

11261
2
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado

DESENQUISTACION Y AXENIZACION
DE CEPAS MEXICANAS DE
Giardia lamblia

T E S I S

Que para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
PARASITOLOGIA

P r e s e n t a
ROSAMARIA BERNAL REDONDO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

I.- INTRODUCCION

- 1.- HISTORIA
- 2.- TAXONOMIA
- 3.- MORFOLOGIA
- 4.- METABOLISMO
- 5.- DIVISION CELULAR
- 6.- EPIDEMIOLOGIA
- 7.- PATOGENIA
- 8.- CUADRO CLINICO
- 9.- INMUNOLOGIA
- 10.- GENETICA

II.- DESENQUISTACION

III.- MEDIOS DE CULTIVO

IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

V.- HIPOTESIS

VI.- OBJETIVOS

VII.- MATERIAL Y METODOS

VIII.- RESULTADOS

IX.- DISCUSION

X.- CONCLUSIONES

XI.- RESUMEN

XII.- APENDICE TECNICO

XIII.- REFERENCIAS

I. INTRODUCCION

1. HISTORIA

La historia del género Giardia se inicia con los dibujos del holandés Van Leeuwenhoek, basados en las observaciones de sus heces, que hiciera en el microscopio diseñado por él mismo. Estas descripciones fueron enviadas a Henry Oldenburg, secretario de la Real Academia de Londres, a partir de 1688, en un diálogo epistolar que duró hasta 1723, en el cual Leeuwenhoek describió "las maravillas del mundo invisible".¹

Resulta interesante destacar que fue hasta la segunda mitad del siglo XIX, casi 200 años después (1859), cuando Federovic Lambl, al observar las heces blandas de niños, describió un organismo móvil de 18 a 21 μm de largo, por 8 a 16 μm de ancho, que presentaba un disco oval anterior, dos núcleos y una cola de 3 a 4 μm . Este autor denominó a este organismo Cercomonas intestinalis y más tarde, en 1881, lo llamó Lamblia intestinalis.²

Existe una descripción realizada por Cunningham en 1872, quien estudió en la India a los enfermos de cólera, en la cual menciona a un "organismo en forma de espátula, convexo en un lado y cóncavo en el otro, con apéndice filiforme de rápida vibración"; sin embargo, no lo compara con lo descrito por Lambl y no le da una denominación especial.³

En 1879, Grassi describe a un organismo de forma oval, que mide en promedio 7 μm de largo por 4 μm de ancho, con cuatro flagelos que emergen de la parte anterior. En el extremo posterior tiene una prolongación tan larga como el

cuerpo y en la región anterior, se reconocen estructuras similares a núcleos.

Grassi realizó sus observaciones tanto en heces humanas como en heces de ratas domésticas y campestres, por lo que consideró que los organismos observados eran los mismos en el hombre y en los roedores. Así sugirió que el hombre se infectaba al ingerir alimentos almacenados en los graneros contaminados por las heces de las ratas, y llamó a dichos organismos Dimorphus muris.

Posteriormente, en 1881 describió con mayor detalle el organismo cóncavo-convexo con una gran estructura suctoria de localización anterior, un eje vertical del cuerpo, y la presencia de dos núcleos y ocho flagelos. También hizo mención de la gran cantidad de "formas elípticas" en las heces, sin sospechar que se tratara de quistes del mismo género; estas observaciones hicieron que el nombre cambiara a Megastoma entericum.³

Kunstler, en 1882, se refirió a estructuras móviles en las heces de anfibios a las que denominó Giardia; las descripciones de Grassi coinciden con las de Kunstler, pero la designación del género Giardia es anterior a la del género Megastoma, y por lo tanto, los organismos estudiados por Grassi corresponden a Giardia entérica. Por alguna razón no clara se ignoran las descripciones de Lambl.⁴

La denominación original de Lamblia fue rescatada por Blanchard en 1888 quien la llamó Lamblia intestinalis. Stiles, la designó Lamblia duodenalis en 1902. Benson, en 1908, cuestionó el origen zoonótico de las giardias humanas, al comparar las publicaciones de Metzner (1907) de giardias de conejos y las de Wenyon (1907) de ratones, con los trofozoítos y quistes de Giardia entérica obtenidas del hombre.

Benson realizó una descripción detallada de los trofozoítos como "formas delgadas, más anchas en la parte anterior, con cuatro gránulos basales en posición anterior al polo del núcleo; unidos al centrosoma mediante un

rizoplasto, los flagelos. El "cuerpo problemático" es muy grande y se localiza en posición transversal en el sitio de origen de los flagelos ventrales". ³

Las descripciones de Rodenwalt en 1912, son probablemente las más detalladas que existen del parásito y están basadas en observaciones en heces humanas. Menciona que la longitud puede variar de 10 a 12.5 um, las formas jóvenes son más largas y delgadas, las formas adultas más anchas y gruesas; el disco succionario o peristomo está formado por dos grandes depresiones unidas en la parte media, los flagelos tienen su origen en los gránulos basales. ³

En algunas publicaciones se atribuye a Kofoid (1915) el nombre de Giardia lamblia. Stiles ³ y otros autores proponen que fue Stiles quien en 1915, para terminar con la confusión de entérica e intestinalis, creó la denominación binomial de Giardia lamblia en honor del profesor A. Giard de París y del doctor F. Lambl de Praga. ⁴

En la literatura contemporánea se encuentra citada como: Giardia lamblia por los norteamericanos y latinoamericanos, Lamblia intestinalis por los europeos orientales y Giardia intestinalis o G. duodenalis por los europeos occidentales. ⁴

2. TAXONOMIA

Superreino	Eucariote Stainer, 1941
Reino	Protista Haeckel, 1866
Subreino	Protozoa (Golfuss, 1817) Von Siebold, 1845
Phylum	Sarcomastigophora Honigberg & Balamuth, 1963
Subphylum	Mastigophora Diesing, 1866
Clase	Zoonastigophora Calkins, 1909
Orden	Diplomonadida (Wenyon, 1926) Brugerolle, 197
Suborden	Diplomonadina
Familia	Hexamitidae Kent, 1880
Subfamilia	Giardiinae Brugerolle, 1979
Género	<u>Giardia</u> Kunstler, 1882
Especie	<u>Giardia lamblia</u> Stiles, 1915

Esta clasificación corresponde a la propuesta por Levine y colaboradores en 1980. 7

Suborden Diplomonadina. Con dos cariomastigotes, cuerpos con una simetría rotacional o bilateral, en un género; cada mastigote con cuatro flagelos, uno de ellos recurrente, con una variedad de bandas microtubulares, quistes presentes, de vida libre o parásita.

Familia Hexamitidae. Último flagelo recurrente por cariomastigote, cuatro pares de flagelos, dos núcleos, citostoma funcional o no, con o sin disco succionario; de vida libre o parásita.

Subfamilia Giardiinae. El flagelo recurrente yace en el citoplasma, sin citostoma, las fibras forman un citoesqueleto axial con dos axonemas del flagelo recurrente;

sin mitocondrias y aparato de Golgi. Quistes con pared quística delgada y en el interior axonemas y citoesqueleto; todos parásitos.

Género Giardia. Con disco suctorio en la región ventral.

Una gran variedad de vertebrados que incluyen al hombre, son huéspedes de Giardia; su clasificación en especie se ha basado en características morfométricas y de especificidad de huésped.

Durante muchos años se dio mayor importancia a la denominación y ubicación taxonómica y se olvidaron los estudios de transmisión cruzada entre el hombre y especies animales. *

En una serie de trabajos encaminados a dilucidar la similitud entre las giardias aisladas del hombre y las de origen murino, Simon en 1921 determino basado en caracteres morfométricos, varias especies de Giardia en diferentes huéspedes; identificó G. muris en ratón, G. microti en rata y G. entérica en el hombre. *

Hegner continuó los trabajos iniciados por Simon y estableció rigidez en especificidad de especie: G. felis en gatos, G. canis en perros, G. muris en ratón, G. microti en rata y G. entérica en el hombre. Aseguraba que el tamaño y forma de trofozoitos eran caracteres suficientes para clasificar las especies, de diferentes huéspedes animales. *

Ademas para explicarse la presencia de giardias similares en diferentes huéspedes, argumentó que éstas podían transmitirse de un huésped a otro, pero que la sobrevida en los huéspedes accidentales era corta. En caso de transmisión experimental, los quistes de Giardia de origen humano que fueron transferidos a los ratones, eran destruidos por los jugos gástricos de los murinos. 10

En 1930 se mantenía firme el criterio de especificidad de especie, se negaba la transmisión cruzada entre el hombre y los mamíferos inferiores y las giardias se diferenciaban por caracteres morfológicos en las siguientes especies: *G. agilis* en anfibios, *G. viscaiae* y *G. varoni* en reptiles, *G. lamblia* o *G. duodenalis* en el hombre, *G. muris* o *G. microti*, *G. simoni*, *G. canis*, *G. canis*, *G. caprae* y *G. felis* en mamíferos inferiores y *G. ardeae* y *G. sanguinis* en aves. ¹¹

En 1952 Filice clasificó el género *Giardia* en tres especies:

Giardia agilis (de anfibios), el cuerpo más largo que ancho de 20 por 5 μm , cuerpos mediales fusionados y de gran tamaño, disco succionario pequeño.

Giardia muris (de roedores, aves y reptiles), cuerpo corto y redondeado de 10 por 7 μm , cuerpos mediales pequeños y centrales, disco succionario de gran tamaño que ocupa 2/3 partes del cuerpo.

Giardia duodenalis (*lamblia*) o *G. intestinalis* (en vertebrados de sangre caliente, aves, reptiles y mamíferos incluyendo al hombre), cuerpo en forma de "gota" de 12 a 15 μm de ancho, cuerpo medial doble, ubicado en la parte más ancha del cuerpo, en forma de "garra" o "colmillo". ¹²

La primera mención que se hace de giardias de aves, corresponde a Gonder en 1911 ¹³, quien reportó la fase móvil en sangre de halcón (*Elanus caeruleus*), no encontró quistes y le dio la denominación de *Giardia sanguinis*.

Nöller, al revisar, en 1920 ¹⁴ el contenido del intestino de varias garzas (*Ardea cinerea* y *Ardetta minuta*) encontró abundantes formas móviles de giardias, que denominó *Giardia ardeae*.

El interés por describir especies nuevas en aves, llevó a Katlan en 1922, a buscar en el contenido del intestino de *Lanius colluris* y del avoceta *Recurvirostra avocetta*, las giardias reportadas por Nöller, sin agregar nuevas especies. ¹⁵

Hegner, en 1925, se enfocó a buscar giardias en dos especies de halcones, *Ardea herodias* y *Nycticorax nycticorax naevius*; el hallazgo fue exclusivamente en el intestino, en donde localizó formas jóvenes y no encontró quistes. Estos organismos se distinguen de las giardias del hombre, en que son más delgadas y tienen disco adhesivo de mayor tamaño. Este autor las consideró como *Giardia ardeae* según la clasificación de Nöller y menciona que aun cuando ignoraba el mecanismo de transmisión, debido a la ausencia de quistes, sugirió que tal vez los trofozoitos localizados en el agua y alimentos, eran ingeridos por el nuevo huésped.¹⁶

La clasificación de Filice, que propone tres especies para el género *Giardia*, coloca a las giardias de las aves dentro de *G. muris* y *G. duodenalis*. Box¹⁴ en 1981 colocó a las giardias de perico dentro de la especie *G. duodenalis* en la raza *psittaci*.

Estudios de microscopía electrónica de giardias obtenidas de intestinos de perico (*Melopsittacus undulatus*), proponen la existencia de una nueva especie denominada *Giardia psittaci* por el hecho de que la pestaña flanco ventrolateral que rodea al disco adhesivo se encuentra incompleta, en el margen lateral y anterior.

Probablemente esta nueva especie no sólo se localiza en los pericos, sino en el resto de las aves, de tal manera que estas al albergar una especie diferente a la humana, no podrían ser fuente de infección para el hombre, como fueron consideradas por Georgi.¹⁷

Además existe la hipótesis de que estas presentan una línea evolutiva divergente de la especie *G. duodenalis* del hombre y los mamíferos.¹⁸

Dentro de las novedades de clasificación de protozoarios, se cuenta con la taxonomía bioquímica.

Bertram^{19,20} introdujo los zimogramas al estudio comparativo de cultivos axénicos de *Giardia*, aislados del hombre, gato, cobayo y conejo.

Mediante técnicas isoenzimáticas en gel de poliacrilamida, de seis enzimas, se identificaron tres grupos de patrones estables de zimodemos: el zimodemo I incluye dos cepas humanas y una de gato; el zimodemo II, una cepa de cobayo, y zimodemo III, otra cepa humana y otra de conejo.

En algunas ocasiones el zimodemo coincidió con la especie clasificada morfológicamente, pero en otros no; Bertram recomienda el criterio de Filice de tres especies y la taxonomía bioquímica para mayor caracterización e identificación de *G. duodenalis*, porque se demuestra que las dimensiones y el origen de los trofozoítos no son suficientes para su clasificación.

También se prueban evidencias de transmisión cruzada entre el hombre y especies animales inferiores y se señala que un mismo tipo enzimático y morfológico puede parasitar a varias especies animales, y que las giardias aisladas de humano con igual tipo morfológico pueden presentar un patrón enzimático distinto.

Otros criterios bioquímicos, como el análisis de endonucleasa de DNA de 15 cepas de *Giardia* aisladas en cultivos exénicos, 11 humanas y 4 de mamíferos inferiores (dos de castor, una de gato y otra de cobayo), revelan nueve diferentes patrones que muestran que no existe correlación entre la cepa aislada y el huésped de origen. En estos estudios una cepa de castor y dos cepas humanas presentan un patrón de endonucleasa diferente a los de las otras seis cepas. Los autores argumentan que posiblemente la disparidad en el bandeo de endonucleasa puede corresponder a diferencias antigénicas en el mismo organismo, así como sucedería en el caso de encontrar similitudes.²¹

Los estudios de movilidad electroforética de Smith²² trataron de correlacionar las cepas aisladas de diferentes zonas geográficas con un determinado patrón de corrimiento electroforético. Sus resultados mostraron grandes similitudes entre las cepas humanas y las de animales

domésticos y silvestres, lo que hace suponer que no hay un organismo estándar para realizar estudios comparativos o simples y que pueden existir diferentes fenotipos para la misma especie.

Para la tipificación serológica de cepas de *G. lamblia* se han utilizado dos anticuerpos monoclonales, específicos para flagelo y dos para disco adhesivo, lo que ha permitido encontrar diferentes serotipos dentro del mismo tipo morfológico.²³

Meyer, uno de los primeros investigadores que logró establecer cultivos axénicos, considera que un carácter diferencial de especie, sería el hecho de que *G. duodenalis*, aislada del hombre y de mamíferos inferiores, es la única que ha sido cultivada "in vitro" y mantenida en el laboratorio por tiempos prolongados.^{24,25}

El mantenimiento de giardias en cultivo de células ha permitido observar que *G. muris* no creció en las líneas celulares y *G. lamblia* sí.²⁶ Las condiciones de cultivo de *G. muris* son muy restringidas y específicas, y tal vez podrían ser consideradas como un carácter de especie.²⁷

Por otro lado observaciones clínicas sobre el patrón de eliminación de quistes de huéspedes parasitados en forma natural, marcan que la eliminación intermitente de parásitos se presenta en el hombre y en algunos mamíferos inferiores, a diferencia del patrón continuo de expulsión de parásitos que sólo se presenta en las especies murinas.²⁸

3. MORFOLOGIA

Durante gran parte del siglo pasado y del actual, los estudios morfológicos de los trofozoitos y quistes de Giardia, han sido enfocados a definir con precisión los componentes estructurales, su localización y origen dentro de la célula y su correlación funcional.²⁰

TROFOZOITO. Organismo en forma de "gota" o "lágrima", con marcada simetría bilateral, el extremo anterior es ancho y redondeado, el extremo posterior termina en punta. Mide de 12 a 14 μm de largo por 7 a 9 μm de ancho y 1 a 2 μm de espesor. La comparación de medidas de longitud entre varias cepas axénicas muestra una diferencia que no excede de 0.5 a 1.0 μm , debida probablemente que los trofozoitos sin cuerpo medial son más pequeños que los que sí lo presentan.²⁰

Membrana Citoplasmática. Un gran número de glucoproteínas de superficie pueden ser detectadas mediante lectinas.²⁰ Por digestión con glucosidasa se ha demostrado a N-acetyl-D-glucosamida como importante componente no polimerizado de la membrana.

La localización de lectinas -aglutinina de germen de trigo (WGA), aglutinina de germen de trigo succinato (S-WGA) y aglutinina de tomate (LEA)- unidas a glucósidos de superficie, ha permitido la identificación de trofozoitos WGA (+) en el 80% y trofozoitos WGA (-) en el 20%, mediante los técnicas de Western blot, en varias cepas de cultivos axénicos.²¹

Flagelos. Los trofozoitos presentan ocho flagelos, dispuestos en cuatro pares simétricos, dos antero-laterales, dos postero-laterales, dos ventrales y un par caudal. Estos tienen su origen en ocho cuerpos parabasales²² colocados simétricamente a los lados de la línea media, a la altura del borde superior de los núcleos.

Los flagelos se inician en el citoplasma como axonemas, formados por un grupo de microtúbulos en un círculo externo de nueve pares y dos pares centrales (9x2), diferentes a los microtúbulos de los cuerpos parabasales que son 9x0.³²

El cuerpo de tres pares de flagelos tiene dirección antero-posterior y sólo uno de los pares va en sentido anterior. Los axonemas atraviesan el citoplasma y salen fuera del cuerpo, cubiertos con una vaina de membrana para formar el flagelo libre. Los flagelos ventrales tienen una aleta extendida a todo lo largo.³³ Asociadas a los axonemas antero-posteriores, están dos láminas de microtúbulos orientadas paralelamente, y compuestas de 10 a 20 microtúbulos situados a los lados, corresponden al axostilo visto en el microscopio de luz.

Disco adhesivo. No es simétrico bilateralmente, aunque fue descrito como formado por dos lóbulos.^{33,34} Está integrado por microtúbulos espirales que siguen las manecillas del reloj y desvían a una zona central de transporte vesicular, llamada "zona desnuda"³⁵. En el disco se localiza una abertura posterior donde los flagelos, expelen fluido desde la cavidad bajo el disco, hacia el canal ventral y exterior.

El disco mide de 8 a 10 μm . Recientemente la electroforesis en gel de poliacrilamida³⁵ ha permitido identificar dos proteínas del citoesqueleto del disco, una con peso molecular de 54,000 daltones y otra de 30,000; la primera compatible con tubulina de tipo alfa y beta y la segunda, de menor peso sin identificar. Estas proteínas forman los microtúbulos y las microvarillas del disco, axonemas y axostilo. Además la proteína giardina constituye el 20% del disco.³⁶ La membrana citoplasmática que cubre al disco adhesivo, presenta lectinas con una importante función en los mecanismos de adhesión del parásito.³⁷

Pestaña o flanco ventro-lateral. En el borde del disco adhesivo se localiza el flanco ventro-lateral que lo delimita, el cual es considerado de naturaleza flexible ³⁶, con un papel contráctil. Esta formado por dos placas paracrystalinas de proteína de tipo actina, alfa-actina, miosina y tropomiosina. ³⁷

Morfológicamente consiste en una extensión del citoplasma ³⁸ de la porción dorsal de la periferia, mas allá del borde del disco. Se le atribuye una función de adhesión al enterocito, que facilita el íntimo contacto entre el parásito y las microvellosidades del huésped. En el modelo hidrodinámico de Holberton ³³, se sugiere que la fuerza de succión del disco podría ser controlada por la pestaña, aplicando la flexión y extensión de otras estructuras.

En el caso de *G. psittaci*, en donde la pestaña ventro-lateral está incompleta, se considera que el disco adhesivo es suficiente para mantener el ataque al enterocito. ¹⁹

Cuerpos mediales. Denominados "cuerpos problemáticos", "cuerpos misteriosos" ³, por su naturaleza de estructuras intracitoplasmáticas transitorias, que pueden estar presentes o no. La microscopia electrónica ha revelado que son microtubulos curvados que se extienden de lado a lado, ventralmente, por debajo del disco adhesivo, constituidos entre 6 y 14 microtúbulos que semejan un montículo de 2 μ m. de diámetro. presentes del 47.8% al 54.9% de los trofozoitos. ²⁰

La morfología de los cuerpos mediales constituyó un carácter esencial para la clasificación en especies de Filice ¹². *G. agilis* tiene dos cuerpos mediales alargados, comp una clava en forma de bastón; *G. muris* los presenta pequeños y redondeados, en un par muy cerca uno del otro, y en *G. duodenalis* son dobles o sencillos en forma de "garra" o "colmillo" cruzando el cuerpo del trofozoito. A estas estructuras se les ha asociado con las siguientes funciones:

- a. división celular, porque desaparecen durante la división binaria transversal y no están presentes en los trofozoítos jóvenes. ³⁷
- b. reserva de lipoproteínas, relacionadas con la construcción del disco adhesivo en las células hijas. ^{38,37}
- c. soporte de la región terminal, donde no hay disco adhesivo. ⁴⁰

Núcleos. En el citoplasma se encuentran dos núcleos ovoides, con endosoma central bien diferenciado, condición que da a los trofozoítos un aspecto de "cara". ³⁸ La presencia de dos núcleos en el orden Diplomonadida no está claro, parecen dos células asociadas en una, como si la división binaria no hubiera concluido. ⁴¹

Los núcleos, de gran tamaño, ocupan un cuarto de la longitud y dos tercios del ancho de la célula y se localizan por debajo del disco adhesivo, en la porción más ancha del cuerpo. La membrana nuclear es delgada, de 300 a 600 Angstroms (A), con poros y cubierta por ribosomas.

Citoplasma. Está constituido por gran cantidad de gránulos, unos denominados "grandes" de 300 A, de aspecto denso considerados como glucogeno, otros "pequeños" de 150 a 200 A de aspecto claro que corresponden a ribosomas. Presenta retículo endoplásmico rugoso, no hay aparato de Golgi ^{32,40}, retículo endoplásmico liso, "cuerpos de pigmento" ni mitocondrias, tiene estructuras parecidas a lisosomas que pueden acumular ferritina. ⁴²

Además contiene gran número de vacuolas ovoides y circulares limitadas por una membrana, se encuentran localizadas en forma de hilera, en la periferia dorsal y ventral ⁴⁰, a excepción de la zona del disco; su tamaño varía de 100 A de ancho por 100 a 300 A de largo; están interconectadas formando una red de canales intracitoplasmáticos que conforman el sistema digestivo del parásito. ⁴³

En *G. muris* existen unos cuerpos intracitoplasmáticos de 240 nm de ancho, por 600 a 1400 nm de largo que parecen independientes del contenido del citoplasma; aparentemente estos cuerpos están ausentes en *G. lamblia*. Fueron descritos por primera vez por Nemanic ⁴⁴ y considerados bacterias endosimbiontes, localizados en trofozoítos y quistes; se ha sugerido que podrían participar en la patogenicidad ^{39,43} también considerados semejantes a virus ³³ porque los trofozoítos que los contienen muestran alteraciones citoplasmáticas, que sugieren pérdida de viabilidad.²⁹

QUISTE. Aunque fueron observados y dibujados por Lambl en 1859 y Grassi en 1881, se atribuye a Perroncito ⁴⁵, en 1887, el haberlos relacionado con trofozoítos, en individuos con diarrea.

Los quistes pueden ser esféricos u ovoides, con 17 μ m de largo y 12 μ m de ancho. Están presentes, en gran cantidad, en las heces de individuos con diarrea. Estos son expulsados por el huésped contenidos en la materia fecal, para diseminarse ampliamente en el medio ambiente.

