

**Universidad Nacional de San Martín.
(UNSAM)**

**Administración Nacional de
Laboratorios e Institutos de Salud
“Dr Carlos Malbran”
(ANLIS)**

Maestría en Microbiología Molecular.

Tesis:

Título: Detección de genotipos A (I y II) y B por PCR-RFLP de *Giardia lamblia* en heces humanas y animales en La Plata y su área de influencia.

Tesista: Marta Cecilia Minvielle.

Director: Profesor Doctor Mario Lozano.

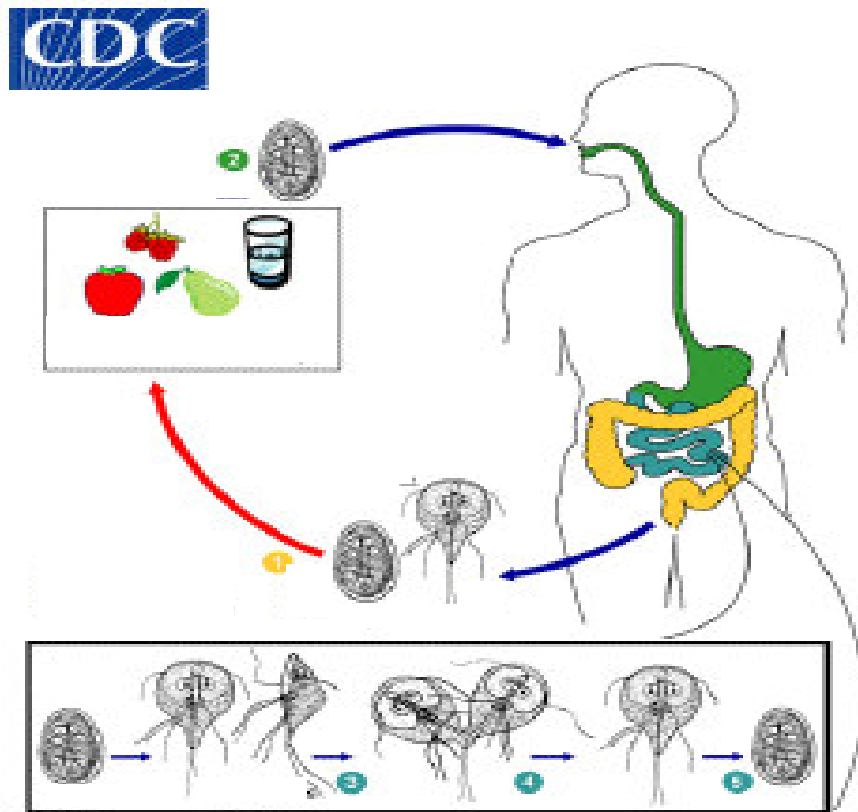
Lugar de Trabajo:
Cátedra de Microbiología y Parasitología.
Facultad de Ciencias Médicas.
Universidad Nacional de La Plata.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Giardia lamblia (sinónimos: *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis*) es un microorganismo flagelado eucariota unicelular que causa enfermedad diarreica en todo el mundo (Adam R, 2001). Este protozoo intestinal fue hallado en un amplio rango de mamíferos y se encuentra aceptado como agente zoonótico (Mc Glade et al., 2003). Es la causa más frecuente de diarrea no bacteriana en niños de todo el mundo (Eligio García et al., 2002). Su prevalencia e incidencia es alta en países en vías de desarrollo y es la causa más común de brotes de diarrea de origen hídrico en Estados Unidos (Adam R, 2001). Ocasionalmente, este parásito ha sido mencionado como agente etiológico de diarrea de origen alimentario (Mintz et al., 1993). También tiene importancia en ciertas áreas del mundo como agente etiológico de diarrea del viajero (Brodsky et al., 1974)

La enfermedad se adquiere principalmente por ingestión de quistes y puede producir desde cuadros asintomáticos hasta diarreas graves con síndrome de malabsorción, que afectan principalmente el desarrollo de niños pre-escolares (Fraser et al., 2000; Amar et al., 2002). Los quistes ingresan con el consumo de agua o alimentos contaminados (Figura 1), o mediante contacto directo de persona a persona (ciclo ano-mano-boca). Para van Keulen y colaboradores (2002) esta última es la principal vía de transmisión en los países subdesarrollados.

Figura 1: Ciclo biológico de *Giardia lamblia*.



CLASIFICACIÓN

Tradicionalmente los organismos han sido clasificados en eucariotas y procariotas y aún muchos investigadores siguen esta división. Desde la década del 90, algunos autores han aceptado una nueva clasificación: Archaea (arqueobacterias), Bacteria (eubacterias) y Eukaria (eucariotas) (Woese et al, 1990). Con cualquiera de los sistemas de clasificación mencionados, *G. lamblia* es un organismo eucariota, perteneciente al reino de los protistas. Es un flagelado del orden de los Diplomonadida (dos cariomastigotes, cada uno con cuatro flagelos, dos núcleos, sin mitocondrias, sin complejo de Golgi, presentan quistes, y pueden tener vida libre o parasitaria), familia Hexamitidae (seis u ocho flagelos, dos núcleos, simetría bilateral, a veces axostilos y cuerpos mediales o parabasales). Esta familia también incluye a *Sppironucleus muris*, un parásito del topo y de *Hexamita inflata*, un microorganismo de vida libre (Adam R., 2001).

Las clasificaciones modernas de los organismos se basan fundamentalmente en comparaciones moleculares. Si bien, la clasificación correcta de un microorganismo requiere del conocimiento de su genoma completo, es posible llegar a resultados satisfactorios basando la clasificación en la secuencia de unos pocos genes. Para ello, estos genes deben cumplir determinadas condiciones, entre ellas, que sean requeridos durante toda la vida, que conserven su función en las distintas formas de vida y que posean un grado de conservación suficiente dentro del grupo analizado, para permitir la comparación mediante alineamientos seguros para clasificar todos los organismos. El gen del ARN ribosomal (ARNr) es el más utilizado para las comparaciones moleculares debido a que las secuencias de ARNr son altamente conservadas a través de las distintas formas de vida y porque la función del ARNr es central en la biología de cualquier organismo. En los eucariotas, la clasificación más ampliamente aceptada ha sido realizada teniendo en cuenta la secuencia de la subunidad pequeña (18 S) del ARNr. Basada en la comparación de esta secuencia, *G. lamblia* ha sido propuesta como uno de los organismos eucariotas más primitivos, junto con *Trichomonas vaginalis* y los microsporidios. En definitiva, utilizando los análisis filogenéticos basados en las secuencias nucleotídicas de los ARN 18S, *Giardia* ha sido clasificada según el siguiente esquema: reino Protista, subreino Archezoa, subphylum Eopharyngia, clase Trepomonadea, subclase Diplozoa, y orden Giardiida que incluye las familias Octomitidae y Giardiidae (Adam R., 2001).

ESPECIES

Según Noemí & Atias (1993), *Giardia* fue identificada por primera vez por Leeuwenhoek en 1681 cuando él mismo examinaba sus heces diarreicas en el microscopio. El microorganismo fue descrito con gran detalle por Lambl en 1859, quien la denominó *Cercomonas intestinalis*. En 1879, fue hallada en roedores y en 1882 en renacuajos, donde se utilizó el término *Giardia* como género. En 1888, Blanchard sugiere el nombre *Lamblia intestinalis*, mientras que en 1902 Stiles lo cambia por *G. duodenalis*. Subsecuentemente, también fueron propuestos los nombres de *G. lamblia* (1915) y *G. enterica* (1920). En 1952, Filice publicó una detallada descripción morfológica de *Giardia* y propuso el nombre de tres especies sobre la base de la morfología del cuerpo medial:

G. duodenalis, *G. muris* y *G. agilis* (Figura 2, tomada de Monis and Thompson, 2003).

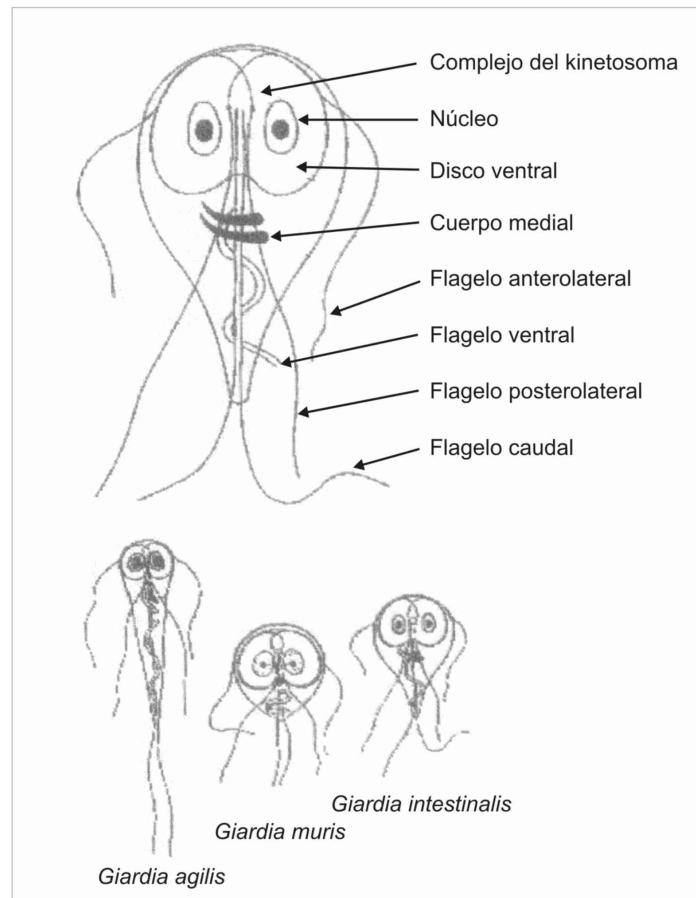
Otras especies descritas son: *G. psittaci* en loros, *G. ardeae* en garzas, *G. microti* en ratones campestres y en ratas almizcleras (van Keulen et al., 1998).

El nombre *G. lamblia* comenzó a ser aceptado a partir de 1970. Algunos trabajos publicados en 1980 la refieren con el nombre de *G. duodenalis* y, a partir de 1990 el nombre *G. intestinalis* aparece en los títulos de las publicaciones. Según Adam (2001), no existe razón para abandonar el término *G. lamblia*, que ha sido aceptado en la literatura científica.

El trofozoíto de *G. lamblia* (cuya descripción detallada se presenta más adelante en la sección Biología Celular), tiene forma de pera y posee uno o dos cuerpos mediales (también llamados parabasales) en forma de clava, *G. agilis* es larga y delgada y tiene un cuerpo medial en forma de lágrima y *G. muris* es más corta y redondeada y posee un pequeño y redondeado cuerpo medial. *G. lamblia* es encontrada en humanos y en una variedad de otros mamíferos. *G. muris* se halla en roedores y *G. agilis* en anfibios.

Una apropiada clasificación de *Giardia* spp es necesaria para comprender la biología, la patogénesis y la epidemiología de este microorganismo. La controversia acerca del número de especies de *Giardia* continuó por muchos años pues muchos microscopistas que describieron a *Giardia* spp proponían una especie diferente para cada huésped (sinónimos: hospedador, hospedero). Aproximadamente 40 especies han sido propuestas sobre la base del huésped (Adam R, 2001). Estas clasificaciones fueron realizadas en base a las diferencias morfológicas detectadas por microscopía óptica, por lo que, es probable que, en la actualidad, todavía se sobreestime el número de especies. Además, las infecciones cruzadas entre huéspedes han resultado muy controvertidas. Las herramientas utilizadas para distinguir aislamientos de *Giardia* han sido inadecuadas hasta la introducción de las técnicas moleculares y de microscopía electrónica que han permitido comenzar a establecer un sistema de clasificación más consensuado.

