transferencia.

Técnica empleando Tinta India.- Se cortaron dos tiras de papel de nitrocelulosa en la forma descrita y se lavaron con 100 ml de de AFS-Tween 20 al 0.05 % durante 20 min con un cambio a los 10

min. Se agregaron 100 µl de tinta India a 100 ml de amortiguador nuevo y se incubó a temperatura ambiente hasta que fueron evidentes las bandas de proteína. Luego se enjuagaron las tiras con AFS-Tween 20 al 0.05 % y posteriormente con agua de grifo. Por último, las tiras se secaron a temperatura ambiente.

3.6.2. Desarrollo de la Inmunolectrotransferencia

Para probar la reactividad del papel de nitrocelulosa con sueros humanos, se emplearon soluciones descritas en el apéndice. Una vez realizada la electrotransferencia se cortaron tiras de 4 mm de ancho del papel de nitrocelulosa y se colocaron en tubos de tapón de rosca (Pirex) donde se agregó la solución diluyente de muestra y el suero humano o AFS como testigo del proceso (testigo de conjugado) probando a diferentes diluciones desde 1:25 hasta 1:500. Las tiras se incubaron a 37°C durante 3 horas con agitación ligera en un aparato agitador con plataforma (Bellico, Biotechnol USA). Posteriormente las tiras se enjuagaron 3 veces durante 15 min cada vez, con 2.5 ml de AFS-Triton X-100 al 1 % en agitación constante. Se realizó una segunda incubación con 1 ml de conjugado anti-Inmunoglobulinas humanas-peroxidasa 1:1000 en AFS-suero bovino al 10 % y se colocó en agitación a 37°C durante 3 horas. Nuevamente las tiras se enjuagaron en la forma descrita y se incubaron con 2 ml de solución reveladora de Naftol 6N. Cuando se detectaron las bandas de reacción, las tiras se enjuagaron abundantemente con agua destilada durante 2 min y se secaron a temperatura ambiente.

3.7. Radioinmunoprecipitación de Antígeno de Giardia lamblia con Sueros Humanos

3.7.1. Marcaje Radioactivo de Proteínas de Membrana de Trofozoitos

Para la radioiodinación de proteínas de superficie se siguió el método descrito por Morrison y Bayse (136). Después de concentrar trofozoitos de Giardia lamblia, estos se resuspendieron a dilución 1:1000 en AFS pH 7.4 y se contaron en una Cámara de Newbauer. Por cada 150 millones de trofozoitos se utilizaron 0.5 mCi de Na¹²⁵I neutralizado. Se calculó el volumen que se adiciona de acuerdo a la tabla de decaimiento de la emisión gama.

En un tubo de vidrio tratado con mezcla crónica por 24 horas y esterilizado, se colocó un volumen de Na¹²⁵I, se agregó un volumen igual de AFS 2x-HCl 0.1 N, 2.7×10^{-6} M de KI, 100 ug/ml de Lactoperoxidasa y AFS para llevar el volumen a 1 ml. Posteriormente se agregaron los trofozoitos, se agitó la suspensión celular y se hicieron dos adiciones de 25 µl de peróxido de Hidrógeno al 0.03 % con un intervalo de 2.5 minutos. Después de la última adición de peróxido de Hidrógeno, la mezcla se sometió a centrifugación un mínimo de 4 veces adicionando 10 ml de AFS 1x-KI 0.1 M y retirando el sobrenadante cada vez. En todas las fases del procedimiento se confirmó la radioemisión con un contador Geiger (Model Pug 1, Technical Associated, USA) tanto del paquete celular como del sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de amortiguador Tris-Inhibidores de proteasas

y se procedió a desintegrar las células en la forma descrita en la sección 3.5.2. salvo que se usaron como protección, cilindros de plomo durante el manejo de la muestra. Finalmente, antes de conservar el Ag a -20°C se separó una alícuota de 5 μl para registrar la incorporación de Iodo en CPM en un contador (Packard Autogamma Scintillation Spectrometer 5230) en el canal ¹²⁵I.

3.7.2. Precipitación de Anticuerpos Séricos con Proteína Radioiodinada

Para la precipitación de Ac contenidos en el suero de individuos con giardiasis y proteína radioiodinada se empleó el método de Proteína A-Sefarosa. Las soluciones utilizadas se describen en el apéndice. El procedimiento se realizó de la siguiente manera: En tubos siliconizados con solución de Prosil 28 al 1 % en agua, se colocaron de 80,000 a 100,000 CPM de proteína radioactiva con 10 μl de suero humano o AFS que se usó como testigo del ensayo y se incubaron a 4°C durante toda la noche en agitación constante. Posteriormente se agregaron 25 μl de Proteína A-Sefarosa CL-4B (Pharmacia Inc. USA) al 50 % en NETT-ASF al 6 % a cada tubo y se incubaron a 4°C / 90 min. Se sometieron a centrifugación por 3 veces a 2500 rpm / 10 min a 4°C resuspendiendo los coprecipitados cada vez con 3 ml de NETT-ASF al 1 %, NETT-NaCl 0.5 M y NETT 1x, retirando el sobrenadante con pipeta Pasteur. Enseguida se transfirieron los coprecipitados a tubos eppendorf (Brinkman Co. USA) de 2.5 ml de capacidad para

centrifugar a 12,000 rpm / 5 min. Se retiró el sobrenadante y se adicionaron a los precipitados 25 µl de amortiguador diluyente de muestra 2x sin Pironina "Y" pero con 5 µl de Azul de Bromofenol 0.1 % en glicerol al 60 %. Finalmente se procedió a la electroforésis de proteínas descrita en la sección 3.5. utilizando geles de poliacrilamida en gradiente 5-15 %. El ensayo se efectuó con los siguientes testigos; suero humano negativo a G. lamblia descrito en la sección 3.1 y 60,000 CPM de Ag radiomarcado sin someter a inmunoprecipitación así como marcadores de peso molecular (Pharmacia, Inc. USA).

3.7.3. Revelado por Auto-Radiografía

Una vez realizada la electroforésis en el gel de poliacrilamida en gradiente continuo 5-15 %, se procedió a tefir el gel durante una hora en solución de Azul de Coomassie al 0.1 % y el exceso de colorante se removió con 3 cambios de solución de isopropanol 25 %-acético 7 %. Se enjuagó 3 veces con agua durante 30 min cada vez. Luego se colocó en solución de Salicilato de Sodio 1M pH 6 por 30 minutos. Se equilibró con solución de metanol 30 %-glicerol 3 % durante 40 minutos. Por último se sometió a deshidratación sobre papel filtro Whatman 3 MM en una Cámara Secadora de geles (Bio-Rad, Model 224, USA) a 60°C con vacío para extraer el vapor. Dicho proceso se realizó en 90 minutos y el gel deshidratado fue expuesto a una pantalla de Cloruro de Tungsteno, cubierto con una película (Kodak X0-MAT AR) a -70°C durante una o dos semanas dependiendo de la emisión.

CAPITULO 4. RESULTADOS

4.1. Análisis de Datos de Individuos Infectados y de Testigos

En el análisis clínico de los 67 niños portadores de quistes de G. lamblia se encontró que 9 de ellos no presentaron síntomas referentes al criterio descrito en la sección 3.1, los cuales fueron clasificados como asintomáticos.

El 53 % de los niños infectados fueron del sexo masculino y el 47 % del femenino y sus edades fluctuaron desde un mes hasta 12 años excepto uno de 14 años; la media estándar fue de 6 años \pm 3. La distribución porcentual por edades se realizó siguiendo el criterio de lactantes de 1 mes a 2 años, preescolares de 2 años 1 mes a 6 años y escolares, niños mayores de 6 años de edad. Esta distribución mostró que el 40 % fueron escolares, el 43 % preescolares y el 17 % lactantes. El 42 % de estos niños procedieron del Estado de México, el 37 % del Distrito Federal, el 6 % de Guerrero, el 4 % de Puebla y el 11 % de Tlaxcala, Hidalgo, Morelos, Oaxaca, Jalisco y Veracruz.

En el grupo de niños con síntomas prevalecieron dolor abdominal, diarrea y anorexia. El 48 % presentó giardiasis crónica, tomando como criterio mas de 3 meses con sintomatología.

En el grupo testigo, la distribución porcentual por edades mostró que el 20 % fueron niños escolares, 40 % preescolares y el 40 % lactantes.

4.2. Cuantificación de Proteínas Solubles de Trofozoitos.

Para la cuantificación de proteínas solubles de G. lamblia se aplicó el procedimiento descrito por Lowry y Col. (131) y se utilizó albúmina sérica bovina (ASB) como marco de referencia. Por cada 200 millones de trofozoitos sometidos a fraccionamiento y centrifugación, se obtuvo en promedio 10 mg de proteína.

4.3. Estandarización del ELISA en Papel.

Un método de ELISA de tipo indirecto, fue estandarizado y consistió en colocar un disco de papel sensibilizado en cada pozo de una microplaca de poliestireno (Nunc, Danemark) y adicionar los reactivos biológicos requeridos para detectar la reacción antígeno-anticuerpo. Las diluciones óptimas de los reactivos fueron determinadas por titulación individual de cada reactivo de acuerdo a lo descrito en la sección 3.4.2. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C/ 30 min y después de cada incubación, los discos fueron sometidos 8 veces a enjuagues con 200 µl de AFS-Tween 20 al 0.05 %. En la primera incubación se colocaron 200 µl de AFS pH 7.4 con albúmina sérica bovina (ASB) al 6 % o suero fetal bovino (Gibco, Co. USA) a la misma concentración, un disco de papel sensibilizado con proteína soluble de G. lamblia y suero de conejo a una dilución final de 1:260. Como testigos del proceso se emplearon los discos de papel, el suero fetal bovino y AFS en sustitución del suero de conejo. En la segunda incubación

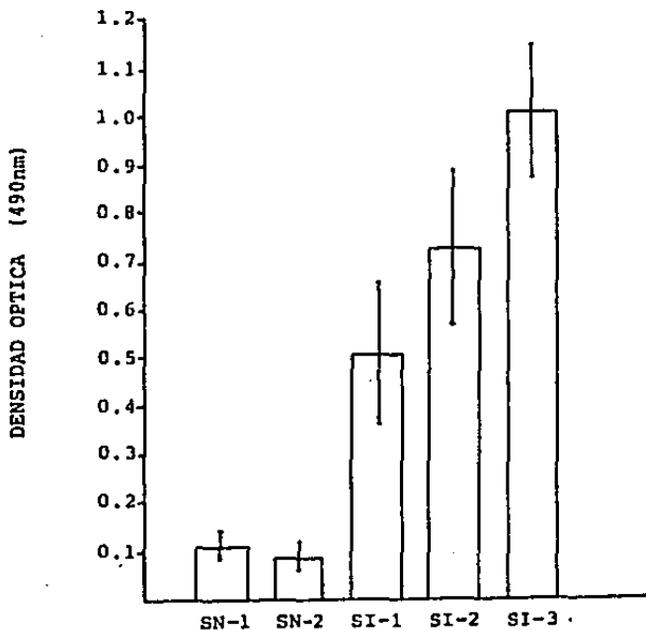


Figura 3. Especificidad de ensayos inmunoenzimáticos empleando sueros diluidos 1:260 de conejos normales (SN) e inoculados con *G. lamblia* (SI). Cada columna representa la media y la desviación estándar de ensayos por octuplicado.

se adicionaron 200 µl de solución de Proteína A conjugada a peroxidasa diluida 1:2000 (Polysciences, Inc. USA). En la última incubación se agregaron 200 µl de solución de sustrato preparada en amortiguador de citrato-fosfato pH 5 (ver apéndice) y al término de ésta se inhibió la reacción adicionando 50 µl de Ácido sulfúrico al 2.5 N (Beckman, USA). A continuación fueron transferidos 100 µl del sobrenadante a otra microplaca limpia y seca. El color desarrollado fue medido en un lector de ELISA (Behring Inst. Germany) con filtro de 490 nm.