La síntesis de la pared quística es un paso esencial en la diferenciación de trofozoíto a quiste; la presencia de lectinas de superficie WGA (+) y WGA (-) en trofozoítos podría corresponder a dos subpoblaciones, en un proceso de diferenciación hacia la formación del quiste. ³¹

Los trabajos de Ward ⁴⁶ demostraron, mediante el empleo de quitinasa, que la quitina es el polisacárido de la pared quística. Esta pared está estrechamente unida a la membrana citoplasmática, con un espesor de 0.3 μ m ⁴⁰ o de 0.15 a 0.25 μ m ⁴⁶, es suave y lisa, no presenta hoyos, poros, depresiones o arrugas y está constituida por una malla fibrosa, mezclada con partículas finas.

Por debajo de ella, las vesículas periféricas parecen contener material secretor, eventualmente utilizado para fabricar la pared del quiste. Estas vesículas se unen para formar una laguna periférica muy grande, que cuando se

completa, rodea todo el organismo y es conocida como sistema lacunar.³² Sin embargo, Scheffield⁴⁰ descartó a las vacuolas periféricas como secretoras de la pared quística, porque estas permanecían después de haberse formado el quiste.

Durante el enquistamiento, el disco adhesivo se fragmenta y se esparce en el citoplasma; además se observan los microtúbulos, las microvarillas y los restos de la cresta del disco. Los flagelos y axonemas son enrollados y colocados en posición central.⁴⁷ No se ven los cuerpos mediales, que aparentemente desaparecen durante el enquistamiento,⁴⁸ aunque la microscopía electrónica ha mostrado estructuras parecidas⁴⁷. En el área central se encuentran restos de cuerpos parabasales.

En la actualidad se ha confirmado la naturaleza flexible del quiste que puede adquirir forma cuboide, esférica, oval o elíptica.⁴⁹

Estudios descriptivos de gran detalle distinguen cinco tipos de quistes¹⁰: normales, con pared lisa y retraída; con contenido muy retraído; quistes de pared dilatada con un organismo dentro de él y quistes de pared dilatada en cuyo interior se observa un organismo en forma de trofozoito.

Las preparaciones en fresco pueden contener quistes completos que son fácilmente identificables,⁴⁰ pero también pueden existir formas atípicas, con el interior muy retraído, que es posible confundir con otras estructuras y que se denominan "quistes fantasmas".⁴⁷

En el interior del quiste se observan de 2 a 4 núcleos envueltos en una membrana nuclear, nucleoplasma denso y endosoma central bien marcado; la mayoría de los quistes son tetranucleados, indicando que la primera división se ha llevado a cabo. Carecen de mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y lisosomas. En el interior se observan dos tipos de estructuras que no se identifican claramente: (1) masas redondeadas en varios sitios del citoplasma parecidas a las estructuras estriadas de la

pestaña ventro-lateral, (2) líneas densas curvadas o en ángulo, agrupadas y colocadas en la periferia que tal vez corresponden a elementos del disco. 40 Así mismo contienen estructuras redondeadas, consideradas por algunos como endosimbiontes. 43

Mediante el uso de la microscopia electrónica se demostró que los quistes de Giardia, de diferentes huéspedes, son indistinguibles entre sí. 40

En años recientes se han desarrollado varias técnicas para conocer la viabilidad de los quistes y su resistencia a factores físicos y químicos del medio ambiente, que pudieran estar relacionados con la capacidad infectiva. La prueba tintoreal de eosina tiñe de rojo intenso únicamente a los quistes no viables 41, donde los quistes viables no permiten la entrada del colorante. Otros trabajos muestran que los quistes viables tienen afinidad tintoreal a fluoresceína y los quistes muertos a coloración con propidium. Los autores de esta técnica opinan que además de ser utilizada como criterio de viabilidad podría usarse en la clasificación de especie, porque la morfología interna en los quistes de Giardia lamblia difiere de la presente en G. muris. 42

4. METABOLISMO

Giardia lamblia es un parásito habitante del duodeno e inicio del yeyuno, que tiene características aeróbicas y anaeróbicas, ya que respira en presencia de oxígeno y es considerado aero-tolerante o microaerofílico.

En su respiración no produce hidrógeno molecular. La respiración endógena es estimulada por glucosa y no por otro carbohidrato; su metabolismo está basado en la glucólisis, que lleva a la producción de acetato, etanol y CO₂ (Figura 1). 43

La detección de varias enzimas que participan en las vías metabólicas de los carbohidratos, demuestra que el

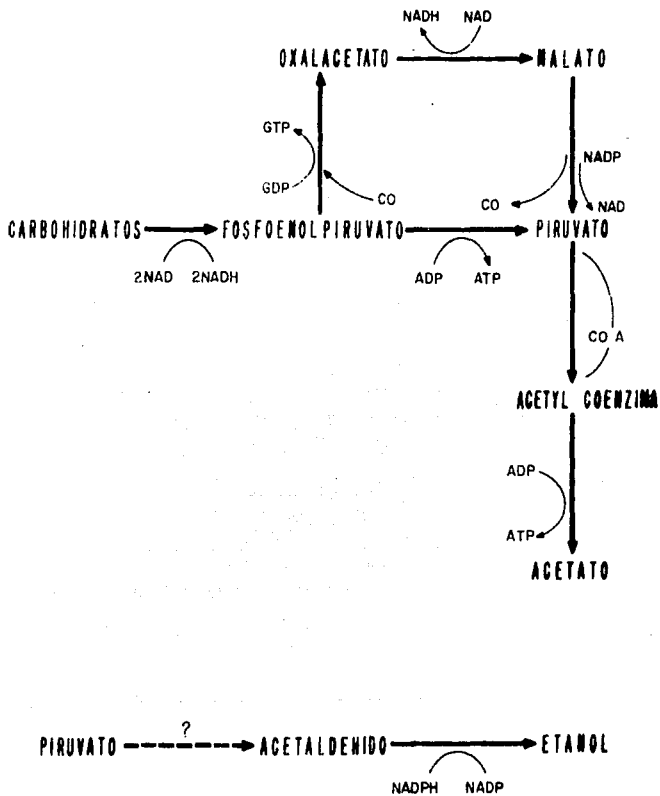


FIG. 1. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS DE GIARDIA LAMBLIA (LINDMARK 1980)

metabolismo energético de este protozooario es fermentativo. El parásito carece de mitocondrias y de enzimas mitocondriales, por lo tanto no realiza ciclo de Krebs, no hay citocromos, ni evidencia de fosforilación oxidativa. 54

Parte del metabolismo de *G. lamblia* se conoce gracias al desarrollo de los cultivos axénicos. Las variaciones en los componentes de los medios de cultivo han detectado aspectos de los requerimientos nutricionales de los trofozoitos. En este aspecto se ha demostrado la necesidad de L-cisteina, no sólo como agente reductor, sino también como componente esencial, ya que la ausencia de esta disminuye el crecimiento de los trofozoitos e impide la formación de monocapas adheridas a la pared del tubo de cultivo. 55

El radioinmunoensayo ha permitido reconocer en los trofozoitos de *G. lamblia* humana la presencia de calmodulina, proteína de un PM de 16.7 kD, encontrandose en concentraciones de 176 a 260 µg de calmodulina /gramo de trofozoitos de cultivo. Esta proteína es un receptor importante de Ca⁺⁺, indispensable para el crecimiento de los trofozoitos, lo que hace pensar que intervenga en gran número de funciones orgánicas, como sucede con otros eucariotes. 56

La calmodulina es una proteína utilizada en el transporte de Ca⁺⁺ a través de la membrana, ya que se ha demostrado que los antagonistas de calmodulina inhiben el transporte transmembranal de este ión. 57

5. DIVISION CELULAR

Las primeras observaciones sobre la división celular mencionan que el proceso se inicia en el núcleo, con la fragmentación del cariosoma, que se divide en partes iguales para constituir los núcleos de las células hijas. 58

El concepto de división celular de un "zonóide" que origina "dos zonóides hermanos", mediante una partición longitudinal, fue establecido desde principios de este siglo.

La multiplicación de Giardia, por tratarse de un parásito unicelular, era considerada tradicionalmente como la "partición de la célula adulta para dar dos células hijas". La explicación que se daba a la presencia de cuatro núcleos en el quiste era que el enquistamiento se llevaba a cabo cuando los zonóides hermanos estaban en división y el quiste se formaba antes de que se completara el proceso. ⁵⁰

Los minuciosos y múltiples estudios en estos parásitos provenientes de heces humanas, realizados por Simon ⁵¹, permitieron conocer que la cromatina nuclear de estos parásitos se fragmenta hasta en ocho cromosomas, que se colocan en una placa ecuatorial y que subsecuentemente se sitúan en pares, antes de separarse por partes iguales, en los nuevos núcleos.

Trabajos actuales señalan que el enquistamiento se origina en un trofozoito binucleado y que hasta después de formada la pared del quiste, sucede la división, para dar origen al quiste tetranucleado. ^{40, 52}

La observación del proceso de desenquistación "in vitro" ha permitido conocer que de cada quiste tetranucleado se originan dos trofozoitos hijos. ⁴⁰

6. EPIDEMIOLOGIA

1. PREVALENCIA. Giardia lamblia es el protozoo intestinal que más se identifica en los exámenes coproparasitológicos (CPS). ⁵³. En una revisión que reúne 37 trabajos de 14 estados de la República Mexicana ⁵², se muestra que G. lamblia ocupa el primer lugar con 18.98% del

total de CPS positivos, presentándose el mayor porcentaje en preescolares y escolares.

Publicaciones posteriores en México reportan 4.5% en población adulta con duodenitis y acidez gástrica normal ⁶³; 16.22% en la zona lagunera ⁶⁴; 14.8 por ciento en poblaciones escolares del Distrito Federal ⁶⁵; 18.9% en una escuela secundaria de Iztacalco ⁶⁶; 28.9 % en un estudio realizado en el Estado de Nuevo León ⁶⁷; 38.0% en niños con diarrea crónica en un hospital de la Ciudad de México ⁶⁸; 14.9% en la población infantil del estado de Puebla ⁶⁹, y 70.0% en una escuela primaria del Distrito Federal. ⁷⁰

La giardiasis se encuentra ampliamente distribuida; no está limitada a países tropicales, exóticos o de tercer mundo. ⁷¹ Se encuentra en forma endémica y epidémica en diversos estados de Estados Unidos de Norteamérica ⁷²⁻⁷⁴, en el Reino Unido ⁷⁵, en los países socialistas ⁷⁶ y en localidades frías como Canadá, Yukon / Groenlandia. ⁷⁸

2. MECANISMO DE TRANSMISION. La giardiasis es una protozoosis cuya transmisión está relacionada con el fecalismo; las formas infectantes (quistes tetranucleados) se localizan en las heces de los huéspedes naturales. Puede ser transmitida por la ruta fecal-oral entre hombre-hombre, o entre el hombre y diversos animales domésticos o silvestres.

Los quistes pueden ser transmitidos por el agua contaminada de ríos, norias, pozos, canales de riego, manantiales naturales, agua potable entubada y por los alimentos contaminados.

Se ha demostrado la transmisión directa mediante la vía ano-mano-boca en guarderías, centros de enfermos mentales o simplemente, en las casas habitación donde hay hacinamiento. Las condiciones que favorecen la transmisión de la giardiasis son múltiples y la sostienen en una alta prevalencia en la población humana:

a. **Diseminación de quistes por individuos asintomáticos.** El seguimiento, durante ocho semanas, de niños infectados, con buen estado general de salud y nutricional, demostró tres patrones diferentes de eliminación de quistes: 79.00

ALTO: de 500 a 2000 quistes/mg de heces, en el 91% de los CPS, con un máximo de 42 millones de quistes/día.

BAJO: de 10 a 100 quistes/mg de heces, en el 40% de los CPS positivos, alternando con periodos de CPS negativos.

MIXTO: con alternancia de alta y baja, en el 65% de los CPS positivos.

Estos estudios han permitido demostrar que un individuo puede eliminar hasta 9.8×10^4 de quistes diariamente, y que la infección puede permanecer durante tres semanas, por lo cual la diseminación es amplia y la probabilidad de que otros individuos sanos se infecten, es alta.

b. El número de quistes que un individuo necesita ingerir para infectarse es muy bajo; desde 1954 se conoce que de 10 a 25 quistes fueron suficientes para iniciar una infección en el 36.4% de los voluntarios humanos estudiados²¹; con 100 quistes se logró infectar al 100%, con periodos prepatentes de 6 a 11 días.

Los trabajos que tomaron como modelo a voluntarios humanos, bajo condiciones higiénicas y de alimentación controladas, demostraron que los sujetos que ingirieron un quiste, no se infectaban; con una ingestión de 100 quistes el período de eliminación de quistes se acortó a 9 días, y con dosis mayores de 10,000 quistes y menores de 1 000 000, el periodo prepatente fue de 6 a 11 días.²²

c. El agua es un importante vehículo de diseminación de Biardia. En el mundo serias epidemias se han asociado con la contaminación del agua por excretas. En los Estados

Unidos de Norteamérica se piensa que el 35% de los brotes epidémicos se originan mediante este mecanismo. 72,73,83,84

Deben tomarse en cuenta las diferencias en clorinación y filtración que cada tipo de agua requiere para ser potable, de donde resulta todo un reto controlar las condiciones de pH, turbidez, temperatura, tiempo de contacto y dosis de los desinfectantes. 85-87

En ocasiones la purificación del agua solo se obtiene con una hiperclorinación de 3 mg/litro, durante una hora, dosis que puede ser tóxica para el hombre; las cantidades habituales de 0.5 a 0.8 mg/litro resultan insuficientes. 75 Se tiene que considerar que los quistes de G. lamblia permanecen viables a 89C durante 16 días 84, que pueden vivir a temperatura de 49C, hasta por dos meses 88 y soportan clorinaciones de 1mg/l.

Un 99% de la efectividad de la destrucción de quistes se logra con sustancias como halosone, glibotrine y tintura de yodo al 2%. Sin embargo, el mejor método de esterilización del agua es la ebullición. 73

d. Transmisión por alimentos. Este mecanismo se demostró en una epidemia sufrida en una escuela, donde todos los profesores tomaban sus alimentos en un comedor comun; todos cursaron con diarrea de 10 a 16 días y se pudo demostrar el parásito en heces. 89

Asimismo, Jackson 88, por comunicación personal, menciona el hallazgo de quistes de G. lamblia en fresas.

e. Las moscas domésticas (Musca domestica) no son buenas transmisoras de quistes. Esto se demostró en experimentos realizados con 16 voluntarios humanos que no lograron infectarse al ingerir alimentos contaminados con quistes de G. lamblia, mediante las patas de moscas domésticas. 82

f. La transmisión directa ano-mano-boca sucede en condiciones de hacinamiento y malos hábitos higiénicos. En establecimientos como las guarderías, la giardiasis se presenta como el padecimiento número uno. 99.96

Un estudio realizado en 30 guarderías de Texas 91, evidenció la presencia de quistes de G. lamblia en el 72.4% de los niños. Un trabajo similar que se llevó a cabo en 40 guarderías de la Ciudad de México, en niños con edades comprendidas de 40 días a 4 años 11 meses; mostró un 35 % de niños positivos a quistes de G. lamblia en heces, con condiciones higienicas deficientes y un 79.2% de niños con desnutrición de primer y segundo grado. 92

Datos muy parecidos se obtuvieron en una guardería con número reducido de niños (60 niños) y buenas condiciones higiénicas, donde los quistes de G. lamblia se indentificaron en el 47.3% de los CPS realizados en niños asintomáticos. 93

Este tipo de transmisión tambien se presenta en hogares donde hay malos hábitos higiénicos, que ocasionan la diseminación interfamiliar. 94 Asimismo, existen reportes de transmisión oral-anal entre individuos homosexuales. 95

g. La giardiasis está asociada con la "diarrea del turista". Individuos que viajan a lugares distintos de su sitio de origen, presentan en forma explosiva, malestares gastrointestinales, 15 días después de su regreso, con eliminación de quistes de G. lamblia. 96-100

h. Existe la transmisión cruzada de G. lamblia humana con otras especies animales. Probablemente las primeras observaciones de este fenómeno fueron realizadas por Grassi en el siglo pasado; éstos trabajos fueron olvidados y luego Simon los retomó 97 y Hegner los continuo 98. Dichas observaciones permitieron clasificar a las giardias de acuerdo con la especie de huésped infectado y establecer el

criterio de especificidad del mismo, el cual se mantuvo rígido por muchos años.

A partir de 1978 Grant y Woo retomaron el tema y demostraron que los quistes de *G. lamblia* obtenidos del hombre, pueden infectar a ratones de laboratorio y a animales domésticos. ¹⁰

Hasta la fecha existen dos grupos en oposición; uno considera a la giardiasis como una zoonosis ¹¹. ^{102, 103-104} y apoya el significado potencial de los animales domésticos y silvestres como huéspedes naturales de *Giardia*, y por lo tanto, como fuente de infección para el hombre. El otro grupo apoya la especificidad de huésped y no considera la transmisión cruzada entre el hombre y los mamíferos inferiores. ¹²

7. PATOGENIA

Los quistes tetranucleados ingeridos por el huésped, al pasar al estómago, sufren la inducción de desenquistación, por acción de las enzimas y el pH ácido (1.3 - 2.7) de los jugos gástricos y la temperatura de 37°C. En este primer paso se presenta flexibilidad en el quiste y movilidad del parásito en el interior.

La desenquistación ocurre al pasar al duodeno o yeyuno con un pH más favorable (6.8 - 7.2), condiciones bajo las cuales se rompe la pared del quiste en un polo y se inicia la salida de un par de trofozoitos, que permanecen unidos por algunas horas, antes de colonizar la mucosa del intestino. ¹⁰

El daño que los trofozoitos producen a su huésped se origina a través de los siguientes mecanismos:

1. Adherencia del trofozoito. Una de las primeras evidencias de que la fijación del parásito a la mucosa del intestino producía lesiones, se observó en un caso mortal de giardiasis, en el que la autopsia reveló gran cantidad de trofozoitos de *Giardia* fijos por el peristomo en zonas de importante ulceración.

Las primeras deducciones no asociaron la fisiopatología observada, con la presencia de los trofozoitos.¹⁰⁰ Trabajos posteriores sugirieron que la adherencia de los trofozoitos podría interferir con la absorción, sobre todo porque los pacientes mejoraban considerablemente, después de la erradicación del parásito.¹¹⁰

El parásito presenta tropismo hacia la mucosa del duodeno y yeyuno, el total del cuerpo del parásito bloquea tres células epiteliales y deja un espacio entre los enterocitos y el disco adhesivo, que no contiene material alimenticio.

La superficie dorsal del parásito queda hacia la luz del intestino y muestra gran cantidad de vacuolas con función pinocítica.¹¹¹ El epitelio intestinal aumenta su cubierta mucóide, en respuesta a la adherencia del parásito; las microvellosidades se ramifican, presentan huecos en la base e incrementan sus "cuerpos densos" (probablemente lisosomas).^{110, 112}

Infecciones experimentales con *G. muris* permitieron observar que los trofozoitos colonizan el 25% del intestino proximal y se adhieren a células columnares, pero no a las células M (células que transportan antígeno particulado y soluble, del lumen, al sistema linfóide asociado con el intestino).³⁰

Estudios de microscopía electrónica han demostrado que los trofozoitos de *G. lamblia* se establecen sobre la superficie de las microvellosidades intestinales, desde la porción media, hasta la porción libre de microvellosidad, en una imagen como "sombrija" que cubre y guarda una relación íntima con la superficie del enterocito, apoyados en los

flancos ventro-laterales que están embebidos en el borde del cepillo, sin penetrar a la lamina propia.

Las células epiteliales se conservan íntegras, con mitosis normal, poca vacuolización, escasa inflamación y pocos eosinófilos. ¹¹³

Existe controversia sobre si los trofozoítos de G. lamblia son o no patógenos; una corriente señala que no lo son, apoyada en el daño mínimo que se observa sobre los enterocitos afectados, mientras que otros afirman que existe un daño serio y alteraciones considerables de las funciones en ese nivel. ^{39, 114, 115}

Los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo la adherencia de los trofozoítos a las microvellosidades del enterocito, intentan ser explicadas mediante cuatro teorías:

a) la de Müeller propone que el parásito se adhiere mediante movimientos contráctiles y heliocoidales, donde el diámetro del disco varía de tamaño. ¹¹⁴

b) La de Holberton centra en los flagelos ventrales la fuerza que crea un sistema de válvulas, facilitando la adherencia mediante una succión continua por parte del disco. ³³

c) La de Erlandsen sugiere que el flanco ventro-lateral posibilita la adherencia mediante un mecanismo de compresión contráctil. ¹¹⁷

d) La de Farthing y col. supone la demostración de lectinas de membrana con especificidad a residuos D-glicosyl y D-manocyl presentes en el enterocito que podrían ser receptores en el sitio de colonización. ³⁰

2. Deficiencia de Absorción. La asociación entre trofozoítos de G. lamblia, con la deficiencia en la absorción de grasas, se reportó desde 1939 en el estudio de un niño de dos años que mostraba signos y síntomas de enfermedad celiaca ¹¹⁶, condiciones clínicas consideradas de difícil diagnóstico diferencial, no asociada a giardiasis. ¹¹⁷

Se discute sobre si G. lamblia es causante de deficiencias de absorción intestinal; sin embargo, se reconoce que todas las enfermedades que alteran la integridad anatómico-funcional de la porción alta del intestino y dañan el epitelio columnar que recubre las microvellosidades, modifican en forma importante la absorción de carbohidratos y proteínas a ese nivel. Esto lo sustentan trabajos estadísticos donde se muestra que hay diferencias en la concentración de D-xilosa, proteínas en sangre y talla baja, entre niños que albergan el parásito, aun sin presentar manifestaciones clínicas, y los que no lo albergan. ^{114.120}

La absorción de lípidos se realiza principalmente en la porción distal del duodeno e inicio del yeyuno; ¹²¹ G. lamblia se fija en esa región y altera la capacidad para absorber grasas, lo cual se traduce en esteatorrea en los individuos infectados. ^{122. 123} La cantidad de grasas eliminadas con las heces, de niños con G. lamblia es de 10.2 gramos/día, cantidad que disminuye a 4.6 gramos/día después del tratamiento antiparasitario. ¹¹³ Estos resultados contrastan con las experiencias en niños brasileños, donde las pruebas de D-xilosa y lípidol se encontraron sólo ligeramente modificadas y no variaron después de administrar el fármaco antiparasitario ¹¹¹, al igual que en niños africanos en quienes las pruebas de lactosa se conservan normales, a pesar de la presencia del parásito. ¹²⁴

Pruebas en adultos sintomáticos, con G. lamblia en heces, señalan que el 14% tienen valores de D-xilosa subnormales, 12% muestran disminución en la absorción de grasas y 40% exhiben daño a la mucosa. ¹²⁵ Otro grupo encuentra niveles de absorción de carbohidratos normales ^{126.127} y concluye que el daño a la mucosa por los trofozoítos es de poca consideración.

El daño a los enterocitos altera la concentración de algunas enzimas en el borde del cepillo, como lactasa,

sucrasa y leucyl-naftilaminasa, mientras que la maltasa y la fosfatasa alcalina permanecen normales. ¹¹³

La absorción de la hormona del crecimiento o somatotropina no se altera por la presencia de G. lamblia; parece que la talla baja guarda más relación con deficiencias del estado nutricional por los efectos negativos que produce el parásito, que con modificaciones en los niveles de la hormona. ¹²⁸

3. Invasión. Los cortes histológicos de 23 biopsias yeyunales, de 10 pacientes con giardiasis mostraron la invasión del espacio entersticial y la de la lámina propia, por los trofozoítos que aparecían como organismos solitarios o en pequeños grupos de 4 a 7.