Figura 2. Trofozoitos de *Giardia lamblia* (*G. intestinalis*), *G. muris* y *G. agilis* (tomada de Monis and Thompson, 2003)



GENOTIPOS

Las herramientas de clasificación molecular han comenzado a aplicarse en la identificación de este protozoo en las últimas décadas pues aportan información para comprender la patogénesis y el rango de huéspedes de *Giardia* spp obtenidas de humanos y de una variedad de otros mamíferos. El primer estudio sobre las diferencias moleculares fue el análisis de zimodemas de cinco aislamientos axénicos, tres de humanos, uno de cobayo y uno de gato, usando seis enzimas metabólicas (Bertram et al., 1983). El análisis de zimodemas consiste en la tipificación de organismos basada en la migración electroforética de enzimas. La migración de las moléculas sobre un soporte depende de su tamaño, estructura y punto isoeléctrico. Dado que dichas propiedades dependen de la secuencia primaria de aminoácidos, las diferencias en los zimodemas pueden reflejar diferencias en las secuencias de los genes que codifican estas enzimas. En el año 1985 se llevó a cabo el análisis del polimorfismo de longitud de los segmentos de restricción (RFLP) en 15 aislamientos (Nash et al., 1985). Estos estudios identificaron tres grupos de aislamientos de *Giardia*; el grupo 3 fue tan diferente de los grupos 1 y 2, que se sugirió pertenecía a una especie diferente. Subsecuentemente, otros estudios de clasificación molecular han sido llevados a cabo usando análisis de

zimodemas (Proctor et al., 1989; Strandén et al., 1990) y electroforesis de campo pulsante (Sarafis and Isaac-Renton, 1993). Sin embargo según Adam (2001), este tipo de metodologías son de limitado valor para la clasificación debido a la frecuente ocurrencia de reordenamientos cromosómicos. Del mismo modo, la clasificación mediante la detección de antígenos de superficie (Davis-Hayman & Nash, 2002) está limitada por la variación antigénica de las proteínas variantes de superficie.

Las secuencias de los genes del rRNA 18S o de las enzimas triosafosfato-isomerasa (tim) y glutamato-dehidrogenasa (gdh) se han estudiado fundamentalmente para permitir una mejor identificación y comparación de los aislamientos de *Giardia* (Monis et al., 1999; Adam, 2000; Lu et al., 2002; Rimhanen-Finne et al., 2002). Todos estos estudios han confirmado la división de los aislamientos humanos en dos grupos principales denominados genotipos A (también denominado grupo Polaco) y B (o grupo Belga) (Mayrhofer et al., 1995). Además de las diferencias genéticas, los dos genotipos pueden tener un número importante de diferencias biológicas. Por ejemplo, el genotipo B fue significativamente más patogénico en infecciones de voluntarios humanos respecto al genotipo A. El genotipo A ha sido posteriormente separado en dos subgrupos I y II con diferencias biológicas y epidemiológicas importantes (Adam R, 2000).

En animales se han identificado los genotipos A, B, C, D, E, F y G. Si bien cada uno de estos genotipos podría ser considerado una especie separada, se requieren una mayor cantidad de datos y consensos para asegurarlo (Tabla 1). La designación de especie a organismos clonales es controvertida (Adam R, 2001) y debería estar supeditada a un acuerdo general entre los investigadores. La designación mediante genotipos podría facilitar una mejor comprensión de la información sobre este parásito.

Los estudios de genotipificación han permitido la identificación de aislamientos de este protozoo en perros, algunos genéticamente diferentes a los obtenidos en humanos. Los aislamientos de *Giardia* de perros han sido difíciles de cultivar, en comparación a los aislamientos humanos (Meloni and Thompson, 1987). Hopkins y colaboradores (1997) llevaron a cabo un estudio sobre nueve aislamientos de perros y encontraron que solo uno fue similar a los aislamientos de humanos. Estos resultados sugieren que la mayoría de las *Giardias* que parasitan perros son distintas de las halladas en humanos y por lo tanto existiría un bajo potencial de transmisión zoonótica.

Estudios sobre *Giardia* obtenidas de ganado vacuno han demostrado que algunos de estos aislamientos pertenecen al genotipo E y otros al genotipo A, y solamente este último podría infectar a los humanos (O'Handley et al., 2000).

Los genotipos C a G no han sido aún encontrados en humanos, sugiriendo la probabilidad de que algunos genotipos de *Giardia* tengan un amplio rango de huésped, incluyendo a los seres humanos, mientras que otros parecen ser más restringidos en su rango de huéspedes y no poseen riesgo de transmisión zoonótica.

Tabla 1. Genotipos de *G. lamblia* propuestos por Adam R (2001).

Genotipo	Clasificación de Nash (1985)	Clasificación de Mayrhofer (1995)	Clasificación de Homan (1992)	Huésped
A-I	1	A (grupo 1)	Polaco	Humanos, perros, gatos, caballos, ovejas, vacas, cerdos chinchillas, alpacas, castores, lemures
A-II	2	A (grupo 2)		Humanos, castores
B	3	B (grupos 3 y 4)	Belga	Humanos, perros, castores, hamsters, monos
		C		Perros
		D		Perros
		E		Vacas, ovejas, cerdos, cabras, alpacas
		F		Gatos
		G		Ratas

BIOLOGÍA CELULAR

El ciclo de vida de *Giardia* incluye dos principales estadios: quiste y trofozoíto. La infección del huésped se inicia cuando los quistes ingresan por vía oral. Éstos son de forma ovalada o elipsoide. El desenquistamiento y posterior desarrollo de los trofozoítos en el intestino delgado se produce después de la exposición al pH ácido del estómago. El trofozoíto es la forma vegetativa que se multiplica en el intestino y ejerce la acción patógena. Algunos trofozoítos forman quistes en el yeyuno debido a la acción de diversos factores, entre ellos la secreción biliar; y se eliminan con las heces, completando el ciclo de transmisión al infectar un nuevo huésped (Noemí & Atias, 1993).

Trofozoíto

La fase vegetativa posee dos núcleos con membranas nucleares, un citoesqueleto, un sistema de endomembranas y diversas vacuolas periféricas que semejan lisosomas (Lujan and Tour, 2003). No presenta otras organelas que son universales en eucariotas, tales como nucleolo, peroxisomas y mitocondrias. Este microorganismo no posee ningún componente de la fosforilación oxidativa por lo que desarrolla un metabolismo anaeróbico. El reconocimiento de genes de origen mitocondrial en los genomas de *T. vaginalis* y de *G. lamblia* sugiere que estos protistas amitocondriados descienden de protistas mitocondriados que han perdido sus mitocondrias (Roger et al, 1998).

Los trofozoítos presentan forma de pera y miden aproximadamente 12 a 15 μm de largo (rango de 10 a 20 μm) por 5 a 9 μm de ancho. El citoesqueleto incluye un cuerpo medial, cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral), y un disco ventral (Figura 3). Los trofozoítos tienen dos núcleos sin nucleolos, que están localizados en la parte anterior y son simétricos respecto al eje longitudinal. En el citoplasma se encuentran lisosomas, ribosomas y gránulos de glucógeno. Aunque Luján y colaboradores (1995, 2003) han demostrado que los trofozoítos pueden tener un singular complejo de Golgi, el mismo no ha sido detectado mediante técnicas microscópicas comunes.

Los dos núcleos son prácticamente idénticos en apariencia, se multiplican casi al mismo tiempo y ambos son transcripcionalmente activos. Tienen aproximadamente igual número de genes y de cromosomas (Adam R, 2001). Los nucleolos (sitios de transcripción de ARNr) no se identifican en *Giardia*, sugiriendo que la transcripción y el procesamiento del ARNr no se localiza en una determinada parte del núcleo.

El tiempo de división es muy corto. Sobre la base de la observación microscópica, se ha visto que durante la división celular, el núcleo se mueve lateralmente seguido de una replicación nuclear, resultando un trofozoíto de cuatro núcleos (Solari et al., 2003). Luego, éstos se dividen en un plano longitudinal de manera que mantienen la simetría.

Los trofozoítos se ubican en el intestino delgado del huésped, de manera predominante en el yeyuno medio. Ellos se adhieren por su superficie ventral cóncava (disco ventral adhesivo) a la pared intestinal, donde obtienen los nutrientes necesarios y evitan ser transportados a través del yeyuno. No se ha observado que *Giardia* spp provoque invasión celular ni lesión mediada por

receptores. Se considera que el citoesqueleto y el disco ventral juegan un rol clave en la sobrevivencia del organismo en el intestino del huésped (Noemí & Atias, 1993).

El disco ventral es un componente importante del citoesqueleto de *G. lamblia*. Aparece como una estructura cóncava con una máxima profundidad de 0,4 μm que cubre totalmente la superficie ventral. Contiene las proteínas contráctiles actina, α -actina, miosina y tropomiosina que actúan en la contracción del disco implicada en la adherencia. La adherencia depende de un metabolismo activo y es inhibida por temperaturas menores a 37°C e incrementada con el aumento en el nivel de oxígeno (Adam R., 2001)

Los trofozoítos tienen cuatro pares de flagelos que se inician en el complejo del kinetosoma. Ellos emergen desde las regiones anterior, posterior, caudal y ventral del trofozoíto. Los flagelos parecen ser importantes en la motilidad pero no en la adhesión. Emergen tempranamente a través de la pared del quiste durante el proceso de desenquistamiento (Noemí & Atias, 1993).

El cuerpo medial es un componente del citoesqueleto que se localiza en la línea media dorsal y está formado por microtúbulos agrupados en manojo. Su estructura ayuda a definir las características morfológicas de las diferentes especies de *Giardia*. Los trofozoítos de *G. lamblia* típicos tienen dos cuerpos mediales que tienen forma de clava. Los cuerpos mediales han sido propuestos como el sitio de ensamble de los microtúbulos que serán incorporados en el disco ventral.

Los trofozoítos tienen numerosas vacuolas en la periferia de la célula. Estas vacuolas tienen función de endosomas, lisosomas, y podrían estar funcionalmente asociadas al retículo endoplásmico (Lanfredi-Rangel et al., 1998, Lujan and Tour, 2003). Presentan también un proteosoma, un gran complejo que degrada proteínas del citosol.

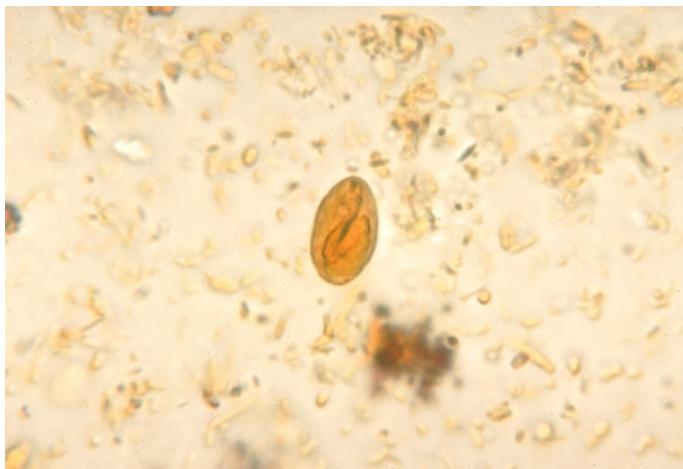
Figura 3. Trofozoítos de *G. lamblia*. (Atlas CDC, Atlanta, USA)



Quiste

El enquistamiento ocurre después de la replicación nuclear pero antes de la división celular, por eso el quiste contiene cuatro núcleos. Ellos miden 5 μm de ancho por 7-10 μm de largo y están cubiertos por una pared de 0,3 a 0,5 μm de grosor que está compuesta por una capa externa filamentosa y una capa interna de doble membrana (Figura 4). Cuatro proteínas más importantes han sido identificadas en la capa externa de la pared quística (29, 75, 88 y 102 kDa). Se ha determinado que el componente glucídico predominante de la capa externa es un polisacárido que contiene *N*-acetilgalactosamina, descartando los anteriores supuestos de que el principal compuesto era la quitina (un polímero de *N*-acetilglucosamina). El metabolismo del quiste alcanza solo al 10-20% del metabolismo del trofozoíto. (Adam R., 2001). Cueto Rúa y Feldman (1996) describieron dos tipos de quistes: el tipo I, con capacidad infectante, posee en su interior organelas bien visibles y tiene una tasa de desenquistamiento superior al 90%; y el tipo II, en el cual no se visualizan estructuras internas y su tasa de desenquistamiento oscila entre 0 y 15%, y carece de capacidad infectante.