4.3.1. Pruebas de Especificidad

Para probar la especificidad del análisis inmunoenzimático se utilizaron sueros de conejos normales y de conejos inoculados con Giardia lamblia. De las pruebas de especificidad solo se emplearon las que a continuación se describen:

En la figura 3 se muestran los resultados de 3 sueros de conejos inoculados con G. lamblia (SI) los cuales dieron valores promedio de 0.513, 0.725 y 1.054 de absorbencia. Los sueros normales de conejo (SN) tuvieron DO de 0.112 y 0.092 y sus desviaciones estándar (DE) fueron menores a 0.04. En la figura 4 se muestran los resultados de la adsorción de uno de los sueros (SI-2) con 2 mg de proteína soluble del parásito de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3.1 y en el ensayo se obtuvo una disminución en la DO hasta de un 50 % (0.364 de absorbencia). Con respecto a los sueros SI-1 y SI-3 no se realizó la adsorción en

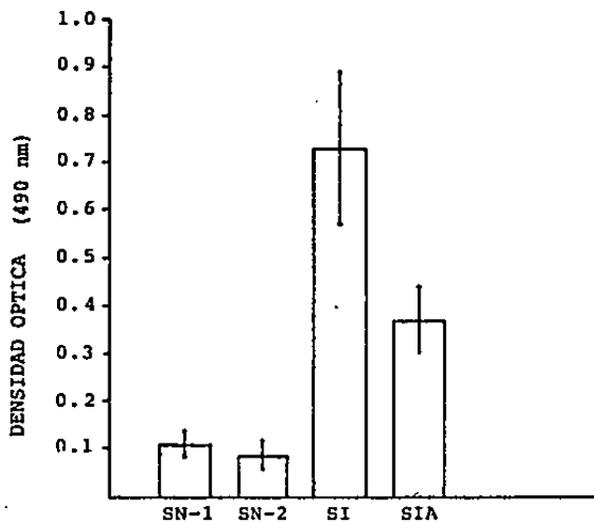


Figura 4. Especificidad de ensayos inmunocimáticos empleando sueros diluidos 1:260 de conejo normal (SN), inoculado con *G. lamblia* (SI) y adsorbido con antígenos del parásito (SIA). Cada columna representa la media y la desviación estándar de ensayos por octuplicado.

virtud de que el primero de ellos la DO fue baja y el otro se obtuvo en poca cantidad. En estos ensayos, el amortiguador diluyente de muestra se preparò con ASB al 6 % (Sigma, USA).

4.3.1.1. Inhibición Competitiva del Análisis Inmunoenzimático.

Para probar nuevamente la especificidad del método inmunoenzimático en papel, se utilizò suero normal de conejo y suero de conejo inoculado con G. lamblia a dilución 1:260, amortiguador diluyente de muestra con suero fetal bovino al 6 % en sustitución de ASB y conjugado Proteína A- peroxidasa a dilución 1:2000. Se realizó una Inhibición Competitiva del análisis inmunoenzimático, la cual consistió en añadir proteína soluble de trofozoitos de G. lamblia en la primera fase del método. El Ag en forma soluble y el Ag que se encuentra acoplado al papel compiten por los Ac anti-Giardia presentes en los sueros de conejos inoculados con el parásito. Los complejos Ag-Ac en forma libre son eliminados en los primeros enjuagues del disco de papel. De esta manera disminuyen los valores de DO en aquellos pozos donde se agregó la proteína soluble. En la figura 5 se muestran los resultados y como puede observarse en todos los casos en donde se agregaron diferentes cantidades de proteína soluble de G. lamblia hubo una disminución en los valores de DO. Así se encontró que 28 µg de proteína fue la concentración óptima en que se observò un 50 % de inhibición en los valores de DO obtenidos en la reacción con suero de conejo. En la figura 6, se

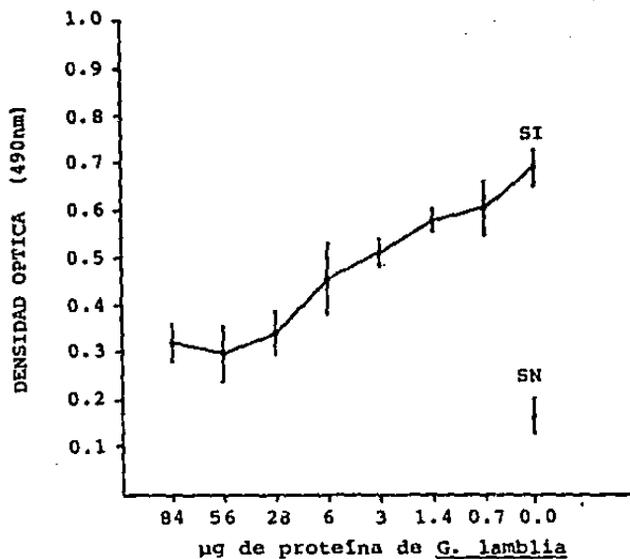


Figura 5. Inhibición Competitiva empleando suero diluido 1:260 de conejo inoculado con *G. lamblia* (SI). En la primera fase del ensayo se agregaron concentraciones conocidas de proteína soluble del parásito. Suero normal de conejo (SN). Cada punto con línea representa la media y la desviación estándar de ensayos por cuadruplicado.

emplearon 28 µg de proteína para obtener el por ciento de inhibición en los valores de DO del suero anti-Giardia. Como puede observarse los valores de DO de los sueros SI-1 y SI-3 disminuyeron respectivamente el 38 % y el 44 % cuando se adicionó el Ag en la primera incubación del ensayo.

4.3.1.2. Reacciones Cruzadas

Con el objeto de probar la reacción cruzada del Ag soluble de G. lamblia con otros Ag de microorganismos, se utilizaron sueros de conejos inoculados individualmente con Giardia lamblia, Entamoeba histolytica, Klebsiella pneumoniae y Isonia sarginata. En estos ensayos se emplearon los sueros a una dilución de 1:320 y el amortiguador diluyente de muestra se adicionó con suero bovino al 6 % en sustitución de ASB. El conjugado que se utilizó fue Proteína A-peroxidasa diluido 1:2000. Los resultados se muestran en la figura 7, donde se observa que los valores promedio de DO obtenidos con los sueros de conejos contra E. histolytica, T. sarginata, K. pneumoniae y el suero normal de conejo fueron similares y corresponden a 0.133, 0.202, 0.123 y 0.162 respectivamente. Los valores de DO del suero de conejo contra G. lamblia fueron en promedio de 0.547, los cuales siempre fueron superiores a todos los sueros utilizados en estos ensayos.

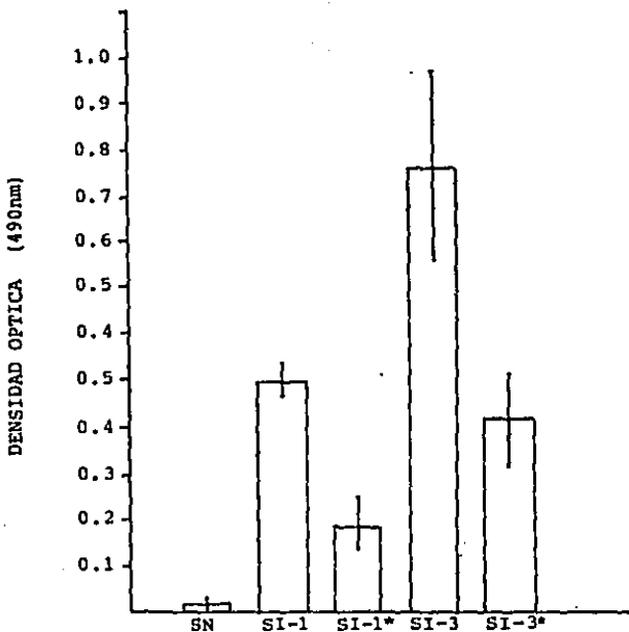


Figura 6. Inhibición Competitiva empleando 2 sueros diluidos 1:240 de conejos inoculados con *Giardia lamblia* (SI).
 † En la primera fase del ensayo se agregó la concentración óptima (28 µg) de proteínas solubles del parásito. Cada columna representa la media y la desviación estándar de ensayos por cuadruplicado.

4.3.2. Pruebas de Reproducibilidad del Análisis Inmunoenzimático

Para probar la reproducibilidad del análisis inmunoenzimático en papel, se emplearon tanto sueros de conejos normales e inoculados con G. lamblia como sueros de niños con giardiasis. Las pruebas se realizaron con intervalos de una a 5 semanas. En el cuadro 1 se muestran los resultados en donde cada valor de DO fue la media estándar de ensayos por triplicado. Como puede observarse, solo en los sueros de conejos normales (SN-1 y SN-2) así como en los sueros humanos 381, 394, 405, 522 y 529 los valores de DO disminuyeron en relación a la lectura anterior. Esta disminución en los valores de DO pueden ser consecuencia de que haya disminuido el título de Ac en los sueros debido a que fueron congelados y descongelados un mínimo de 5 veces. Sin embargo aun cuando los ensayos fueron realizados con diferencia en tiempo, los resultados fueron reproducibles.

4.4. Análisis y Selección de Sueros Humanos por el Método Inmunoenzimático en Papel.

Para el análisis cuantitativo de Ac contra G. lamblia en sueros humanos a dilución 1:100, se utilizó un conjugado anti-IgG humana-peroxidasa (Cappel Co. USA) diluida 1:2000. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los sueros que se probaron fueron obtenidos de niños infectados con G. lamblia sintomáticos y asintomáticos y de niños en quienes no se detectó al parásito en 3 CPS, los cuales se emplearon como testigos. Los resultados se

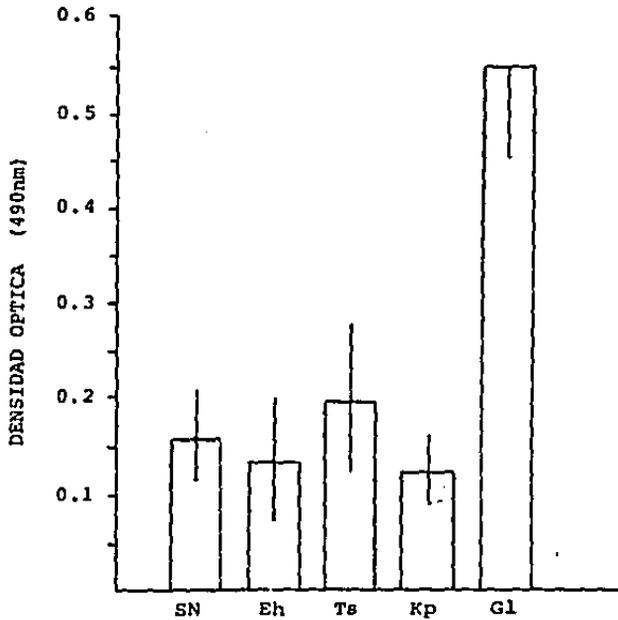


Figura 7. Reacciones cruzadas empleando sueros diluidos 1:320 de conejo normal (SN) e inoculados con *E. histolytica* (Eh), *T. sapinata* (Ts), *K. pneumoniae* (Kp) y *G. lamblia* (G1) en confrontación con el antígeno de *G. lamblia*. Cada columna representa la media y la desviación estándar de ensayos por cuadruplicado.

muestran en la figura 8 donde se observa que que en 67/67 (100 %) de los sueros de niños infectados presentó valores de DO mayores a 0.1, mientras que en 7/12 (58.3 %) de los sueros testigos fue menor a ese valor. En muestras de niños infectados y con síntomas (IS) los valores de DO fluctuaron desde 0.103 hasta 0.487 con una media estándar de 0.264 ± 0.085 . En los niños infectados asintomáticos (IA) la DO fue de 0.125 a 0.393 con una media estándar de 0.272 ± 0.104 . En el grupo de testigos (T) la DO fue de 0.052 a 0.261 con una media de 0.126 ± 0.076 . Cuando estos valores fueron analizados, se encontraron diferencias estadísticas. El análisis de varianca no-paramétrica de Kruskal-Wallis mostró que los grupos IA e IS son iguales entre sí pero diferentes del grupo T, $P < 0.0001$. Similarmente con la prueba de Mann-Whitney, el grupo T mostró diferencias estadísticamente significativas con cada uno de los grupos IA e IS; en la comparación del grupo T con el grupo IA, la igualdad fue de una $P < 0.004$ y en la comparación de los grupos T e IS, la igualdad fue de una $P < 0.0001$.