Algunos trofozoítos lograban penetrar en el interior de los enterocitos sin producir zonas de necrosis ni mostrar sitios de penetración; las células epiteliales parecen cerrarse después de la entrada de los trofozoítos, sin dejar huella. No existe reacción inflamatoria, tal vez porque los parásitos comparten antígenos con células epiteliales. ¹²⁹

Estudios histopatológicos evidenciaron el daño y penetración de los trofozoítos dentro del enterocito y de la lámina propia. Se piensa que la penetración tal vez ocurra en dirección paralela a la célula y que los trofozoítos en su trayecto dejan una huella en la superficie de la membrana del enterocito, que es utilizada para la entrada de otro trofozoíto. ¹³⁰

Las microvellosidades se muestran cortas y aplanadas, epitelio columnar con incremento de células inflamatorias, células plasmáticas y linfocitos; borde del cepillo perdido en algunos sitios, células en copa incrementadas, con pérdidas de polaridad de núcleos de células basales. ¹³⁰

La inflamación de la lámina propia es más de tipo crónico que agudo. En este mismo grupo de estudio, la biopsia de individuos sin invasión muestra enterocitos íntegros.

Gran número de biopsias de individuos que eliminan quistes de G. lamblia y que muestran trofozoitos en la luz del intestino, indican que la invasión intracelular no es de los principales mecanismos de patogenicidad. ^{109, 114, 125}

4. Liberación de toxinas. Estudios de Radulescu y col. de trofozoitos de G. lamblia, G. catiis y G. cavie muestran que estos producen un efecto citopático sobre fibroblastos humanos "in vitro", los cuales a las 24 horas ocasionan degradación celular, vacuolización del citoplasma, marginación nuclear y núcleo picnótico, con pérdida de cromatina; a las 96 horas la monocapa de fibroblastos está totalmente destruida. ¹³¹

Este efecto se produce por el contacto directo y la acción de metabolitos tóxicos liberados del parásito sobre las células. ¹³² Otra evidencia de acción citopática valora la posible producción de enterotoxinas semejantes a las del cólera, aunque sus resultados no confirman su presencia. ¹³³

5. Sinergismo con enterobacterias. La reacción inflamatoria de la mucosa intestinal que despierta la presencia de los trofozoitos, planteó la posible asociación de estos con las enterobacterias. ¹¹⁶ Otras observaciones mostraron que individuos con giardiasis y malabsorción, presentaban un importante aumento de las sales biliares en el tubo digestivo y dificultad en la solubilidad de las grasas. ¹³⁴

La asociación de las enterobacterias y G. lamblia se pretendió conocer indirectamente, al medir la cantidad de bacterias productoras de indol que habitan el tubo digestivo de los niños con giardiasis, para lo cual se midió el sulfato de indoxil (indicán) en la orina, antes y después del tratamiento antiparasitario; los resultados permitieron suponer que independientemente del cuadro clínico, G. lamblia coexiste con una mayor población de enterobacterias. ¹³⁵

Si se acepta el sinergismo entre enterobacterias y G.lamblia, también habría que considerar que probablemente las toxinas bacterianas producen "hipersensibilidad" en el duodeno. ¹¹⁴

8. CUADRO CLINICO

El periodo prepatente, definido como el que transcurre entre la ingestión de quistes tetranucleados y la demostración del parásito en heces, fue fijado en un lapso de 9.1 días. ¹¹⁵

Se señala que en giardiasis, el periodo de incubación, de ocho días, es más corto que el prepatente, de 12 a 14 días, de tal manera que pueden presentarse signos y síntomas sin que sea posible demostrar la presencia del parásito. ¹¹⁶ El periodo de incubación puede acortarse hasta cinco días y ser atribuible a giardiasis. ¹¹⁷

En un grupo de paseantes que visitaron la URSS y presentaron diarrea al regreso a su lugar de origen, se lograron identificar tres tipos de evolución clínica: ¹¹⁸

A. AGUDO. con diarrea fétida, dolor epigástrico, flatulencia y distensión, náuseas y anorexia. Ese periodo fue por lo general, de pocos días y se comportó como amibiasis o disentería bacilar, pero sin sangre o pus en heces; se prolongó de 2 a 3 semanas y en algunos ocasionó pérdida de peso y lasitud.

b. SUBAGUDO. Con duración de meses a años y episodios de heces fétidas y blandas, además de evidencia de esteatorrea, flatulencia y distensión, dolor epigástrico parecido al de la hernia hiatal, úlcera o enfermedad de la vesícula.

c. CRONICO. Con heces blandas y fétidas, aumento de la flatulencia y distensión abdominal, síntomas que desaparecieron con el tiempo.

La duración de las manifestaciones clínicas puede limitarse a pocos días en algunos individuos; en otros, presentarse con carácter de larga evolución ¹³⁸, con síntomas leves, diarrea intermitente y dolor abdominal que responde al tratamiento. Otro grupo de pacientes puede cursar con daño severo a la mucosa y evoluciona a un cuadro clínico de malabsorción. ^{139, 140}

La patogenicidad de G. lamblia fue cuestionada con base en el gran número de individuos que eliminan quistes y no presentan manifestaciones clínicas. ¹⁴¹⁻¹⁴³

Se sabe que esta parasitosis es endémica en poblaciones sometidas a hacinamiento, y en niños de guardería ¹⁴⁴⁻¹⁴⁵, donde la mayoría son asintomáticos.

En adultos mexicanos ⁴³ la úlcera péptica duodenal o gástrica, la gastritis y amibiasis, pueden asociarse con un cuadro clínico de giardiasis, en individuos que presentan un síndrome ulceroso atípico con acidez gástrica normal, y donde sólo la duodenoscopia muestra los cambios inflamatorios y hace el diagnóstico diferencial.

También en niños se ha demostrado la asociación colónica, y se requiere de rectosigmoidoscopia para demostrar la presencia de G. lamblia en casos de colon irritable y evacuaciones blandas verde-amarillentas.

En individuos con pancreatitis crónica que presentan heces fétidas, pérdida de peso y dolor abdominal, el parásito se demuestra por biopsia duodenal y los pacientes pueden tener síndrome de malabsorción. ¹⁴⁵

9. INMUNOLOGIA

INMUNIDAD HUMORAL. G. lamblia es capaz de inducir una respuesta humoral, con producción de anticuerpos

detectables, mediante varias técnicas, hasta en 93.9% de los casos. ^{22,144,147}

La aplicación de antisueros conjugados con fluoresceína²² en el intestino de pacientes con giardiasis, produce un marcaje específico de linfocitos y de células plasmáticas productoras de IgM e IgA. Los anticuerpos de tipo IgG e IgA de tubo digestivo, incrementan la fagocitosis de trofozoítos por macrófagos peritoneales y neutrófilos de ratón. ¹⁴⁸

Los títulos elevados de IgG en pacientes con giardiasis recurrente, señalan que los anticuerpos no son protectores ²² y que tal vez la respuesta local juegue un papel importante. Sin embargo, otros trabajos muestran que en individuos con hipogamaglobulinemia, la giardiasis se incrementa en forma importante. ¹⁴⁹

Algunas experiencias muestran que la respuesta sérica se mantiene positiva, después de 15 meses de terapia antiparasitaria ¹⁵⁰, mientras que otras señalan que los niveles de IgG decrecen rápidamente después del tratamiento. ¹⁵¹ Las concentraciones séricas de IgE permanecen normales ¹⁵², aunque la cantidad de células yeyunales, productoras de esta inmunoglobulina aumenten.

El comportamiento por la vía clásica participa en inducir lisis sobre los trofozoítos mediante IgM. ^{153,154} Los ensayos con antígenos preparados, a partir de quistes, indican que los anticuerpos anti*Giardia* son específicos y no hay reacción cruzada con antígenos de otros protozoarios o enterobacterias. ¹⁵⁵

ANTIGENOS DE *Giardia lamblia*. La proteína tubulina del citoesqueleto y otras de peso molecular bajo (30kD), denominada "giardina", han sido identificadas mediante anticuerpos monoclonales y policlonales de ratón y de conejo, como antígenos de superficie. ³⁵

Algunos componentes de membrana, de naturaleza polipéptica y otros del citoplasma, también proteícos,

resultan antigénicos en humanos y otros animales. ¹⁵⁶ Se han encontrado diferencias antigénicas en distintas cepas axénicas; estas pueden identificar fenotipos de capacidad patogénica distinta. ¹⁵⁷⁻¹⁶⁰

VARIACION ANTIGENICA. Los trofozoitos de la cepa WB presentan un antígeno de 170 kD, que induce la producción de anticuerpos citotóxicos, la reacción antígeno-anticuerpo que se realiza ocasiona lisis en los trofozoitos; los sobrevivientes de este encuentro y sus progenies no presentan el mismo tipo de antígeno, sino otro de peso molecular de 64 kD, el cual induce un nuevo anticuerpo citotóxico. Estos estudios demuestran la pérdida del antígeno de 170 kD con alto contenido de cisteína y el reemplazamiento por otro de menor peso, que nos permite detectar dos epitopos diferentes para la misma cepa WB de trofozoitos. ¹⁵⁹⁻¹⁶¹

PRUEBAS DIAGNOSTICAS. Se han realizado diversas pruebas con antígenos de quistes ^{22, 147} y de trofozoitos ¹⁶², mediante técnicas de inmunodifusión, inmunofluorescencia y ELISA, que han demostrado sensibilidad de 81% ²⁷ y de 92% ¹⁴⁴.

Las pruebas de inmunofluorescencia mostraron que los resultados con títulos mayores a 1:16 son significativos en el caso de giardiasis en pacientes que presentan daño a la mucosa y malabsorción; los títulos menores a 1:16 la excluyen ¹⁴⁴. Un resultado con títulos positivos indica existencia de la infección y por lo tanto, presencia del parásito, por lo cual deberá insistirse en su búsqueda. ¹⁴³

Por el patrón irregular con que los quistes son expulsados, se requiere realizar varios CPS para demostrar la presencia del parásito y esto conduce a desarrollar pruebas que detectan antígeno de *G. lamblia* en heces. Entre ellas hay una prueba de ELISA ¹⁴⁴ con sensibilidad del 92%, y otra con sensibilidad del 98% y especificidad del 100% ¹⁴³,

que pueden ser utilizadas para estudios diagnósticos y/o epidemiológicos.

ASOCIACION CON INMUNDEFICIENCIAS. Varios trabajos considerados como clásicos, ¹⁴⁴ demostraron la asociación de G. lamblia, hipogamaglobulinemia y síntomas gastrointestinales, principalmente con anomalías de la mucosa del intestino; en todos los casos estudiados los pacientes carecían de células plasmáticas en la lámina propia, al erradicar el parásito la normalidad de las microvellosidades se recobro; sin embargo estos mismos autores cuestionaron si todo el daño es debido a los parásitos o el huésped con inmunodeficiencia contribuye importantemente a la severidad de la giardiasis. ¹⁴⁵

En pacientes con hipogamaglobulina primaria se observa un predominio de G. lamblia como causante de diarrea, en donde la biopsia muestra atrofia de las microvellosidades. ¹⁵⁰

TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO CON MUCOSAS. En giardiasis, la respuesta humoral sérica confiere una protección muy pobre y el papel de la IgA secretora intestinal es más importante ¹⁴⁴ Si el valor normal de la IgA secretora es de 150 mg/100 ml., esta se encuentra disminuida hasta 52.4 mg/100 ml. en los pacientes con giardiasis. ¹⁴⁷

Sin embargo, Jones ¹⁴⁸ comparó las concentraciones de IgA sérica y secretora, mediante inmunodifusión radial y encontró que son similares en individuos con o sin giardiasis.

La IgA secretora de calostro parece tener un papel protector en ratones lactantes; en éstos los anticuerpos específicos contra la Giardia son transferidos por la leche materna; en humanos se desconoce este fenómeno. ¹⁴⁹

Diversos ensayos señalan que los trofozoitos incubados con IgA secretora específica pierden su capacidad de adherencia. ^{149 170}

La función de las células linfoides asociadas al intestino debe ser diferente a la de las células periféricas, debido a que la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) peritoneal es más efectiva que la periférica. ¹⁷¹ El aumento de linfocitos epiteliales en niños con giardiasis y la evidencia de que muchas de estas células son T dependientes, envuelve tanto la respuesta humoral como la de células T. ¹⁷²

INMUNIDAD CELULAR. Los linfocitos de la lamina propia intestinal cruzan el epitelio y atacan a los trofozoitos de Giardia en el lumen, y así contribuyen a la eliminación del parásito. ⁴⁴ Los monocitos-macrófagos de sangre periférica son espontáneamente citotóxicos ²² a trofozoito de G. lamblia, así como los macrófagos de exudado peritoneal. ¹⁷¹

La citotoxicidad disminuye en los monocitos de individuos con giardiasis crónica; trabajos "in vitro" muestran que anticuerpos IgG anti-giardia pueden participar en procesos de citotoxicidad, dependientes de anticuerpos (ADCC) con polimorfonucleares periféricos, pero su papel "in vivo" no está claro. ^{149, 157}

Se cree que las células cebadas participan en la resistencia porque en ratones W'/W' (deficientes en células cebadas), la giardiasis se desarrolla en forma crónica, y el tratamiento antihistamínico prolonga la infección en ratones con G. muris. ¹⁴⁹

10. GENETICA

Existe una fuerte controversia sobre la existencia ¹⁷³⁻ ¹⁷⁴ o ausencia ^{177, 178} de relación entre la giardiasis y el grupo sanguíneo A. Sin embargo, un análisis estadístico reciente mostró que por cada 100 personas del grupo sanguíneo O con giardiasis, hay 143 del grupo sanguíneo A

con la misma infección; es decir, que el riesgo de enfermar de estos últimos es 43% más alto.¹⁷⁹

En el caso de la giardiasis murina no está definida la correlación entre la capacidad del suero inmune específico proveniente de ratones susceptibles (A/J) y resistentes (B10.A) a lisar trofozoitos de *G. muris* contra la habilidad de estas cepas de ratones a controlar la infección.¹⁸⁴

Otros autores que han trabajado sobre la relación de susceptibilidad y resistencia en diferentes cepas de ratones, concluyeron que no está controlada por el complejo de locus H-2, sino que guarda más relación con la dosis infectante de quistes; además, piensan que en el hombre la susceptibilidad puede segregarse con marcadores HLA.¹⁸⁰

Trabajos sobre marcadores genéticos en 48 individuos con infección crónica de giardiasis mostraron que ocho de ellos presentaban deficiencia en la respuesta humoral, pero la mayoría eran normales. El estudio del HLA y de los individuos deficientes mostró un número mayor de Ag HLA A1 y B12 y de los fenotipos A1/A2 y B12/B27, que pudieran estar relacionados con defecto en la respuesta inmune de estos individuos.¹⁸⁰

En otro estudio de tipificación de HLA, realizado en 30 individuos egipcios con giardiasis, los resultados mostraron un predominio de HLA-A2, HLA-B8 y HLA-B12; los pacientes con lesiones más severas en la mucosa duodenal correspondieron a HLA-B8 que, además, presentaban títulos bajos de IgA secretora intestinal.¹⁸¹

II. DESENUSTACION

Las bases del conocimiento actual sobre desenustacion fueron establecidas por Simon, ³ quien al observar un gran número de preparaciones de heces en fresco de pacientes con giardiasis, encontro formas vegetativas pequeñas, binucleadas y móviles, que propuso se trataban de "merozoitos" recién nacidos, que emergian de quistes del tracto digestivo en número de dos o mas.

Hegner realizó múltiples esquemas detallados, ¹⁴ donde señaló cinco tipos de quistes presentes en las heces y aseguró que estas formas se encuentran simultáneamente en el mismo individuo. Propuso que la desenustacion se inicia con gran actividad dentro del quiste, los nucleos se ven claros y polarizados, el contenido hace que el quiste se alargue y termine en punta y nace un trofozoito de cada quiste.

La inquietud por conocer el sitio preciso de la desenustacion en el tracto digestivo llevó a Hegner a realizar ensayos en modelos animales, utilizando quistes de *G. muris* y *G. enterica* humana inoculó a ratones directamente en el estómago, duodeno, yeyuno e ileon y los sacrificó en diferentes periodos. Sus observaciones le permitieron concluir que la desenustacion se realiza despues del estómago y que se requiere de tres factores para que se lleve a cabo: la estimulación de los jugos gastricos, la humedad y la temperatura de 37°C.

En esquemas detallados, Hegner marcó que el proceso de desenustacion se inicia con movimientos dentro del quiste, que se forma un extremo puntiagudo por donde sale el flagelo

posterior y confirmó que de cada quiste eclosionan dos trofozoítos. 10

Posteriormente modelos animales 102, 103 permitieron conocer los requerimientos y el lugar de desenquistación. Con estos antecedentes se elaboró un modelo "in vitro" para analizar con detalle el proceso. Para ello se utilizaron quistes obtenidos del hombre y de animales como: conejo, chinchilla, cobayo. Así se pudo determinar que existe un factor de inducción ácido dependiente pH 1.3 - 2.7, pero que requiere posteriormente de un medio neutro para completar el proceso. Mediante un "jugo digestivo sintético" e incubación a 37°C por periodos hasta de una hora, se observó la eclosión de dos trofozoítos, como "el escape de un fluido de balón, por un pequeño hoyo en el extremo del quiste".

El máximo porcentaje de desenquistación fue observado a los 5 y 15 minutos de ser expuestos a la solución de pH 0.5, y de 10 a 30 minutos con pH 2.0. Todo el proceso se observó en un porta-objeto excavado, bajo microscopio de luz invertida. Sin embargo los autores no localizaron un punto o extremo del quiste donde se iniciara el proceso. 31, 40

El procedimiento "in vitro" permitió conocer que los quistes requieren un tiempo de madurez de dos a siete días para ser desenquistados, y obtener un porcentaje de desenquistación hasta del 50%. 40, 104, 105

Las condiciones del proceso de desenquistación "in vitro" para *Giardia*, aislada del hombre variaron considerablemente al emplearse giardias murinas, (*G. muris*) logrando sólo un éxito del 5%. 27, 104

Sin embargo, al modificar la técnica con agentes reductores para crear un potencial de oxidación-reducción mayor de 120 mV, se obtuvo el 90% de desenquistación a los 30 minutos. Esto originó montar un método con potencial de oxidación-reducción +600 mV, pH 2.0 y temperatura de 37°C, lo que dio como resultado hasta 96.2% de desenquistación. 107

Los factores extrínsecos que inducen la desenquistación se han determinado, así como la secuencia en la liberación

de los trofozoitos ¹⁰⁰⁻¹⁰⁰ pero los fenómenos intrínsecos que ocurren en el proceso son desconocidos. Se ha sugerido que las enzimas endógenas localizadas en la periferia del citoplasma del quiste, que se activan a un pH ácido pueden jugar un papel importante en el fenómeno ²⁰.

En 1981 se habían determinado tres pasos en el proceso de desinquestración:

1. Solución inductora a pH ácido y temperatura de 37°C ^{100.100}
2. Lavados con solución de tripsina en Tyrode a pH 8.0 ¹⁰⁰.
3. Incubación en un medio de cultivo favorable ¹⁰¹, ¹⁰², esto para el caso de G. lamblia aislada del hombre y mamíferos inferiores.

Estas condiciones requieren además de un potencial de óxido-reducción de +600 mV en el caso de G. muris de ratones. ¹⁰⁷

Los criterios de viabilidad de quiste se basaron en:

1. Uso de colorantes como Eosina al 1% que permite diferenciar a los no viables, que se tiñen de rojo, de los viables que no permiten la entrada del colorante. ¹⁰¹
2. Técnicas de desenquistación. ¹⁰⁷
3. Capacidad infectiva en animales de laboratorio.
4. El empleo de sustratos fluorescentes, con diacetato de fluoresceína (FDA) y propidium iónico (PI) que permiten diferenciar que los quistes FDA (+) son viables e infectantes y los PI (+) no viables. ¹⁰²

III. MEDIOS DE CULTIVO

La obtención de cultivos en tubo de ensayo, a partir de trofozoítos obtenidos por técnicas de desenquistación o mediante contenido duodenal, que puedan subcultivarse por tiempos prolongados, es algo que actualmente se maneja en forma rutinaria en los laboratorios.

Las dificultades que los iniciadores tuvieron para lograr el mantenimiento "in vitro" han sido superadas por la introducción de medios de cultivo sintéticos que pueden manejarse fácilmente.

En la actualidad es posible mantener cultivos permanentes de G. lamblia aislada del hombre y mamíferos inferiores; no se han intentado los cultivos de G. agilis, y todos los intentos por subcultivar a trofozoítos de G. muris obtenidos por desenquistación, han sido infructuosos.

En los años 60 de este siglo se iniciaron los cultivos "in vitro"; en algunas de estas experiencias se obtuvieron trofozoítos de pacientes con giardiasis, por sondeo duodenal; se incubaron en un medio artificial a pH 6.4 que contenía infusión de hígado de cerdo, suero de conejo y antibióticos (penicilina y colomicina); sólo se lograron periodos de sobrevida de los trofozoítos de 10 a 12 días; el fracaso se atribuyó a la contaminación con bacterias. ¹⁷⁴

El primer método reproducible y utilizado para la producción masiva de trofozoítos se debe a Karapetyan, ¹⁷⁵ que cultivó G. duodenalis sobre fibroblastos de pollo, en asociación con Candida quillermondi, durante siete meses. Sus observaciones mostraron que los trofozoítos sobrevivieron a pesar de la destrucción de los fibroblastos, y que era indispensable sustituir las levaduras. Con el

propósito de aumentar el tiempo de sobrevivencia, probó con extracto de embrión de pollo, suero humano, digerido de carne de res y levaduras frescas de *Saccharomyces cerevisiae*, y logró mantenerlos por cinco meses.

Mediante estos cultivos monoxénicos logró aislar *G. duodenalis* de conejo y de humano y estimó que el tiempo de división era de 36 a 38 horas. Estandarizó el cultivo con medios denominados Li-1 con suero humano, extracto de embrión de pollo y solución de Hanks, y el Li-3 que además contenía digerido triptico de buey.¹⁹⁴

Los medios ideados por Karapetyan sirvieron de base a Soloviev,¹⁹⁷ para realizar cultivos monoxénicos de *G. duodenalis* de conejo y *Saccharomyces cerevisiae*, los que mantuvo por año y medio, con el único cambio de disminuir el suero humano del 25% al 10%.

Posteriormente modificaciones a los cultivos de Karapetyan, en las concentraciones de suero humano, adición de jugos pancreáticos y la asociación con levaduras, permitieron mantener subcultivos donde fue posible realizar los primeros estudios de cinética, para determinar el tiempo máximo de crecimiento exponencial y el tiempo de generación de 34 a 36 horas.¹⁹⁸

Desde la década de los 50, Meyer trató de cultivar *G. muris* en los medios de Karapetyan y los fracasos continuos lo llevaron a afirmar que los trofozoítos de las giardias murinas no podían ser cultivados en el laboratorio. Sus cultivos con *G. duodenalis* de conejo y chinchilla fueron sostenidos por 18 meses en condiciones monoxénicas con *S. cerevisiae*.¹⁹⁹

Meyer sustituyó las levaduras frescas por extracto de levaduras²⁰⁰ y sostuvo el crecimiento. Finalmente, en 1976 se lograron los cultivos axénicos¹⁹¹, libres de levaduras, subcultivados por año y medio, de trofozoítos de *G. duodenalis* de conejos, chinchillas, gatos, cobayos y del hombre.^{201,202}

Además se desarrollaron medios de cultivo específicos denominados HSP-1 y HSP-2, que contenían peptona, fitona, glucosa, L- cisteína, solución de Hanks, suero humano y antibióticos, todo a un pH 6.8 - 7.0, esterilizado en autoclave y en incubación a 37°C. También se logró aislar una cepa de mono que se mantuvo en el laboratorio por siete meses. ¹⁷¹

En una serie de trabajos quedaron reportados los experimentos de Iyer y Goitonde, de giardias aisladas de pacientes con diarrea aguda, en el medio clásico de Karapetyan, y en otro medio de cultivo. Obtuvieron tiempos de generación de 5.4 a 7.8 horas y subcultivos por varios meses.