Figura 4: quiste de *Giardia* spp. (Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP.)



Enquistamiento

Algunos trofozoítos enquistan en el yeyuno después de la exposición a las secreciones biliares. Este proceso ha sido llevado a cabo in vitro mediante la exposición de trofozoítos a un ambiente que mimetiza al del yeyuno. Las condiciones específicas que lo promueven incluyen un pH medianamente alcalino, alrededor de 7,8, y presencia de conjugados de sales biliares y ácidos grasos. Lujan y colaboradores (1996) han reportado la expresión de una proteína marcadora de enquistamiento en la pared quística 90 minutos después del inicio de este proceso. Cuando se adiciona colesterol esta expresión se interrumpe; permitiendo suponer que la privación de este lípido influye en el proceso.

Dentro de este proceso se distingue una fase temprana y una fase tardía. En la fase temprana, que dura desde el inicio hasta la hora 10 aproximadamente, hay síntesis intracelular y transporte de componentes hacia la pared del quiste. Es en esta fase donde se observan membranas semejantes al complejo de Golgi. En la fase tardía aparece la pared quística. Cuando el tiempo de enquistamiento se completa, la motilidad desaparece, los parásitos comienzan a redondearse y se desprenden de la superficie. El quiste incluye un trofozoíto en proceso de división, conteniendo cuatro núcleos.

Desenquistamiento

El desenquistamiento ocurre con la exposición del quiste al contenido del intestino delgado proximal luego de pasar a través del ambiente ácido del estómago. Este proceso ha sido inducido in vitro mediante la exposición de quistes a pHs ácidos. Ocurre de manera óptima luego de la exposición a un pH entre 1,3 y 2,7; aunque en *G. muris* ha sido logrado con un buffer fosfato con bicarbonato a pH 7,5, indicando que un pH ácido no es un requisito esencial para el desenquistamiento (Adam R., 2001). Este proceso se facilita ante la presencia de proteasas pancreáticas y de cistein-proteasas propias de *Giardia*, completándose en 10 minutos. El trofozoíto que emerge de la pared quística posee cuatro núcleos pero solo ocho flagelos. Es oval al principio y con el tiempo va tornándose mas redondeado. Luego de 15 a 30 minutos del desenquistamiento, se produce la división celular de tal manera que se forman dos trofozoítos a partir de un quiste (Noemí & Atias, 1993).

ESTRUCTURA DEL GENOMA

El genoma de *G. lamblia* tiene las características del de la mayoría de las células eucariotas, con cromosomas lineales flanqueados por telómeros. Los telómeros de los cromosomas de *Giardia* tienen secuencias similares a otros eucariotas (TAGGG) (Le Blancq et al, 1991). El ADN cromosomal forma la cromatina mediante su asociación con cuatro histonas internas (H2a, H2b, H3 y H4) y una histona de unión (H1) para formar nucleosomas. Se ha sugerido que el ADN de *Giardia* es rico en contenido G+C. Pero los estudios del proyecto genoma, después de haber obtenido la secuencia nucleotídica de prácticamente el 96% del genoma de *Giardia*, indican que el contenido de G+C ronda el 49% si se excluyen los genes del ADNr (ADN ribosomal) (Mc Arthur et al., 2000) (<http://gmod.mbl.edu/perl/site/giardia?page=intro>).

Por electroforesis de campo pulsante, se ha demostrado la presencia de cinco cromosomas en los trofozoítos de *G. lamblia* con un tamaño entre 1.6 y 3.8 Mb (Le Blancq et al., 1998). El cromosoma 1 varía en tamaño entre 1,1 a 1,9 Mb y la variación ocurre en las regiones subteloméricas donde se hallan secuencias repetitivas de los ADNr. La diferencia de tamaño está relacionada fundamentalmente con el número de copias de ADNr (Adam R, 2001).

Bernarder y colaboradores (2001) encontraron que los trofozoítos alternaban entre 4n y 8n (n es el tamaño del genoma haploide) con mayoría de trofozoítos estacionarios en 4n. Estos resultados sugieren que cada trofozoíto

contiene dos núcleos diploides y que como la replicación del ADN ocurre rápidamente, muchos trofozoítos tienen una ploidía de 8.

Para un microorganismo con una ploidía mayor a 1, se espera un cierto grado de heterocigosis. Dado que *Giardia* spp. es un organismo poliploide, se podría esperar un alto grado de heterocigosis alélica. Aunque la heterocigosis de copias repetidas de genes de proteínas de superficie variables (VSPs) han sido observadas, el grado de variación identificado en la secuencia de 12 kb del gen de la triosafosfatoisomerasa (tim) ha sido menor al 0,02% (Baruch et al 1996). El grado de heterocigosis alélica identificada en el proyecto genoma es también muy bajo, pudiendo deberse a una no reconocida reproducción sexual o a una pérdida intermitente de núcleos (Adam R., 2001).

ANTÍGENOS DE SUPERFICIE Y VARIACIÓN ANTIGÉNICA

G. lamblia posee una alta variación en sus antígenos de superficie, tanto en número como en tamaño, desde 50 a 200 kDa aproximadamente. La variación antigénica es considerada un mecanismo por el cual los trofozoitos cambian su cubierta superficial para sobrevivir dentro del intestino del huésped. De manera espontánea o en respuesta a las defensas del huésped, una proteína de superficie puede ser reemplazada por otra antigénicamente distinta. (Carranza et al., 2002). En cultivos axénicos, la variación ocurre aproximadamente una vez cada 6 a 12 generaciones con una frecuencia de 10^{-3} a 10^{-4} (Nash et al., 1988). En los modelos murinos ensayados, la respuesta humoral hacia las VSP parece ser la fuerza selectiva de la variación antigénica. La ampliación de este ítem excede los objetivos de esta tesis.

PATOGENESIS

Para Cueto Rúa y Feldman (1996) las teorías patogénicas más difundidas sobre giardiosis son. A- Formación de una barrera mecánica directamente relacionada con el número de trofozoítos, B -Reacción inflamatoria del epitelio intestinal, C -Alteración de las sales biliares, D - Producción de alguna toxina de acción local, E -Alteración de las enzimas pancreáticas, F -Deficiencia de disacaridasas, G - Liberación de prostaglandinas que alteran la motilidad intestinal, H - Consumo de lípidos biliares e I - Alteración de la barrera del moco. La ampliación de este tema excede los objetivos de esta tesis.

EPIDEMIOLOGÍA

La población mundial con giardiosis es de aproximadamente 200 millones de personas y cada individuo elimina alrededor de 900 millones de quistes por día (Crompton D., 1999). La mayor prevalencia se encuentra en zonas tropicales y subtropicales, donde afecta hasta el 30% de las personas. Es la parasitosis intestinal más frecuente en Estados Unidos (Adam R., 2001). En Brasil, la prevalencia de infección humana con *G. lamblia* varía entre el 4 y 30% y es endémica en muchas regiones (Guimaraes et al., 1999). En México las cifras de infección por este parásito son muy variables, desde 1 hasta 60%

de la población estudiada. La incidencia guarda estrecha relación con las condiciones sanitarias, vivienda, higiene personal y nivel educativo (Rivera et al., 2002). En estudios epidemiológicos llevados a cabo en la ciudad de La Plata (Argentina), se ha encontrado una prevalencia del 10 % en zonas urbanas y del 34% en asentamientos precarios (Gamboa et al., 2003). En áreas rurales su frecuencia ha sido cercana al 4% (Minvielle et al., 2004). En animales de la región se ha reportado una prevalencia de 7,5% en bovinos, 18,6% en caninos y 3,9% en roedores (Pezzani et al., 2003). También se ha observado su presencia en muestras ambientales (suelo y agua) hallándosela en muestras de tierra alrededor de los hogares de las áreas marginales y en diversas muestras de aguas recreacionales y de consumo de diferentes zonas del país (Pierangeli et al., 2003).

Los factores involucrados en la variación de las manifestaciones clínicas de giardiosis son poco conocidos, pudiendo influir el estado inmune del huésped, el tipo de dieta, la motilidad intestinal, el tiempo de infección y la virulencia del parásito (Guimaraes et al., 1999; Faubert G, 2000). Varios estudios epidemiológicos se han llevado a cabo a fin de conocer la variabilidad genética de los diferentes aislamientos de *G. lamblia* (Guimaraes et al., 1999; Thompson R., 2000; Read et al., 2004). Estos estudios contribuyen a dilucidar las vías de diseminación, la resistencia al tratamiento, el potencial zoonótico y la variabilidad de la virulencia del parásito en el transcurso de la enfermedad (Thompson R., 2000).

En Argentina, los métodos usuales de detección de este parásito en materia fecal humana y animal y en muestras ambientales, están basados en el reconocimiento morfológico por microscopía óptica o en la utilización de técnicas con anticuerpos fluorescentes de los quistes y/o trofozoítos de *G. lamblia*.

No existen en la bibliografía consultada, estudios epidemiológicos sobre giardiosis utilizando técnicas moleculares en nuestro país.

OBJETIVOS

Objetivo General

Teniendo en cuenta que los métodos moleculares proveen una herramienta útil para estudiar la epidemiología de giardiosis, el **objetivo de esta tesis** fue detectar la presencia de *Giardia* spp. en heces humanas y de animales de La Plata y su área de influencia y realizar una clasificación basada en caracteres genómicos aplicando la metodología de PCR-RFLP.

Objetivos Específicos

- 1- Optimizar y evaluar las técnicas de purificación y ruptura de quistes de *Giardia* spp a partir de heces humanas y animales para la obtención de ADN.
- 2- Evaluar distintos procedimientos de purificación de ADN de quistes de *Giardia* spp.
- 3- Optimizar una PCR-RFLP para detección de los genotipos A y B de *Giardia* spp.
- 4- Aplicar la técnica desarrollada en quistes de *Giardia* spp provenientes de heces humanas y de animales.

CAPÍTULO 1

Optimización y evaluación de las técnicas de purificación y ruptura de quistes de *Giardia* spp a partir de heces humanas y animales para la obtención del ADN del parásito.

En la revisión de estas metodologías, se encontró que diversas soluciones de sacarosa y de sulfato de zinc han sido tradicionalmente usadas para concentrar quistes de *Giardia* spp (Barr and Bowman, 1994). Ninguna de estas técnicas separa completamente los quistes de la materia fecal y detritos bacterianos, pero ayudan a concentrar el número de los mismos (Upton S, 1997). Leber y Novak (1999) recomiendan el uso de técnicas inmunomagnéticas para lograr una purificación de quistes (Leber and Novak, 1999), pero el costo de este método hace muy difícil su aplicación en nuestro medio. Para la ruptura de quistes, se han realizado diferentes metodologías tales como la degradación química, enzimática o mecánica de la pared de los quistes (van Keulen et al, 1991; Upton S, 1997; Eligio García et al., 2002).

Debido a la elevada especificidad de las metodologías moleculares que se utilizarán en el desarrollo de este trabajo, no es indispensable utilizar técnicas de preparación que aseguren una completa pureza y homogeneidad biológica de las muestras. En cambio sí es muy importante asegurar la eliminación de todos los posibles inhibidores enzimáticos presentes en la materia fecal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Purificación de quistes

Treinta mililitros de materia fecal filtrada a través de gasas se dispensaron en 3 alícuotas, las cuales fueron centrifugadas durante 5 minutos a 1500 rpm. Los sobrenadantes se descartaron y los pellet fueron tratados por 3 técnicas distintas.