Por otra parte, los grupos mencionados fueron distribuidos en función de la edad de acuerdo al criterio descrito en la sección 4.1. Por consiguiente se obtuvieron promedios de DO para cada uno de los subgrupos. Los resultados se muestran en el cuadro 2. Cuando esta distribución fue analizada, se encontró una diferencia significativa entre sueros de niños lactantes infectados y de lactantes no infectados. La probabilidad de igualdad entre ambos grupos fue menor a 0.002.

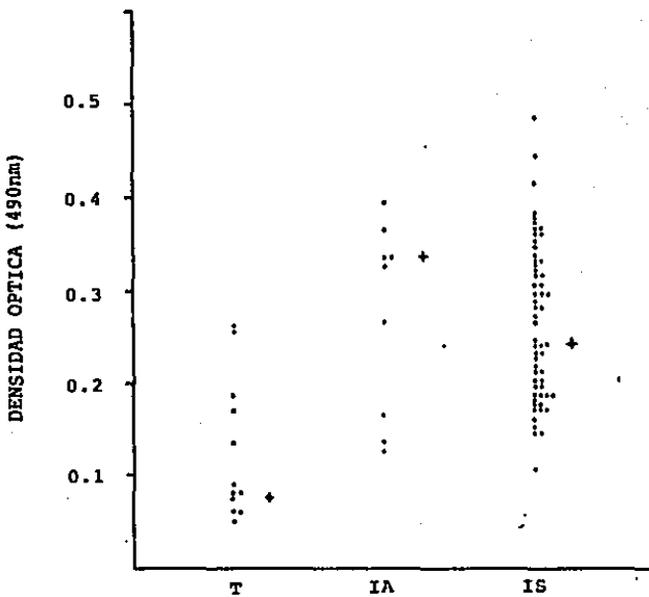


Figura 8. Análisis inmunoenzimático en papel para detectar anticuerpos IgG contra *G. lamblia* en sueros diluidos 1:100 de niños asintomáticos sin expulsión de quistes en heces (T) y de niños con expulsión de quistes; asintomáticos (IA) y con síntomas (IS). Los puntos representan individualmente el valor promedio de cada suero y las cruces las medianas de cada grupo.

Para el análisis de reconocimiento de proteínas solubles de G. lamblia, fueron seleccionados los sueros con valores altos de OD y con volúmenes disponibles mayores a 500 ul. Así quedaron integrados 28 sueros de niños con expulsión de quistes: 24 de ellos fueron del grupo IS y 4 del grupo IA.

Cuadro 1. Reproducibilidad del ELISA a diferentes intervalos.

		Densidades ópticas de los ensayos			
		1 semana	4 semanas	4 semanas	5 semanas
Sueros de Conejos					
SN-1	0.162	0.102	0.133	0.035	
SN-2	0.086	0.087	0.067	NR	
SI-1	0.671	0.589	0.659	0.757	
SI-2	0.547	0.520	0.569	0.545	
Sueros Humanos					
331	0.134	0.196	NR	0.177	0.170
334	0.299	0.220	0.291	0.294	0.305
339	0.381	0.320	0.485	0.421	0.445
342	0.240	0.225	0.265	0.208	0.230
353	0.346	0.301	0.305	NR	0.360
359	0.464	0.412	0.337	NR	0.487
381	0.287	0.289	NR	0.255	0.176
387	0.225	0.351	0.239	0.281	0.239
392	0.235	NR	0.297	0.258	0.257
394	0.274	0.165	0.167	0.053	0.091
405	0.310	0.205	0.166	0.185	NR
513	0.289	NR	0.472	0.353	0.305
522	0.260	0.213	0.210	0.199	0.149
529	NR	NR	0.196	0.154	0.125
596	0.360	0.317	0.301	0.300	0.323

En estos ensayos se emplearon sueros de conejos normales (SN) e inoculados con G. lamblia (SI) así como sueros humanos representados con números enteros. Cada una de las 5 columnas constituyen valores de densidad óptica obtenidos en las mismas muestras, bajo las mismas condiciones pero a diferentes tiempos. NR = No realizado

Cuadro 2. Valores promedio de densidad óptica obtenidos de inmunoensayos para detectar anticuerpos séricos contra *G. lamblia* en una distribución de subgrupos en función de la edad.

	Lactantes	Preescolares	Escolares
I Niños portadores de quistes	0.259±0.079 †	0.271±0.085	0.255±0.083
1) Asintomáticos	0.244±0.112	0.291±0.103	0.250±0.165
2) Sintomáticos	0.263±0.078	0.266±0.082	0.255±0.079
II Niños no portadores	0.078±0.012 †	0.168±0.021	0.259±0.003

† La diferencia estadística de 0.259 ± 0.079 contra 0.078 ± 0.012 por la prueba no-paramétrica U de Mann Whitney dio una $P < 0.002$

4.5. Análisis Electroforético de Proteínas de *Giardia lamblia*

El análisis de las proteínas solubles de trofozoitos de *G. lamblia* se llevó a cabo por electroforésis en gels de poliacrilamida con un gradiente continuo de 5-15 %. Con el propósito de estandarizar la electroforésis se probaron corrimientos de 25, 50 y 100 µg de proteína soluble y resultó que con un mínimo de 100 µg en un carril de 0.8 cm se definieron muy bien las bandas. En el perfil se detectaron aproximadamente 56 bandas proteicas.

También se realizaron pruebas con 100 µg de proteína solubilizada con desoxicolato de Sodio al 2 %, con Triton X-100 al 0.5 % y con los mismos agentes en presencia de beta-mercaptoetanol al 5 %. En los resultados, no se observaron diferencias en la resolución electroforética de la proteína sometida a esas condiciones.

4.6. Identificación de Proteínas de Giardia lamblia por Inmunolectrotransferencia con Sueros de Niños con Giardiasis

Después de realizar la separación de proteínas totales de G. lamblia en SDS-PAGE en gradiente continuo, se llevó a cabo la transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa. Para el procedimiento mencionado se utilizó de 1.6 a 2 mg de proteína dando buenos resultados. Luego de la transferencia, el papel de nitrocelulosa fue secado, dividido en tiras e incubado con los diferentes sueros humanos empleando una dilución de 1:50 (ver sección 3.6.2). Los sueros humanos fueron de niños infectados con G. lamblia: sintomáticos (IS) y asintomáticos (IA) así como de niños no infectados (T) de acuerdo al criterio descrito en la sección 3.1. El peso molecular de las bandas de reacción, se calculó al interpolar la distribución de las proteínas de calibración cuya correlación con el método de "Mínimos Cuadrados" fue de $r = 0.949$. La posibilidad de adsorción inespecífica del conjugado se descartó ya que el papel de nitrocelulosa sin el suero humano no presentó bandas de reacción. Los resultados se muestran a continuación:

En la figura 9 se representa la reacción de los Ac presentes en los sueros de niños de los grupos IS e IA, los cuales reconocieron en total 22 bandas de proteína del parásito cuyos pesos moleculares fueron de 243, 203, 185, 172, 135, 126, 120, 98, 88, 81, 78, 72, 68, 63, 55, 53, 46, 35, 32, 28, 24 y 20 kDa. Sin embargo, los sueros más reactivos reconocieron un máximo de 17 bandas de proteína de G. lamblia.



Figura 9. Representación gráfica del reconocimiento de proteínas de *G. lamblia* por inmunoelectrotransferencia con sueros de niños que expulsaron quistes en heces. En ésta se incluyen todas las bandas que fueron reconocidas por los sueros probados.

En la figura 10 se muestran los resultados de la inmunoelectrotransferencia. Como se puede observar, en 2 de los 3 sueros del grupo T hubo reacción débil con proteínas de 135, 126, 88, 68, 63, 46 y 35 KDa. Los sueros del grupo IA (numerados del 1 al 4) y en 7/24 del grupo IS (números 5, 8, 14-18) reconocieron proteínas de 203, 185, 172, 135, 126, 120, 98, 88, 81, 78, 72, 63, 55, 53, 46 y 35 KDa siendo las mas prominentes las de 88, 46 y 35 KDa. Consecuentemente en el grupo IS, 17/24 de los sueros no reaccionaron con las proteínas de 203, 185 y 172 KDa pero siguieron el patrón de reconocimiento observado en el grupo IA. Cabe mencionar que en la reacción de los sueros del grupo IS, se notó que el 25 % reconoció prominentemente en forma individual algunas de las proteínas mencionadas y se observó en los siguientes casos: El suero No. 5 reaccionó intensamente con las proteínas de 203, 46 y 35 KDa; el No. 6 reaccionó además con una de 28 KDa; ; el No.19 con las proteínas de 135, 88 y 46 KDa; el No. 20 con las de 88, 68, 63, 55 y 46 KDa; el No. 21 con las de 88, 72, 63, 55, 53, 46 KDa y débilmente con otras de 28, 24 y 20 KDa; el No.22 con las de 55 y 53 y débilmente con las de 88 y 63 KDa; el No.7 con una de 24 KDa y en forma débil con la de 32 KDa; los números 23, 24 y 25 reaccionaron fuertemente con la proteína de 46 KDa ; el No.27 con las de 172 y 135 KDa. Otros sueros reaccionaron intensamente con la mayoría de las proteínas como es el caso de los sueros 8 y 18. El primero de estos sueros reconoció además una proteína de 243 KDa.

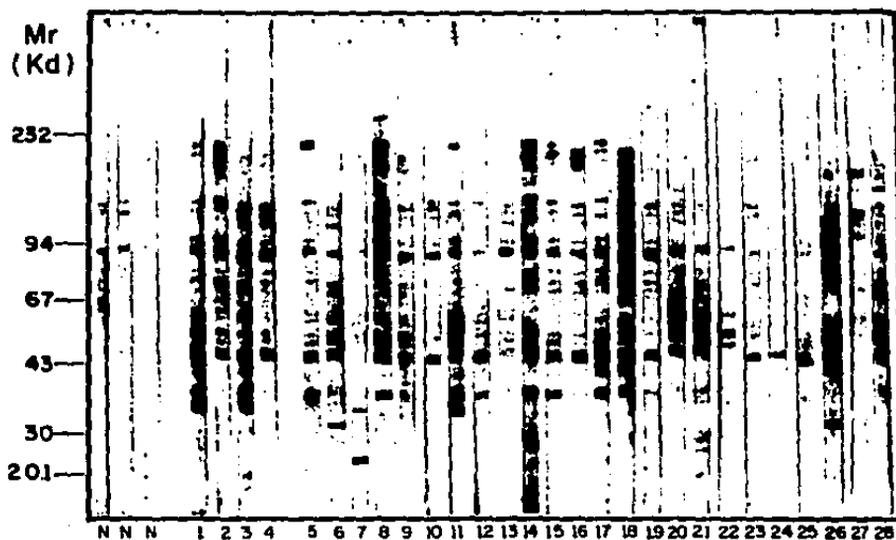


Figura 10. Reconocimiento de proteínas solubles de trofozoitos de la cepa P-1 de *G. lamblia* por inmunoelectrotransferencia con sueros de niños asintomáticos sin expulsión de quistes en heces (N) así como de niños con expulsión de quistes; asintomáticos (carriles 1-4) y con síntomas (carriles 5-28).