Desde 1977 Visvesvara utilizó los medios de Meyer para los cultivos de *Giardia* y sustituyó el suero humano, por suero bovino, de caballo y de conejo. ²⁰³

Los medios TPS-1 que Diamond ²⁰⁴ desarrolló con gran éxito para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*, fueron utilizados por Visvesvara para adaptar a *G. lamblia* aislada en los medios de Meyer. El TPS-1 contiene trypticasa, pamede (extracto de hígado), cloruro de sodio, L-cisteína, ácido ascórbico, glucosa, suero de caballo y vitaminas, con un pH de 7. Habitualmente para el cultivo de amibas, el medio es esterilizado en autoclave y suplementado con 10% de suero de caballo y vitaminas; las modificaciones para el cultivo de *Giardia* fue la esterilización por filtración, doble cantidad de L-cisteína, suplementado con suero bovino y vitaminas.

El cambio fue en forma gradual, el máximo de crecimiento se logró a los siete días y el tiempo de generación fue de 12.2 horas ¹⁷², menor que lo reportado por Meyer, de 18.1 ²⁰⁰ y muy por debajo de lo obtenido por Karapetyan, de 36 a 38 horas. ¹⁷⁶

A raíz de la adaptación de *G. lamblia* a crecer en los medios de Diamond, surgieron un sinúmero de modificaciones para producir cantidades masivas de trofozoitos. Al medio

TPS-1 se le agregó agarosa al 0.22% para la obtención de colonias en un medio semisólido. ²⁰⁵ Debido a la inestabilidad del medio de TPS-1 en los lotes de pamede, se cambió al medio de TYI-S-33 y BI-S-33. ^{204,207}

En otros trabajos se reportó el uso de un medio libre de suero el cual fue sustituido por solución de lipoproteínas y colesterol, albúmina sérica bovina y bilis bovina; los demás componentes del medio TYI-S permanecieron iguales. ²⁰⁸

Keister consideró que las giardias que habitan el duodeno tienen como nutriente la bilis, por lo que agregó bilis bovina o porcina al medio TYI-S favorecía el crecimiento de los trofozoítos en el cultivo; también eliminó el uso de las vitaminas. Con esa combinación obtuvo un estupendo crecimiento con formación de monocapas adheridas a la pared del tubo, con máximo crecimiento a las 72 y 96 horas y un tiempo de generación de seis a siete horas. ²⁰⁹ También se probaron otras bilis de mamíferos. ²¹⁰

El TYI-S se propuso como medio rutinario para el aislamiento de cepas de G. lamblia, suplementado con suero fetal y bilis bovina, sin vitaminas y con antibióticos para evitar la contaminación. ¹⁹⁴ El programa de resiembras recomendaba cambios de medio cada 10 días. ²⁰⁷

El aislamiento de múltiples cepas de Giardia, tomadas del hombre y de mamíferos inferiores (a excepción de las murinas) se realizó sin dificultad con los medios TYI-S y BI-S; así se produjo el aislamiento de una cepa de castor ¹⁹⁰, veinte cepas humanas con técnicas de desenquistación artificial ²¹¹ y cepas humanas de individuos asintomáticos y sintomáticos. ²¹²

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La giardiasis es una protozoosis intestinal tres veces más común entre la población infantil, sobre todo en preescolares y escolares, que entre la población adulta de nuestro medio. En casi todos los estudios de prevalencia realizados en nuestro país, Giardia lamblia ocupa el primero o segundo lugar en frecuencia entre los menores de 12 años.

El amplio espectro clínico en estos grupos de edad es motivo de estudio para aclarar el verdadero papel patógeno de este parásito. Los estudios muestran una gran variabilidad en las manifestaciones que va desde una mayoría de individuos asintomáticos, aparentemente sanos, que pueden cursar con talla baja por deficiencia de absorción, hasta niños con diarrea de larga evolución que en pocas ocasiones presentan daño severo a la mucosa.

La facilidad de las técnicas de desenquistación "in vitro" y el manejo en forma rutinaria de los cultivos axénicos, han proporcionado al investigador un instrumento de trabajo, que puede ser utilizado para contestar gran número de preguntas sobre la biología, epidemiología y patogenia de este protozoario intestinal.

Las características de inducción "in vitro" de desenquistación, así como la observación microscópica del proceso, y las condiciones por mantener los subcultivos axénicos durante tiempos prolongados que se conocen y manejan en nuestro medio, provienen de los Estados Unidos de Norteamérica y han servido de base para estudios en nuestro país.

Los resultados que se obtienen podrían corresponder a características propias de raza o cepa, y ser diferentes al comportamiento de la G. lamblia aislada de la población infantil mexicana.

Las evidencias que sugieren que la giardiasis en México difiere de la observada en otras regiones del mundo, podrían confirmarse, al realizar estudios de desenquistación "in vitro" y axenización de cepas de G. lamblia de individuos infectados en nuestro medio.

Este trabajo se inició en 1985, cuando en México todos los estudios sobre giardiasis eran realizados con las cepas Portland-1, aislada por Meyer en 1976 y la cepa WB, aislada por Gillin en 1981.

El propósito principal de este trabajo fue axenizar trofozoítos de G. lamblia, obtenidos mediante inducción "in vitro" de desenquistación. Para lo cual los parásitos se aislaron de heces de niños atendidos en la consulta externa del Hospital Infantil de México Federico Gómez, cuyos exámenes coproparasitológicos realizados en el Laboratorio de Parasitología del mismo hospital resultaban positivos con quistes de Giardia lamblia.

El trabajo implica conocer las condiciones y requisitos de todo el proceso de desenquistación y axenización de cepas aisladas de niños mexicanos, para investigar las diferencias o similitudes que tienen con poblaciones de otros países.

V. HIPOTESIS

Si consideramos que la patología de la giardiasis en nuestro país presenta características propias y diferentes al comportamiento en otras áreas geográficas, entonces, al obtener cultivos axénicos a partir de desenquistación de G. lamblia aislada de niños mexicanos, daremos el primer paso en la tipificación y caracterización de cepas autóctonas de este protozoo, que permitan entender la biología, epidemiología y clínica de la giardiasis infantil en México.

VI. OBJETIVOS

1. Definir las condiciones de desenquistación y axenización de G. lamblia aislada de niños infectados con cepas mexicanas.
2. Estandarizar un proceso sencillo y rápido para obtener trofozoítos de G. lamblia a partir de la inducción "in vitro" de quistes aislados de heces de niños mexicanos.
3. Establecer cultivos axénicos de los trofozoítos obtenidos por desenquistación, en un crecimiento prolongado y libre de otros microorganismos, bajo condiciones controladas en el laboratorio.
4. Disponer de cepas axenizadas de G. lamblia para ensayos de mantenimiento continuo en tubos de cultivo.
5. Contar con cultivos axénicos de G. lamblia para tipificar y caracterizar cepas autóctonas para estudios biológicos, epidemiológicos y fisiopatológicos de la giardiasis infantil en México.

VII. MATERIALES Y METODOS

1. MATERIAL DE ESTUDIO. Se trabajó con niños atendidos en la consulta externa del Hospital Infantil de México, Federico Gómez. A cada niño se le realizaron exámenes coproparasitológicos (CPS) en serie de tres, en el Laboratorio de Parasitología del mismo hospital. Se elaboró una ficha de registro del niño que ingresó al estudio en la que, además de consignar sus datos de identidad, se anotaron los resultados de los exámenes CPS.

2. MUESTRAS BIOLÓGICAS. La elección de las muestras de heces se basó en el resultado de la técnica CPS de concentración por flotación Ferreira 1:10 (apéndice técnico 1). Se procedió a separar las muestras de heces que resultaron positivas con quistes de G.lamblia y que, a la observación microscópica, mostraron más de 1 000 quistes/campo. Las muestras así seleccionadas se conservaron en refrigeración a 4°C, por 24 y 48 horas hasta su procesamiento.

3. CONCENTRACION DE QUISTES. Para los propósitos del trabajo se requirieron grandes cantidades de quistes, por lo que se probaron varias técnicas de concentración de quistes; sedimentación con formol-éter, flotación con sulfato de zinc, flotación con glucosa y gradiente simple de sacarosa, para seleccionar aquella que permitiera la obtención de un mayor número de quistes sin alterar la integridad y viabilidad de estos.

Los métodos a base de formol-éter y sulfato de zinc, debido a que fijan los quistes, estos pierden viabilidad, por lo tanto fueron descartados.

Las dos técnicas seleccionadas, flotación Ferreira glucosa (FFG) y gradiente simple de sacarosa (GSS) se sometieron a un estudio comparativo. La técnica FFG 1:10 de acuerdo al método descrito por Biagi 213 con algunas modificaciones como fueron el uso de glucosa a una densidad de 1.190 baumé, como medio de flotación, en lugar del sulfato de zinc y la omisión de la fijación con formol (apéndice técnico 2).

Para la separación con GSS 60 se homogeneizó la muestra de heces con solución salina adicionada con antibiótico, posteriormente se centrifugó en frío a 600 Xg en una solución de 0.85M de sacarosa; la interfase con el paquete de quistes se localizó entre la solución salina mas antibióticos y la sacarosa, y en el sedimento se depositaron los detritus de las heces (apéndice técnico 3). Ambas pruebas conservaron viables los quistes después del proceso.

4. CUANTIFICACION DE QUISTES. Una vez concentrados y purificados, los quistes fueron contados en la cámara de Neubauer y se estimó el número total de quistes por ml. De acuerdo con los resultados del conteo se prepararon alícuotas de un mililitro (Apéndice técnico 4) que contenían cuatro millones de quistes, los cuales fueron procesados para desenquistación.

5. PURIFICACION DE QUISTES. Durante el proceso de separación y concentración de quistes, fue necesario eliminar contaminantes como enterobacterias y hongos. Para tal efecto, los quistes fueron sometidos a la acción de varias combinaciones de antibióticos, cuya efectividad se probó mediante siembras de quistes tratados, en medios de

cultivo específicos para Gram (+) y (-) (Mc Conkey, EMB, SS, Gelosa sangre) y hongos (Sabouraud y Micosel).

En la purificación se empleó solución salina isotónica estéril con antibióticos como penicilina, estreptomina, gentamicina, nitromicina, ketoconazol y anfotericina B, en diferentes combinaciones y concentraciones (apéndice técnico 5 y 6).

La solución con mayor efectividad se empleó en el homogeneizado para la concentración de quistes y en el lavado de los paquetes obtenidos del gradiente. También se usó de dos a tres veces después de la incubación en HCl y, finalmente, se conservaron en un volumen de 0.5 y 1.0 ml, para la inoculación en los medios de cultivo.

6. DETERMINACION DEL NUMERO DE NUCLEOS EN QUISTES. El número de núcleos presente en los quistes tiene relación con la madurez y ésta con la exquistación. Para conocer el estado de madurez que guardan los quistes se observó el número de núcleos en los concentrados de las muestras de heces recién eliminadas, en una preparación directa coloreada con azul de algodón. Por observación microscópica en un sistema óptico de luz y con objetivo de 100x se realizó una cuenta diferencial de 100 quistes bi y tetranucleados. El resultado de cinco lecturas se promedió y se reportó en porcentaje de madurez de los quistes (apéndice técnico 7).

7. VIABILIDAD DE QUISTES Era primordial que los quistes, después de concentrados y purificados, conservaran su viabilidad para el proceso de desenquistación. Para conocerlo se empleo un examen directo con Eosina Y al 1%, que permitió cuantificar los quistes viables y los no viables. Esta tinción distinguió a lo quistes viables, que permanecieron sin coloración, de los no viables, teñidos de

rojo con el colorante. Esta técnica que permito así mismo determinar diferencias morfológicas entre los quistes, los caracteres tomados en cuenta para el estudio morfométrico diferencial fueron principalmente: tamaño, integridad de la pared quística, número de núcleos y estructuras contenidas en el citoplasma (apéndice técnico 8).

B. INDUCCION DE DESENQUISTACION. De acuerdo con las características ácido dependientes en la inducción, se probaron varias soluciones de HCl, en concentraciones 1N, 0.5N y 0.1N preparadas con distintas clases de agua (corriente, destilada, tridestilada, desionizada y desionizada inyectable), a diferentes pH y en tiempos variables de incubación a 37°C.

Los estudios preliminares con una serie de soluciones nos permitieron, finalmente, seleccionar dos para continuar con el desarrollo del proceso: la primera de HCl 1N a pH 0.5 y la segunda de HCl 0.1N a pH 1.6, ambas preparadas con agua desionizada inyectable. Se montaron dos ensayos de diez muestras cada uno, para valorar la eficacia de las soluciones, y se determinó en cada uno de los ensayos, el porcentaje de desenquistación de acuerdo con la fórmula 107:

$$\%D = \frac{T + QV}{T + QV + QC} \times 100$$

T = trofozoitos
 QV = quistes vacíos
 QC = quistes completos

Los resultados permitieron seleccionar a la solución idónea para el proceso (apéndice técnico 9).

Después de la incubación, los quistes se lavaron de dos a tres veces con solución salina y antibiótico, para acercarlos a la neutralidad, y de inmediato fueron puestos en los tubos con medios de cultivo.

9. DESENGUÍSTACION. La inducción de desenquistación es ácido dependiente, pero la liberación final de los trofozoitos ocurre en el medio de cultivo con pH neutro; ambos procesos requieren temperatura de 37°C.

Para lograr la eclosión de trofozoitos de los quistes inducidos, se utilizaron tres modificaciones de la fórmula básica del medio TYI-S (apéndice técnico 10).

En la primera se sustituyeron la tripticasa y el extracto de levadura por la peptona de biotriptasa, que contiene extracto de levadura y digerido pancreático de caseína PB-Bb-S de fabricación nacional (Bioxon); el segundo medio se utilizó de acuerdo con la fórmula original TYI-S, y por último, se empleó la variante de BI-S que contiene biosate, en lugar de tripticasa y extracto de levadura.

En todos los casos, se empleó doble cantidad de L-cisteína y suplementó con bilis y suero bovino. El medio se esterilizó por filtración en cuarto estéril (apéndice técnico 11). El medio se utilizó dentro de las dos semanas de su preparación y se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su uso.

El volumen final de 0.5 ml de quistes inducidos y mantenidos en solución salina con antibiótico, se inoculó en los tubos de tapón de rosca, con 7 ml de medio de cultivo; este procedimiento se realizó bajo condiciones estrictas de esterilidad. Los quistes en el medio de cultivo se incubaron a 37°C (apéndice técnico 12).

Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo el fenómeno de desenquistación y el desarrollo de todo el proceso, se observaron detenidamente bajo microscopía y se tomaron registros fotográficos y se realizaron esquemas con el objetivo de 100x para establecer las diferencias o similitudes, con lo antes descrito en cepas aisladas en otros países.

Se hicieron observaciones directas, entre porta y cubre-objeto en preparaciones no teñidas y también en preparaciones teñidas, unas con azul algodón y otras con

Eosina (apéndice técnico 13), para determinar el tiempo que transcurre durante el proceso, los cambios en las diferentes fases en el desarrollo de los trofozoítos hijos y definir las estructuras presentes. Debido a que el material que se observó se encuentra en fresco con o sin coloración, las preparaciones fueron delgadas y se revisaron al microscopio a 100x, bajo microscopio óptico con un sistema de iluminación de campo claro y de contraste de fases.

Así mismo se elaboraron preparaciones permanentes teñidas con colorante de Giemsa en concentración 1:45 (apéndice técnico 14), que facilitó la observación del proceso y la descripción de las fases. Tanto las preparaciones en fresco, teñidas o no, como las de tinción permanente, se elaboraron del material incubado en el medio TYI-S y BI-S en periodos de 1, 2 y 24 horas.

10. AXENIZACION Y RESIEMBRA. Con la finalidad de que, los trofozoítos pudieran multiplicarse en los medios de cultivo, en ausencia de microorganismos, se empleó desde la técnica de concentración la solución salina con antibióticos, así como en todos los lavados hechos entre la inducción y la inoculación en el medio de cultivo.

El volumen final de un mililitro de quistes inducidos y mantenidos en solución salina con antibiótico, se inoculó en los tubos de tapón de rosca de 16 x 125 mm con 13 ml de medio de cultivo (apéndice técnico 15).

Una vez que eclosionaron los trofozoítos en los tubos de cultivo, se revisaron bajo el microscopio con luz invertida, para verificar la movilidad, y se mantuvieron en incubación a 37°C por 24 horas más.

Transcurrido el tiempo de incubación, se reconoce si se logró la axenización o no, al observar la transparencia del medio; para verificar la axenización de los cultivos se tomaron muestras de estos y se realizó la comprobación

bacteriológica, sembrando en medios de cultivo para bacterias y hongos.

Cuando los trofozoitos crecían en forma libre, el tubo de cultivo se centrifugó a 600 Xg por cinco minutos, se retiró el sobrenadante, y el sedimento resuspendido en un volumen de un mililitro, fue transferido a un tubo con medio de cultivo nuevo. Los medios de cultivo conservados a 49C se colocaban en la estufa hasta igualar la temperatura de 379C antes de ser utilizados, para que el cambio de temperatura no fuera brusco.

Cuando los trofozoitos formaron monocapa, se cambió el medio de cultivo; sin desprender la monocapa, se agitó ligeramente y los tubos se incubaron en forma inclinada a 379C.

Al inicio del establecimiento del cultivo, el cambio de medio se realizó diariamente, poco a poco se espació el tiempo hasta que se estableció un calendario de resiembras. Para espaciar los cambios de medios, se verificó bajo el microscopio de luz invertida que los trofozoitos tuvieran buen crecimiento y estuvieran exentos de contaminantes. Si a las 24 horas de incubación, después de varios cambios diarios, el medio estaba claro y con buen desarrollo, el tubo sin alterar su contenido se incubó por otras 24 horas. Nuevamente se realizó la comprobación bacteriológica.

Al completar la incubación de 48 horas, se verificaron bajo el microscopio de luz invertida el crecimiento y la axenización, y se realizó un cambio de medio como en los casos anteriores, según el tipo de crecimiento. Si éste disminuía, se volvía al cambio de medio cada 24 horas, pero si continuaba un buen crecimiento sin contaminantes, se establecía un calendario de recambios cada 72 horas.

Cuando se aseguró el crecimiento de la cepa, los subcultivos continuaron con resiembras cada 72 horas bajo condiciones diferentes. Los tubos con cultivo abundante eran retirados de la estufa de incubación a 379C y colocados

en la mesa de trabajo a temperatura ambiente. Los trofozoítos se desprendían de la monocapa y quedaban libres en el medio, con una pipeta graduada estéril se tomó un inóculo de un mililitro de la suspensión de trofozoítos y se sembró en un tubo de 16 x 125 mm con 13 ml de medio. En cuentas de cámara de Neubauer, el inóculo de un mililitro aproximadamente contenía entre 1×10^3 a 1×10^6 de trofozoítos. De esta forma, se sembraron varios tubos.

El contenido de trofozoítos restantes en el medio de cultivo del que se tomaban los inóculos, se utilizó para conteo de crecimiento y determinación del número de trofozoítos por mililitro. Se realizaron control bacteriológico y preparaciones en fresco y permanentes para estudios morfométricos.

VIII. RESULTADOS

1. MATERIAL DE ESTUDIO. En el Laboratorio de Parasitología del Hospital Infantil de México, Federico Gómez, durante 1987 y 88 se realizaron, en promedio, 17,826 coproparasitoscópicos (CPS) Ferreira 1:10, que corresponden aproximadamente a 8,054 niños. Los resultados señalan que el 25% son positivos a parásitos intestinales, de los cuales *Giardia lamblia* se identifica en el 42.6% y ocupa el primer lugar de frecuencia. (Datos del Laboratorio de Parasitología HIMFG)

Para la realización de este estudio se separaron 500 muestras de heces positivas a quistes de *G. lamblia*, correspondientes a niños, desde recién nacidos hasta los 16 años de edad.

2. SELECCION DE MATERIAL. De las 500 muestras de heces positivas con quistes de *G. lamblia*, se seleccionaron 370, que mostraron más de 1,000 quistes de *G. lamblia* por campo. Ningún niño menor de un año presentó más de 1,000 quistes/campo.

Los niños incluidos en el estudio tenían de uno a 16 años de edad; el 53.3% residía en el Área Metropolitana de la Ciudad de México y el 46.7% provenía de diversos estados de la República.

Los pacientes acudieron a consulta por presentar ciertas manifestaciones gastrointestinales, cuyos principales signos y síntomas fueron, en orden de frecuencia: dolor abdominal, diarrea crónica, vómito, cefalea, distensión abdominal e hiporexia, que se

presentaron en el 42.4% de los niños, y quedó un grupo mayoritario de asintomáticos, del 57.6%.

Las muestras de heces con quistes de G. lamblia almacenadas en refrigeración a 4°C durante 24 y 48 horas, conservaron viables los quistes antes de su procesamiento.

3. CONCENTRACION Y CUANTIFICACION DE QUISTES. El estudio comparativo entre la técnica de Flotación Ferreira con Glucosa (FFG) y la de Gradiente Simple de Sacarosa (GSS), mostró que con la de FFG se concentraron de 1.11 a 7.24×10^4 quistes, mientras que por la técnica GSS se obtuvieron de 5.38 a 24.89×10^4 quistes; el valor de t de student fue significativo a un nivel menor del 5% para la técnica de Gradiente Simple de Sacarosa (Cuadro 1).

Cuadro 1. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DOS PROCEDIMIENTOS DE CONCENTRACION DE QUISTES DE Giardia lamblia

TECNICA	n	RANGO ($\times 10^4$)	\bar{X}	SD
FLOTACION FERREIRA GLUCOSA	20	1.11-7.24	3.54	2.26
GRADIENTE SIMPLE DE SACAROSA	20	5.38-24.89	11.09	± 12.50

Prueba t de student $p < 0.05$

n= número de ensayos \bar{X} = promedio SD= desviación estándar

La cuantificación de paquetes de quistes obtenidos por concentración con GSS de 370 muestras de heces, con cámara de Neubauer, mostró cuentas desde 500,000 hasta 24 millones de quistes por gramo de heces; 54 muestras (14.6%) tuvieron cuentas de quistes menores de un millón; 116 muestras (31.4%) con quistes entre un millón y cuatro millones y, finalmente, el porcentaje más alto de 54.0% (200 muestras)

60

contenían más de cuatro millones de quistes por gramo de heces.

4. PURIFICACION DE QUISTES. Los primeros 20 ensayos de purificación con diferentes combinaciones de antibióticos, verificados en cultivos selectivos para Gram positivos y negativos y de hongos, mostraron desarrollo de enterobacterias como Escherichia coli, Klebsiella spp, del Gram (+) Bacillus subtilis así como de la levadura Candida spp.

La combinación de penicilina con estreptomycin permitió exclusivamente el desarrollo de Gram (-) y levaduras; esta misma combinación más ketoconazol impedía el crecimiento de levaduras, pero los restos de este antifúngico dañaban a los trofozoítos de G. lamblia. Al utilizar la netromicina con penicilina y estreptomycin, no se lograba erradicar a las levaduras; lo mismo sucedió con la combinación de gentamicina.

Finalmente, la solución salina estéril mas un millón de unidades de penicilina, 1 g de estreptomycin, 100 mg de gentamicina y 50 mg de anfotericina B, permitió la desenquistación libre de contaminantes de las heces.

5. CUENTA DIFERENCIAL DEL NUMERO DE NUCLEOS EN LOS QUISTES. El conteo diferencial de 100 quistes recién eliminados, con objetivo de 100% y promedios de cinco lecturas, en 50 ensayos demostraron que existe un predominio del 97.1% de quistes tetranucleados (cuadro 2).