Técnica 1. El pellet se resuspendió hasta las $\frac{3}{4}$ partes de un tubo de centrifuga de 15 ml en la solución de Telemann (formaldehído 2%, NaCl 85mM) (Feldman y Guardis, 1990) con 2 ml de éter. La mezcla fue centrifugada durante 5 minutos a 1500 rpm. El sobrenadante se descartó y el pellet fue llevado a un volumen de 0,5 ml con solución salina fosfatada o PBS (NaCl 8% (p/v); KCl 0,2% (p/v); Na₂PO₄H 0,78% (p/v), K PO₄H₂ 0,2% (p/v); pH 7,2).

Técnica 2. Se agregaron 5 ml de PBS al pellet y se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm (los quistes quedan en el fondo del tubo). Se descartó el sobrenadante y se agregaron 3 ml de PBS, se resuspendió por vortex y por las paredes se volcaron 4 ml de solución de sacarosa (densidad 1,275). Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se aspiró la

fase sacarosa con pipeta Pasteur pues en ella se concentran los quistes. Se trasvasaron a otro tubo al que se le agregaron 2 volúmenes de PBS. Los quistes se concentraron por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos. El sedimento fue resuspendido con PBS en un volumen final de 0,5 ml y almacenado a 4 °C para su posterior uso.

Técnica 3. Se realizó la técnica 1 y al pellet resultante se le aplicó la técnica 2.

El número de quiste iniciales y finales fue cuantificado mediante recuento en cámara de Neubauer al microscopio óptico. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el test de Kruskal-Wallis. (El contraste de Kruskal-Wallis es la alternativa no paramétrica del método ANOVA) (www.bioestadística.uma.es/libro/node156.htm)

Para evaluar la presencia de restos de materia fecal que aparecían junto a los quistes, se clasificó la turbidez de las muestras obtenidas en base al porcentaje de detritos encontrados en un campo óptico (400 X), como limpio (< 25% del campo óptico ocupado por detritos), ligeramente turbio (25 - 75%) y turbio (75 – 100%).

Ruptura de los quistes

Se probaron 3 técnicas

- a. *Técnica de shock osmótico y calor* (van Keulen et al, 2002). A las muestras de quistes purificados se les incorporó NaCl 2,5 M y se los sometió a ebullición durante 15 minutos.
- b. *Técnica de la degradación química.* A los quistes purificados se les agregó HCl 1 N y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Luego se realizaron 2 lavados con PBS y se centrifugó a 11.000 rpm durante 5 minutos. Al pellet se agregó 300 µl de tripsina (0,05%, 1/250)- EDTA (0,02%) pH 7,9 y la mezcla se incubó a 37°C durante 24 horas. A continuación se agregó 2-mercaptoetanol hasta una concentración final de 0,5 M y luego de una incubación durante 30 minutos a 37°C, la muestra se reservó para la extracción del ADN.
- c. *Técnica de shock térmico y acción enzimática.* Los quistes purificados se sometieron a 3, 4, 5 y 6 ciclos de enfriamiento (incubación a -80°C durante 30 minutos) y calentamiento (incubación a +80°C durante 30 minutos) y posterior ebullición (incubación a 100°C durante 15 minutos). Luego se incubaron con Proteinasa K (1 mg/ml) a 60°C durante 24 horas. El homogenado se incubó en un buffer de lisis (NaCl 0,15 M, EDTA 0,1 M, SDS 0,5%, pH 7-8) a 37°C durante 24 horas (Eligio Garcia et al, 2002, Polverino et al., 2004).

Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado. La evaluación de la ruptura se realizó por recuento de los quistes en cámara de Neubauer antes

y después de cada tratamiento. Posteriormente, se realizó la extracción del ADN para comprobar el rendimiento.

Extracción del ADN

El ADN fue purificado por métodos tradicionales (Sambrook and Russell, 2001). La muestra (200 µl) fue extraída con una mezcla de solventes orgánicos (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, 25:24:1), la fase acuosa se recuperó por centrifugación a 11.000 rpm durante 10 minutos y se le agregó 2 volúmenes de etanol absoluto en presencia de acetato de sodio 0,3 M a pH 5,2. El pellet conteniendo el ADN, se obtuvo después de una centrifugación a 11.000 rpm durante 30 minutos y fue lavado con etanol 70%. Se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Se almacenó a -20 °C para su posterior análisis electroforético.

Electroforesis

La electroforesis se realizó en gel de agarosa de bajo punto de fusión 1% a 80 voltios durante 30 minutos en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato pH 8, 1 mM EDTA). El gel se tiñó con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Se corrieron 15 µl de cada muestra. Las bandas de ADN se observaron en una fuente de luz ultravioleta y la cantidad de ADN en cada muestra se estimó semicuantitativamente por comparación con las bandas de los marcadores de peso molecular. Se documentó por fotografía.

RESULTADOS

Purificación de quistes

Se utilizaron 10 muestras de materia fecal de humanos y perros en formol al 10%. Todas fueron diagnosticadas como positivas para *Giardia* spp al microscopio óptico. Se almacenaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

Los recuentos de quistes iniciales fueron muy variables, desde 10 hasta 618 quistes/mm³. Los recuentos finales de los quistes purificados tuvieron un rango de 10 a 875, 5 a 1355 y 3 a 440 quistes/mm³ para las técnicas 1, 2 y 3 respectivamente. El rendimiento (número de quistes finales/número de quistes iniciales) de cada técnica y la turbidez observada se muestran en la Tabla 2.

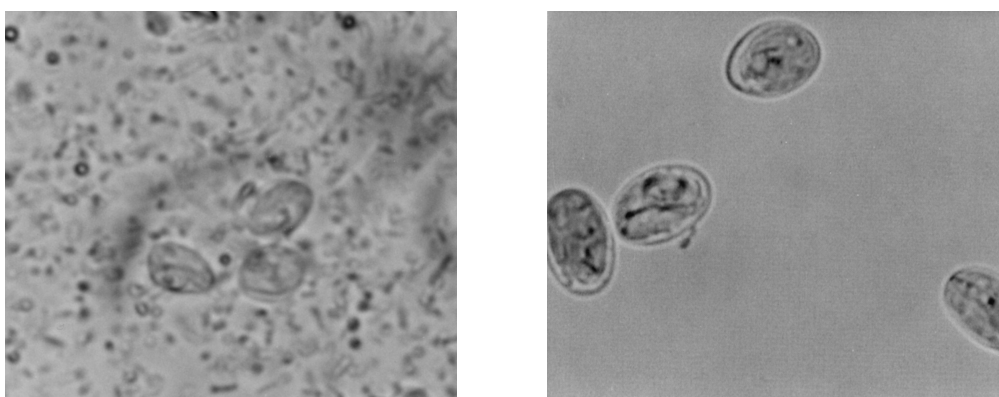
El análisis estadístico aplicado a la comparación de las tres técnicas reveló que no hubo diferencias significativas entre ellas (Kruskal-Wallis H, 2 g.l. = 1,35, *P* = 5,99).

Las técnicas 2 y 3 fueron las que dejaron menos detritos en los quistes purificados (Figura 5).

Tabla 2. Rendimiento (número de quistes finales/número de quistes iniciales) y turbidez observada en tres técnicas de purificación de quistes de *Giardia* spp. de materia fecal.

Técnicas	Telemann	Sacarosa	Telemann + Sacarosa
Rendimiento promedio	2,15	1,23	0,90
Turbidez	turbio	limpio	limpio

Figura 5. Fotografía de pellet obtenido con: a) técnica de Telemann, b) técnica de sacarosa. Los campos escogidos son representativos de la preparación total.

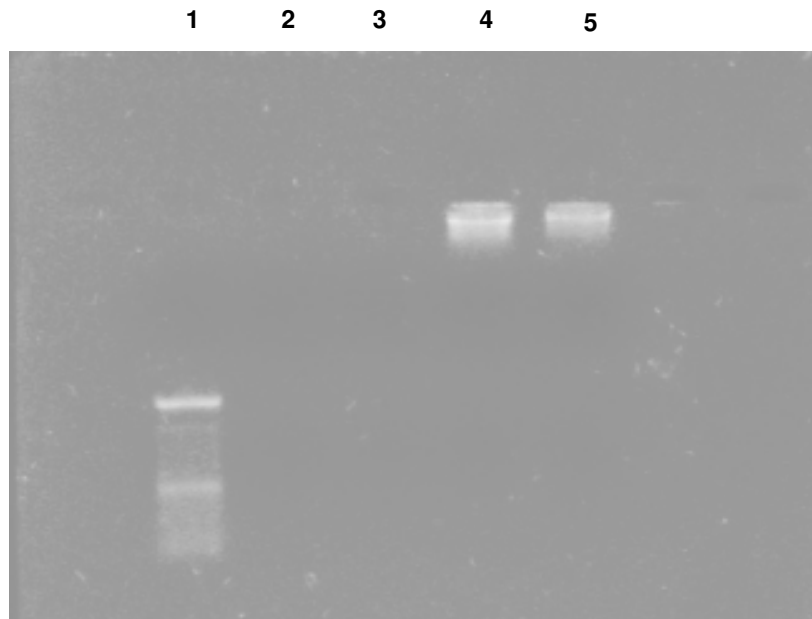


Ruptura de los quistes, extracción de ADN y electroforesis

Los quistes sometidos a ruptura fueron los obtenidos mediante purificación con sacarosa. En la técnica de shock osmótico y calor, al igual que en la técnica de degradación química, se contaron cantidades semejantes de quistes antes y después de cada tratamiento (promedio de quistes iniciales = 22 y promedio de quistes finales = 21 para ambos tratamientos). En ambos casos, no se observó la presencia de bandas fluorescentes típicas de los ADNs en la electroforesis.

En la técnica de shock térmico y acción enzimática no se encontraron quistes después del tratamiento (promedio de quistes iniciales = 22 y recuento final = 0). Se observó fluorescencia de igual intensidad en todos los ciclos de shock térmico propuestos (Figura 6).

Figura 6. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. 1. Marcador de peso molecular (100bp Ladder-Invitrogen). Extracción de ADN de quistes de *Giardia* spp. con distintos tratamientos: 2. shock osmótico y calor, 3. degradación química, 4. shock térmico (4 ciclos) y acción enzimática, 5.idem 4 pero con 6 ciclos.



DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró optimizar y simplificar una técnica de purificación de quistes de *Giardia* spp a partir de materia fecal formolada. Los quistes fueron aislados utilizando filtraciones y centrifugaciones diferenciales con PBS y sacarosa.

Basso y colaboradores (1998) recomiendan la utilización de las muestras sin formol a las formoladas y en el caso de los exámenes seriados incluir por lo menos una muestra en fresco. Esta situación en nuestro medio es infrecuente, pues la mayoría de las muestras de materia fecal para análisis coproparasitario son remitidas en formol al 5 o al 10%. Estos investigadores además sostienen que la técnica de formol-éter (Telemann) es más eficiente para la detección de quistes de *Giardia* spp. Sin embargo, en las 3 técnicas empleadas en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas. En el presente trabajo, el pellet de la técnica de formol-eter fue el que presentó mayor turbiedad por campo óptico. Con las otras técnicas los quistes quedaron más limpios. Por consiguiente se eligió la técnica de sacarosa por su simplicidad y menor tiempo de procesamiento.

La densidad de sacarosa utilizada para la concentración de los quistes de *Giardia* spp coincide con los rangos recomendados en la bibliografía para muestras de agua (Le Chevallier et al., 1995) y muestras clínicas (Basso et al., 1998); ésto es 1,10 y 1,30 respectivamente.

Respecto a la ruptura de los quistes, a diferencia de lo publicado por van Keulen y colaboradores (1991, 2002), estos no se pudieron romper cuando se los sometió a ebullición con NaCl 2,5 M durante 15 minutos.