En el análisis cualitativo de la reactividad de los sueros ante proteínas de *G. lamblia* no se observaron diferencias en el reconocimiento de los sueros entre los grupos IA e IS, no se encontró relación con el tiempo de infección en el grupo IS, ni en cuanto a las edades de los niños y el patrón de reconocimiento. Los sueros de lactantes fueron los números 5 y 6; los de preescolares fueron el 8, 9, 11-14 y 24 y el resto de niños escolares. Tampoco se encontró relación del patrón de reconocimiento de proteínas del parásito con la procedencia del donador del suero. Los sueros que pertenecieron a niños que habitaron en otras zonas geográficas del país fueron; el suero No.1 de un niño de Oaxaca, el No. 6 de Tlaxcala, el No. 8 de Jalisco, el No. 9 de Guerrero, el No. 10 de Puebla y el No. 28 de Hidalgo. Los demás sueros pertenecieron a niños del Estado de México o del Distrito Federal.

En el análisis porcentual de la reactividad de los sueros con proteínas de *G. lamblia* se observó (cuadro 3) que las bandas más reactivas ante los sueros del grupo T fueron las de 185, 135, 126, 98, 88, 46 y 35 KDa; ante los sueros del grupo IA fueron las de 185, 172, 135, 126, 98, 88, 81, 78, 72, 55, 53, 46 y 35 KDa; y ante los sueros del grupo IS fueron las de 135, 88, 78, 72, 63, 55, 53, 46 y 35 KDa.

Cuadro 3. Reconocimiento porcentual de proteínas de G. lamblia por inmunoelectrotransferencia con sueros de niños.

Número de banda	Movilidad relativa en KDa	Positivos al parásito en uno o mas CPS			Negativos al parásito en 3 CPS (testigos)	% total
		IA	IS	% Subtotal		
1	243	50	12.5	17.9	33.3	19.4
2	203	50	29.2	32.1	33.3	32.3
3	185	100	54.2	60.7	66.7	61.3
4	172	100	37.5	46.4	0.0	41.9
5	135	100	83.3	85.7	66.7	83.9
6	126	100	70.8	75.0	66.7	74.2
7	120	100	66.7	71.4	0.0	64.5
8	98	100	62.5	67.9	66.7	67.7
9	88	100	83.3	85.7	66.7	87.1
10	81	100	62.5	67.9	33.3	64.5
11	78	100	75.0	78.6	33.3	74.2
12	72	100	79.2	82.1	33.3	77.4
13	68	75	50.0	53.6	33.3	51.6
14	63	75	79.2	78.6	33.3	74.2
15	55	100	87.5	89.3	0.0	80.6
16	53	100	75.0	78.6	0.0	71.0
17	46	100	91.7	92.9	66.7	90.3
18	35	100	75.0	78.6	66.7	77.4
19	32	50	37.5	39.3	0.0	35.5
20	28	0	20.8	17.9	0.0	16.1
21	24	0	25.0	21.4	0.0	19.4
22	20	0	8.3	7.1	0.0	6.5

En el cuadro se muestra el porcentaje (subtotal) que presentaron los grupos asintomáticos (IA) y con síntomas (IS) así como el porcentaje total que incluye al grupo testigo.

CPS = coproparasitoscópico.

4.7. Identificación de Proteínas de Giardia lamblia por Radioinmunoprecipitación con Sueros de Niños con Giardiasis.

Con el propósito de identificar proteínas de superficie de G. lamblia, que fueran reconocidas por sueros de individuos con

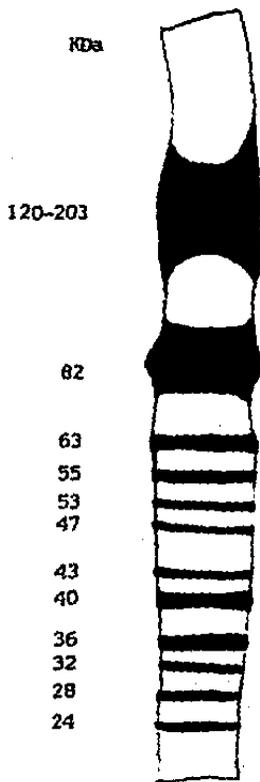


Figura 11. Auto-radiografía de electroforesis en gel de poliacrilamida con proteínas de trofozoitos de la cepa P-1 de Giardia lamblia radiiodinados en su superficie.

giardiasis, se llevó a cabo la precipitación de antígenos de superficie que fueron marcados con ¹²⁵I. En estos ensayos se emplearon sueros de niños de los grupos IS, IA y I. Se utilizó proteína de trofozoitos de la cepa P-1. Como testigo del ensayo se utilizó solución amortiguadora NETT-ASB al 6 % con proteína de G. lamblia marcada con ¹²⁵I para descartar inespecificidad en el procedimiento de inmunoprecipitación. Como testigo del marcaje de proteínas, se analizó en SDS-PAGE proteína obtenida de trofozoitos expuestos a ¹²⁵I pero sin someter a los ensayos de inmunoprecipitación (P-IT en la figura 12).

Los resultados fueron los siguientes; en la figura 11 se muestra la proteína total radiiodinada. Se observan dos bandas mayoritariamente iodinadas, una de las cuales es polidispersa con un peso molecular de 120-203 KDa y la otra tiene un peso molecular de 62 KDa. También se observan otras bandas iodinadas de 63, 55, 53, 47, 43, 40, 36, 32, 28 y 24 KDa.

Con respecto a las autorradiografías de los coprecipitados se observa en la figura 12 que tanto el grupo IA como el IS (carriles A1-A5 y S1-S5) reaccionaron con proteínas de una Mr de 82, 63 y 55 KDa. En relación con el suero testigo (carril N) y el testigo del ensayo descrito anteriormente no se observó reacción alguna. Como se pueda apreciar no se encontraron diferencias en el reconocimiento de proteínas de superficie entre los sueros del grupo IS y los del grupo IA.

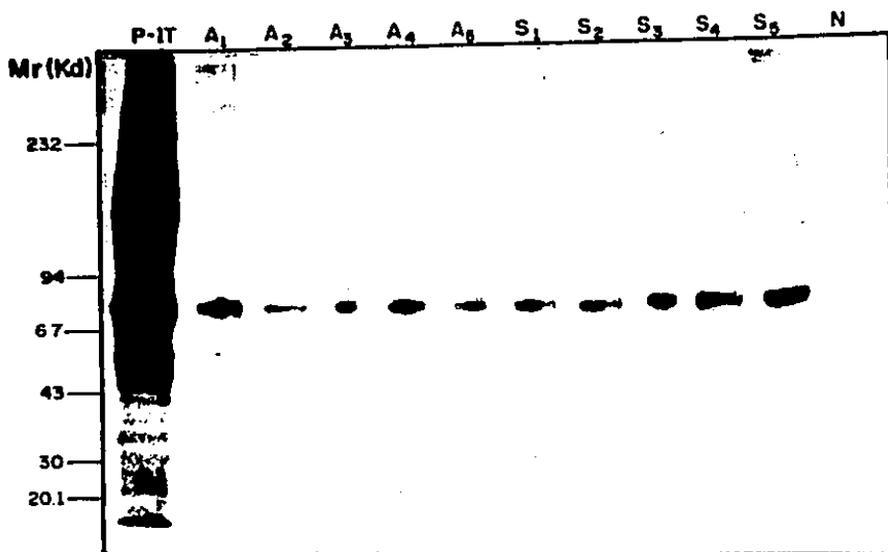


Figura 12. Reconocimiento de proteínas de *Giardia lamblia* por radioinmunoprecipitación con un suero de niño asintomático sin expulsión de quistes en heces (carril N) así como de niños con expulsión de quistes; asintomáticos (carriles A1-A5) y con síntomas (carriles S1-S5). En la extrema izquierda se muestra la electroforesis de proteína soluble de trofozoitos de la cepa P-1 radiodiodinados en su superficie (carril P-IT).

CAPITULO 5. DISCUSION

En el presente trabajo, se describe la estandarización y optimización de un análisis inmunoenzimático (ELISA) en papel. Se utilizó como antígeno (Ag) proteína soluble de la cepa de G. lamblia Portland 1 (P-1). Para la valoración del método se obtuvieron sueros de conejos, los cuales fueron sometidos a un esquema de inmunización destinado a elevar el título de anticuerpos (Ac) contra el parásito. Para cada uno de los ensayos inmunoenzimáticos se usó como un testigo del procedimiento, amortiguador fosfato-salino (AFS) en sustitución de la muestra problema. La ausencia de reacción en este testigo descartó la posibilidad de uniones inespecíficas. Lo cual indicó que el conjugado Proteína A-peroxidasa no reaccionó con el papel filtro empleado como fase sólida del método.

Los resultados mostraron poca variación inter e intraensayos. Las mediciones de Ac contra Ag del parásito fueron reproducibles como se observa en los resultados expresados en el cuadro 1. De las pruebas de especificidad que se realizaron, se aprecia en los resultados una clara diferencia entre los valores de densidad óptica (DO) de los sueros de conejos normales y los obtenidos de conejos inoculados con G. lamblia (figuras 3-7). Además se observa que estos valores de DO disminuyeron cuando los sueros inmunes fueron adsorbidos previamente con el Ag homólogo (figura 4) o por adición de Ag soluble en la prueba de inhibición competitiva (figura 6). Con respecto a la inhibición competitiva

del inmunoensayo se aprecia que la DO obtenida de un suero de conejo inoculado con G. lamblia disminuyó en correlación directa con la cantidad de Ag adicionado hasta formar una curva de inhibición (figura 5). La especificidad se muestra en la medición de la competencia por los Ac del suero inmune entre el Ag inmovilizado y el Ag soluble. Así, pese a la inmovilización de la proteína al papel, ésta conservó su antigenicidad ya que los Ac reaccionaron equitativamente tanto para el Ag de fase sólida como para el Ag soluble (ver sección 4.3.1.1.). En otra de las pruebas de especificidad se observa que la DO de un suero de conejo inoculado con G. lamblia fue superior a todos los sueros de conejos inoculados con otros patógenos (figura 7).

El empleo de este método para medir Ac contra el parásito en sueros humanos mostró una dispersión de valores de DO (figura 8) tanto en sueros de niños infectados sintomáticos (IS) y asintomáticos (IA) como en sueros de niños no infectados (T). En el análisis estadístico, se halló una diferencia significativa entre las DO de los grupos IA e IS cuando fueron comparados con las DO del grupo T (ver sección 4.4.). Lo cual muestra que el método tiene capacidad para detectar concentraciones de Ac generados en una infección natural. Similarmente en estudios previos, diversos autores (15,35,82,85-88) han utilizado inmunodifusión radial (IDR), inmunofluorescencia indirecta (IFI) o ELISA para determinar Ac contra Ag de quistes o de trofozoitos del parásito. En estos estudios se intentó diferenciar mediante el título de Ac séricos a individuos con giardiasis de los

individuos no infectados. Pero en la mayoría de los estudios se limitó el número de muestras. Pese a ello no lograron definir claramente la positividad a G. lamblia en el individuo parasitado ya que algunos autores registraron seropositividad al parásito en testigos no infectados (86,88) en cambio otros detectaron concentraciones bajas de Ac séricos anti $giardia$ en un porcentaje de individuos con giardiasis sintomática (85,86) o asintomática (35,87). En nuestro caso se utilizó Ag soluble de trofozoitos de cultivo axénico. Con el método de ELISA en papel se observó que el 100 % de las DO de los grupos de sueros de niños infectados con el parásito y en 5/12 (41.7 %) de los sueros del grupo T fueron superiores a 0.1 (figura 8). Esto podría ser debido a la presencia de Ac contra G. lamblia en algunos sueros del grupo T. La prevalencia de Ac contra el parásito en individuos de la ciudad de México fue mostrada por Nicotti y Col. (83) quienes detectaron títulos de Ac séricos contra G. lamblia en el 77 % de un grupo de madres residentes en el Valle de México. La posibilidad de una prevalencia de Ac contra el parásito en niños no puede ser excluida ya que ha reportado que un alto porcentaje de giardiasis se ha presentado tanto en niños preescolares (101) como en escolares (19). La posibilidad aumenta si consideramos que la exposición al parásito puede producir una respuesta inmunitaria humoral (15) y que los Ac contra el parásito pueden persistir hasta 15 meses después de una infección (86). Por consiguiente podría esperarse persistencia a la positividad sérica a G. lamblia en la población infantil que ha presentado

mayor tasa de incidencia de giardiasis como se ha mencionado. Por otra parte se encontró que aquellos sueros del grupo T que dieron valores comparables al de los grupos de niños infectados correspondieron a niños de edad preescolar o escolar. En base a que en zonas endémicas las probabilidades de infección aumentan a medida que aumenta la edad del individuo, se comparó la media estándar de DO en subgrupos clasificados en función de la edad. Pese a que no se encontraron diferencias significativas entre las DO de lactantes, preescolares y escolares del grupo T, éstos valores aumentaron directamente con la edad como se puede observar en el cuadro 2. Asimismo en éste análisis se encontró que la DO de sueros de niños lactantes infectados fue significativamente mas alta que los obtenidos de lactantes no infectados mientras que en los subgrupos de preescolares y escolares no se halló ninguna diferencia (cuadro 2). Estos hallazgos sugieren una infección previa en los niños mayores de 2 años de edad que fueron considerados como testigos seronegativos a G. lamblia. La posibilidad de establecer mediante una DO la infección del parásito en individuos puede depender de alternativas como medir simultáneamente otra clase de Ac como Igm o Iga contra G. lamblia.