Cuadro 2. CUENTA DIFERENCIAL DEL NUMERO DE NUCLEOS EN QUISTES DE *Giardia lamblia* RECIEN ELIMINADOS

QUISTES	n	RANGO	\bar{X}	DS	%C.V.
TETRANUCLEADOS	50	93-99	97.1	± 1.91	1.96
BINUCLEADOS	50	1-7	2.9	± 1.91	65.83

n= numero de ensayos \bar{X} = promedio DS=desviación estandar
 %C. V. porcentaje de coeficiente de variación

6. VIABILIDAD DE LOS QUISTES. En observaciones de quistes recién eliminados y concentrados por gradiente simple de sacarosa, la coloración con eosina muestra que entre el 75 y el 76% corresponde a quistes completos, íntegros y sin coloración, lo cual los identifica como viables. Entre el 24 y el 25 % de quistes toman la coloración rosa de la eosina y permiten la penetración del colorante, señalándolos como no viables (cuadros 3 y 4). Dentro de este 25% se observa de un 13 a un 14% de quistes íntegros con contenido citoplasmático escasamente retraído, marcado sistema lacunar y núcleos evidentes.

Del 10 al 11.5% de los quistes muestran un contenido muy retraído y granuloso, con un amplio sistema lacunar, quistes con dimensiones de 10.5 a 13.0 μ m, donde no se distinguen estructuras intracitoplasmáticas como núcleos, axonemas y axostilos; estos se denominan "quistes fantasmas", se confunden con otras estructuras y son lo que resta de un quiste verdadero (figuras 1 y 2).

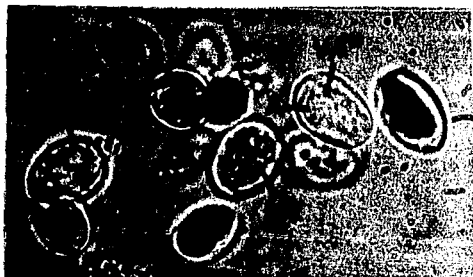


Figura 1. QUISTES DE *G. lamblia* TEÑIDOS CON EOSINA. Se observan los quistes viables, sin coloración, grandes y alargados. (VA), con núcleos (N), axonemas y axostilos (A). Quistes no viables (NV), teñidos de rojo y quistes fantasmas (F) con un gran sistema lacunar. Observación "in vivo" en contraste de fases. 1250 X.

Cuadro 3. VIABILIDAD DE QUISTES DE Giardia lamblia
RECIENTE EXPULSADOS EN LAS HECEAS

QUISTES	n	RANGO	X	DS	%C.V.
COMPLETOS NO TERIDOS	12	72-77	75.0	±2.30	3.06
COMPLETOS TERIDOS	12	10-18	13.4	±2.75	20.52
RETRAIDOS TERIDOS	12	8-16	11.5	±2.50	21.73

n= número de ensayos X= promedio DS= desviación estandar
%C.V.=porcentaje de coeficiente de variación

Cuadro 4. VIABILIDAD DE QUISTES DE Giardia lamblia
OBTENIDOS POR GRADIENTE SIMPLE DE SACAROSA

QUISTE	n	RANGO	X	DS	%C.V.
COMPLETOS NO TERIDOS	12	73-78	76.0	±1.70	2.23
COMPLETOS TERIDOS	12	10-18	14.0	±2.67	19.07
RETRAIDOS TERIDOS	12	8-12	10.0	±1.72	17.20

n= número de ensayos X= promedio DS= desviación estandar
%C.V.= porcentaje de coeficiente de variación.

La tinción con eosina permite distinguir, dentro del grupo de los quistes ovaes viables, tres tipos de acuerdo con el tamaño y la forma:

Pequeño	Grande	Alargado
largo 10.5--12.5 μm	largo 12.5--14.0 μm	largo 15.0--15.7 μm
ancho 7.0--8.5 μm	ancho 8.7--10.5 μm	ancho 7.0 μm

Dentro de los quistes completos no viables, se distinguen los completos con estructuras internas bien identificadas, con la retracción del contenido que da origen al sistema lacunar, de tamaño pequeño o grande (figura 2).

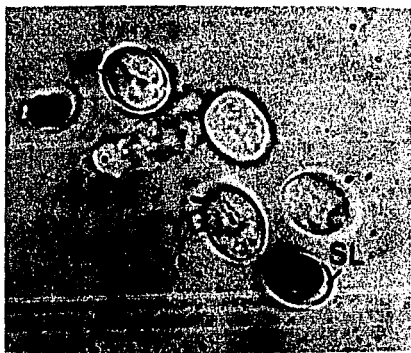


Fig 2. QUISTES DE *G. lamblia* TEÑIDOS CON EOSINA viables de tamaño pequeño (VP) y grandes (VG) Quistes en inicio de desenquistación (D) Quistes no viables teñidos de rojo con marcado sistema lacunar (SL). Observación en fresco. 1 250 X.

7. INDUCCION "IN VITRO" DE DESENQUISTACION. Se logró entre 45 y 53 por ciento de desenquistación con una solución de HCl 0.1N a pH 1.6 en periodos de incubación de 30 y 40 minutos (cuadro 5). Se obtuvo un promedio de 45.8% de desenquistación con HCl a pH 0.5 con 15 minutos de incubación y disminuyó a 31.9% cuando la incubación se prolongó por 20 minutos (cuadro 6).

Los quistes no sometidos a la acción de solución inductora y colocados en el medio TYI-S permanecieron completos sin desenquistar; lo mismo sucedió con los inducidos que no desenquistaron en las primeras horas.

Cuadro 5. INDUCCION "IN VITRO" DE DESENQUISTACION DE Giardia lamblia EN POR CIENTO*

TIEMPO	N	RANGO	X	DS	%C.V.
20'	10	-----	----	-----	----
30'	10	45 - 52	48.3	±2.45	5.07
40'	10	41 - 53	48.4	±3.69	7.62
50'	10	-----	----	-----	----

* 4X10⁴ quistes (1 ml)+HCl 1N pH 1.6 (9 ml) a 37°C

Cuadro 6. INDUCCION "IN VITRO" DE DESENQUISTACION DE Giardia lamblia EN PORCIENTO*

TIEMPO	n	RANGO	X	DS	%C.V.
10'	10	-----	----	-----	----
15'	10	44 - 48	45.8	±1.40	3.05
20'	10	27 - 34	31.9	±3.93	12.30

*4X10⁴ quistes (1 ml)+HCl 1N pH 0.5 (9ml) a 37°C

8. DESENQUISTACION DE QUISTES RECIEN EMITIDOS Y REFRIGERADOS. Cuando la desenquistación se llevó a cabo el mismo día en que los quistes fueron eliminados, se obtuvo un desenquistamiento del 38.2% y cifras ligeramente superiores al segundo y tercer día de refrigeración; el porcentaje más alto, del 46.6, se alcanzó a las 48 horas de su eliminación (cuadro 7).

Cuadro 7. EDAD Y PORCENTAJE DE DESENQUISTACION DE QUISTES DE Giardia lamblia REFRIGERADOS

DIA	n	RANGO	X	DS
1	10	21-51	38.2	± 10.95
2	10	23-51	36.7	± 8.47
3	10	37-53	46.6	± 5.83
4	10	33-51	43.0	± 5.08

n= número X= promedio DS= desviación estandar

9. DESENQUISTACION Y MEDIOS DE CULTIVO. Se realizaron 30 ensayos en tres diferentes medios de cultivo para completar la desenquistación e iniciar la axenización.

El primer medio que se probó fue de acuerdo con la fórmula del TYI-S sustituyendo la tripticasa y el extracto de levadura por la peptona de biotriptasa (PB-Bb-S) con bilis y suero bovinos, todo de fabricación nacional (Bioxon).

Los resultados mostraron que se podía lograr desenquistación en un porcentaje de 27.1, y cultivos primarios en 12 cepas, con cambio de medio diario, sostenidos por dos semanas; después de este tiempo el desarrollo disminuyó y a pesar del cambio diario de medio, finalmente, las cepas se perdieron.

Al utilizar el medio TYI-S con tripticasa y extracto de levaduras, sin vitaminas y suplementado con bilis y suero bovinos, se logró un 48.4% de desenquistación y se axenizaron 20 cepas, mantenidas por ocho semanas. Resultados mejores se obtuvieron con el medio BI-S que contiene biosate suplementado con bilis y suero bovino, al lograr un 49.9% de desenquistación y 28 cepas de cultivos axénicos, sostenidos 10 semanas (cuadro 8).

Cuadro 8. DESENQUISTACION DE Giardia lamblia EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO	n	RANGO	X	DS	%C.V.
PB-Bb-S	30	22-32	27.1	±3.25	11.99
TY-S	30	41-52	48.4	±3.69	7.62
BI-S	30	47-53	49.9	±2.18	4.36

10. DESENQUISTACION. La desenquistación completa con la liberación de dos trofozoítos de un quiste inducido, se logra en los medios de cultivo a 37^o. La secuencia en el proceso la presentaremos en una serie de imágenes fotográficas, que marcan con detalle la eclosión de los trofozoítos.

DESENQUISTACION DE CERO A CINCO MINUTOS. Lo primero que se observa es el alargamiento en la forma del quiste, seguido por una retracción en el contenido al aumentar los espacios lacunares, la pared del quiste se conserva intacta. El contenido citoplasmático muestra cuatro núcleos y axonemas. Además puede verse una cantidad de quistes sin cambios (figura 3).



Fig. 3. QUISTES DE *G. lamblia* EN PROCESO DE DESENQUISTACION. La imagen izquierda muestra un quiste íntegro, alargado, con núcleos (N) y restos de disco adhesivo (DA). A la derecha se observa un quiste de contenido retraído, con sistema lacunar (SL).
Observación en fresco. Contraste de fases. 1 250 X.

DESENQUISTACION: CINCO A DIEZ MINUTOS DESPUES DE INDUCIDO EL PROCESO. En este período aumenta el alargamiento en los quistes hasta 15.0 a 15.7 μm , en algunos, el contenido se repliega sobre un extremo y se observa muy denso, como si hubieran aumentado las estructuras en el interior y formado una "madeja de flagelos". Los núcleos se localizan polarizados, con endosoma denso; en el mismo extremo se distingue el sistema lacunar (figuras 4A y 4B).



Fig. 4. QUISTE DE *G. lamblia* EN PROCESO DE DESENQUISTACION DE CINCO A DIEZ MINUTOS.
A) Quiste alargado que muestra en el extremo inferior un aumento de estructuras como "madeja de flagelos" (MF)
B) En el extremo superior se observan los núcleos polarizados (N) y el sistema lacunar (SL).
Observaciones en fresco. Contraste de fases. 3500.

DESENQUISTACION: 10 a 15 MINUTOS DESPUES DE INDUCIDO EL PROCESO. En este periodo se observa que el extremo opuesto a la polarización de los núcleos se prolonga en punta, donde hay un vaciamiento del contenido y forma una "burbuja" que aumenta de tamaño. Esto corresponde a la zona de la "madeja de flagelos" donde se están formando los flagelos y presionando contra la pared del quiste. La "burbuja" finalmente se rompe y libera un flagelo que se agita vigorosamente, y de inmediato, aparecen de dos a cuatro flagelos que se azotan con mucha fuerza. La cromatina nuclear se torna fragmentada y los núcleos permanecen polarizados (figura 5).



Fig. 5. QUISTE DE G. lamblia EN PROCESO DE DESENQUISTACION DE 10 A 15 MINUTOS. Quiste completo aumentado de tamaño, con un vaciamiento en un extremo formando una "burbuja". Observaciones en fresco. Contraste de fases. 1 250 X.

DESENQUISTACION: 15 A 20 MINUTOS DESPUES DE INDUCIDO EL PROCESO. En este periodo corresponde la salida de los trofozoítos hijos del quiste. En ocasiones la división celular se sucede tan rápidamente que los trofozoítos recién formados no salen del todo del quiste, y parte de ellos queda dentro, distinguiéndose sólo en forma libre los discos adhesivos y flagelos. A veces las células hijas están totalmente formadas pero aún permanecen unidas al quiste por la porción terminal.

Cuando la temperatura de la suspensión entre porta y cubre-objeto disminuye, se observa un retraso en el proceso. El contenido del quiste puede salir como una gran masa flagelada, sin división de las células hijas y permanecer así por espacio de varios minutos, y no completar la formación de los trofozoítos hijos. En esta etapa la cromatina de las células hijas permanece fragmentada y no se localiza cuerpo medial.



Fig 6. QUISTES DE *G. lamblia* EN PROCESO DE DESENQUISTACION 15 A 20 MINUTOS. En el lado derecho se muestran los trofozoítos hijos parcialmente fuera del quiste, se distinguen el disco adhesivo (DA) de una de las células hijas y flagelos (F) agitándose libremente. A la izquierda se observan quistes completos con núcleos (N) condensados y sistema lacunar (SL). Observación en fresco. 1 250 X.

DESENQUISTACION: 20 MINUTOS DESPUES DE INDUCIDO EL PROCESO. En este periodo los trofozoitos logran la eclosion del quiste y permanecen "en pareja" desplazándose libremente en círculo y con gran actividad. En esto se distinguen los discos adhesivos bien desarrollados y cada trofozoito hijo con ocho flagelos. Los trofozoitos están unidos por la porción terminal, donde no hay un disco adhesivo (parte del canal ventral) y se pueden observar así hasta dos horas después de emergidos del quiste. La cromatina nuclear es de tipo granuloso y carecen de cuerpo medial (figura 7A). Al final de la división celular, los trofozoitos se separan por la región terminal del cuerpo y forman un "puente de union" en el extremo caudal del cuerpo (figura 7B).

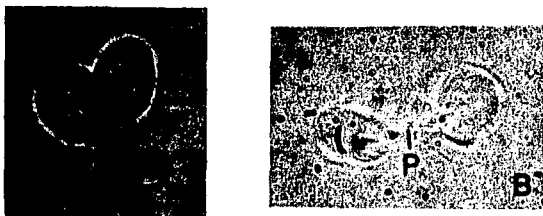


Fig. 7. QUISTES DE *G. lamblia* EN PROCESO DE DESENQUISTACION 20 A 30 MINUTOS
 A) muestra a dos células hijas unidas "en pareja", con núcleos (N) en posición anterior y cromatina fragmentada. Sin cuerpos mediales.
 B) muestra el "puente" (P) que se forma en los último momentos de la división celular.
 Observaciones en fresco. 1 250 X.

DESENQUISTACION DESPUES DE 20 MINUTOS. A los 20 minutos despues de iniciado el proceso de desenquistación los trofozoítos recién eclosionados se separan y se desplazan en forma individual. Miden de 10.5 a 11.0 μm de largo y 8.0 μm de ancho. Se nota un gran disco adhesivo, los ocho flagélos, los núcleos y la cromatina nuclear fragmentada, axonemas y axostilos y carecen de cuerpo medial. Pueden encontrarse trofozoítos libres cinco o diez minutos después de haber sido colocados los quistes inducidos en el medio de cultivo, o pueden permanecer en parejas por tiempos muy prolongados (figura 8).



Fig. 8. TROFOZOITO DE *G. lamblia* RECIEN ECLOSIONADO, se señala el disco adhesivo (DA), flagelos (F) móviles. 1 250 X.

La desenquistación se ve afectada por la temperatura, cuando ésta disminuye, el proceso se ve interrumpido en alguno de los pasos y puede no completarse. Cuando se detiene en el momento en que se forma la "burbuja" se encuentra una gran cantidad de quistes con vaciamiento en un extremo. Así mismo puede tardar el proceso de la salida de los flagelos y en esta etapa se observan "quistes flagelados". La disminución de la temperatura es capaz de provocar que la división celular no se concluya y haga eclosión una masa flagelada sin diferenciación.

11. AXENIZACION Y RESIEMBRAS. Se considera que la axenización de una cepa se logra cuando el crecimiento sin contaminación puede sostenerse en subcultivos cada 72 horas con un inóculo conocido.

A continuación desglosamos los resultados de las 500 muestras de heces con quistes de *G. lamblia* que fueron procesadas durante el tiempo de estudio, cuyos resultados se obtuvieron en forma periódica.

De las 500 muestras de heces procesadas por el método CPS Ferreira 1:10, identificadas como positivas con quistes de *G. lamblia*, se seleccionaron 370, que a la observación microscópica mostraban más de 1,000 quistes por campo. Al realizar las cuentas de quistes en cámara de Neubauer, 220 de las 370 muestras de heces contenían más de cuatro millones de quistes por gramo de heces, y se escogieron para el estudio.

Las 200 inducciones de desenquistación se completaron en tres diferentes medios de cultivo, de esta, en 80 ensayos no se obtuvo desenquistación; 40 se realizaron en peptona de biotriptasa (PB-Bb-S), 20 en tripticasa y extracto de levadura (TYI-S) y 20 en biosate (BI-S), todos suplementados con bilis y suero bovino mas antibiótico. En los restantes 120 ensayos si lograron eclosionar los trofozoítos; 33 ensayos en medio PB-Bb-S, 40 ensayos en TYI-S y 47 ensayos en BY-S (cuadro 9).

Cuadro 9. 200 ENSAYOS DE DESENQUISTACION "IN VITRO" DE *Giardia lamblia**

NUMERO DE ENSAYOS	MEDIO DE CULTIVO	DESENQUISTACION**	
		(-)	(+)
73	PB-Bb-S	20.0 /40	16.5 /33
60	TYI-S	10.0 /20	20.0 /40
67	BI-S	10.0 /20	23.5 /47
200		40.0 /80	60.0 /120

* 1 ml 4 x 10⁶ quistes + 9 ml de HCl pH 1.6 a 37°C
** porcentaje / número de ensayos.

Dentro del grupo de los 120 ensayos con desenquistación positiva, en 24 casos (12%) el resultado fue inferior al 30%, insuficiente para que el cultivo se sostuviera; de estos 24 ensayos, 10 fueron aislados en PB-Bb-S, 6 en TYI-S y 8 en BI-S. Las 96 cepas restantes tuvieron porcentajes mayores al 30% suficiente para sostener un cultivo, dentro de este grupo, 23 axenizadas en PB-Bb-S, 34 en TYI-S y 39 en BI-S. En cada uno de los casos se considera que los resultados corresponden a la axenización y resiembras en tres medios de cultivo, por lo tanto, se muestran por triplicado.

En el primer periodo, de estabilización de los trofozoítos en los medios de cultivo, con recambio cada 24 horas, el 27.2% de las 96 cepas se contaminaron con levaduras, y a pesar del cambio del medio nuevo diariamente más 50 microgramos de anfotericina B por mililitro, no se recobraron y finalmente, tuvieron que ser desechadas. En este lote de cepas unas se contaminaban durante el periodo de recambio diario y otras en el periodo de espaciamento de resiembras; sólo se utilizaron los medios PB-Bb-S y TYI-S.

Las 70 cepas axenizadas restantes lograron sostenerse sin contaminación durante distintos periodos de tiempo. El primer grupo de 22 cepas creció por 2 semanas, dichos cultivos primarios no pudieron alcanzar una axenización sostenida, ni entrar a resiembras cada 72 horas, estos cultivos fueron: ocho en PB-Bb-S, ocho en TY-S y seis en BI-S

En el segundo grupo de 48 cepas se logró pasar de recambios cada 24 horas a resiembras cada 72 horas, con inóculos de 1 mililitro de 1×10^8 y 1×10^6 de trofozoítos; para estas axenizaciones se emplearon 20 en TYI-S y 28 en BI-S (cuadro 10). Todas las 20 cepas aisladas en TYI-S crecieron en forma libre sin llegar a integrar monocapas, no se contaminaron y se mantuvieron durante ocho semanas, los cambios de medio se realizaban por

centrifugación y concentración en mililitro y transferencia a un tubo de 16 x 125 mm con 13 ml de medio de cultivo nuevo; a pesar de este tratamiento la sobrevida de las cepas disminuyó, y finalmente, murieron.

Cuadro 10. CRECIMIENTO EN MEDIO DE CULTIVO DE 96 CEPAS AXENIZADAS DE Giardia lamblia.

NÚMERO DE CEPAS	MEDIO DE CULTIVO	SOSTENIMIENTO EN SEMANAS*		
23	PB-Bb-S	15.7/0	8.3/2	
39	TYI-S	11.5/0	8.3/2	20.8/8
34	BI-S	6.2/2	29.1/10	29.2/12

* porcentaje / número de semanas

Otro grupo de 28 cepas fueron axenizadas en medio BI-S y estandarizadas en subcultivos cada 72 horas con inóculos de 1×10^8 y 1×10^6 de trofozoitos por mililitro; 15 de estas cepas, correspondientes al 53.5 por ciento, siempre crecieron en forma libre sin monocapa y las 13 cepas restantes (46.5%) hicieron monocapa adherida a la pared del tubo durante su desarrollo. Nueve de ellas (9/13) formaron una monocapa 24 horas después de desenquistar y un pequeño grupo de cuatro (4/13), lograron integrar una monocapa, después de una semana de recambio de medio cada 24 horas y en ese momento se procedió al espaciamiento cada 48 y 72 horas.

Las 28 cepas axenizadas en medio BI-S fueron las que presentaron un mejor y mayor crecimiento, sostenidas en subcultivos por 12 semanas. La manipulación en las resiembras ocasionó que el 21.4% (6/28) se contaminaran con levaduras, el resto de 22 cepas (78.6%) crecieron en buenas condiciones.

El máximo de sostenimiento de los cultivos fue de 12 semanas en medio BI-S suplementado con bilis y suero bovino

y antibióticos en resiembras cada 72 horas sin contaminación.

En los primeros recambios cada 24 horas, el medio de cultivo, era igualado a la temperatura de 37°C antes de ser utilizado; al establecerse las resiembras cada 72 horas, el medio se dejó a la temperatura del cuarto estéril. En las pocas ocasiones en que se colocaron los medios en baño frío por cinco minutos, hubo una disminución en el crecimiento de los parásitos.

En el caso de conservar en congelación, con nitrógeno líquido, a tres aislados "Ruth", "Lupita" y "Francisco", que presentaron un excelente crecimiento de monocapa, obtenidas de niños asintomáticos de guardería y sin embargo, perecieron durante el proceso.

El sostenimiento de los cultivos axénicos se interrumpió porque se habían cumplido los objetivos del trabajo y no era costeable mantener por tiempo indefinido unas cepas que no tenían, por el momento, ningún proyecto de estudio.

En 19 cepas de las 22 conservadas por doce semanas en BI-S, se pretendió espaciar los subcultivos a cada 96 horas y también se utilizó el enfriamiento a 4°C para desprender la monocapa; en ninguno de los casos hubo crecimiento y finalmente, se sacrificaron.

Los trofozoítos de cultivos de 12 semanas fueron utilizados para frotis y observaciones directas de estudios morfométricos, y también para averiguar el tiempo de duplicación de los trofozoítos en cuentas realizadas en cámara de Neubauer, estas observaciones hacen pensar que el tiempo de generación en nuestro modelo se encuentra entre 10 y 12 horas.

IX. DISCUSION

En la actualidad, de las parasitosis intestinales que afectan a la población infantil en los niños, es muy probable que la giardiasis ocupe el primer lugar en frecuencia.

La incidencia de 42.6% de quistes de G. lamblia, reportada en CPS de niños que asisten a la consulta externa del Hospital Infantil de México, Federico Gómez, coincide con diversos autores ^{42.44.47.48} que refieren mayor prevalencia en niños que en adultos, destacando los grupos prescolares y escolares como los más afectados.

El alto índice, de 57.6%, de asintomáticos incluidos en este estudio, señala la presencia de este protozooario en niños que aparentemente están sanos, pero que tienen una talla baja, quizá debido a la considerable deficiencia de absorción de nutrientes producida por el parásito.