El desenquistamiento de *Giardia* spp en hospedadores mamíferos ocurre con la exposición en el intestino delgado de enzimas pancreáticas luego del pasaje en medio ácido (Adam R., 2001). Tales condiciones fueron recreadas en la técnica de la degradación química, aunque no se observaron variaciones en el número de quistes, ni fluorescencia en los geles de agarosa.

Las mejores condiciones de trabajo para la ruptura de los quistes se obtuvieron con la técnica de shock térmico y acción enzimática; donde se evidenciaron las bandas de ADN en los geles de agarosa. Si bien resultados exitosos fueron publicados realizando sólo los ciclos de enfriamiento y calentamiento (Rimhanen-Finne et al., 2002), o la incubación en buffer de lisis solamente (Eligio García et al., 2002), no se obtuvieron resultados semejantes en nuestros experimentos.

Los resultados de este trabajo permitieron contar con una metodología de purificación y ruptura de quistes de *Giardia* spp. eficiente para ser usada en función de la técnica de PCR.

CAPÍTULO 2

Evaluación de procedimientos de purificación de ADN de quistes de *Giardia* spp.

Debido a que en las distintas muestras de materia fecal analizada existió una significativa variación en la carga parasitaria, en la presencia de aditivos o conservantes, en la composición y homogeneidad de la muestra y en el tiempo de almacenamiento, se consideró necesario optimizar la extracción y purificación del ADN a partir de los quistes de materia fecal para asegurar la calidad de la muestra.

El aislamiento de ADN de alto peso molecular, intacto y con el menor número de contaminantes es esencial para la aplicación de técnicas moleculares, incluyendo PCR, digestión con nucleasas de restricción, Southern blot y construcción de biblioteca genómica (Ausubel et al., 1992). Existe abundante bibliografía sobre la extracción y purificación de ácidos nucleicos de protozoos (Troll et al., 1997; Dowd et al., 1998; Ionas et al., 1998; Baszler et al., 1999; Carnevale et al., 2000; Bienz et al., 2001; Guy et al., 2004). No obstante, los protocolos estandares y métodos comerciales disponibles en la actualidad no presentan patrones de rendimiento homogéneos (Greenspoon et al., 1998). En consecuencia, se consideró fundamental determinar cual era el sistema de extracción y purificación de ácidos nucleicos más adecuado para nuestro tipo de muestra.

Para tal fin se evaluó la eficiencia de tres procedimientos de purificación de ADN de quistes de *G. lamblia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se partió de una muestra de materia fecal humana conservada en formol al 10% diagnosticada positiva para *Giardia* spp al microscopio óptico Se procedió a la purificación de quistes mediante la técnica con sacarosa (densidad 1,275). Los quistes purificados, se dividieron en alícuotas de 200 µl y fueron sometidos a la técnica de ruptura que aplica shock térmico y acción enzimática y se conservaron a -20°C hasta la purificación de ADN.

Purificación de ADN

El lisado de quistes fue sometido a tres procesos de extracción de ADN:

- a) Extracción con solventes orgánicos (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1), precipitación con etanol absoluto y acetato de sodio (0,3 M), lavado en etanol 70% y disolución con agua (Sambrook and Russel, 2001)
- b) Resina Chelex 100 (Biorad®). Cada muestra se mezcló con igual volumen de resina Chelex 100 al 5% y se realizó un ciclo de calentamiento durante

10 minutos a 98°C en termociclador (Techne Thechgene) (Dowd et al., 1998).

- c) Extracción con Kit comercial. Se utilizó el miniKit Qiagen® de spin-columns (QIAamp DNA stool minikit, Cat. 51504). Los mismos fueron procesados por el protocolo estandar según fabricante, con mínimas modificaciones: 1) la temperatura de lisis se incrementó a 95° C, luego se realizó el recuento de quistes, 2) el buffer de elución AE se incubó 10 minutos.

Cada procedimiento se realizó por cuatriplicado.

Los métodos de extracción de ADN fueron evaluados analizando la cantidad de ADN obtenido por absorbancia a DO^{260} (Espectrofotómetro Shimadzu, UV-visible) y la pureza se evaluó según el cociente DO^{260}/DO^{280} .

Los datos recogidos de todos los protocolos se analizaron estadísticamente mediante el test de Student.

RESULTADOS

Las concentraciones de ADN obtenidas con los tres métodos de extracción se muestran en la tabla 3.

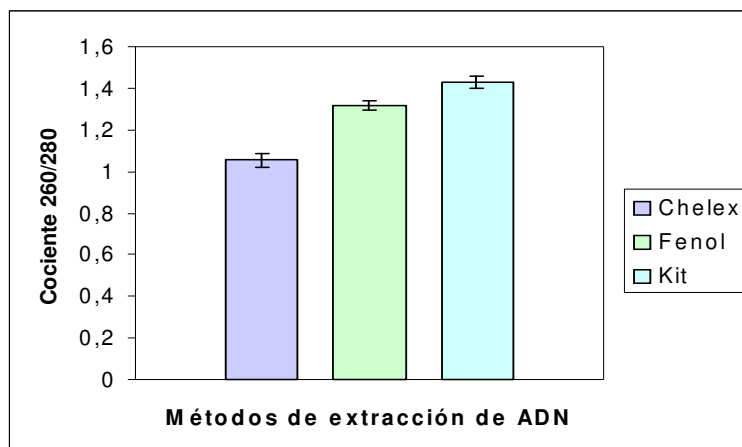
Tabla 3: Concentración de ADN. Comparación de tres métodos de extracción a partir de quistes de *Giardia lamblia*.

Método de extracción de ADN	Concentración de ADN ($\mu\text{g/ml}$) media	desvío standard
Resina Chelex 100	1035	214.05
Fenol/Cloroformo/isoamílico	32.28	1.80
QIAamp DNA stool minikit	6.5	1.34

El análisis estadístico indicó que había diferencias entre el método de Resina Chelex y Kit ($p= 0,001$); entre Resina Chelex y Fenol ($p=0,000$) y entre Fenol y Kit ($p= 0,005$).

La pureza resultante se muestra en la figura7.

Figura 7: Pureza de ADN. Comparación de tres métodos.



El análisis estadístico resultó significativo entre Chelex y Fenol ($p=0,002$) y entre Chelex y Kit ($p=0,001$).

El protocolo de extracción con fenol demandó aproximadamente 1 día, la técnica con Chelex, una hora y el kit comercial requirió de 3 horas de proceso. El análisis de los costos reveló que dos de los métodos analizados en este trabajo tuvieron un valor inferior a 2 dólares/muestra, excepto el kit comercial cuyo costo fue de 9 dólares/muestra.

DISCUSIÓN

En este estudio se compararon tres métodos de purificación de ADN de quistes de *G. lamblia* respecto a la cantidad y pureza del mismo y complejidad de las técnicas. Se realizó, además, un análisis de tiempos y costos de procesamiento.

Los tres protocolos de purificación probados (Chelex, Fenol y Kit) difirieron en cantidad de ADN, tiempos de procesamiento, complejidad y costos y diferencias en la pureza.

Analizando el rendimiento, la técnica de Chelex mostró la mayor eficiencia de recuperación de ADN y además un cociente 260/280 mayor de 1,0. Su uso redujo la manipulación de las muestras, minimizando las posibles contaminaciones cruzadas. Presentó la ventaja de ser económica, sencilla y rápida.

El procedimiento del kit comercial tuvo bajo rendimiento de ADN con el mayor índice de pureza. Fue el protocolo más costoso, su tiempo de realización fue corto y su complejidad se consideró intermedia debido al número de pasos.

En la bibliografía consultada, Greenspoon y colaboradores (1998) reportaron resultados variables, donde se observa mayor recuperación de ADN de semen utilizando un kit comercial (QIAamp tissue Kit, Qiagen®) respecto a la extracción con fenol. Brusés y colaboradores (2000) reportaron que el kit comercial utilizado (Instagene Matrix®) para la extracción de ADN de *T. cruzi*

tuvo la menor recuperación y el menor índice de pureza, comparado con los métodos del Salting out y el de CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio) seguido de extracción con solventes. Coombs y colaboradores (1999) evaluaron distintos protocolos de extracción de ADN de tejidos y concluyeron que el método de Chelex es seguro, simple, más efectivo y económico que los otros métodos, incluido el kit comercial QIAamp DNA minikit (Qiagen®). Stemmer y colaboradores (2003) reportaron que obtuvieron mayor recuperación de ADN al procesar muestras plasmáticas mediante el método de King Fisher respecto al Kit QIAamp DNA Midi reagent set (Qiagen®). Todos estos resultados son difíciles de comparar con los obtenidos en este trabajo debido a la diversidad de las muestras procesadas y a la utilización de diferentes kits comerciales. Gioffré y colaboradores (2004) trabajando con *E. coli* publicaron que el rendimiento promedio de ADN fue menor con el kit QIAamp DNA stool minikit (Qiagen®) que cuando utilizaron un protocolo de lisis por calor. Sin embargo, los cocientes 260/280 para el kit fueron mayores que para el otro método, coincidiendo con nuestros resultados.

La extracción con solventes permitió obtener cantidades de ADN intermedias entre los otros dos métodos (Chelex y kit) aunque insume un largo tiempo. A diferencia del kit comercial, es un procedimiento económico y de complejidad intermedia a causa de varios pasos de extracción y de preparación de reactivos. Nuestro análisis concuerda con Deng y Cliver (1999) concluyendo que la extracción con solventes orgánicos requiere mayor tiempo y manipulación, siendo tedioso el procesamiento de un gran número de muestras.

En conclusión la extracción con Chelex resultó la más eficiente teniendo en cuenta el rendimiento, con un adecuado grado de pureza. Además resultó una técnica sencilla y de bajo costo.

CAPÍTULO 3

Optimización de la metodología de PCR-RFLP para la detección de genotipos Ay B de *G. lamblia*.

Para implementar estas técnicas en nuestro laboratorio, se adaptó la metodología publicada por Amar y colaboradores (2002).

MATERIALES Y MÉTODOS:

Muestras:

Se utilizaron tres tipos de muestras:

- a) ADN de referencia genotipo A y genotipo B de *G. lamblia* gentilmente cedido por Harry van Keulen, del Departamento de Ciencias Biológicas, Geológicas y Ambientales, Universidad Estatal de Cleveland, Estados Unidos.
- b) ADN genotipo B extraído de una línea clonal de trofozoítos de *G. lamblia* (GS/M-83-H7) cultivados en medio TYI-33 cedida gentilmente por Pablo Pérez del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) de La Plata, Argentina.
- c) ADN extraído de quistes provenientes de cuatro muestras de materia fecal humana formoladas y una muestra de materia fecal canina formolada diagnosticadas positivamente para *Giardia* spp. en el Laboratorio de Parasitología de la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

La extracción del ADN de los trofozoítos y de las materias fecales se realizó siguiendo las tres técnicas mencionadas en el objetivo anterior (solventes orgánicos, resina chelex y kit comercial).

Se realizó una espectrofotometría de las muestras de ADN obtenidas (Espectrofotómetro Shimadzu, UV visible) a 260 nm, para medir la concentración y se determinó la relación DO^{260}/DO^{280} para obtener el índice de pureza del material purificado.

Primers seleccionados

Se utilizaron dos tripletes (uno para genotipo A y otro para genotipo B) de oligonucleótidos: "directo (D)", "directo interno (DI)" y "reverso (R)" diseñados sobre la base de la secuencia del ADN del gen de la triosa fosfato isomerasa (*tpi*) de *G. lamblia* publicados por Amar y colaboradores (2002). La secuencia de los primers utilizados figura en la Tabla 4.

Amplificación por PCR

La amplificación del gen *tpi* se llevó a cabo mediante una PCR en dos etapas. Esta técnica que es conocida en la bibliografía específica como PCR semi-anidada (*heminested PCR*), requiere de dos etapas de amplificación. En

la primera etapa, que corresponde a una metodología de PCR múltiple, se amplificó el ADN de la muestra con los primers "D" y "R" de ambos genotipos simultáneamente. Para 30 µl de reacción, se colocaron 15µl de ADN (concentración de 1 ng/µl) en 1X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0,25mM de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), cada primer a una concentración final de 0,3 µM y 0,5 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). Las muestras se incubaron a 94°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 94°C por 20 segundos, 52°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto con una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Se utilizó un termociclador Techgene de Techne, Alemania.