Como ya se mencionó, con el método de ELISA en papel, se obtuvieron valores de DO en sueros de los grupos IS, IA y T. Cuando estos valores fueron analizados estadísticamente, se encontró una diferencia significativa al compararse sueros de niños infectados (IA e IS) con los obtenidos del grupo T. Pero en

la comparación entre los grupos IA e IS no se encontró diferencia alguna. En consecuencia el método de ELISA en papel mostró que el título de Ac séricos no permite diferenciar individuos infectados y con síntomas de los individuos infectados asintomáticos. La diferencia entre ambos grupos podría deberse a la presencia de Ac contra algunos determinantes antigénicos de G.lamblia relacionados con la protección. Por lo tanto para identificar proteínas del parásito que sean reconocidas preferentemente por los sueros de niños con giardiasis asintomáticos, se emplearon dos metodologías: inmunolectrotransferencia (IET) y radioinmuno-precipitación (RIP).

Para el análisis antigénico de proteína soluble de G.lamblia se emplearon trofozoitos de las cepas P-1 y WB. La distribución electroforética se realizó en SDS-PAGE en gradiente. En los resultados no se observaron diferencias entre las bandas proteicas de ambas cepas. Se detectaron aproximadamente 56 bandas cuya movilidad relativa (Mr) fue de 243 a 20 KDa. El perfil electroforético fue mas amplio que el reportado por otros autores (125). Para la identificación de proteínas inmunogénicas del parásito fueron seleccionados los sueros de los grupos IA e IS que dieron DO altas en el ELISA en papel.

Para la IET se emplearon 24 sueros del grupo IS, 4 del grupo IA y 3 del grupo T. En los resultados se observó que los 28 sueros de niños que hospedaron al parásito reaccionaron con un verdadero mosaico antigénico (figura 10). Los sueros reconocieron proteínas de 243, 203, 185, 172, 135, 126, 120, 98, 88, 81, 78,

72, 68, 63, 55, 53, 46, 35, 32, 28, 24 y 20 kDa (figura 9) siendo las más prominentes las de 88, 46 y 35 kDa. Con respecto al reconocimiento por los 3 sueros del grupo T cuyos valores de OD fueron de 0.172, 0.137 y 0.060. El primero y el segundo reaccionaron débilmente con proteínas de 135, 126, 88, 68, 63, 46 y 35 kDa. Con el tercero de estos sueros, no se detectó reacción con Ag del parásito.

Los resultados no representan uniones inespecíficas por lo siguiente; como testigo de conjugado se utilizó AFS en sustitución del suero humano. La ausencia de reacción en este testigo indicó que el conjugado anti-inmunoglobulinas humanas-peroxidasa no se unió directamente al papel de nitrocelulosa sino a través de un Ac. Además la distribución antigénica se realizó en SDS-PAGE en gradiente continuo 5-15 %. Estas proteínas fueron electrotransferidas al papel de nitrocelulosa, por consiguiente permitió que el reconocimiento fuese con mayor número de bandas protéicas. Otra de las razones es que el reconocimiento múltiple puede deberse a que la parte de carbohidratos de glicoproteínas sean el blanco de reacción por los Ac. En estudios estructurales de trofozoitos (54,105) se encontró mediante el uso de lectinas y enzimas de especificidad conocida, que el principal carbohidrato expuesto fue identificado como N-Acetil-D-glucosamina (D-Glc-NAC) en enlace Beta. Uno de estos estudios (105) mostró que los residuos de D-Glc-NAC no estaban estructurados en forma de quitina, sino conjugados a proteínas membranales. Duzó un porcentaje considerable de proteínas reconocidas en IEF.

comparten determinantes antigénicos de tipo carbohidratos.

Con respecto a los resultados, en estudios previos Taylor y Wenman (129) hallaron por IET que de 16 sueros de pacientes de diferentes edades, el 69 % reaccionó con una proteína de 31-33 KDa. Los autores sugieren que se trata de una proteína de membrana. Se apoyan en que fue la mas abundante en un perfil electroforético de proteínas radioiodinadas en la superficie de trofozoitos de la cepa WB. Pero estos autores enfocaron su atención en proteínas de bajo peso molecular y probablemente la separación de proteínas la efectuaron en SDS-PAGE al 15 %. Quizá por ello no mencionaron reconocimiento de bandas antigénicas superiores a 67 KDa. No obstante se puede observar reacción con otras proteínas de 27, 28 y 50 KDa (129).

En nuestro caso se observó que solo en 8/28 (29 %) de los sueros de niños infectados reaccionó con un componente protéico de 32 KDa. Lo cual señala que con nuestras condiciones no fue la proteína mas reconocida, pero si tuvo una reacción intensa con 3 sueros (figura 10). En otras condiciones por ejemplo con Ag de la cepa WB, tal vez la reacción del componente de 32 KDa fuese con mayor número de muestras. En relación a las otras proteínas del patrón de reconocimiento, hay estudios que reportan identificación de proteínas de G. lamblia que coinciden en peso molecular con las reconocidas por los sueros de niños infectados. Por ejemplo en estudios ultraestructurales de la cepa P-1 de G. lamblia. Torian y Col. (137) por IET con Ac monoclonales contra disco adherente o flagelos, determinaron el reconocimiento de

polipéptidos de 170, 155, 55 y 53 KDa. Los polipéptidos de 170 y 155 KDa estuvieron presentes en preparaciones de citoesqueleto pero no fueron localizados en la superficie. Los polipéptidos de 55 y 53 KDa estuvieron en superficie de trofozoitos y los autores sugieren que están relacionados con la tubulina de los microtúbulos flagelares y del disco adherente. Holberton y Ward (108) muestran que los microtúbulos de citoesqueleto están constituidos por tubulina y relacionados con una proteína de 52.5 KDa y principalmente con otra de 30 KDa a quien denominan "giardina". Crossley y Holberton (138) al caracterizar proteínas de citoesqueleto, encontraron 20 bandas en el perfil electroforético, siendo las más prominentes, la alfa-tubulina de 58 KDa, la beta-tubulina de 53.5 KDa y la proteína de 30 KDa, así como otras bandas de 110, 95.5 y 81 KDa de menor intensidad. Considerando la Mr en la electroforesis de éstos componentes, se puede inferir que algunos de ellos corresponden a los reconocidos por los sueros de niños infectados. Por ejemplo, la banda de 172 KDa puede contener el polipéptido de 170 KDa identificado por Torian y Col. (137) así como las de 53 y 32 KDa pueden relacionarse con las proteínas de 53.5 y 30 KDa las cuales ya han sido identificadas (108) y caracterizadas (138). Similarmente las bandas protéicas de 55 y 53 KDa también pueden corresponder a proteínas de superficie relacionadas con el disco adherente y flagelos (137).

En el análisis de reacciones en IET (sección 4.6.) se observó que los 4 sueros del grupo IA y en 18/24 (75 %) de sueros

del grupo IS siguieron un patrón de reconocimiento. Pese a que no se observaron diferencias en el perfil de reacciones con el tipo de infección (sintomática y asintomática), se notó en el grupo IS que el 25 % (números 7, 22-25 y 27 de la figura 10) reaccionó prominentemente con una o dos proteínas del patrón de reconocimiento, lo cual sugiere un grado de variabilidad antigénica de tipo cuantitativo.

Para el método de RIP, se emplearon 8 sueros del grupo IS, 4 del grupo IA y 1 del grupo T. En los resultados se observaron 11 bandas protéicas que corresponden a proteínas de superficie de trofozoitos que fueron radiodiodinadas. Los pesos moleculares fueron 203-120, 82, 63, 55, 53, 47, 40, 35, 32, 28 y 24 KDa (figura 11). De estas proteínas de membrana solo fueron reconocidas las de 82, 63 y 55 KDa por los sueros de los niños infectados, mientras que no se observó reacción con el suero testigo (figura 12). Tampoco se observó reacción con el amortiguador que sustituyó al suero humano, lo cual descartó enlace inespecífico de la proteína A-sefaraosa con proteínas radiodiodinadas.

El perfil de proteínas de superficie fue similar al reportado por Einfeld y Stibbs (127) quienes por el mismo método mostraron proteínas de 180, 105, 82, 63, 55, 37, 30 y 24 KDa. Estos componentes de membrana pueden corresponder a aquellos de la IET cuya Mr fue de 88, 63, 55, 53, 46, 35, 32, 28 y 24 KDa (figura 10). En el reconocimiento de proteínas de membrana radiodiodinadas, los resultados difieren de los presentados por

Edson y Col. (128) quienes mostraron que una proteína que le asignaron un peso molecular de 88 KDa fue la única que reaccionó con dos sueros de pacientes. Los autores sugieren que por las características de la molécula es posible que sea la proteína de 82 KDa reportada con anterioridad (127). Al respecto, Einfeld y Stibbs (127) hallaron y caracterizaron parcialmente una proteína de 82 KDa por medio de inmunoelectroforésis en dos dimensiones (IEDD), IET y RIP. Estos autores demostraron que la proteína fue de superficie y que se podía iodinar. Basandonos en lo anterior podemos sugerir que la proteína de 82 KDa reconocida por los sueros de niños infectados con G. lamblia sea la misma que ha sido reportada por los autores mencionados (127,128). Con respecto al reconocimiento de las otras proteínas de superficie de 63 y 55 KDa por sueros humanos, no ha sido reportado. El motivo podría ser que su observación dependiera del tiempo de exposición de la película revoladora ya que se detectaron días después de que se observó la banda de 82 KDa o por variaciones en la expresión antigénica de la cepa de G. lamblia dominante de la región geográfica.

En relación a las proteínas de superficie de trofozoitos, no se encontraron diferencias en el reconocimiento entre los sueros del grupo IA y los del grupo IB. Lo cual sugiere que la aparente ausencia de morbilidad en los individuos asintomáticos puede ser consecuencia de reacción celular a nivel local o al título de Ac IgA de secreción entre otros factores.