Dentro del grupo de niños sintomáticos el principal síntoma corresponde a diarrea crónica de más de 15 días. ⁴⁹ La giardiasis en adultos es poco frecuente en nuestro medio; en aquellos que la padecen es sintomática, cursa con un cuadro clínico inespecífico de dolor epigástrico, y la demostración del parásito requiere en muchas ocasiones de sondeo duodenal. ⁴³

Los métodos coproparasitológicos siguen siendo los más empleados para el diagnóstico de las parasitosis intestinales, y su selección depende de las necesidades de diagnóstico y de los recursos con los que se cuente. Los métodos de concentración por flotación son considerados como los de mayor sensibilidad en la búsqueda de quistes de protozoarios y huevos de helmintos.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

79

El método de Ferreira, que incluye modificaciones cuantitativas, ¹¹³ se considera el más efectivo en el diagnóstico general ¹¹⁷ y permite con alta probabilidad demostrar la presencia de parásitos en aquellos casos verdaderamente positivos. Además, con la modificación de uso de glucosa, los quistes se conservan viables para continuar el proceso.

Al considerar el valor de significación menor del 5% en el uso de la técnica de concentración por gradiente simple de sacarosa, ⁶⁰ se seleccionó esta con el objeto de separar una gran cantidad quistes.

De acuerdo con algunos autores ¹¹⁰ el sulfato de zinc permite una concentración mayor de quistes que la glucosa. Sin embargo, en nuestra experiencia así como en la de otros autores, éste al cristalizarse, destruye los quistes, en tanto que la glucosa los conserva en forma viable e íntegra.
4. 43

Los trabajos de Tombes en 1979 ⁴⁹ evidenciaron quistes de gran flexibilidad que pueden tomar formas cuboides y elípticas, mientras que otros autores afirman que todos los quistes son elípticos y las deformidades se deben, probablemente, al procesamiento. En este estudio las observaciones de quistes recién eliminados y que fueron concentrados con sacarosa, permite verlos con gran flexibilidad, en formas cuboide, esférica, oval y elíptica.

Un reporte anterior, del mismo laboratorio donde se realizó este trabajo, determinó en la cuantificación de quistes de 150 niños con *G. lamblia* cuentas entre 10 mil y 20 millones de quistes por gramo de heces; el 71.8 por ciento de los pacientes estudiados expulsaba menos de 4 millones de quistes por gramo de heces, y la minoría 28.2%, expulsaba más de 4 millones.

En nuestro grupo de estudio el 54% de los niños analizados presentó cuentas mayores a los 4 millones, sin embargo se debe considerar que la muestra fue seleccionada de acuerdo a los objetivos del estudio por lo que no se

considera esta como representativa de la población. La cuenta más elevada de quistes no necesariamente correspondió a niños sintomáticos, pero sí el mayor porcentaje de niños con cuentas altas padecía por lo menos uno o dos síntomas de los atribuibles a la giardiasis.

Uno de los mayores problemas que se presentan en el manejo de los cultivos axénicos, es la facilidad con que los medios enriquecidos se contaminan con enterobacterias y levaduras. En nuestro modelo de trabajo, un punto crítico en la axenización, fue purificar los quistes separados de las heces, que contienen grandes cantidades de bacterias de la flora normal o patógena; por esta razón desde el método de separación y concentración utilizamos una solución salina con antibióticos con el propósito de obtener quiste libres de contaminantes y mantenerlos viables.

Existe sólo un reporte en donde se menciona ²⁰⁴ que una combinación de micostatín, gentamicina, kanamicina, penicilina y estreptomycinina es útil para la purificación y axenización.

En este estudio el uso de una combinación de antibióticos contra Gram (+) y (-) y hongos, en los primeros pasos de la concentración y también en una serie de lavados, antes de inducir la desenquistación e inocular los medios de cultivo, dio excelentes resultados. Esta estrategia permitió la eliminación de contaminantes antes de iniciar los cultivos y evitó así un crecimiento masivo de estos en los medios en los que crecieron los parásitos.

En relación a la viabilidad de los quistes está demostrado que las heces mantenidas en refrigeración a 4°C no dañan la integridad y viabilidad de los quistes. ⁷³ Considerando esto se pudieron conservar las muestras de 24 a 48 horas hasta su procesamiento sin que tuvieran alteraciones en los quistes.

Bingham ⁶⁰ ha sugerido que se requieren de dos a siete días de maduración antes de la desenquistación; otros autores ¹⁰⁰ marcaron un tiempo de maduración de una semana,

y estos mismos autores, en 1984, ¹²⁷ realizaron desenquistación sobre quistes a la primera y segunda hora de ser eliminados.

En los ensayos con quistes mantenidos a 49 hubo un mayor porcentaje de desenquistación que en aquellos conservados por 48 horas. Sin embargo se obtuvieron cifras considerables, del 38.2% en quistes recién eliminados, lo cual es suficiente para llevar a cabo una transmisión directa, sobre todo en lugares hacinados, como guarderías, donde además puede haber malos hábitos higiénicos.

Diversos métodos utilizados para determinar viabilidad de quistes ^{11, 104, 123} reportan porcentajes hasta en 80 y 90 por ciento. En el caso de este estudio llamó la atención que se encontrara un porcentaje del 75 a 76 de quistes viables, y un 24 a 25% no viables en los recién eliminados y en los concentrados con gradiente simple de sacarosa. Los resultados muestran que el proceso de concentración por gradiente simple no modifica la viabilidad y que probablemente, el porcentaje obtenido en este estudio, sea una característica de Giardia lamblia en niños.

Estudios sobre viabilidad de quistes de G. muris con colorantes fluorogénicos ²² en los cuales se separan quistes FDA (+) viables, se pudo observar un espacio entre el citoplasma y la pared, con grupos de flagelos en un extremo. Los quistes PI (+) ,no viables, mostraron núcleos bien definidos, axonemas y elementos curvados del disco adhesivo, sin presentar espacio lacunar. Sin embargo, en nuestras observaciones identificamos un grupo de quistes no viables (13.4 a 14.0%) con poco espacio lacunar, el citoplasma retraído, núcleos y axonemas bien definidos; y otro grupo (10.0 a 11.5%) denominado "quistes fantasmas" ²⁰ con el contenido citoplásmico muy retraído, sin morfología interna, que puede confundirse con otras estructuras.

La ausencia de "quistes fantasmas" en las observaciones de Schupp ²² pueden deberse a que fueron realizados en quistes de G. muris y este estudio se hizo con quistes de G.

lamblia. Así estas características podrían ser un carácter diferencial de especie.

La inducción "in vitro" sólo tiene éxito sobre quistes maduros tetranucleados; en nuestras observaciones esto ocurrió en 97.1% de quistes tetranucleados en muestras de heces recién eliminadas, que sugiere la presencia de una mayoría de quistes maduros.

Las condiciones de inducción "in vitro" de desenquistación son similares a las que ocurren en el estómago del hombre, con un pH 1.5 - 2.5; ¹⁷ sobre estas bases los primeros ensayos experimentales "in vitro" demostraron que la inducción es ácido dependiente ⁴⁰ y que requiere de una solución con pH entre 1.0 y 2.0; estos trabajos determinaron varios pasos en el proceso: 1) concentración de quistes, 2) solución inductora a pH ácido, 3) lavados con solución neutra, 4) inoculación en medios de cultivo. ^{107, 100, 170, 211}

En el modelo de trabajo propuesto en este estudio la solución inductora es de fácil preparación a base de HCl, diluido en agua desionizada inyectable para obtener un pH 1.6; la preparación de esta es más sencilla que las reportadas ^{40, 100, 211} que emplean una solución de Hanks, HCl, pepsina o bicarbonato de sodio. ¹⁷⁰

Con el objeto de neutralizar los quistes después de la inducción de desenquistación éstos se lavaron con solución salina mas antibióticos, método más simple que el de solución Tyrode. ¹⁷⁰

Las condiciones de inducción de desenquistamiento para G. muris difieren considerablemente de las empleadas para G. lamblia. En el caso de quistes obtenidos de ratones se requiere de una solución con potencial de óxido-reducción (Eh) +120 mV porque si se inducen bajo las mismas condiciones que G. lamblia, sólo se obtiene un 5% de desenquistación. ¹⁰⁷ Este podría ser un carácter diferencial importante entre las dos especies de Giardia, lo cual apoyaría el concepto de que la especie de G. lamblia

del humano y la de mamíferos inferiores es la misma, pero no sería un carácter diferencial de cepas entre las aisladas en las distintas áreas geográficas.

El porcentaje de desenquistación varía de un donador a otro ^{40, 211} y aun puede tener diferencias en el mismo individuo; en este estudio observamos que el número de quistes expulsados por un individuo no es regular, y se sugiere que el porcentaje de desenquistación está más relacionado con el número de quistes que con el origen de los mismos.

Algunos estudios proponen que hay de 90 a 92% de desenquistación en pacientes sintomáticos y un 42% en asintomáticos. ¹⁰⁰ Los resultados de la desenquistación empleando quistes aislados de niños sintomáticos y asintomáticos en nuestro estudio, señalaron que el máximo porcentaje fue del 53% de una niña asintomática de guardería y en general, la mayoría de los aislados correspondieron a niños asintomáticos. Probablemente esto también concuerda con que la mayoría de los niños giardiásicos son asintomáticos.

De manera similar a otros reportes ^{40, 100} observamos que la desenquistación se inicia en un extremo del quiste, éste se alarga y las estructuras en el interior aumentan. Pero el microscopio de luz con iluminación de Köhler y de contraste de fases, no permite distinguir cuál es el polo de eclosión, o si existe algún micrópilo o sitio de salida, como tampoco ha sido visto en la microscopía electrónica. ¹⁰⁰

Según nuestras observaciones, probablemente los flagelos son los primeros en formarse en las células hijas, se encuentran como una "madeja" en un extremo y presionan sobre la pared hasta formar una "burbuja" que aumenta de tamaño y se rompe para liberarlos.

Lo que se observa al inicio del proceso, es una clara polarización de los núcleos y en la parte opuesta, se

ubican los flagelos; este polo será el punto de salida de las células hijas.

En este modelo no se observaron características en el borde de inicio de eclosión, como las microesférulas descritas por Buchel, ¹⁹⁶⁶ quizá esto se deba al hecho de que nuestras observaciones se llevaron a cabo con microscopía de luz y con un sistema de contraste de fases.

Algunas descripciones ^{1966, 1967} señalan la eclosión de una masa flagelada que, fuera del quiste, inicia la citoquinesis para la formación de las dos células hijas. En nuestro modelo la división de los trofozoitos comienza dentro del quiste y sus estructuras están bien diferenciadas al salir de éste. Asimismo observamos que en estas etapas los dos trofozoitos libres pueden tener un extremo todavía unido al quiste.

Está descrito que la temperatura es un factor primordial para inducir desenquistación, así todas las soluciones y medios de cultivo deben estar a una temperatura de 37°C antes de ser utilizadas, y el mismo proceso debe sucederse a 37 °C, en esto concuerdan tanto los estudios con cepas de G. lamblia como aquellos que emplean a G. muris.

En las condiciones del ensayo a temperatura constante de 37°C la diferenciación se lleva a cabo en unos cuantos minutos y dentro del quiste. Sin embargo cuando la temperatura disminuye, el proceso se detiene y podemos encontrar "masas flageladas" que pueden permanecer así varias horas sin que se formen las células hijas.

Las diferencias que encontramos con respecto a otros trabajos ^{1967, 1966} que señalan que la división de las células hijas se realiza fuera del quiste, probablemente se deban a que el material se fija para estudio de microscopía electrónica, mientras que nuestros ensayos se hacen en fresco y en vivo.

Después de la división, las células hijas permanecen unidas hasta por dos horas, con un citoplasma continuo entre los dos trofozoitos, que se separan por estiramiento,

formando un "puente" entre ellos. Los trofozoítos recién eclosionados miden 10.5 a 11.0 μm de largo y 8.0 μm de ancho, carecen de cuerpo medial y la cromatina nuclear está fragmentada; doce horas después de su salida del quiste, alcanzan las dimensiones de 12.0 a 14.0 μm de largo y 7.0 a 9.0 μm de ancho, la cromatina nuclear se ha condensado en un endosoma central y puede o no presentar cuerpo medial.

Cuando los quistes inducidos se colocaron en el medio de cultivo, a los cinco minutos, se observaron trofozoítos libres e independientes, mientras que en las preparaciones entre porta y cubre objetos, se detectan trofozoítos unidos en pareja y la eclosión puede retardarse hasta 30 minutos.

A medida que evoluciona la formación de las células hijas en el interior del quiste, la cromatina nuclear se modifica, con el propósito de observar los cambios sufridos durante la desenquistación se detuvo el proceso en intervalos de varios minutos y se tiñó con diversos colorantes, en preparaciones en fresco o permanentes, así pudimos identificar en los quistes inducidos los cuatro núcleos con endosoma central y polarizados en un extremo, cuando se forma la burbuja y los nuevos flagelos emergen en un polo, la cromatina del endosoma se fragmenta y se observa difusa en el núcleo, con localización polarizada. Observamos además que en los trofozoítos recién formados que no abandonan del todo el quiste, la cromatina de los núcleos está fragmentada y así permanece aun en los trofozoítos en pareja y en los libres; nuestras observaciones permiten suponer que la cromatina nuclear se fragmenta en el momento que se forman los trofozoítos hijos dentro del quiste.

Estas observaciones no han sido descritas con anterioridad y considerando esto se propone que los trofozoítos eclosionan primero del extremo posterior del cuerpo, con la salida de los flagelos caudales, ventrales y laterales, y lo último en emerger es la porción anterior que contiene los núcleos.

El tiempo de desenquistación estimado por Bingham ¹⁰⁰ es de 5 a 20 minutos y el estimado por otros autores, de 6 a 48 horas. ¹⁹⁰ En nuestra experiencia, después de 5 minutos de colocar los quistes inducidos en los medios de cultivo, se ven trofozoítos libres. En el caso de observaciones entre el porta y cubre objeto el proceso parece llevar más tiempo.

En este estudio el proceso de desenquistación que emplea una técnica rápida, cuya duración, menor de una hora entre la incubación en la solución inductora, los lavados con solución salina mas antibióticos, y la incubación de quistes en el medio de cultivo permitió obtener un 60% de desenquistamiento, cifra muy similar ¹⁰⁰ o ligeramente inferior a lo obtenido por otros investigadores ^{211, 107, 27} que corresponde al promedio general reportado en varios ensayos, sin embargo en los últimos procedimientos el resultado llegó a ser del 90%.

Uno de los objetivos era el lograr cultivos axénicos de aislados de G. lamblia que pudieran mantenerse por tiempos prolongados y sirvieran como base para estudios posteriores, para este propósito se prestó atención en la vigilancia y el sostenimiento de los cultivos.

En la mitad de los casos con desenquistación superior al 30%, obtuvimos cultivos durante 8 semanas ; 28 cepas sobrevivieron 10 semanas y el resto (22 cepas) se sostuvo durante 12 semanas.

Pocos reportes de cultivos axénicos mencionan el porcentaje de éxito en la axenización en relación con el número de ensayos, tampoco señalan el porcentaje que forma monocapa o permanece libre, sólo encontramos referencias del tiempo que se sostuvo una cepa determinada.

Las condiciones de laboratorio que deben tomarse en cuenta para la axenización sostenida, son muy diversas, según las opiniones de varios autores. Para Gillin, ²⁰⁸ el crecimiento de la cepa depende más del tipo de medio de cultivo que del porcentaje de desenquistación o viabilidad

de los quistes; Kasprkard ²¹¹ propone que el crecimiento se ve favorecido con un buen desarrollo en medio TPS-1 y con pobre crecimiento en TYI-S. Nuestros resultados también varían de acuerdo con el tipo de medio utilizado: el PB-Bb-S permitió el desarrollo de cultivos primarios durante dos semanas; en el medio TYI-S crecieron 39 cepas, de las cuales, el 51.2% (20/39) se mantuvieron por ocho semanas, y el mayor éxito, de 64.7% (22/34), sostenido por 12 semanas, se obtuvo en el medio BI-S.

El crecimiento de G. lamblia en cultivo, en su mayoría, tiende a formar monocapa ²⁰⁰ que puede presentarse a las 24 horas de inoculados en el medio, o requerir de 19 a 31 días en formarse. ²¹¹ Nuestras observaciones mostraron que de las cepas axenizadas, un 19% de los trofozoitos forman monocapa en medio BI-S a las 24 horas de incubación .

Otro grupo, mucho más numeroso, del 81%, se desarrolla en forma libre, en su mayoría no llega a formar monocapa ni en tripticasa ni en biosate y decrece fácilmente; el 10 % de esta población forma monocapa adherida al tubo tardíamente, sólo en BI-S.

Investigadores que trabajan la axenización como rutina tuvieron en sus inicios un éxito del 7%, que fue superado posteriormente con logros del 31.8% y 47.7% ²¹¹.

La experiencia nos permite afirmar que la práctica y conocimiento de la desenquistación y axenización pueden aumentar el porcentaje de éxito en relación con el inicio de los ensayos; así, se utilizarían en forma rutinaria para obtener producciones masivas de trofozoitos de Giardia lamblia.

La desenquistación es un instrumento de trabajo que puede ser empleado para conocer la viabilidad de los quistes, la capacidad infectante, la longevidad, la efectividad de desinfectantes y fármacos sobre los quistes.

Los detalles en el proceso de desenquistación podrían servir para ampliar los conocimientos que sobre la biología

de G. lamblia se tienen y podrían ser utilizados como criterios de clasificación taxonómica.

Actualmente se conocen los pasos en el proceso de desenquistación y se controlan los factores extrínsecos que inducen el fenómeno, pero se desconoce la biología molecular de la citoquinesis, si existe un fenómeno enzimático y cuáles son las acciones sobre la pared quística para romper y salir.

X. CONCLUSIONES

1. En el proceso de recuperación de quistes a partir de individuos parasitados con *G. lamblia*, la mayor concentración se obtiene a través de gradiente simple de sacarosa.
2. La eliminación de microorganismos contaminantes en las muestras de quistes se logró empleando una combinación de antibióticos para purificar quistes consistente en penicilina, estreptomycin, gentamicina y anfotericina B, en solución salina.
3. El 97.1% de los quistes recién eliminados son tetranucleados.
4. Se encontró que la viabilidad de los quistes recién eliminados y de los concentrados con sacarosa, esta entre 75 y 76%.
5. El mayor porcentaje de desenquistación se obtiene con solución inductora a base de HCl en agua desionizada inyectable a un pH 1.6.
6. El proceso de inducción y desenquistación requirió de una temperatura de 37°C.
7. La desenquistación en medio de cultivo ocurrió en los primeros 5 minutos después de la inducción de los quistes, observándose trofozoítos libres.
8. Cuando el proceso de desenquistación entre porta y cubre-objeto tuvo una duración de 30 minutos.
9. Los trofozoítos hijos se forman dentro del quiste y se liberan por un extremo.
10. La formación de los trofozoítos hijos dentro del quiste se observa con la fragmentación de la cromatina nuclear.

11. Los trofozoitos recién eclosionados miden de 10.5 a 11.0 μm de largo por 80 μm de ancho sin cuerpo medial y con cromatina nuclear fragmentada.
12. Los subcultivos de los trofozoitos aislados se pudieron mantener mediante resiembra cada 72 horas e inoculos de 1×10^8 .
13. La mayor parte de los aislados crecieron en forma libre, mientras que la minoría lo hizo en monocapa.
14. Las monocapas de trofozoitos adheridas al tubo se obtienen preferencialmente en medio de biosate.
15. Las diversas modificaciones realizadas durante el presente trabajo permitieron ampliar la experiencia en el proceso de desenquistación, el cual presentó altos rendimientos en sus últimas etapas.

XI. RESUMEN

Varios trabajos sugieren que la giardiasis infantil en México presenta diferencias clínicas y epidemiológicas de la de otros países del mundo. Para conocer si éstas se derivan del parásito, es indispensable contar con cultivos axénicos de G. lamblia obtenidos de niños mexicanos.

En este trabajo se estableció una metodología rápida y fácil para inducir desenquistación "in vitro" y obtener trofozoítos para iniciar cultivos axénicos. Se obtuvieron quistes a partir de nuestras heces mediante concentración en gradiente simple de sacarosa y purificación con solución salina y antibióticos. La desenquistación se logró con el empleo de una solución inductora de HCl con pH 1.6 e incubación a 37°C durante 40 minutos, en 200 ensayos se logró un 60% de desenquistación.

La liberación de los trofozoítos a partir de quistes inducidos se llevó a cabo en tres medios de cultivo: peptona de biotriptasa (PB-Bb-S), tripticasa y extracto de levaduras (TYI-S) y biosate (BI-S), todas complementadas con bilis y suero bovino y antibióticos, con un porcentaje de éxito de 27.1, 48.4 y 49.9%, respectivamente.

En el análisis microfotográfico de desenquistación se observa que se inicia con la retracción del contenido del quiste y el alargamiento de este, polarización de núcleos con cromatina densa y formación de "madeja de flagelos" en el extremo opuesto. Los flagelos presionan la pared del quiste y originan una "burbuja" en un polo, que de inmediato se rompe y los libera. Dentro del quiste se originan los

trofozoítos hijos con cromatina fragmentada y eclosionan por un extremo, unidos en "pareja".

El proceso de eclosión duró cinco minutos en el tubo de medio de cultivo y se alarga de 20 a 30 minutos en la preparación en fresco al microscopio.

Los trofozoítos recién eclosionados miden de 10.5 a 11.0 μm de largo y 8.0 de ancho, presentan cromatina nuclear fragmentada y carecen de cuerpo medial. El mantenimiento de trofozoítos aislados se logró empleando tres medios: PB-Bb-S, TYI-S y BI-S.

En el medio PB-Bb-S el desarrollo de cultivos primarios se logró durante dos semanas, con cambio diario de medio de cultivo. En el medio TYI-S crecieron 39 cepas y el 51.2% (20/39), durante ocho semanas. El mayor y mejor sostenimiento fue en el medio BI-S, de un total de 34 cepas, el 64.7% creció en subcultivos con recambio de medio cada 72 horas durante 12 semanas.

Los ensayos realizados con este modelo permitieron ampliar la experiencia en el manejo del método de desenquistación, el cual presentó altos rendimientos en la fase final de este trabajo.

XII. APENDICE TECNICO

1. COPROPARASITOSCOPICO (CPS) FERREIRA 1:10

- Pesar 5 g de materia fecal en un frasco de cristal de capacidad de 100 ml.
- Agregar 45 ml de formol al 2% y homogeneizar con una varilla de vidrio.
- Colar la suspension a un tubo de poliuretano de 25 x 100 mm y volumen de 50 ml, sobre un embudo con malla de alambre.
- Centrifugar a 700 Xg durante un minuto.
- Decantar el sobrenadante y agregar 10 ml de solucion de sulfato de zinc con densidad de 1.209 baume y agitar el sedimento con una varilla de vidrio; retirar la varilla y colocar la "campana de Ferreira" y completar el llenado del tubo con sulfato de zinc hasta el borde.
- Centrifugar a 700 Xg durante un minuto.
- Retirar el tubo de la cetrifuga y colocarlo en una gradilla.
- Fresionar la banda de hule de la "campana" entre el pulgar y el indice, e invertir la "campana" sobre un porta-objeto, agregar una gota de lugol, colocar un cubre-objeto.

2. CPS FERREIRA 1:10 CON GLUCOSA

- Pesar 5 g de materia fecal en un frasco de cristal de capacidad de 100 ml.
- Agregar 45 ml de solución salina con antibiótico y homogeneizar con una varilla de vidrio.
- Colar la suspension a un tubo de poliuretano de 25 x 100 mm y volumen de 50 ml, sobre un embudo con malla de alambre y gasa.
- Centrifugar a 700 Xg durante un minuto.
- Decantar el sobrenadante y agregar 10 ml de solución de glucosa con densidad de 1.192 baume y agitar el sedimento con una varilla de vidrio, retirar la varilla de vidrio y colocar la "campana de Ferreira", completar el llenado del tubo hasta el borde con solución de glucosa.
- Centrifugar a 700 Xg durante un minuto.