El producto de esta reacción se utilizó como sustrato para las siguientes amplificaciones que eran específicas de genotipo. Para estas amplificaciones se utilizaron los primers "DI" y "R" en reacciones separadas para cada genotipo ("Primers A y B" respectivamente). Las reacciones se llevaron a cabo en 30 µl finales, utilizando 1,5 µl del amplicón de la primera reacción de amplificación, 0,25mM de dNTPs, cada primer a una concentración final de 1µM y 1 U de *Taq* DNA polimerasa. Además, la concentración final de MgCl₂ fue de 1 mM para amplificar el genotipo A y de 1,5 mM para amplificar el genotipo B. Luego se aplicó una desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, seguida de 33 ciclos de 94°C por 20 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, con una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Las muestras se catalogaron teniendo en cuenta el par de primers con el que amplificaron y de acuerdo al tamaño del fragmento amplificado. Los tamaños de los productos de amplificación esperados se presentan en la Tabla 4.

RFLP

Los fragmentos de ADN amplificados en forma específica para el genotipo A, fueron digeridos con la endonucleasa de restricción *Rsa* I para diferenciar los subgrupos I y II, tal como está descrito en bibliografía (Amar et al., 2002).

Los productos de PCR y los fragmentos de restricción se analizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (1% para el primer ciclo y 1,5% para el segundo ciclo) con bromuro de etidio y se visualizaron por transiluminación UV (Labnet Model TM-26).

Tabla 4. Secuencias de primers, amplicones y fragmentos de restricción esperables según Amar y colaboradores (2002). D (Directo), R (Reverso), DI (Directo Interno).

	Genotipo A	Genotipo B
Primera reacción	DA: CGAGACAAGTGTTGAGATG RA: GGTCAAGAGCTTACAACACG	DB: GTTGCTCCCTCCTTTGTGC RB: CTCTGCTCATTGGTCTCGC
Productos esperados	576 bp	208 bp
Segunda reacción	DIA: CCAAGAAGGCTAAGCGTGC RA: GGTCAAGAGCTTACAACACG	DIB: GCACAGAACGTGTATCTGG RB: CTCTGCTCATTGGTCTCGC
Productos esperados	476 bp	140 bp
Digestión <i>Rsa I</i>	con A I: 437 y 39 bp A II: 235, 202 y 39 bp	

RESULTADOS:

Puesta a punto de la metodología

Inicialmente, no se visualizaron fragmentos amplificados luego de la electroforesis en el gel de agarosa, cuando se utilizaron las condiciones publicadas por Amar y colaboradores (2002). Por lo tanto, se optimizaron las variables de la técnica de PCR para obtener los productos amplificados.

Para poner a punto la técnica de PCR, se procedió al cambio de una variable por vez. Las modificaciones que permitieron las amplificaciones fueron las siguientes:

- Se cambió el medio de la primera reacción de amplificación modificando la concentración final de $MgCl_2$ e incorporando albúmina sérica bovina. Se obtuvieron los mejores resultados utilizando el $MgCl_2$ a una concentración final de 3mM y la albúmina sérica bovina a una concentración final de 0,1 $\mu g/\mu l$.
- Se modificó el patrón de ciclado térmico de ambas etapas de amplificación y se obtuvieron los mejores resultados cuando se utilizó el siguiente programa e ambas etapas: 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos.
- Se modificó la concentración final de la enzima Taq polimerasa. En las condiciones optimizadas de los puntos a) y b) se produjeron

amplificaciones de las muestras positivas, aún disminuyendo la concentración de la Taq polimerasa en la reacción hasta 0,1 U/μl.

Optimización de la metodología para la detección de los genotipos de *G. lamblia*

Se observó la amplificación de las muestras de ADN preparadas mediante la utilización del kit comercial, tanto del trofozoíto como de los quistes y de los controles positivos cedidos por el Dr van Keulen. El ADN -de las muestras de materia fecal y del cultivo de trofozoítos-extraído mediante las técnicas con resina Chelex y con solventes orgánicos no pudo ser amplificado.

Tanto en la primera reacción de PCR como en la segunda, se obtuvieron fragmentos de amplificación del tamaño esperado para ambos genotipos. En la Figura 8 se muestra el resultado de la segunda ronda de amplificación (PCR semianidada) para una serie de muestras control de los genotipos A y B y para muestras preparadas a partir de materia fecal humana y canina con diagnóstico microscópico de giardiosis. Es posible observar un fragmento amplificado de aproximadamente 500 pb para las muestras con *G. lamblia* de genotipo A y un fragmento amplificado de aproximadamente 150 pb para las muestras con *G. lamblia* de genotipo B (Figura 8). La digestión con *Rsa I* de los productos de la PCR semianidada para la muestra de referencia del genotipo A, produjo los fragmentos de digestión con los tamaños característicos del genotipo AII (tabla 4).

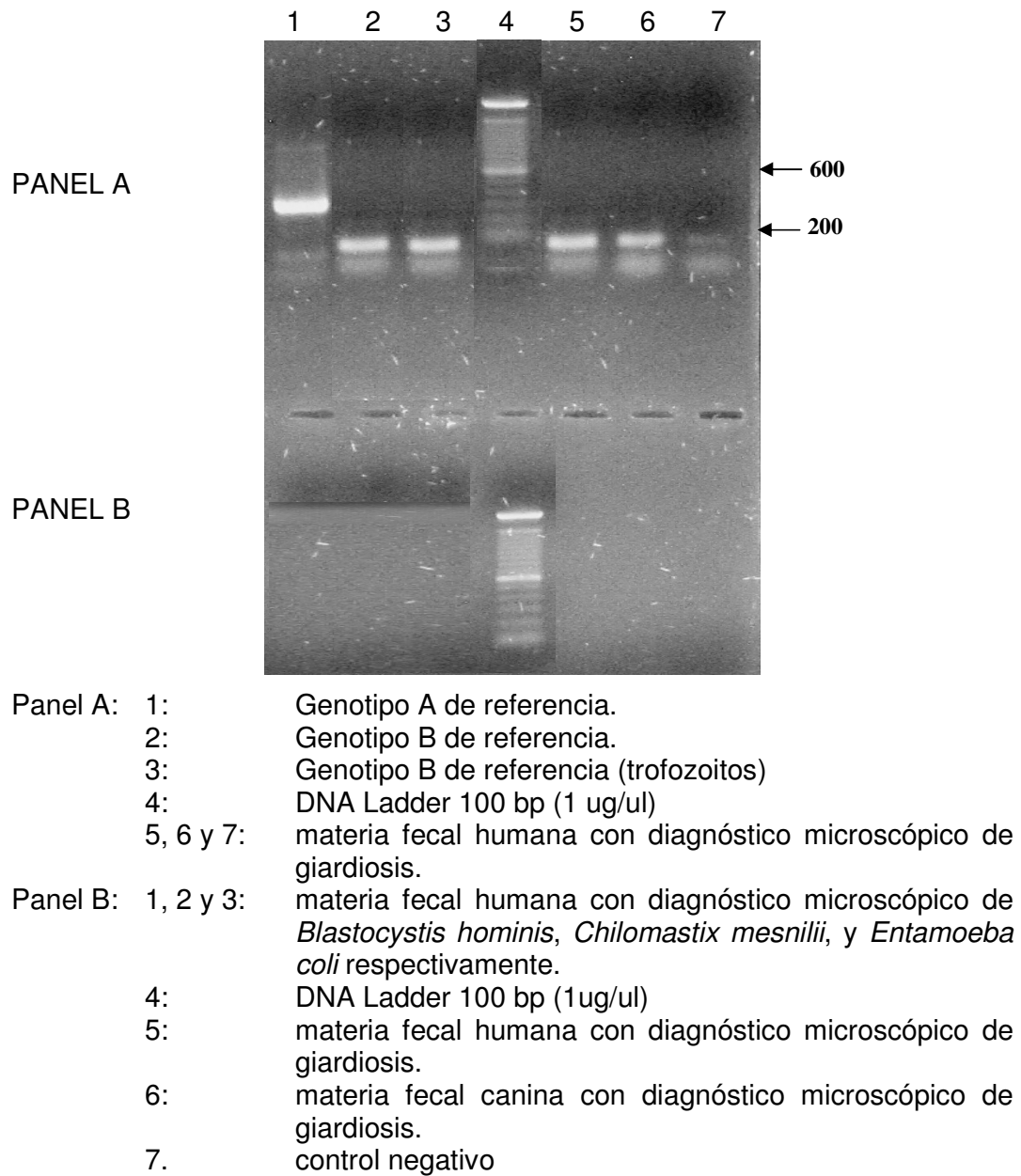
De las cuatro muestras de materia fecal humana procesadas, tres resultaron amplificables y todas se clasificaron dentro del genotipo B. En la muestra de quistes purificados a partir de materia fecal canina no se obtuvo amplificación. No se observó amplificación en los controles negativos utilizados, donde se reemplazó la muestra de ADN por agua (control negativo estándar) o por ADN extraído de otros microorganismos provenientes de heces humanas procesadas en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNLP como *Blastocystis hominis*, *Chilomastix mesnili* y *Entamoeba coli*.

Para evaluar la sensibilidad de esta técnica, se realizaron diluciones decimales de los ADN de referencia. Tanto el genotipo A como el B pudieron ser amplificados usando diluciones 1:10, 1:100, 1:1000, 1: 10000 y 1: 100000 equivalentes a 10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001 ng/μl de ADN original en la muestra, respectivamente.

Los resultados negativos fueron confirmados tanto por repetición de las amplificaciones como por la realización de una PCR control de inhibidores. Para esto último, se realizó la metodología de PCR semianidada sobre una muestra obtenida de la mezcla del ADN de cada una de las muestras que dieron resultados negativos con el ADN de una de las muestras de referencia. Para ambos ADNs se mantuvo la concentración final en el tubo de PCR en el mismo nivel que las reacciones anteriores. Todos estos controles produjeron los fragmentos de amplificación correspondientes a los esperados para los ADNs de las muestras de referencia indicando la ausencia de potenciales inhibidores en las muestras que dieron resultado negativo. Sin embargo, todavía no es posible descartar que el resultado negativo se deba a la presencia de un ADN de baja calidad en estas muestras.

Para investigar la reproducibilidad de de esta técnica, se llevaron a cabo réplicas por quintuplicado tanto con los ADN de referencia como con los ADN de las muestras fecales, tanto parasitadas con *Giardia* como con los otros parásitos mencionados anteriormente. Los resultados fueron 100% reproducibles para todas las muestras procesadas.

Figura 8: Amplificación del gen *tpi* de *Giardia* por PCR semianidada.



DISCUSIÓN:

El 18% de divergencia en la secuencia del ADN de un fragmento del gen *tpi* de *G.lambli*a, permitió a Amar y colaboradores (2002) desarrollar una PCR semianidada que permite diferenciar los genotipos A (I y II) y B de este parásito.

En este trabajo se llevó a cabo el mismo procedimiento y sólo luego de las modificaciones presentadas, se obtuvieron resultados positivos. En coincidencia con el trabajo de referencia, la técnica implementada en nuestro laboratorio tuvo una adecuada especificidad pues no amplificó cuando utilizamos muestras fecales que no tenían *Giardia* pero que estaban contaminadas con otros parásitos. Si bien se analizó un bajo número de muestras, la reproducibilidad fue superior a la reportada por Amar y colaboradores (2002) quienes refieren un porcentaje del 77% cuando usaron muestras fecales y del 100% cuando usaron trofozoítos. La PCR tuvo una muy buena sensibilidad permitiendo amplificar desde 0,001 ng/μl derivados de ADN de referencia.