En el análisis de proteínas detectables en RIP o en IET,

las proteínas de superficie de 82, 63 y 55 KDa pueden correlacionarse con las proteínas de 88 u 81, 63 y 55 KDa que reaccionaron respectivamente con el 86 % o 64 %, 82 % y 87 % de todos los sueros probados en IET. Sin embargo las proteínas de 53, 46, 35, 32, 28 y 24 KDa se observaron en el perfil de proteínas de superficie minoritariamente iodinadas y podrían ser las mismas que fueron prominentemente reconocidas en IET (figuras 9 y 10). La razón de que no hayan sido detectadas en RIP podría deberse a las limitaciones del método; proteínas que no exponen adecuadamente residuos de Tirosina o en menor grado Histidina, son minoritariamente iodinables. Consecuentemente no se muestra la reacción por auto-radiografía debido a la escasa emisión de radiación gama. Es posible que estas proteínas que no fueron detectadas por el método de RIP sean de las mas glicosiladas y no expongan adecuadamente residuos de Tirosina. Esta posibilidad no puede ser descartada ya que se ha encontrado gran cantidad de proteínas glicosiladas en superficie de trofozoitos de G. lamblia (105). También se ha demostrado que el residuo D-Glc-NAc ha sido el principal carbohidrato detectado en glicoproteínas con pesos moleculares desde 220 a 40 KDa (105). Similarmente se ha encontrado que la banda protéica de 82 KDa detectada con un suero de conejo hiperinmunizado correspondia a una glicoproteína de superficie (127). Los autores, prepararon Ac monoespecificos contra la glicoproteína de 82 KDa y en ensayos de inmunoprecipitación detectaron reacción con proteínas de 105, 30 y 24 KDa (127). La reacción cruzada de estas proteínas con la

glicoproteína de 82 KDa aumenta la posibilidad de que el determinante antigénico sea un carbohidrato. Por lo cual podemos sugerir la importancia de proteínas que no fueron detectadas con los sueros en RIP pero que fueron preferentemente reconocidas en IET. Por ejemplo las proteínas de 53, 46 y 35 KDa fueron reconocidas por el 75 %, 91.7 % y 75 % respectivamente (cuadro 3) Además la prevalencia de Ac en los sueros testigos que reconocieron en IET algunas de las proteínas mencionadas, aumenta su importancia. Como se puede observar en la figura 10, los Ac de 2 de los sueros testigos reaccionaron predominantemente con bandas proteicas de 88, 63, 46 y 35 KDa. En virtud de estas observaciones podemos señalar que ya sea la proteína de 82 KDa o la de 46 KDa pueden constituirse como candidatos para estudios epidemiológicos, siendo factible su uso como Ag de fase sólida con el método de ELISA en papel o adaptarlo para identificación de Ag en heces. Acerca de eso, conociendo la migración electroforética de éstas proteínas se podrían aislar y probar su capacidad inmunogénica, así como su efecto en animales de laboratorio para buscar su relación con la patología. Por otro lado, la estandarización del método de ELISA en papel, promete ser una alternativa para laboratorios clínicos no especializados. También podría facilitar estudios epidemiológicos.

En síntesis, podemos expresar que no se había establecido claramente si eran una o varias proteínas de G. lamblia, las reconocidas específicamente por los individuos parasitados. Por una parte Edson y Col. (128) mostraron que solo una proteína de

88 kDa presente en la superficie de trofozoítos reaccionó con 2 sueros de pacientes. Por otra parte Taylor y Wenman (129) con otra técnica señalan una proteína de 31-33 kDa. En esta tesis se muestra que el reconocimiento de Ag por Ac ante una infección natural con el parásito es bastante compleja. Encontramos la posibilidad de que las diferencias entre los grupos IA e IS no se produzcan por el título de Ac, ni por el reconocimiento de componentes de citosol o de superficie del parásito como se observa en los resultados con IET y RIP. Es una posibilidad, ya que no se pudo concluir claramente debido al número limitado de muestra en el grupo IA. Cabe destacar que las diferencias en la intensidad de las reacciones observadas con sueros del grupo IS sugieren una variabilidad antigénica. La diversidad antigénica en distintas cepas ha sido mostrada por la caracterización de isoenzimas (139) y en las secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) en aislados de G. lamblia (140,141). En uno de estos estudios encontraron que las diferencias notadas en el patrón de bandas de ADN se reflejaron moderadamente en las proteínas de superficie (140). Por lo tanto para corroborar las observaciones se deben elaborar proyectos que permitan comparar el reconocimiento de antígenos de diferentes cepas de G. lamblia. Se debe también realizar ensayos de isoelectroenfoco e IEDD con las bandas más reconocidas por los sueros en los métodos de RIP e IET. Un seguimiento de respuesta serológica en una población podría esclarecer las diferencias entre individuos asintomáticos de los que presentan sintomatología definida.

5.1 Conclusiones

- 1.-El método de ELISA en papel permitió seleccionar sueros con alta positividad a G. lamblia en niños infectados con el parásito y ofrece perspectivas en cuanto a diferenciar mediante la densidad óptica a los niños infectados de los no infectados.
- 2.-Con los métodos radioinmunoprecipitación e inmunoelectrotransferencia se identificaron proteínas del parásito que fueron reconocidas por los sueros de niños infectados y con alta positividad a G. lamblia.
- 3.-En el reconocimiento de proteínas de superficie de trofozoitos por los sueros de niños infectados, no se encontraron diferencias entre asintomáticos y sintomáticos en las muestras analizadas.

Apéndice

Amortiguador Fosfato-Salino (AFS) pH 7.4 al 0.15 M

NaCl		8.0	g
KCl		0.2	g
Fosfato monobásico de Potasio		0.2	g
Fosfato dibásico de Sodio		1.15	g
Agua destilada c.b.p.		1000	ml

Amortiguador Citrato-fosfato pH 5

Fosfato dibásico de Sodio	0.2 M	25.7	ml
Acido cítrico	0.1 M c.b.p. pH 5	24.3	ml
Agua bidestilada		50.0	ml

Solución de Sustrato para Peroxidasa (uso inmediato)

Adicionar por cada 100 ml de amortiguador citrato-fosfato

Peróxido de Hidrógeno al 30 %	40.0	µl
Ortofenilendiamina (Sigma, USA)	40.0	mg

Amortiguador Tris-Inhibidores de proteasas

PMSF	200 mM	en isopropanol (-20°C)	0.03	ml
NEM	100 mM	en agua destilada (4°C)	1.50	ml
Trizma	10 mM	en agua destilada pH 8.13	4.47	ml

Preparación de geles de Poli(acrilamida)

Acilamida 30 % - Bisacrilamida 0.8 % - Glicerol 30 %

Acilamida	60.0	ml
N,N' bisacrilamida	1.6	ml
Glicerol	60	ml
Agua desmineralizada c.b.p.	200	ml

Gel Separador al 10 % para 30 ml

Acilamida-bisacrilamida-glicerol (30% : 0.8% : 30%)	10	ml
Tris-base 1 M pH 8.8	11.25	ml
SDS al 20 %	0.15	ml
Agua desmineralizada	8.4	ml
TEMED (Bio-Rad, USA)	13.0	µl
Persulfato de Amonio al 10 %	90.0	µl

Gel Concentrador para 10 ml

Acrilamida-bisacrilamida-glicerol (30% : 0.8% : 30%)	1.7 ml
Tris-base 1 M pH 6.8	1.25 ml
SDS al 20 %	0.05 ml
Agua desmineralizada	7.5 ml
TEMED (Bio-Rad, USA)	0.01 ml
Persulfato de Amonio al 10 %	0.05 ml

Amortiguador para el Gel Espaciador (AGE 5x)

Trizma base 2M pH 8.8	187.5 ml
SDS al 20 %	5.0 ml
Agua desmineralizada c.b.p.	200.0 ml

Amortiguador para el Gel Concentrador (ABC 8x)

Trizma base 2 M pH 6.8	50 ml
SDS al 20 %	4 ml
Agua desmineralizada c.b.p.	100 ml

Gel Espaciador para Gradiente 5-15 %

	5 %	15 %
AGE 5x	3.4 ml	3.4 ml
Agua destilada	10.85 ml	5.15 ml
Acrilamida 30 %-bisacrilamida		
0.8 %-glicerol 30 %	2.85 ml	8.55 ml
TEMED	4 µl	4 µl
Persulfato de amonio al 10 %	17 µl	17 µl

Amortiguador para Electroforesis

Trizma base	3.02 g
Glicina	14.41 g
SDS al 20 %	5 ml
HCl fumante, ajustar a pH 8.3	
Agua desmineralizada c.b.p.	1000 ml

Amortiguador de Muestra 2x

Trizma base	1.512 g
Glicerol	20 ml
Pironina Y	2 mg
SDS al 20 %	2 ml
HCl fumante, ajustar pH a 6.8	
Agua bidestilada, esteril c.b.p.	100 ml
Se filtró en membrana millipore 0.45 um	

Solución de Azul de Coomassie al 0.1 % para Tefir Geles

Metanol	500 ml
Acido acético	100 ml
Azul de Coomassie	1 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Soluciones para Destefir Geles de Poliacrilamida

Metanol	500 ml
Acido acético	100 ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Metanol	50 ml
Acido acético	70 ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Isopropanol	250 ml
Acido acético	70 ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Soluciones para Inmunoelctrotransferencia

Amortiguador para Transferencia

Trizma base (0.25 M)	6.055 g
Glicina (0.192 M)	28.84 g
Metanol absoluto	400 ml
Agua destilada c.b.p.	2000 ml

Solución para Tefir Papel de Nitrocelulosa

Negro de Amido	0.1 g
Metanol	5 ml
Acido acético	10 ml
Agua destilada c.b.p.	100 ml

Solución 5x ASB-detergentes

ASB	4 g
Triton X-100 al 10 %	4 ml
SDS al 20 %	2 ml
Azida de Sodio al 10 %	130 µl
Agua destilada c.b.p.	20 ml

Diluyente de Muestra para Papel de Nitrocelulosa

Solución 5x ASB-detergentes	200 µl
Suero bovino de complementado	100 µl
AFS pH 7.4 c.b.p.	960 µl

Solución Reveladora de Naftol 6x

4 Cloro 1 Naftol	6 mg
Metanol	2 ml
Peróxido de Hidrógeno al 30 %	4 µl
AFS pH 7.4	10 ml

Soluciones para Radioiodinar Trofozoitos Vivos

AFS 2x - HCl 0.1 N

AFS 10x pH 7.4	1 ml
HCl fumante	41.5 µl
Agua bidestilada c.b.p.	5 ml

AFS 1x - KI 0.1 M

KI	8.3 g
AFS 1x c.b.p.	500 ml

Peróxido de Hidrógeno al 0.03 %

AFS 10x	100 µl
Peróxido de Hidrógeno al 30 %	1 µl
Agua bidestilada c.b.p.	1 ml

Solución de Lactoperoxidasa 1mg/ml

Lactoperoxidasa	1 mg
AFS 10x	100 µl
Aqua bidestilada c.b.p.	1 ml

Solución de Yoduro de Potasio 0.27 mM

KI	4.482 mg
AFS 10x	10 ml
Aqua destilada c.b.p.	100 ml

NETT 1x pH 7.4

NaCl	2.625 g
EDTA	0.84 g
Iris-HCl	3.02 g
Triton X-100	5 ml
Aqua bidestilada c.b.p.	500 ml

NETT-ASB al 6 %

ASB	1.2 g
NETT 1x	20 ml

NETT-ASB al 1 %

ASB	1 g
NETT 1x	100 ml

NETT-NaCl 0.5 M

NaCl	2.45 g
NETT 1x	200 ml

Proteína A-Sepharosa 50 % (p/v)