- Retirar el tubo de la centrifuga y colocarlo en una gradilla.
- Fresionar la banda de hule de la "campana" entre el pulgar y el indice e invertir la "campana" sobre un embudo con papel filtro, en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm y agregar 5 ml de solucion salina con antibioticos.
- Centrifugar a 600 Xg durante cinco minutos, retirar el sobrenadante.
- Repetir la centrifugación con solución salina con antibioticos y dejar en un volumen de un mililitro.

3. GRADIENTE SIMPLE DE SACAROSA

- Pesar 5 g de material fecal en un frasco de cristal con capacidad de 100 ml.
- Agregar 45 ml de solución salina con antibiotico y homogeneizar con una varilla de vidrio.
- Colar la suspensión a un tubo de poliuretano de 25 x 100 mm sobre un embudo con malla de alambre y gasa.
- Centrifugar a 700 Xg durante un minuto.
- Decantar el sobrenadante y realizar dos lavados con solución salina con antibiotico.
- Colocar en un tubo cónico de plástico con tapón de rosca tres mililitros de solución de sacarosa 0.85M.
- Agregar cinco mililitros de suspensión de heces, deslizando por las paredes.
- Centrifugar en frio a 4°C a 600Xg durante 10 minutos.
- Retirar con pipeta Pasteur la segunda interfase que contiene los quistes y colocarlos en un tubo cónico graduado de cristal de 15 ml y agregar 5 ml de solución salina con antibiotico.
- Centrifugar a 600 Xg durante cinco minutos.
- Realizar dos lavados con solución salina con antibioticos, para retirar el exceso de sacarosa y dejar un volumen final de 1 ml.
- Realizar el mismo proceso para obtener finalmente varias alícuotas de quistes con 1 ml cada una.

4. CUANTIFICACION DE QUISTES

- Conteo en cámara de Neubauer.
- Tomar con la pipeta de Thoma hasta 0.5 ml del paquete de concentrado de quistes.
- Llenar a 11 con solución salina (dilución 1:20), agitar durante un minuto.
- Tirar las dos primeras gotas, y la tercera y cuarta colocarlas en ambos extremos de la cámara, entre el cubre-objeto y la cámara.
- Contar los quistes contenidos en los cuatro extremos de la cuadrícula.
- Multiplicar por 50 para obtener el número de quistes

por mm³.

- Multiplicar por 1000 para obtener el número de quistes por mililitro.
- Realizar la cuenta en ambos extremos de la cámara y promediar.
- Preparar varios inoculos con 4×10^4 quistes/ml cada uno.

5. SOLUCION CON ANTIBIOTICO PARA PURIFICAR QUISTES

- Preparar 1l de solución salina isotónica y esterilizar.
- Agregar 1g de estreptomina S (sector salud) y un millón de unidades de penicilina G sodica (Fisa).
- Preparar 1l de una solución salina isotónica y esterilizar.
- Agregar 1g de Estreptomina, un millón de unidades de penicilina y 100 mg de ketoconazol.
- Preparar 1l de solución salina isotónica y esterilizar.
- Agregar 1g de estreptomina, un millón de unidades de penicilina y 100 mg de netromicina.

6. SOLUCION CON ANTIBIOTICOS, OPTIMA PARA PURIFICAR QUISTES

- Preparar 1l de solución salina isotónica y esterilizar.
- Agregar 1g de estreptomina, un millón de unidades de penicilina, 100 mg de gentamicina y 50 mg de anfotericina B.

7. CONTEO DE NUCLEOS

- Tomar una gota de los paquetes de quistes obtenidos por gradiente y colocarlos en un porta-objeto.
- Agregar una gota de colorante de azul de algodón (azul de anilina) al 1%, colocar un cubre-objeto.
- Observar al microscopio con objetivo 100x y realizar una cuenta diferencial de 100 quistes, con dos o cuatro núcleos.
- Promediar la cuenta de cinco lecturas.
- Reportar porcentajes de quistes bi y tetranucleados.

8. TINCION EN FRESCO DE QUISTES CON EOSINA Y

- Tomar una porción de heces con quistes recién eliminados, una gota de los paquetes de quistes

- obtenidos por gradiente y una gota de los paquetes de quistes purificados, colocarlos por separado en un porta-objeto.
- Agregar una gota de eosina Y al 1%, colocar un cubre-objeto.
 - Observar al microscopio con objetivo de 100x y realizar una cuenta diferencial de 100 quistes, entre los teñidos de rojo y los que permanecen sin coloración.
 - Promediar la cuenta de cinco lecturas.
 - Reportar porcentajes de quistes viables (sin teñir) y no viables (teñidos de rojo).

9. INDUCCION DE DESENQUISTACION "IN VITRO"

- Preparar en concentraciones de 1N, 0.5N y 0.1N, HCl (ácido clorhídrico) con pureza del 36%.
- Emplear agua corriente, destilada, bidestilada, desionizada y desionizada inyectable.
- Medir en potenciómetro el pH de la solución

Solución óptima para desenquistación:

- HCl (pureza del 36%)----- 7.0 ml
- agua desionizada inyectable (Pisa) a 1 l
- ajustar estrictamente en el potenciómetro a pH 1.6

Metodología de Inducción:

- Colocar en la estufa a 37°C la solución de HCl, la solución salina con antibióticos, tubos con 7 y 13 ml de medio de cultivo y la suspensión de quistes, esperar a que tomen la temperatura de 37°C.
- Montar varios tubos en una relación 1:10, de 1 ml con 4×10^6 de quistes más 9 ml de solución de HCl.
- Agitar e incubar a 37°C durante 40 minutos.
- Centrifugar a 650 Xg durante cinco minutos.
- Retirar el sobrenadante con pipeta Pasteur y realizar dos lavados con solución salina con antibiótico.
- Dejar 2 tubos de 13 x 75 mm con una suspensión final de 0.5 ml.
- Dejar en tubos de 13 x 75 mm una suspensión final de 1 ml.

10. MEDIO DE CULTIVO TYI-S

tripticasa-----	2 g
extracto de levadura-----	1 g
glucosa-----	1 g
cloruro de sodio-----	0.2 g
L- cisteina-----	0.2 g
ácido ascórbico-----	0.02 g
fosfato de potasio monobásico-----	0.06 g
fosfato de potasio dibásico-----	0.1 g

- | | | |
|------------------------------------|--------|----|
| bilis bovina----- | 0.1 | g |
| citrato férrico de amonio----- | 0.0023 | g |
| agua bidestilada----- | 100 | ml |
| penicilina G sódica----- | 25,000 | U |
| estreptomocina "S"----- | 0.025 | g |
| suero bovino descomplementado----- | 10 | ml |
- Ajustar el pH a 6.8 - 6.9 con NaOH 1N
 - Prefiltrar en filtro de porcelana con papel filtro Watman No. 1
 - Prefiltrar con membrana AW de millipore
 - Esterilizar con membrana 0.45 um de millipore
 - Envasar en tubos de borosilicato con tapón de rosca

tubos de 14 x 100 mm-----	7	ml
tubos de 16 x 125 mm-----	13	ml

11. CUARTO ESTERIL

Cuarto independiente, cerrado hermético, con luz ultravioleta. Conexiones para gas, aire. Tarjas con llaves de agua corriente. Mesas y sillas de trabajo.

12. DESENQUISTACION

- Colocar en la estufa a 37^o el tubo de tapón de rosca con 7 ml de medio de cultivo con PB-Bb-S, TYI-S o BI-S.
- Inocular la suspensión de 0.5 ml de quistes inducidos y lavados con solución salina mas antibiótico.
- Incubar en la estufa a 37^oC.

13. OBSERVACION DIRECTA DE DESENQUISTACION

Examen en fresco

- Retirar de la estufa a 37^oC el tubo de ensaye con medio de cultivo y los quistes inducidos, cinco minutos después de ser colocados.
- Tomar una gota del contenido y ponerla entre porta y cubre-objeto.
- Devolver a la estufa el tubo de cultivo.
- Observar al microscopio con objetivo 100x.
- Realizar esquemas, medir el tiempo de los eventos y fotografiar con luz normal y de contraste de fases.
- Repetir las observaciones en diferentes tiempos de incubación.
- Realizar los pasos antes mencionados, pero en preparaciones coloreadas con azul de algodón al 1% y eosina Y al 1%.

14. TINCION PERMANENTE CON GIEMSA

- Elaborar frotis del material contenido en los

medios de cultivo, con crecimiento de uno, dos, cuatro, 12 y 24 horas.

- Fijar con alcohol etílico absoluto, durante tres minutos.
- Secar al aire.
- Fijar con solución de formol al 10% en amortiguador de fosfatos, durante 30 segundos.
- Secar al aire.
- Teñir con solución de Giemsa 1:45, durante 45 minutos.
- Lavar con agua corriente y secar al aire.

15. AXENIZACION

- Colocar en la estufa a 37°C el tubo de tapón de rosca con 13 ml de medio TYI-S o BI-S.
- Inocular la suspensión de 1 ml con quistes inducidos y lavados con solución salina mas antibiótico.
- Incubar en forma inclinada en la estufa de 37°C.

16. LAVADO Y PREPARACION DE MATERIAL

- Sumergir el material sucio en solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 4 horas.
- Enjuagar con agua corriente.
- Sumergir el material en solución de extrán neutro al 5% por 24 horas.
- Tallar con escobillón todo el material.
- Enjuagar con agua de la llave varias veces y finalmente con agua destilada, hasta quitar el exceso de detergente.
- Colocar el material de cristalería en canastillas y secar al horno a 120°C durante 30 minutos.
- Dejar escurrir y secar al aire el material de poliuretano.
- Envolver con papel Kraft los tubos de tapón de rosca, tubos cónicos de cristal, pipetas graduadas, pipetas Pasteur, tubos de poliuretano, embudos, rejillas, equipo de filtración, matraces Kitasato.
- Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

17. PREPARACION DE SOLUCIONES

- a. Solución de formol al 2%
 formaldehido comercial al 36%----- 20 ml
 agua de la llave----- 1 l
- b. Solución salina isotónica
 cloruro de sodio----- 9 g
 agua destilada----- a 1 l

- c. Solución de sulfato de zinc, densidad a 1.20^g baumé
 sulfato de zinc comercial----- 350 g
 agua destilada----- 1 l
 ajustar densidad a 1.20, con densímetro.
- d. Lugol (solución madre)
 yodo cristaloid----- 5 g
 yoduro de potasio----- 10 g
 agua destilada----- 100 ml
- e. Solución de glucosa con densidad 1.19^g baumé
 glucosa-----350 g
 agua destilada----- 1 l
 calentar para disolver, envasar y esterilizar
 en autoclave.
- f. Solución salina con antibiótico
 cloruro de sodio----- 9 g
 agua destilada----- a 1 l
 estreptomicina "S" (sector salud)----- 1 g
 penicilina G sódica (Pisa)----- 1X10⁴U
 gentamicina (Sheramex)----- 100 mg
 anfotericina B (Squibb)----- 50 mg
 Preparar la solución salina y esterilizar en
 autoclave, agregar los antibióticos.
- g. Solución de sacarosa 0.85M
 Sacarosa (PM-342)----- 290.7 g
 Agua destilada----- a 1 l
 Calentar para disolver, envasar y esterilizar en
 autoclave, la solución presenta una densidad de
 1.11^g baumé.
- h. Solución de HCl 0.1N a pH 1.6
 HCl (36% de pureza)----- 7.0 ml
 agua desionizada inyectable libre
 de pirógenos (Pisa)----- 1 l
 Ajustar estrictamente a pH 1.6 en potenciómetro.
- i. Colorante de eosina Y al 1%
 eosina Y----- 1 g
 agua destilada----- a 100 ml.
- j. Colorante de azul de algodón (anilina)
 azul de algodón o de anilina----- 0.05 g
 agua destilada----- a 100 ml
- k. Colorante de Giemsa (solución madre)
 giemsa----- 3.8 g
 glicerina----- 250 ml
 metanol libre de acetona----- 250 ml
- l. Colorante de Giemsa (solución de trabajo)

- solución madre----- 1 ml
solución amortiguadora de fosfatos-45 ml.
- m. Solución amortiguadora de fosfatos
fosfato monopotásico----- 0.49 g
fosfato disódico----- 1.14 g
agua destilada----- 1 l
Ajustar a pH 7.2
- n. Solución de formol al 10% con solución amortiguadora
de fosfatos
formaldehido (pureza 36%)----- 10 ml
amortiguador de fosfatos----- 100 ml.
- o. Solución de extrán neutro al 5%
Extrán neutro concentrado----- 50 ml
agua de la llave----- 1 l
- p. Solución de hipoclorito de sodio al 10%
hipoclorito de sodio comercial----- 100 ml
agua de la llave----- 1 l.

XIII. REFERENCIAS

1. Crockett JL An hour with Mr. Henry Oldenburg of the Royal Society of London and Heer Antony Van Leeuwenhoek of Delft, Holland In: Proceeding of the Fifth International Congress of Protozoology New York. 1977: 5-13.
2. Cheng TC: Parasitología General Editorial AC Madrid, España, 1978: 120-134.
3. Simon EC. Giardia enterica: A parasitic intestinal flagellate of man. Am J Hyg 1921; 1:440-491.
4. Faust EC, Rusell PF, Jung RC. Craig y Faust Parasitología Clínica: Salvat Mexicana de Ediciones SA de CV, México, 1981: 59-62.
5. Rodenwaltz E. Section on Laublia intestinalis in article on flagellates. Prowasek's Handbuch d Pathogen Protozoen, 1912:88-9.
6. Levine ND. Giardia lamblia: Classification, Structure, Identification. In: Jakubowski W, Hoff JC, eds. Waterborne Transmission of Giardiasis. Cincinnati, Ohio: Environmental Protection Agency (EPA), 1979:2-8.
7. Levine ND, Corlis JO, Cox EEG y col. A newly revised classification of the protozoa. J Protozool 1980; 27 :37-58.
8. Wenyon CM, O'Connor FW: Human intestinal protozoa in the near east. Wellcome Bureau Sci Res London 1917.
9. Hegner R. Giardia felis n.sp., from the domestic cat and giardias from birds. Am J Hyg 1924; 5:258-273.
10. Hegner R. Exystation and infection in the rat with Giardia lamblia from man. Am J Hyg 1927; 7:433-447.
11. Hegner R. Exystation in Giardia lamblia from man. Am J Hyg 1924; 5:250-257.

12. Filice FP. Studies on the cytology and life history of a Giardia from the laboratory rat. Univ Calif Publ Zool 1952; 57:53-143.
13. Bonder R.: Lambliia sanguinis n.sp. (Gonder) Archiv Protist 1911; 21:209-212.
14. Näller W. Kleine beobachtungen an parasitischen protozoen. Archiv für Protist 1920; 41:169-189.
15. Kotlan A. Zur kenntnis der darmflagellaten aus der haussente und anderen wasservögeln. Centrbl f Bakt Parasit u Infekt Orig 1923; 90:24-28.
16. Box ED: Observations on Giardia of budgerigars. J Protozool 1981; 28:491-494.
17. Georgi ME, Carlisle MS, Smiley LE: Giardiasis in a great blue heron: (Andrea herodias) in New York state Another potential source of Waterborne giardiasis. Am J Epidemiol 1986; 123(5):916-917.
18. Erlandsen SL, Bearrick WJ: SEM Evidence for a new species, Giardia psittaci. J Parasitol 1987; 73:623-629.
19. Bertram MA, Meyer EA, Lile JD y col: A comparison of isozymes of five axenic Giardia isolates. J Parasitol 1983; 69: 793-801.
20. Bertram MA, Meyer EA, Anderson DL y col: A morphometric comparison of five axenic Giardia isolates. J Parasitol 1984; 70: 530-535.
21. Nash TE, Mc Cutchan T, Keister D y col: Restriction-Endonuclease analysis of DNA from 15 Giardia isolates, obtained from humans and animals. J Infect Dis 1985; 152:64-73.
22. Smith PD, Gillin FD, Spira WM y col. Chronic giardiasis studies on drug sensitivity, toxin production and host immune response. Gastroenterology 1982; 83:789-803.
23. Torian BE, Barnes RC, Stephens RS y col. Tubulin and high-molecular weight polypeptides as Giardia lamblia antigens. Infect Immunol 1984; 46:152-160.
24. Meyer EA, Radulesco S. In vitro cultivation of Giardia trophozoites. In: Giardia and Giardiasis. Erlandsen SL, Meyer EA. New York Plenum Press 1984: 99-108.
25. Bowie WR, Isaac-Renton J, Prasad N. Giardia duodenalis enhanced growth in cell culture. Trans R Soc Trop Med

Hyg 1988; 82:433-436.

26. Chávez B, Knaippe F, González ML. Giardia lamblia: electrophysiology and ultrastructure of cytopathology in cultures epithelial cells. Exp Parasitol 1986; 61:379-389.
27. Feely DE. A simplified method for in vitro excystation of Giardia muris. J Parasitol 1986; 72:474-475.
28. Faubert GM. Evidence that Giardiasis is a Zoonosis. Parasitology Today 1988; 4:66-68.
29. Feely DE, Erlandsen SL, Chase DG. Structure of the trophozoites and cyst. In: Erlandsen SL, Meyer EA eds: Giardia and Giardiasis. New York: Plenum Press, 1984:147-161.
30. Farthing MJG, Preira MEA, Keusch GT. Description and characterization of a surface lectin from Giardia lamblia. Infect Immunol 1986; 51:661-667.
31. Ward HD, Alroy J, Lev BI y col. Biology of Giardia lamblia. Detection of N-acetyl-D-glucosamine as only surface saccharide moiety and identification of two distinct subsets of trophozoites by lectin binding. J Exp Med 1988; 167:73-88.
32. Friend DS. The fine structure of Giardia muris. J. Cell Biol 1966; 29:317-332.
33. Holberton DV. Attachment of Giardia. A Hydrodynamic model based on flagellar activity. J Exp Biol 1974; 60:207-221.
34. Cheissin EM. Ultrastructure of Lamblia duodenalis. The locomotor apparatus axial rods and other organelles. Arch Protistenk 1965; 108:8-18.
35. Holberton DV, Ward AP. Isolation of the cytoskeleton from Giardia. Tubulin and a low-molecular weight protein associated with microribbon structures. J Cell Sci 1981; 47:139-166.
36. Crosley R, Holberton DV. Characterization of proteins from the cytoskeleton of Giardia lamblia. J Cell Sci 1983; 59:81-103.
37. Feely DE, Schollmeyer JV, Erlandsen SL. Giardia spp.: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. Exp Parasitol 1982; 53:145-154.
38. Friend DS. The Fine Structure of Giardia muris. J. Cell Biol 1966; 29:317-332.

39. Owen RL, Nemanic PC, Stevens DP. Ultrastructural observations on giardiasis in a murine model. *Gastroenterology* 1979; 76:757-769.
40. Scheffield HG. The ultrastructural aspects on Giardia. In: Jakubowski W, Hoff JC eds. *Waterborne Transmission of Giardiasis*. Cincinnati, Ohio: Environmental Protection Agency (EPA) 1978: 9-21.
41. Brugerolle G, Taylor FJR. Taxonomy, cytology and evolution of the mastigophora In: *Proceeding of the Fifth International Congress of Protozoology*, New York. 1977: 14-29.
42. Bockman DE, Winborn WB. Electron microscopic localization of exogenous ferritin within vacuoles of G. muris. *J Protozool* 1968; 15:26-30.
43. Owen RL. The ultrastructural basis of Giardia infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980; 74 :429-431.
44. Nemanic PC, Owen RL, Stevens PD y col. Ultrastructural observations on giardiasis in a mouse model II. Endosymbiosis and organelle distribution in Giardia muris and Giardia lamblia. *J Infect Dis* 1979; 140: 222-228.
45. Perroncito E. Incapsulamento del Megastoma intestinal. *Giornale della R. Academ med, Transl Centbl Bakt* 1887; 11:738.
46. Ward HD, Alroy J, Lev BI y col. Identification of chitin as a structural component of Giardia cysts. *Infect Immunol* 1985; 49:629-634.
47. Scheffield HG, Bjorvatn B. Ultrastructure of the cyst of Giardia lamblia. *Am J Trop Med Hyg* 1977;26:23-30.
48. Luchtel DL, Lawrence WP, De Walle P. Electron Microscopy of Giardia lamblia cysts. *Appl Environ Microbiol* 1980; 40:821-832.
49. Collins JP, Keller KF, Brown L. "Ghost" forms of Giardia lamblia cyst initially misdiagnosed as Isospora. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27:835-836.
50. Toebes AS, Landfried SS, Williams LD. Surface morphology of Giardia cysts recovered from a variety of hosts. In: Jakubowski W, Hof JC: *Waterborne transmission of Giardiasis*. Cincinnati, Ohio: Environmental Protection Agency (EPA), 1978:22-37.
51. Bingham AK, Jarrol EI, Meyer EA. Induction

- of Giardia excystation and the effect of temperature on cysts viability as compared by eosin-exclusion and vitro excystation. In: Jakubowski W, Hoff JC eds: Waterborne transmission of Giardiasis, Cincinnati, Ohio: Environment Protection Agency (EPA), 1979: 217-228.
52. Schupp DG, Erlandsen SL. Determination of Giardia muris cyst viability by differential interference contrast phase or brightfield microscopy. J Parasitol 1987; 73 : 723-729.
 53. Lindmark GD. Energy metabolism of the anaerobic protozoon Giardia lamblia. Mol Biochem Parasitol 1980; 1:1-12.
 54. Weinbach EC, Claggett CE, Keiter DB. y col. Respiratory metabolism of Giardia lamblia. J. Parasitol 1980; 66: 347-350.
 55. Gillin FD, Diamond LS: Entamoeba histolytica and Giardia lamblia: growth responses to reducing agents. Exp Parasitol 1981; 51:382-391.
 56. Muñoz ML, Winbach EC, Wieder SC y col. Giardia lamblia: detection and characterization of calmodulin. Exp Parasitol 1987; 63:42-48.
 57. Muñoz ML, Claggett CE, Weinbach EC. Calcium transport and catabolism of adenosine triphosphate in protozoan parasite Giardia lamblia. Comp Biochem Physiol 1988; 91B : 137-142.
 58. Kofoid CA, Chrustuabsen ED. On binary and multiple fission in Giardia muris (Grassi). Univ Calif Publ Zool 1915; 16:30.
 59. Kulda J, Nohvynkova E. Flagellates of the human intestines of other species. In: Kreier JP eds: Parasitic Protozoa Intestinal Flagellates. New York: Academic Press, 1978; 2:2-139.
 60. Bingham AK, Meyer EA. Giardia excystation can be induced in vitro in acidic solutions. Nature 1979; 277: 301-302.
 61. Bernal RR. Giardiasis. En: Zoonosis Parasitarias. Fac. Veterinaria UNAM, Méx, 1985:104-126.
 62. Tay ZJ, Salazar SPM, Haro AI y col. Frecuencia de las protozoosis intestinales en México. Sal Pub Méx 1978; 20: 297-337.
 63. Gómez MT, García CR, Ortiz RE. Duodenitis por Giardia lamblia. Rev Mex Gastroenterol 1981;

46:11-15.