Es probable que la presencia de formol en la materia fecal analizada haya sido la causa de la falta de amplificación en una de las cuatro muestras de quistes provenientes de humanos, sobre todo teniendo en cuenta la elevada capacidad de modificación química del ADN que posee el formaldehído. Para poder solucionar este problema en el futuro, será necesario modificar la práctica de remisión de muestras de materia fecal para el análisis coproparasitológico que, en nuestro medio, se suele realizar en formol al 5 o 10%.

En las condiciones ensayadas, solamente se obtuvieron amplificaciones con el ADN de trofozoítos y de muestras fecales, extraído utilizando el kit comercial. En el trabajo de referencia la amplificación se llevaba a cabo sobre ADN extraído con solventes orgánicos de cultivos de trofozoítos y de quistes de materia fecal sin conservantes. La materia fecal de nuestras muestras tenía formol al 10% que, además de disminuir la cantidad de ADN de calidad adecuada para los análisis, puede actuar como inhibidor de la PCR. Es probable que este reactivo resulte eliminado con mayor eficiencia mediante la utilización del kit comercial y no por los otros procedimientos. Probablemente, también algún factor inhibidor se encuentre en el medio de cultivo de los trofozoítos ya que tampoco pudo obtenerse amplificación con los métodos de extracción con solventes orgánicos y con la resina. La utilización del kit comercial también ha sido reportado por autores tales como Betcher y colaboradores (2004) para estudio de genotipos de *Giardia* en heces de bovinos y Read y colaboradores (2004), quienes estudiaron genotipos de *Giardia* en heces humanas.

En conclusión, se consideró que la metodología de purificación de ADN y la PCR-RFLP puesta a punto poseía una adecuada sensibilidad, especificidad y reproducibilidad para poder aplicar la técnica desarrollada en la caracterización de *Giardia* spp proveniente de quistes de heces humanas y de animales.

CAPÍTULO 4

Genotipificación de *Giardia* spp provenientes de quistes encontrados en heces humanas y animales.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Muestras

Se analizaron 60 muestras fecales de personas y 10 de animales con diagnóstico de giardiosis por microscopía óptica en el Laboratorio de la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP. Las mismas se seleccionaron de la coproteca de la Cátedra teniendo solamente un criterio de inclusión temporal: "muestras obtenidas durante los años 2001-2002". Todas las muestras estaban conservadas en formol al 5-10% y correspondían a un seriado coproparasitológico en el caso de las personas y a una sola toma en el caso de los animales. Todos los datos de número de habitantes corresponden al censo de 1999.

Área del estudio

Materias fecales humanas:

- a) 49/60 muestras correspondieron a habitantes de General Mansilla, ciudad distante a 30 km de La Plata. Esta localidad presenta características rurales, con actividad ganadera preponderante (tambos). Se encuentra dividida en dos sectores: el casco urbano (CU), donde residen 1700 personas y la zona rural propiamente dicha (ZR) habitada por 2300 personas.
- b) 11/60 muestras pertenecían a niños residentes en un asentamiento precario de la ciudad de La Plata con un nivel de pobreza N.B.I. (necesidades básicas insatisfechas). En el momento que se tomaron las muestras, habitaban 459 personas de las cuales 21,78% (100) eran menores de 14 años.

Materias fecales de animales:

- c) Se buscó en la base de datos de la Cátedra la presencia de animales en el domicilio y peridomicilio de cada individuo seleccionado. De las 49 personas que residían en General Mansilla, 40 (81,63%) poseían animales, variando el tipo según la residencia. En CU los tres más frecuentes fueron perros, gatos y aves, mientras que en ZR fueron perros, aves de corral y bovinos. Solamente 4 niños del asentamiento precario eran dueños de perros. Se seleccionaron de la coproteca, aquellas materias fecales de animales con diagnóstico microscópico de giardiosis.

Encuesta:

Como normativa del laboratorio de Parasitología de la Cátedra, cuando se toman las muestras de las personas se completa una encuesta estructurada y cerrada donde se registran variables demográficas, socioculturales, ambientales y presencia/ausencia de signos/síntomas que también se vuelca a la base de datos. Para este trabajo se seleccionaron los datos que correspondieron a las siguientes variables:

1. Variables demográficas:
 - a) sexo
 - b) edad.
2. Variables socioculturales:
 - a) residencia (Urbana o Rural),
 - b) condición sanitaria (Buena, Regular o Mala), considerándose como Buena: Vivienda de mampostería, pisos de cemento/mosaico/cerámico, baño completo, agua corriente, servicio cloacal y recolección municipal de la basura. Regular: vivienda de mampostería, pisos de cemento/mosaico/cerámico, baño completo/incompleto, agua de bomba domiciliaria, pozo con/sin cámara séptica y sin recolección domiciliaria de la basura (entierro o quema). Mala: vivienda de madera/cartón y/o chapa, piso de tierra, letrina, agua de bomba o de canilla comunitaria y arrojan la basura a cielo abierto.
 - c) hacinamiento (Si o No). Considerándose como tal cuando duermen más de 3 personas por habitación.
3. Variables ambientales:
 - a) anegamiento de la vivienda. (Nunca, A veces o Con frecuencia). Considerándose “a veces” hasta dos anegamientos de la vivienda por año y “con frecuencia” tres o más anegamientos de la vivienda por año.
4. Variables clínicas:
 - a) presencia/ausencia de signos/síntomas: (Si o No). Registrándose diarrea, vómitos, dolor abdominal, pérdida de apetito, decaimiento y sueño alterado.
5. Variables parasitarias:
 - a) presencia de otros parásitos en materia fecal y en el escobillado perianal de las personas (incorporados a la base de datos de la Cátedra).

Genotipificación

La genotipificación se llevó a cabo siguiendo los procedimientos de purificación, ruptura, extracción de ADN y PCR-RFLP, optimizados tal como se describe en los capítulos anteriores. En resumen la purificación de los quistes se realizó siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 1, técnica 2; la ruptura de quistes se realizó siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 1, técnica c; para la extracción del ADN se utilizó el miniKit Quiagen® de spin-columns (Capítulo 2, técnica c) y para la genotipificación se usó PCR-RFLP para la amplificación del gen *tpi* mediante técnica descrita en el Capítulo 3.

El diseño seleccionado para este trabajo fue observacional, descriptivo, retrospectivo y transversal. Como el número de personas estudiadas (muestra) no es representativo de las poblaciones no se realizó análisis estadístico inferencial. Tratándose de un estudio preliminar se presenta a continuación el análisis estadístico descriptivo según las variables registradas.

RESULTADOS:

De las 60 muestras de materia fecal humana, se logró amplificación en 43 (71,66%). Amplificaron 35/49 (71,42%) y 8/11 (72,72%) de las provenientes de General Mansilla (GM) y de La Plata (LP) respectivamente.

Se evaluó la influencia del número de quistes entre las muestras amplificadas y las que no lo hicieron. En las muestras genotipificadas la media fue de 102 (101,79) quistes/mm³ con rangos muy amplios que variaron desde 1 hasta 460 quistes por mm³. Treinta y dos muestras tuvieron entre 1-100 quistes/mm³, tres muestras entre 101-200 quistes/mm³, cuatro entre 301-400 quistes/mm³, una sola muestra tuvo entre 301-400 quistes/mm³ y tres muestras entre 401 y 500 quistes/mm³. En las muestras que no amplificaron, la media fue de 69 (68,70) quistes/mm³, con rangos muy amplios que variaron entre 1 y 300 quistes/mm³. Catorce muestras tuvieron entre 1 y 100 quistes/mm³, una muestra tuvo entre 101-200 quistes/mm³ y dos muestras tuvieron entre 201-300 quistes/mm³. Si bien, las dos distribuciones fueron muy asimétricas, correspondiendo a 7 el valor de la mediana de las muestras que no amplificaron y a 30 el valor de la mediana de las muestras que amplificaron, el test de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas ($p= 0.25$). La distribución de muestras amplificadas se muestra en la tabla siguiente.

Tabla 5: Frecuencia de muestras de materia fecal humana con *Giardia* amplificadas por PCR según lugar de residencia, sexo y edad.

General Mansilla

	ZR mujeres	ZR varones	CU mujeres	CU varones	Totales
< 21 años					
MO+	10	12	6	16	44
amplificaron	7 (70%)	8 (66,66)	4 (66,66)	13 (81,25%)	32 (72,72%)
> 21 años					
MO+	2	1	-	2	5
amplificaron	2 (100%)	1 (100%)	-	0 (0%)	3 (60%)

La Plata

	mujeres	varones	Totales
< 14 años			
MO+	3	8	11
amplificaron	2 (66,6%)	6 (75%)	8 (72,72%)

ZR: zona rural

CU: casco urbano

MO +: diagnóstico de giardiasis por microscopía óptica.

Materias fecales de animales: Solamente 6/20 perros pertenecientes a 25 personas de GM que amplificaron en la PCR fueron positivos para *Giardia* por microscopía óptica. Lo mismo ocurrió con 2/3 perros de 4 niños de LP. Además, 2 materias fecales de ganado vacuno resultaron positivos para *Giardia* por microscopía óptica.

En la tabla siguiente se presentan los resultados de la genotipificación de los niños de La Plata, identificando el sexo, la edad y la posesión de animales

Tabla 6. Genotipificación de *Giardia* por PCR en niños de un asentamiento precario de La Plata.

Código	sexo	edad (años)	animal	Genotipo
1	masc	4	perro*	B
2	masc	3	perro*	B
3	masc	5	perro	B
4	masc	3	perro	B
5	masc	7	-	All
6	fem	13	-	All
7	masc	11	-	All
8	fem	8	-	B

perro* es un perro con diagnóstico de giardiosis por microscopía óptica. No amplificaron por PCR
3 y 4 son hermanos. Lo mismo que 5,6 y 7.

En la tabla siguiente se presentan los datos sobre sexo, edad y posesión de animales de los adultos de General Mansilla que amplificaron. Todos resultaron genotipo B.

Tabla 7. Sexo, edad y posesión de animales en adultos de General Mansilla que amplificaron el gen *tpi* de *Giardia* por PCR (genotipo B).

Código	sexo	edad	animal
9	Fem	29	perro**
10	Fem	33	perro
11	Masc	26	Perro

10 y 11 eran convivientes.
Perro **es un perro con diagnóstico de giardiosis por microscopía óptica y que resultó genotipo B.

En la tabla siguiente se presentan los datos sobre sexo, edad y posesión de animales de los niños que habitaban en la zona rural de General Mansilla que amplificaron. Todos resultaron genotipo B.

Tabla 8. Sexo, edad y posesión de animales en niños rurales de General Mansilla que amplificaron el gen *tpi* de *Giardia* por PCR. Todos resultaron genotipo B.

Código	sexo	edad	Animal
12	masc	2	perro, vaca*
13	fem	4	perro, vaca*
14	masc	1	perro
15	masc	5	-
16	fem	3	perro*
17	masc	8	perro*
18	masc	3	-
19	fem	4	-
20	masc	3	perro
21	masc	4	perro
22	fem	6	-
23	fem	3	perro*
24	masc	4	perro
25	fem	4	-
26	fem	2	-
27	fem	7	-

25,26 y 27 son hermanas

perro* es un perro con diagnóstico de giardiosis por microscopía óptica. No amplificaron por PCR

vaca* es una vaca con diagnóstico de giardiosis por microscopía óptica. No amplificaron por PCR

En la tabla siguiente se presentan los datos sobre sexo, edad y posesión de animales de los niños que habitaban en el casco urbano de General Mansilla que amplificaron. Todos resultaron genotipo B.

Tabla 9. Sexo, edad y posesión de animales en niños urbanos de General Mansilla que amplificaron el gen *tpi* de *Giardia* por PCR.