Proteína A-Sepharosa CL-4B (Pharmacia F. Chemicals)	143 mg
NETT-ASB al 6 %	1 ml

Bibliografia

- 1.-De Muro P. "Clinical aspects of giardiasis".
Acta Med Scand 1939, 99; 78
- 2.-Katsampes CP, Mc Coord AB and Phillips WA. "Vitamin A absorption test in cases of giardiasis".
Am J Dis Child 1944, 67; 189
- 3.-Webster BH. "Human infection with Giardia lamblia: analysis of 32 cases". Am J Digest Dis 1958, 3; 64
- 4.-Cortner JA. "Giardiasis: a cause of celiac syndrome"
Am J Dis Chil 1959, 98; 311
- 5.-Wanner RG, Atchley FD and Wasley MA. "Association of diarrhea with Giardia lamblia in families observed weekly for occurrence of enteric infections".
Am J Trop Med 1963, 12; 851
- 6.-Soto J and Dreiling D. "Giardia lamblia. A case presentation of chronic cholecystitis and duodenitis".
Am J Gastroent 1977, 67; 265
- 7.-Goldstein F, Thornton J and Szydłowski T. "Biliary tract dysfunction in giardiasis". Am J Dig Dis 1978, 23; 559
- 8.-Farthing MJB, Chong SKF and Smith JAW. "Acute allergic phenomena in giardiasis". Lancet 1983, 17; 1428
- 9.-Dykes AC, Juraneck DD, Lorenz RA, Sinclair S, Jakubowski and Davies R. "Municipal waterborne giardiasis: an epidemiologic investigation".
Ann Inter Med 1980, 92 (Part 1); 165
- 10.-Takano J and Yarley JH. "Jejunal lesions in patients with giardiasis and malabsorption. An electron microscopic study"
Bull Hopkins Hosp 1965, 116; 413
- 11.-Antia FP, Desai HG, Jeejeebhoy KN, Kane MP and Borkar AV "Giardiasis in adults: incidence, symptomatology and absorption studies". Ind J Med Sci 1966, 20; 471
- 12.-Hoskins LC, Winaver SJ, Broitman SA, Gottlieb LS and Zscheck N. "Clinical giardiasis and intestinal malabsorption". Gastroent 1967, 53; 265
- 13.-Alp MH, Hislop IG. "The effect of Giardia lamblia infestation on the gastrointestinal tract"
Aust Ann Med 1969, 17; 232
- 14.-Notis WM. "Giardiasis and vitamin B12 malabsorption"
Gastroent 1972, 63; 1085
- 15.-Ridley MJ and Ridley DS. "Serum antibodies and jejunal histology in giardiasis associated with malabsorption"
J Clin Pathol 1976, 29; 30
- 16.-Khosla S, Sharma S and Srivastava S. "Malabsorption in giardiasis". Am J Gastroent 1978; 69; 694
- 17.-Wright SG. "Giardiasis and malabsorption".
Trans R Soc Trop Med Hyg 1980, 74 (4); 436
- 18.-Craft J. "Giardia and giardiasis in childhood".
Pediatr Infect Dis 1982, 1; 196

- 19.-Ramirez-Mayans JA, Rivera EM, Mora MN y Saucedo L
"Principales manifestaciones gastrointestinales de la giardiasis en niños". Bol Med Hosp Inf Mex: 1983, 40(10): 571
- 20.-Shaw FK, Brodsky RE, Lyman DD, Wood BT, Hibler CP, Healy GR, Macleod KIE, Stahl W and Schultz MG. "A communitywide outbreak of giardiasis with evidence transmission by a municipal water supply". Ann Inter Med 1977, 87 (4): 426
- 21.-Craft JC. "Experimental infection with Giardia lamblia in rats". J Infect Dis 1982, 145 (4): 495
- 22.-Hewlett EL, Andrews Jr JS, Ruffier J and Schaefer III FW
"Experimental infection of mongrel dogs with Giardia lamblia cysts and cultured trophozoites".
J Infect Dis 1982, 145 (1): 89
- 23.-Moore BT, Cross WM, Mc Guire D, Molichan CS, Gleason NN, Healy GR and Newton LH. "Epidemic giardiasis at a ski resort" N Engl J Med 1969, 21: 402
- 24.-Brodsky RE, Spencer HC and Schultz MG. "Giardiasis in American travelers to the Soviet Union".
J Infect Dis 1974, 130: 319
- 25.-Thompson RG, Karandikar DS and Loeck J. "Giardiasis, an unusual cause of epidemic diarrhea". Lancet 1974, 1: 615
- 26.-Walzer PD, Wolfe MS and Schultz MG. "Giardiasis in travelers"
J Infect Dis 1971, 124: 235
- 27.-Jokipii L and Jokipii AM. "Giardiasis in travelers: a prospective study". J Infect Dis 1974, 130: 295
- 28.-Black RE, Dykes AC, Sinclair SP and Wells JG. "Giardiasis in day-care centers: Evidence to person-to-person transmission" Pediatr. 1977, 60: 486
- 29.-Schmerin MJ, Jones TC and Klein H. "Giardiasis: association with homosexuality". Ann Int Med 1978, 88: 801
- 30.-Yoell M, Most H, Hammond J and Scheinsson GP. "Parasitic infections in a closed community".
Trans R Soc Trop Med Hyg 1972, 66 (5): 764
- 31.-Pickering LK, Woodward WE, DuPont HL and Sullivan P.
"Occurrence of Giardia lamblia in children in day care centers". J Pediatr 1984, 104 (4): 522
- 32.-Osterholm MT, Forfang JC, Ristinen TL, Dean AG, Washburn JW, Godes JR, Rude RA and Mc Gullough JG. "An outbreak of foodborne giardiasis". N Engl J Med 1981, 304: 24
- 33.-Rentdorff RC. "The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites II. Giardia lamblia cysts given in capsules". Am J Hyg 1954, 59: 209
- 34.-Roberts-Thomson IC, Stevens DP, Mahmoud AA and Warren KS
"Giardiasis in the mouse: An animal model".
Gastroent 1976, 71: 57
- 35.-Islam A, Stoll BJ, Ljungstrom I, Biswas J, Nazrul H and Hultdt G. "Giardia lamblia infections in a cohort of Bangladeshi mothers and infants followed for one year"
J Pediatr 1983, 103: 996
- 36.-Barnes G and Kay R. "Blood groups in giardiasis".
Lancet 1977, 1: 808

- 37.-Zisman M. "Blood-group A and giardiasis".
Lancet 1977, 2: 1285
- 38.-Sotto A, Cabrera S, Castro J, Borbolla E, Gonzalez N and Pomar F. "Blood groups in recurrent giardiasis"
Lancet 1983, 3: 1312
- 39.-Paulsen O. "Blood-group A and giardiasis".
Lancet 1977, 2: 984
- 40.-Smith PD, Gillin FD, Spira WM and Nash TE. "Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production and host immune response". Gastroent 1982, 83: 797
- 41.-Giannella RA, Broitman SA and Zamcheck N. "Influence of gastric acidity on bacterial and parasitic enteric infections". Ann Intern Med 1973, 78: 271
- 42.-Hughes WS, Cerda JJ, Holtzapfle P. "Primary hypogammaglobulinemia and malabsorption".
Ann Intern Med 1971, 74: 903
- 43.-Webster ADB. "Giardiasis and immunodeficiency diseases".
Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1980, 74: 440
- 44.-Ament ME and Rubin CE. "Relation of giardiasis to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes". Gastroent 1972, 62 (2): 216
- 45.-Underdown BJ, Roberts-Thomson IC, Anders RF and Mitchell GF. "Giardiasis in mice: Studies on the characteristics of chronic infection in C3H/He mice". J Immunol 1981, 126: 669
- 46.-Roberts-Thomson IC, Mitchell GF, Anders RF, Tait BP, Kerlin P, Kerr-Grant A and Cavanagh P. "Genetic studies in human and murine giardiasis". Gut 1980, 21: 397
- 47.-Jokipii AMM and Jokipii L. "Prepatency of giardiasis".
Lancet 1977, 1: 1093
- 48.-Wright SG, Tomkins AM and Ridley DS. "Giardiasis: clinical and therapeutic aspects". Gut 1977, 18: 343
- 49.-DuPont HL and Sullivan PS. "Giardiasis: the clinical spectrum, diagnosis and therapy".
Pediatr Infect Dis 1986, 5 (1): S131
- 50.-Noemi I, Retamal C, Guiraldes E, Reyes H, Rebolledo L, Muñoz P, Gutiérrez C y Mauro G. "IgA secretora en saliva de niños infectados por Giardia lamblia y en niños controles".
Rev Chil Pediatr 1981, 52 (1): 20
- 51.-Burke JA. "Giardiasis in childhood".
Am J Dis Child 1975, 129: 1304
- 52.-Schultz MG. "Giardiasis". JAMA 1975, 233 (13): 1383
- 53.-Farthing MJG, Pereira MEA and Kusch GT. "The cell surface lectin of Giardia lamblia". Clin Res 1982, 30: 496A
- 54.-Hill DR, Hewlett EL and Pearson RD. "Lectin binding by Giardia lamblia". Infect Immun 1984, 34: 733
- 55.-Farthing MJG, Pereira MEA and Kusch GT. "Description and characterization of a surface lectin from Giardia lamblia".
Infect Immun 1986, 51 (2): 661
- 56.-Eriksdalen SL and Chase DG. "Morphological alterations in the microvillous border of villous epithelial cells produced by microorganisms". Am J Clin Nutr 1974, 27: 1277

- 57.-Owen RL, Nemanic FC and Stevens DP. "Ultrastructural observations on giardiasis in murine model. I. Intestinal distribution attachment and relationship to the immune system of *Giardia muris*". Gastroent 1979, 76: 757
- 58.-Tandon BN, Puri BK, Gandhi PC and Tewari SG. "Mucosal surface injury of jejunal mucosa in patients with giardiasis an electron microscope study". Ind J Med Res 1974, 62: 183B
- 59.-Yardley JH, Takano J and Hendrix TR. "Epithelial and other mucosal lesions of the jejunum in giardiasis. Jejunal biopsy studies". Bull Hopkins Hosp 1964, 115: 3B9
- 60.-Wright SG and Tomkins AM. "Quantification of the lymphocyte infiltrate in jejunal epithelium in giardiasis". Clin Exp Immunol 1977, 29: 408
- 61.-Ferguson A, Mc Clure JP and Townley RRW. "Intraepithelial lymphocyte counts in small intestinal biopsies from children with diarrhoea". Act Paediatr Scand 1976, 65: 541
- 62.-Pugh RJ and Newton RW. "Giardiasis in infancy and childhood" Practitioner 1980, 224: 393
- 63.-Hartong WA, Gourley WK and Arvanitakis C. "Giardiasis: clinical spectrum and functional-structural abnormalities of the small intestinal mucosa". Gastroent 1979, 77: 61
- 64.-Brandborg LL, Tankersley CB, Gottlieb S, Barancik M and Sartor VE. "Histological demonstration of mucosal invasion by *Giardia lamblia* in man". Gastroent 1967, 52 (2) Part I: 143
- 65.-Morecki R and Parker JG. "Ultrastructural studies of the human *Giardia lamblia* and subjacent jejunal mucosa in a subject with steatorrhea". Gastroent 1967, 52: 151
- 66.-Zancheck N, Hoskins LC, Winawer SJ, Broitman SA and Gottlieb LS. "Histology and ultrastructure of parasite and intestinal mucosa in human giardiasis: effects of atebriane therapy". Gastroent 1963, 44: 860
- 67.-Gillon J, Althamery D and Ferguson A. "Features of small intestinal pathology (epithelial cell kinetics, intraepithelial lymphocytes, disaccharidases) in a primary *Giardia muris* infection". Gut 1982, 23: 498
- 68.-Ferguson A, Gillon J and Thamerly D. "Intestinal abnormalities in murine giardiasis". Trans R Soc Trop Med Hyg 1980, 74: 445
- 69.-Meyer EA and Radulescu S. "Giardia and giardiasis". Adv Parasitol 1979, 17: 1
- 70.-Brady PB and Wolfe JC. "Waterborne giardiasis". Ann Inter Med 1974, 81: 498
- 71.-Stevens D. "Giardiasis: Host-Pathogen Biology". J Infect Dis 1982, 4: 851
- 72.-Tandon BN, Tandon RK, Satpathy BK and Shrinivas. "Mechanism of malabsorption in giardiasis: a study of bacterial flora and bile salt deconjugation in upper jejunum". Gut 1977, 18: 176