64. Valdez B, Albores A, Cebrian M. Prevalencia de parasitosis intestinal en una población rural de la región lagunera. Sal Pub Mex 1982; 24:55-60.
65. Vega FL, Alvarez EA, Romo QG, Bernal RR. Absorción de proteínas en niños con giardiasis. Bol Med Hosp Infant Mex 1982; 39:19-22.
66. Alonso GT. Frecuencia de las parasitosis intestinales en una escuela secundaria. Sal Pub Méx 1983; 25(4) 387-392.
67. Cázares TR, González DMA. Frecuencia de parasitosis intestinales. Un estudio realizado en pacientes afiliados a la clínica Cuauhtemoc y Famosa. Rev Med Patol Clin 1985; 32: 149-151.
68. Ramirez MJA, Rivera EM, Conti E. Frecuencia de *Giardia lamblia* en las heces de 100 niños con diarrea crónica. Bol Med Hosp Infant Mex 1986; 43:247-249.
69. Cruz LA, Cortés RR, Ita CF. Parasitosis intestinales en el estado de Puebla. Rev Cien Ex Nat Apl Elementos 1987; 2:25-35.
70. Salazar SPM, Alonso GT, Tay ZJ y col. Frecuencia de parasitosis intestinales en un grupo de escolares en Copilco el Alto y comparación de cinco métodos coproparasitológicos en relación a su capacidad diagnóstica. Rev Med Patol Clin 1988; 35:77-82.
71. Meyer EA. The Epidemiology of Giardiasis. Parasitology Today 1988; 4:66-68.
72. Shaw PK, Brodsky RE, Lyman DD y col. A community-wide outbreak of Giardiasis with evidence of transmission by municipal water supply. Ann Inter Med 1977; 87:426-432.
73. Center for Disease Control (CDC). Waterborne Giardiasis- California, Colorado, Oregon, Pennsylvania. MMWR 1980; 29:121-123.
74. Healy GR. The presence and absence of *Giardia lamblia* in studies on parasitic prevalence in the U.S.A. In: Jakubowsky W, Hoff JC eds: Waterborne Transmission of Giardiasis. Cincinnati, Ohio: Environmental Protection Agency (EPA), 1979:92-103.
75. Kent GP, Greenspan RJ, Herndon JL y col. Epidemic giardiasis caused by a contaminated public water supply. Am J Publ Health 1988; 78:139-143.

76. Navin TR, Juranek DD, Ford M y col. Case-control study of waterborne giardiasis in Reno, Nevada. *Am J Epidemiol* 1985; 122 :269-275.
77. Knight R. Epidemiology and transmission of giardiasis. In: *Symposium on giardiasis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1975; 24:237-242.
78. Jakubowski W. Purple burps and the filtration of drinking water supplies. *Am J Public Health* 1988; :123-125.
79. Dacinger M, López M, Mayoral G y col. Evaluacion de la giardiasis en niños. *Rev Med Fed* 1973; 42: 305-309.
80. Dacinger M, López M. Numbers of giardia in the feces of infected children. *Am J Trop Med Hyg* 1975; 24:237-242.
81. Rendtorff CR. The experimental transmission of Giardia lamblia among volunteer subjects. In: Jakubowsky W, Hoff JC eds: *Waterborne Transmission of Giardiasis*. Cincinnati, Ohio: Environmental Protection Agency (EPA), 1979:64-81.
82. Rendtorff RC. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II Giardia lamblia cyst given in capsules. *Am J Hyg* 1954; 59:209-220.
83. Craun GF. Waterborne giardiasis in the United States, 1965-84. *Lancet* 1986, 2:513-514.
84. Moore GT, Cross WM, Mc Guirre D y col. Epidemic giardiasis at ski resort. *New Engl J Med* 1969; 281 : 402.407.
85. Hoff JC. Inactivation of microbial agents by chemical disinfectants. In: *Water Engineering Research Laboratory*. Cincinnati, Ohio: Environmental Protection Agency (EPA), 1986: 2-86.
86. Jarrol EL, Bingham AK, Meyer EA. Giardia cyst destruction: effectiveness of six small-quantitly water disinfection methods. *AM J Trop Med Hyg* 1980 29 :8-13.
87. Isaac-Renton JL, Proctor EM. Evaluation of a tangential flow multiple filter technique for detection of Giardia lamblia cyst in water. *APP Environ microbiol* 1986; 52:400-402.
88. Osterholm MT, Forgang JC, Restinen TL y col. An

- outbreak of foodborne giardiasis. *New Eng J Med* 1981; 304 :24-28.
89. Crawford FG, Vermund SH. Parasitic infections in day care centers. *Pediatric Infect Dis* 1987;6:744-749
 90. Black RE, Dykes AC, Sinclair S y col. Giardiasis in day care centers: evidence of person-to-person transmissions. *Pediatrics* 1977, 60:486-491
 91. Pinckering LK, Woodward WE, Dupont HL. Occurrence of *Giardia lamblia* in children in day care centers. *J Pediatric* 1984; 104:522-526.
 92. Arellano PM, Prieto AB. Frecuencia de parasitosis intestinales en guarderías infantiles del Distrito Federal. *Rev Mex Ped* 1972; 41:173-180
 93. Navar SA, Martínez Ma, Prado LS. Correlación clínica y de laboratorios de parasitosis intestinales en lactantes y preescolares, de la guardería del Hospital Infantil de México. Tesis Hosp Infant Mex 1985.
 94. Ketlis AA, Thor G. Inter and intrafamilial distribution of *Giardia lamblia* infection. *Scand J Infect Dis* 1974, 6:349-353.
 95. Weber J. Sexually acquired parasitic infections in homosexual men. *Parasitology Today* 1985; 1:93-96.
 96. Wofe SM. Giardiasis. *JAMA* 1975; 233:1362-1365.
 97. Jokipii L. Prepatency of giardiasis. *Lancet* 1977; 21:1095-1097.
 98. López CE, Juraneck DD, Sinclair y col Giardiasis in american travelers to Madeira Island, Portugal. *Ann J Trop Med Hyg* 1978; 27:1128-1132.
 99. Babb RR, Peck Oc, Vescia FG. Giardiasis: a cause to traveler's diarrhea. *JAMA* 1971; 217:1359-1361
 100. Lippy EC. Tracing a giardiasis outbreak at Berlin, New Hampshire. *J Am Water Works Assoc* 1976, 70:512-520
 101. Grant DR, Woo PTK. Comparative studies of *Giardia* spp. in small mammals in southern Ontario. *Can J Zool* 1978;56: 1348-1366.
 102. Bemrick WJ, Erlandsen SL. Giardiasis - Is et really a zoonosis. *Parasitology Today* 1988; 4:69-71.

103. Davies RB, Hibler CP. Animal Reservoir and cross-species transmission of Giardia. In: Jakubowsky W, Hoff JC: Waterborne Transmission of giardiasis. Cincinnati, Ohio: Environmental Protection Agency (EPA), 1979:104-125.
104. Hewlett EL, Andrews JS, Ruffer J y col. Experimental infection of mongrel dogs with Giardia lamblia cyst and cultured trophozoites. J Infect Dis 1982; 145:89-93.
105. Wallis PM, Buchnan-Mappin JM, Faubert GM y col. Reservoirs of Giardia spp. in Southwestern Alberta. J Wild Dis 1984; 20:279-283.
106. Belosevic M, Faubert GM, Mc Lean JD y col. Giardia lamblia infections in mongolian gerbils: An animal model. J Infect Dis 1983; 147:222-226.
107. Dykes AC, Juronek DD, Lorenz RA y col. Municipal waterborne giardiasis: An epidemiological investigation beavers implicated as a possible reservoir. Ann Intern Med 1980; 92:165-170.
108. Pacha RE, Clark GW, Williams EA y col. Small rodents and other mammals associated with mountains meadows as reservoirs of Giardia spp. and Campylobacter spp. Appl Environ Microbiol 1987; 53:1574-1579.
109. McGrath J, O'Farrell PT, Boland SJ. Giardial steatorrhea. A fatal case with organic lesions. Irish J Med Sci 1940; 6:802-816.
110. Yarley JH, Takano J, Hendrix TR. Epithelial and other mucosal lesions of the jejunum in giardiasis. Bull Hopk Hosp 1964; 115:389-406.
111. Barbieri D, De Brito T, Hoshino S y col. Giardiasis in childhood: Absorption tests and biochemistry, histochemistry, lighth, and electron microscopy of jejunal mucosa. Arch Dis Child 1970; 45:466-472.
112. Yardley JH, Bayless TM. Giardiasis. Gastroenterology 1967; 52:301-304.
113. Morecki R, Parker JG. Ultrastructural studies of the human Giardia lamblia and subjacent mucosa in a subjeti with steatorrhea. Gastroenterology 1967; 52:151-164.
114. Hartong WA, Gourley WK, Arvanitakis C. Giardiasis: clinical spectrum and functional-structural

abnormalities of the small intestinal mucosa.
Gastroenterology 1979; 77:61-69.

115. Vega-Franco L. Absorción intestinal en niños con giardiasis. En: Simposio Internacional sobre Tinadazol. Inv Med Int 1983; 10:65-71.
116. Müller JC, Jones AL, Brandborg LL. Scanning electron microscope observation in human giardiasis. In: Scanning electron microscopy. III Research Institute, Chicago 1973; 557-564.
117. Earlandsen SL, Chase DG. Morphologic alteration in the microvillous border of villous epithelial cells produced by intestinal microorganism. Am J Clin Nutr 1974; 27:1277-1286.
118. Véghelyi P. Celiac disease imitated by giardiasis. Am J Dis Child 1939; 57:894-899.
119. Miller R. Lambliasis as a cause of chronic enteritis in children. Arch Dis Child 1926; 1:93-94.
120. Vega FL, Meza AC, Lara AR y col. Absorción de la D-xilosa en las parasitosis intestinales. Prensa Med Méx 1975; 50:197-201.
121. Borgström BA, Dahlquist GL, Lundh G. Studies of intestinal digestion and absorption in the human. J Clin Invest 1957; 36:1521-1536.
122. Takano J, Yardley JH. Jejunal lesions in patients with giardiasis and malabsorption. A electron microscopic study. Bull Hopking Hosp 1965; 116:413-429.
123. Cantor D, Biempica L, Toccalino H y col. Small intestinal studies in giardiasis. Am J Gastro 1967; 47:134-141.
124. Tolboom JJM, Kabir H, Notatseli P y col. Lactose malabsorption an giardiasis in Basotho school children. Ac Pediatr Scand 1987; 76:60-65.
125. Khosla SN, Sharma SV, Shivastava SC. Malabsortion in giardiasis. Am J Gastroenterol 1978; 69:694-700.
126. Kotcher E, Miranda M, Esquivel R y col. Intestinal malabsorption and helminthic and protozoan infections of the small intestine. Gastroenterology 1966; 50:366-371.
127. Palumbo PJ, Scudamore H, Thompson J. Relationship of infestation with Giardia lamblia to intestinal malabsorption syndrome. Proc May Clin 1962;

- 37:569-598.
128. Dominguez B. Niveles de hormona de crecimiento en pacientes con Giardia lamblia. Tesis UNAM 1978.
 129. Brandborg LL, Tankersley CB, Gottlieb S y col. Histological demonstration of mucosal invasion by Giardia lamblia in man. *Gastroenterology* 1967; 52:143-150.
 130. Saha TK, Ghosh TK. Invasion of small intestinal mucosa by Giardia lamblia in man. *Gastroenterology* 1977; 72:402-405.
 131. Radulescu S, Rau C, Petrasincu D y col. Behaviour and cytopathogenicity of Giardia lamblia in cell cultures. *Arch Roum Pathol Exp Microbiol* 1980; 39:163-170.
 132. Meyer EA. The propagation of Giardia trophozoites in vitro. In: Jakubowski W, Hoff JC eds: *Waterborne Transmission of Giardiasis*. Cincinnati, Ohio: Environmental Protection Agency (EPA) 1978; 211-216.
 133. Ackers JP. Giardiasis. Basic parasitology. In: *Symposium on Giardiasis*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74:427-429.
 134. Tomkins AM, Wright BS, Drasar BS y col. Bacterial colonization of jejunal mucosa in giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978; 72:33-36.
 135. Vega FL, Meza AC, Romero ZJL, Bernal RR. ¿Favorece la giardia lamblia la proliferación intestinal de bacterias? *Bol Med Hosp Infant Mex* 1986; 43:618-621.
 136. Junanek D. Waterborne giardiasis. In: Jakubowski W, Hoff JC eds: *Waterborne Transmission of Giardiasis*. Cincinnati, Ohio: Environmental Protection Agency (EPA) 1979; 150-163.
 137. Drodsky RE, Spanacer HC, Schultz MG. Giardiasis in american travelers to the Soviet Union. *J Infect Dis* 1974; 130:319-323.
 138. Ayala CA, Vega FL, Toca T, Bernal RR. Giardia lamblia en niños con diarrea de larga evolución. *Rev Mex Ped* 1979; 46:290-295.
 139. Blenkinsopp WK, Gibson JA, Haffenden GP. Giardiasis and severe jejunal abnormality. *Lancet* 1978; 1:994.
 140. Levinson JD, Nastro LJ. Giardiasis with total villous atrophy. *Gastroenterology* 1978; 74:271-275.

141. Cortner JA. Giardiasis, a cause of celiac syndrome. *Am J Dis Child* 1959; 98:311-313.
142. Wolfe MS. Syntomatology, diagnosis and treatment. In Erlandsen SL, Meyer EA eds: Giardia and Giardiasis. New York: Plenum Press, 1984.
143. Hass J, Bücken EW. On the pathogenicity of the Lambia infections. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1967; 92:1869-1871.
144. Webb S, Fowler R. Giardiasis and ulcerative colitis in infant. *N Engl J Med* 1982; 306:1551.
145. Scheehy TW, Holley P. Giardia-induced malabsorption in pancreatitis. *JAMA* 1975; 233:1373-1376.
146. Ungar BLP, Yolken RH, Nash TE. y col. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Giardia lamblia in fecal specimens. *J Infest Dis* 1984; 149:90-97.
147. Ridley MJ, Ridley DS. Serum antibodies and jejunal histology in giardiasis associated with malabsorption. *J Clin Pathol* 1976; 29:30-34.
148. Visvesvara SG, Smith DP, Healy RG. A immunofluorescence test to detect serum antibodies to Giardia lamblia. *Ann Inter Med* 1980; 93:802-805.
149. Hollander N, Riley D, Befus D. Immunology of giardiasis. *Parasitology Today* 1988; 4:124-130.
150. Webster ADB. Giardiasis and immunodeficiency diseases. In: *Simposium on Giardiasis*. *Trans R Soc Med Trop Hyg* 1980; 74:440-442.
151. Yardley JH, Hendrix TR. Immunologic status in patients with giardiasis. *Gastroenterology* 1980; 78:421-422.
152. Geller M, Geller, Flaherty DK y col. Serum IgE levels in giardiasis. *Clin Allergy* 1978; 8:69-71.
153. Deguchi M, Gillin FD, Gigli I. Mechanism of killing of Giardia lamblia trophozoites by complement. *J Clin Invest* 1987; 79:1296-1302.
154. Belosevic M, Faubert GM. Lysis and immobilization of Giardia muris trophozoites in vitro by immune serum from susceptible and resistant mice, *Parasite Immunol* 1987; 9:11-19.
155. Moody AH, Ridley DS, Tomkins AM. y col. The specificity

- of serum antibodies to Giardia lamblia and to enterobacteria in gastrointestinal disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 1982; 76:630-632.
156. Kulkarni K, Khanna R, Khuller M y col. Plasma membrane associated antigens of trophozoites of axenic Giardia lamblia. Trans R Soc Trop Med Hyg 1988; 82:439-444.
 157. Taylor GD, Wenman WM. Human immune response to Giardia lamblia infection. J Infect Dis 1987; 155:137-140.
 158. Nash TE, Keister DB. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of Giardia. J Infect Dis 1985; 152:1166-1168.
 159. Nash TE, Aggarwal A, Adam RD y col. Antigenic variation in Giardia lamblia. J Immunol 1988; 141:636-641.
 160. Adam RD, Aggarwal A, Lal AA y col. Antigenic variation of a cysteine rich protein in Giardia lamblia. J Exp Med 1988; 167:109-118.
 161. Nash TE, Aggarwal A. Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of Giardia isolates. J Immunol 1986; 136:2628-2634.
 162. Sullivan R, Linneman CC, Clark CS y col. Seroepidemiologic study of giardiasis patients in high-risk groups in a midwestern city in the United States. Am J Publ Health 1987; 77:960-963.
 163. Green EI, Miles Ma, Warhurst DC. Immunodiagnostic detection of Giardia antigen in faeces by a rapid visual enzyme-linked immunosorbent assay. Lancet 1985; 11:691-693.
 164. Ament ME, Rubin MD. Relation of giardiasis to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. Gastroenterology 1972; 62:216-226.
 165. Ament ME, Ochs HD, Davis SD. Structure and function of the gastrointestinal tract in primary immunodeficiency syndromes: A study of 39 patients. Medicine 1973; 52:227-248.
 166. Owen RL. The immune response in clinical and experimental giardiasis. In: Symposium on Giardiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74:443-445.
 167. Zinneman HH, Kaplan AP. The association of giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A. Am J Dig Dis 1972; 17:793-797.

168. Jones EG, Brown WR. Serum and intestinal fluid immunoglobulins in patients with giardiasis. *Dig Dis* 1974; 19:791-796.
169. Stevens DP, Thomson RC. Animal model of human disease giardiasis. *Am J Pathol* 1978; 90:529-532.
170. Kraft SC. The intestinal immune response in giardiasis. *Gastroenterology* 1979; 76:877-879.
171. Hill Dr, Burge JJ, Horcus JL y col. Ingestion and killing of *Giardia lamblia* by human macrophages. *Clin Res* 1982; 30:369A.
172. Ferguson A. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut* 1977; 18:921-937.
173. Zisman M. Blood-group A and giardiasis. *Lancet* 1977; 1:1285.
174. Barnes GL, Kay R. Blood-groups in giardiasis. *Lancet* 1977; 1:808.
175. Sotto A, Cabrera S, Castro J. Blood Groups in recurrent giardiasis. *Lancet* 1983; 2:1312-1313.
176. Jokipii L, Jokipii A. Is predisposition to giardiasis associated with the blood groups? *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29:5-7.
177. Weitz JC, Rotler K, Gottlieb B y col. Giardiasis y grupos sanguíneos. *Rev Med Chile* 1981; 109:9-12.
178. León TA, Pérez RBE, Alvarez Ch R. Relación entre grupos sanguíneos y giardiasis en pacientes pediátricos. *Infectología Méx* 1986; 6:367-371.
179. Vega FL, González BM, Zelaya FE, Bernal RR y col. La giardiasis en relación con el grupo sanguíneo A. *Bol Med Hosp Infant Méx* 1987; 44:594-597.
180. Roberts-Thomson IC, Mitchell GF, Anders RF y col. Genetic studies in human and murine giardiasis. *Gut* 1980; 21:397-401.
181. Abaza H, Hilal L, Asser L y col. Histocompatibility and immunological studies in giardiasis. *Trans R Soc Trop. Med Hyg* 1988; 82:437-439.
182. Deschiens R. Chimisme gastrique et infections parasitaires du tube digestif. *Ann Inst Pasteur* 1929; 43:1353-1369.

183. Armaghah V. Biological studies on the Giardia of rats. Am J Hyg 1937; 26:236-258.
184. Gillin FD, Reiner DS, Boucher SE. Small-intestinal factors promote excystation of Giardia lamblia in vitro. Infec Immunol 1988; 56:705-707.
185. Rice EW, Schaefer FW. Improved in vitro excystation procedure for Giardia lamblia cyst. J Clin Microbiol 1981; 14:709-710.
186. Schaefer FW, Rice EW, Hoff JC. In vitro excystation of Giardia muris cysts. 55 th Annual Meeting of the American Society of Parasitology Abstracts 90, 1980:51.
187. Schaefer FW, Rice EW, Hoff JC. Factors promoting in vitro excystation of Giardia muris cysts. Trans R Soc Trop Med Hyg 1984; 78:795-800.
188. Buchel LA, Gorenflot A, Chochillon C y col. In vitro excystation of Giardia from humans. A scanning electron microscopy study. J Parasitol 1987; 73:487-493.
189. Bhatia VN, Warhurst DC. Hatching and subsequent cultivation of cysts of Giardia intestinalis in Diamond's medium. J Trop Med Hyg 1981; 84:45-47.
190. Isaac-Renton JL, Proctor EM, Promeya R y col. A method of excystation an culture of Giardia lamblia. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986; 80:989-990.
191. Meyer AE. Giardia lamblia: Isolation and axenic cultivation. Exp Parasitol 1976; 39:101-105.
192. Visvesvara GS. Axenic growth of Giardia lamblia in Diamond's TPS-1 medium. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74:213-215.
193. Belosevic M, Faubert GM. Giardia muris: correlation between oral dosage course of infection and trophozoite distribution in the mouse small intestine. Exp Parasitol 1983; 56:93-100.
194. Iwata S, Araki T. Studies on giardiasis. Bull Osaka Med School 1960; 6:92-106.
195. Karapetyan AE. In vitro cultivation of Giardia. Tsitologiya 1960; 2:379-381.
196. Karapetyan AE. In vitro cultivation of Giardia duodenalis. J Parasitol 1962; 48:337-340.

197. Soloviev MM, Akimova RF, Schmakova VI. Isolation and maintenance of Giardia duodenalis cultures on an modified Karapetyan medium. Med Parazitol (Mosk) 1971; 40:75-78.
198. Roux G, Ecalle R. Influence du suc pancreatique sur la proliferation in vitro du Giardia duodenalis. Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L'Academie des Sciences, Paris series D 1968; 266:2434-2436.
199. Meyer EA, Pope BL. Culture in vitro of Giardia trophozoites from the rabbit and chinchilla. Nature 1965; 207:1417-1418.
200. Meyer EC. Isolation and axenic cultivation of Giardia trophozoites from the rabbit, chinchilla and cat. Exp Parasitol 1970; 27:179-183.
201. Dancinger M, Meyer EA. The in vitro growth response of Giardia trophozoites from the rabbit. J Protozool 1971; 18:311-313.
202. Fartess E, Meyer EA. Isolation and axenic cultivation of Giardia trophozoites from the guinea pig. J Parasitol 1974; 62:689.
203. Visvesvara GS, Healy GR, Meyer EA. Comparative antigenic analysis of Giardia lamblia trophozoites grown axenically in medium supplemented with either human, bovine or rabbit serum. 5 th International Congress of Protozoology, New York 1977.
204. Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Shaudin 1903 and E.histolytica-like ameba. J Parasitol 1968; 54:1047-1056.
205. Gillin FD, Diamond LS. Clonal growth of Giardia lamblia trophozoites in a semisolid agarose medium. J Parasitol 1980; 66:360-362.
206. Gillin FD, Diamond LS. Inhibition of clonal growth of Entamoeba histolytica and Giardia lamblia by metronidazole, quinacrine and other antimicrobial agents. J Antimicrob Chemother 1981; 8:305-316.
207. Gillin FD, Reiner DS, Wang CS. Human milk kills parasitic intestinal protozoa. Science 1983; 211: 1290- 1292.
208. Weider SC, Keister DB, Reiner DS. Mass cultivation of Giardia lamblia in a serum-free medium. (in press) 1983.
209. Keister DB. Axenic culture of Giardia lamblia in

- TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983; 77:487-488.
210. Farthing MJG, Varon SR, Kusch GT. Mammalian bile promotes growth of *Giardia lamblia* in axenic culture. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983; 77:467-469.
211. Kasprzak W, Majewska AC. Improvement in isolation and axenic growth of *Giardia intestinalis* strains. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985; 79:551-557.
212. Smith P, Gillin F, Spira W y col. Chronic giardiasis: studies on drugs sensitivity, toxin production, and host immune response. Gastroenterology 1982; 83:797-803.
213. Biagi FF, González C. Estudio del método para el recuento de huevos en materia fecal. Rev Lat Microbiol 1959; 2:51-54.

*Las referencias bibliográficas están anotadas de acuerdo con las normas del Velázquez JL, Zurita VE. Instrucciones para autores de escritos médicos: tercera edición. Bol Med Hosp Infant Méx 1989; 46: 65-74.

Agradecimientos:

- A todo el personal del Laboratorio de Parasitología del HIMFG, por su colaboración.
- A la doctora Rocío Peña Alonso por el apoyo técnico en la toma de fotografías.
- A la familia Haces por la corrección de estilo y el trabajo en computadora.