- 73.-Morecki R and Parker JG. "Electron microscopic observations of the relationship between Giardia lamblia and the jejunal mucosa in a subject with asymptomatic steatorrhea (abstr.)". Gastroent 1965, 45; 834
- 74.-Saha R and Ghosh T. "Invasion of small intestinal mucosa by Giardia lamblia in man". Gastroent 1977, 72; 402
- 75.-Radulescu S and Meyer EA. "Opsonization in vitro of Giardia lamblia trophozoites". Infec Immun 1981, 32; 852
- 76.-Smith PD, Elson CG, Keister DB and Nash TE. "Human peripheral blood monocytes are spontaneously cytotoxic for Giardia lamblia in vitro". Gastroent 1981, 80 (Part II); 1288
- 77.-Tomkins AM, Wright SG, Drasar BS and James WPT. "Bacterial colonization of yeyunal mucosa in giardiasis". Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1978, 72; 33
- 78.-Owen RL. "The ultrastructural basis of Giardia function". Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1980, 74; 429
- 79.-Danciger M and Lopez M. "Numbers of Giardia in the feces of infected children". Am J Trop Med Hyg 1975, 24; 237
- 80.-Rosenthal P and Liebman WM. "Comparative study of stool examinations, duodenal aspiration and pediatric Enterotest for giardiasis in children". J Pediatr 1980, 26 (2); 278
- 81.-Wright SG, Moody AM, Tomkins AM and Ridley DS. "Fluorescent antibody studies in giardiasis". Gut 1977, 18; A986
- 82.-Moody AM, Ridley DS, Tomkins AM and Wright SG. "The specificity of serum antibodies to Giardia lamblia and to enterobacteria in gastrointestinal disease". Trans R Soc Trop Med Hyg 1982, 76 (5); 630
- 83.-Miotti PB, Gilman RH, Pickering LK, Ruiz-Palacios G, Park HS and Yolken RH. "Prevalence of serum and milk antibodies to Giardia lamblia in different populations of lactating women" J Infect Dis 1985, 152 (5); 1025
- 84.-Vinayak VK, Jam P and Naik SR. "Demonstration of antibody in giardiasis using the immunodiffusion technique with Giardia cysts as antigen". Ann Trop Med Hyg 1978, 72; 581
- 85.-Visvesvara GS, Smith PD, Healy GR and Brown WR. "An immunofluorescence test to detect serum antibodies to Giardia lamblia". Ann Intern Med 1980, 93; 802
- 86.-Smith PD, Gillin FD, Brown WR and Nash TE. "IgG antibody to Giardia lamblia detected by enzyme linked immunosorbent assay". Gastroent 1981, 80; 1476
- 87.-Wittner M, Maayem S, Farrer W and Tanowitz HB. "Diagnosis of giardiasis by two methods. Immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay". Arch Pathol Lab Med 1983, 107; 524
- 88.-Mohinen A, Maitra TK, Jalan KN and Dhar A. "A simple ELISA for anti giardial antibody using the membrane fraction of the parasite as antigen". Asian Pacific J Allerg Immun 1985, 3; 186
- 89.-Radulescu S, Iancu L, Simionescu S and Meyer EA. "Serum antibodies in giardiasis". J Clin Pathol 1976, 29; 863

- 90.-Craft JC and Nelson JD. "Diagnosis of giardiasis by counterimmunoelectrophoresis of feces".
J Infect Dis 1982, 145 (4): 499
- 91.-Vinayak VI, Kum Kum F, Chandna R, Venkateswarlu K and Mohta
"Detection of Giardia lamblia antigen in the feces by counterimmunoelectrophoresis".
Pediatr Infect Dis 1985, 4 (4): 383
- 92.-Ungar BLF, Yalken RH, Nash TE and Quinn TC. "Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Giardia lamblia in fecal specimens". J Infect Dis 1984, 149 (1): 90
- 93.-Green EL, Miles MA and Warhurst DC. "Immunodiagnostic detection of Giardia antigen in faeces by a rapid visual enzyme-linked immunosorbent assay". Lancet 1985, 28: 691
- 94.-Petersen H. "Giardiasis (lambliasis)".
Scand J Gastroent 1972, 7 (Suppl. 14): 7
- 95.-Knight R. "Epidemiology and transmission of giardiasis".
Trans R Soc Trop Med Hyg 1980, 74 (4): 433
- 96.-Wolfe MS. "Current concepts in parasitology: Giardiasis".
N Engl J Med 1978, 9: 319
- 97.-Ingram VG, Rights FL, Khan HA, Hashimi K and Ansari K
"Diarrhoea in children of West Pakistan: occurrence of bacterial parasitic pathogens".
Am J Trop Med Hyg 1966, 15: 743
- 98.-Mata L. "Discussion: Amebiasis, Giardiasis and malnutrition"
J Infect Dis 1982, 4: 870
- 99.-Martuscelli OA. "Las parasitosis mas comunes en México".
Rev Fac Med 1968, 11 (3): 21
- 100.-Tay J, Salazar SFM, de Haro AI y Ruiz HAL. "Frecuencia de las protozoosis intestinales en México".
Sal Pùb Mèx 1978, 20 (3): 297
- 101.-Biaqi F, Gonzalez CC, Robledo CE y Martuscelli OA.
"Frecuencia de parasitosis intestinales en el Hospital Infantil de México". Bol Med Hosp Inf Mex 1960, 17(6): 857
- 102.-Telch J, Vega FL y Lara R. "Parasitosis intestinal en un Hospital de concentración".
Bol Med Hosp Inf Mex 1974, 31 (4): 733
- 103.-Martuscelli OA. "Frecuencia de los parásitos intestinales en niños de la República Mexicana".
Rev Mex Pediatr 1967, 36 (4): 111
- 104.-Bingham AK and Meyer EA. "Giardia encystation can be induced in vitro in acidic solutions". Nature 1979, 277: 301
- 105.-Ward MD, Alroy J, Lev BI, Keusch GT and Pereira MEA.
"Biology of Giardia lamblia". J Exp Med 1988, 167: 73
- 106.-Billin FD, Reiner DS, Gault MJ, Douglas H, Das B, Wunderlich A and Sauch JF. "Encystation and expression of cyst antigens by Giardia lamblia in vitro".
Sci 1987, 235: 1040
- 107.-Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Derouk B, Gram J, Honigberg BM, Leedale GF and Loeblich AR. "A newly revised classification of the protozoa".
J Protozool 1980, 27 No. 1: 37

- 108.-Holberton DV and Ward AP. "Isolation of the cytoskeleton from *Giardia*. Tubulin and low-molecular-weight protein associated with microribbon structures". *J Cell Sci* 1981, 47: 139
- 109.-Feely DE, Schollmeyer JV and Erlandsen SL. "*Giardia* spp: distribution of contractile proteins in the attachment organelle". *Exp. Parasitol* 1982, 53: 145
- 110.-Holberton DV. "Arrangement of subunits in microribbons from *Giardia*". *J Cell Sci* 1981, 47: 167
- 111.-Holberton DV. "Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*". *J Cell Sci* 1973, 13: 11
- 112.-Brooks SEH, Audretsch J, Miller CG and Sparke B. "Electron microscopy of *Giardia lamblia* in human jejunal biopsies". *J Med Microbiol* 1969, 2: 196
- 113.-Sheffield HG and Bjorvatn B. "Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*". *Am J Trop Med Hyg* 1977, 26: 23
- 114.-Owen R, Allen C and Stevens D. "Phagocytosis of *Giardia muris* in man by macrophages in Peyer's patch epithelium in mice". *Infect Immunol* 1981, 33: 591
- 115.-Roberts-Thomson IC, Stevens DP, Mahmoud AAF and Warren KS. "Acquired resistance to infection in an animal model of giardiasis". *J Immunol* 1976, 117: 2036
- 116.-Nair KP, Gillon J and Ferguson A. "Corticosteroid treatment increases parasite numbers in murine giardiasis". *Gut* 1981, 22:475-480
- 117.-Kraft SC. "The intestinal immune response in giardiasis". *Gastroent* 1979, 76: 877
- 118.-Smith PD, Keister DB and Elson CO. "Human host response to *Giardia lamblia*. II. Antibody-dependent killing in vitro". *Cell Immunol* 1983, 82: 308
- 119.-Owen RL. "The immune response in clinical and experimental giardiasis". *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980, 74: 443
- 120.-Andrews JS, Hewlett EL. "Protection against infection with *Giardia muris* by milk containing antibody to *Giardia*". *J Infect Dis* 1981, 2: 242
- 121.-Briaud M, Morichau-Beauchant M, Matuchansky C, Touchard G and Babib P. "Intestinal immune response in giardiasis". *Lancet* 1981, 2 (8242): 358
- 122.-Zinnerman HH and Kaplan AP. "The association of giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A". *Am J Dig Dis* 1972, 17: 793
- 123.-Gillon J, Andre C. "Changes in mucosal immunoglobulin containing cell in patients with giardiasis before and after treatment". *J Infect Dis* 1982, 5: 67
- 124.-Mowat A Mc I and Ferguson A. "Hypersensitivity reactions in the small intestine. Pathogenesis of the graft-versus-host reaction in the small intestinal mucosa of the mouse". *Transpl* 1981, 32: 238
- 125.-Smith PD, Billin FD, Kaushal NA and Nash TE. "Antigenic analysis of *Giardia lamblia* from Afghanistan, Puerto Rico, Ecuador y Oregon". *Infect Immun* 1982, 36 (2): 714

- 126.--Nash TE, Gillin FD and Smith PD. "Excretory-secretory products of *Giardia lamblia*". J Immunol 1983, 131: 2004
- 127.--Einfeld DA and Stibbs HH. "Identification and characterization of a major surface antigen of *Giardia lamblia*". Infect Immun 1984, 46: 377
- 128.--Edson CM, Farthing MJG, Lawson TDA and Kausch GT. "An 88 000 Mr *Giardia lamblia* surface protein which is immunogenic in humans". Infect Immun 1986, 34: 621
- 129.--Taylor GD and Wenman WW. "Human immune response to *Giardia lamblia* infection". J Infect Dis 1987, 155: 137
- 130.--Keister DB. "Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile". Trans R Soc Trop Med Hyg 1983, 77: 487
- 131.--Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. "Protein measurement with the Folin-phenol reagent". J Biol Chem 1951, 193: 265
- 132.--Acosta G, Cote A, Isibasi A y Kumate R. "Anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* de clase IgA en el calostro de mujeres mexicanas". Inmunol (España) 1985, 4 (1): 24
- 133.--Laemmli UK. "Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature (London) 1970, 227: 680
- 134.--Dulley JR and Grieve PA. "A simple technique for eliminating interference by detergent in the Lowry method of protein determination". Ann Biochem 1975, 64: 136
- 135.--Towbin HT, Staehelin T and Gordon J. "Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications". Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 4350
- 136.--Morrison M and Bayse GS. "Catalysis of iodination by lactoperoxidase". Biochem 1970, 9: 2995
- 137.--Torian BE, Barnes RC, Stephens RS and Stibbs HH. "Tubulin and high molecular weight polypeptides as *Giardia lamblia* antigens". Infect Imm 1984, 46 (1): 152
- 138.--Crossley R and Holberton DV. "Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*". J Cell Sci 1983, 59: 81
- 139.--Bertram MA, Meyer EA, Lile JD and Morse SA. "A comparison of isozymes of five axenic *Giardia* isolates". J Parasitol 1983, 69: 793
- 140.--Nash TE and Keister DB. "Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*". J Infect Dis 1985, 152: 1166
- 141.--Nash TE, Mc Cutchan T, Keister D, Dane JB and Gillin FD. "Endonuclease restriction analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from man and animals". J Infect Dis 1985, 152: 64
- 142.--Roberts-Thomson IC and Mitchel GF. "Giardiasis in mice I. Prolonged infections in certain mouse strains and hypothyroid (nude) mice". Gastroent 1978, 75: 42