Código	sexo	edad	Animal
28	masc	2	-
29	masc	9	Perro
30	masc	12	Perro
31	masc	9	-
32	fem	8	-
33	masc	8	Perro
34	fem	7	Perro
35	fem	10	Perro
36	masc	3	perro
37	masc	4	perro
38	masc	2	perro*
39	masc	3	perro*
40	masc	2	perro*
41	masc	3	perro*
42	masc	5	perro
43	masc	9	Perro

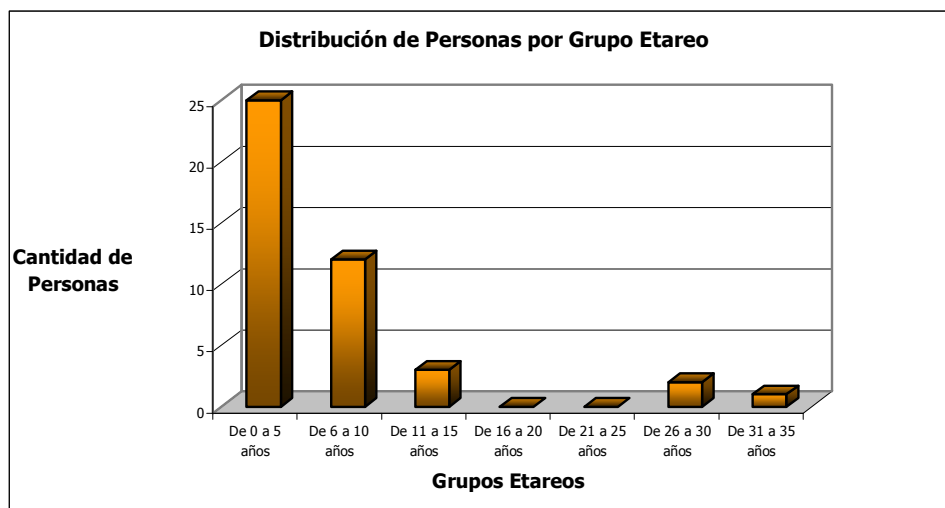
Son hermanos. 29 y 30, 31 y 32, 38 y 39, 40 y 41, 42 y 43.

Perro* es un perro con diagnóstico de giardiosis por microscopía óptica. Ninguno amplificó por PCR.

Edad:

En la Figura 9 se muestra la distribución etárea de la población que amplificó el gen *tpi* de *Giardia* por PCR (n: 43 personas).

Figura 9.



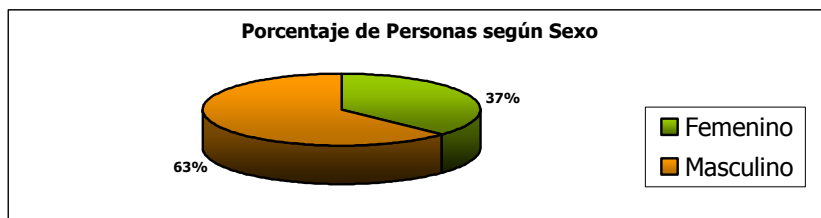
Las personas con genotipo All se presentaron dentro de los grupos etáreos 6-10 y 11-15 años, con un promedio de edad de 10 años.

Las personas con genotipo B se distribuyeron en todos los grupos (excepto 16-20 y 21-25 en los cuales no había muestras) con un promedio de 7 años.

Sexo:

En la Figura 10 se muestra la distribución según sexo de la población que amplificó el gen *tpi* de *Giardia* por PCR

Figura10.

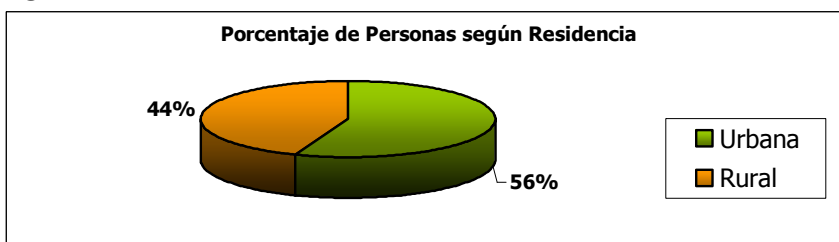


Respecto a esta variable, en el genotipo All 2/3 muestras correspondieron a varones (66,66%) y 1/3 a mujeres (33,33%). Respecto al genotipo B, los varones sumaron el 62,57% (25/40) y las mujeres el 37,50% (15/40). 24/26 niños fueron genotipo B (92,30 %) y 13/14 niñas (92,85%) pertenecieron a este genotipo.

Zona de residencia:

En la Figura 11, se muestra la distribución según zona de residencia de la población que amplificó el gen *tpi* de *Giardia* por PCR

Figura 11

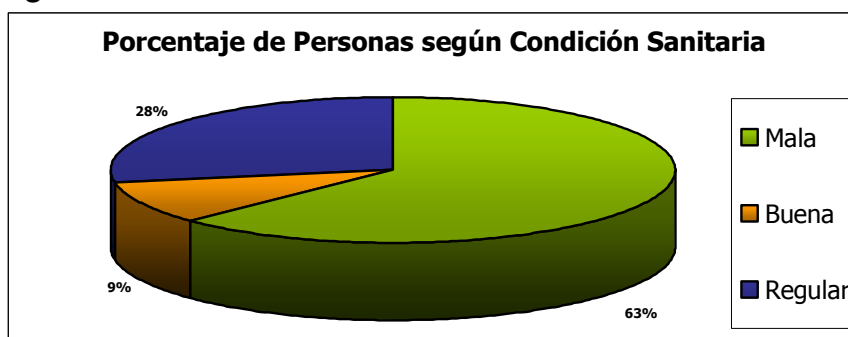


El 100% (3/3) de las personas con genotipo All vivían en una zona urbana, mientras que dentro del genotipo B, el 52,5% (21/40) residían en una zona urbanizada y el 47,5% (19/40) en un área rural.

Condiciones sanitarias:

En la Figura 12, se muestra la distribución según las condiciones sanitarias de las personas que amplificaron el gen *tpi* de *Giardia* por PCR

Figura 12.



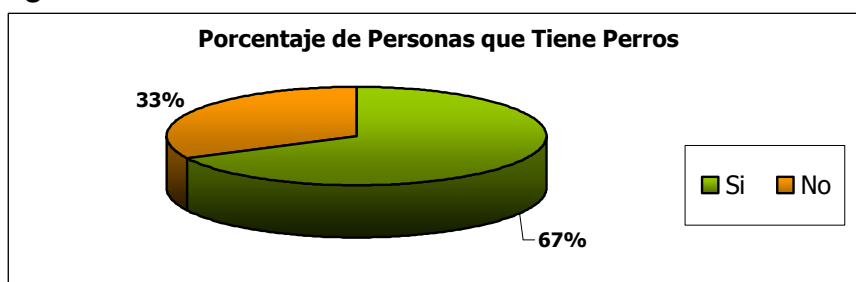
Las Variables corresponden a las descriptas en Materiales y Métodos

Todas las personas con genotipo AII vivían en malas condiciones sanitarias, mientras que en aquellas que poseían el genotipo B estas condiciones variaron entre malas (60%-24/40), regulares (30%-12/40) y buenas (10%- 4/40).

Poseción de perros:

La distribución de las personas que poseían perros se muestra en la Figura 13.

Figura 13.

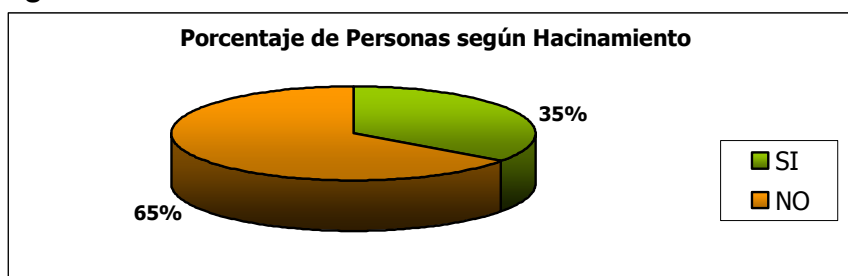


Ninguna persona del genotipo A II poseía perros en su domicilio; mientras que en el genotipo B, 29 personas tenían perros en sus domicilios. Como algunas personas son familiares y comparten la posesión de estos animales, el número de perros es 23 de los cuales 8 perros presentaron *Giardia* en su materia fecal por microscopía óptica. Solo en uno de estos perros se logró amplificación. El mismo habitaba en el área rural y pertenecía a una persona adulta femenina (Código 9). Resultó genotipo B.

Hacinamiento:

Las frecuencias de hacinamiento en las personas se muestran en la Figura 14.

Figura 14.



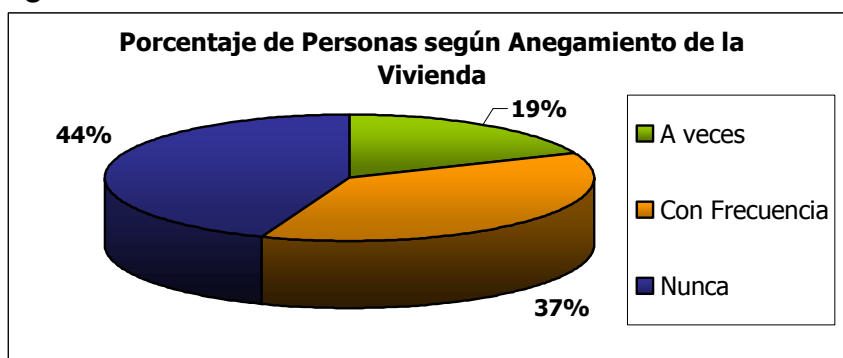
Las Variables corresponden a las descriptas en Materiales y Métodos

Todas las personas con genotipo All presentaron hacinamiento, mientras que dentro de genotipo B solo el 30% (12/40).

Anegamiento:

Los datos sobre anegamiento se presentan en la Figura 15.

Figura 15.



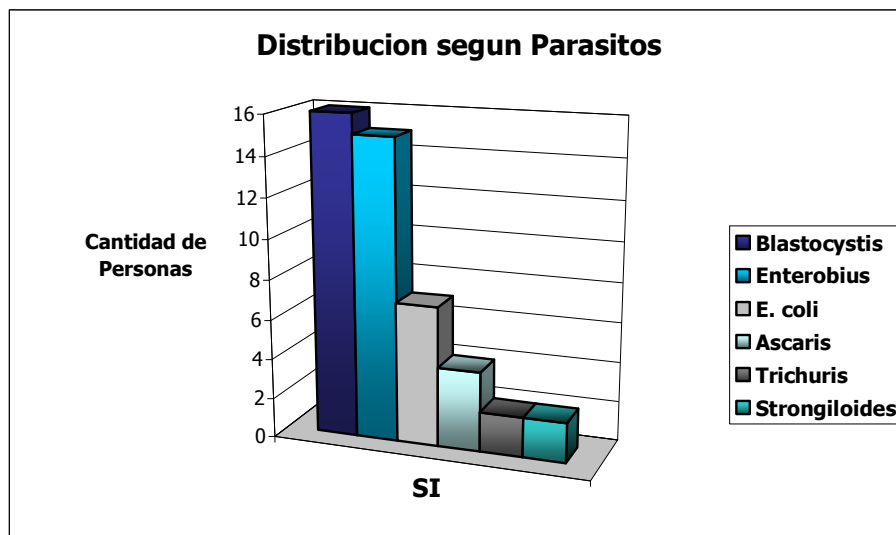
Las Variables corresponden a las descriptas en Materiales y Métodos

El anegamiento nunca se registró en las personas con genotipo All y estuvo con frecuencia en el 40% (16/40), a veces en el 20% (8/40) y nunca en el 40% (16/40) de las personas con genotipo B.

Presencia de otros parásitos en materia fecal:

De las 43 personas, 15 estaban solamente parasitadas por *Giardia*. En la Figura 16 se muestra la distribución de otros parásitos que se detectaron en las restantes 28 personas

Figura 16.

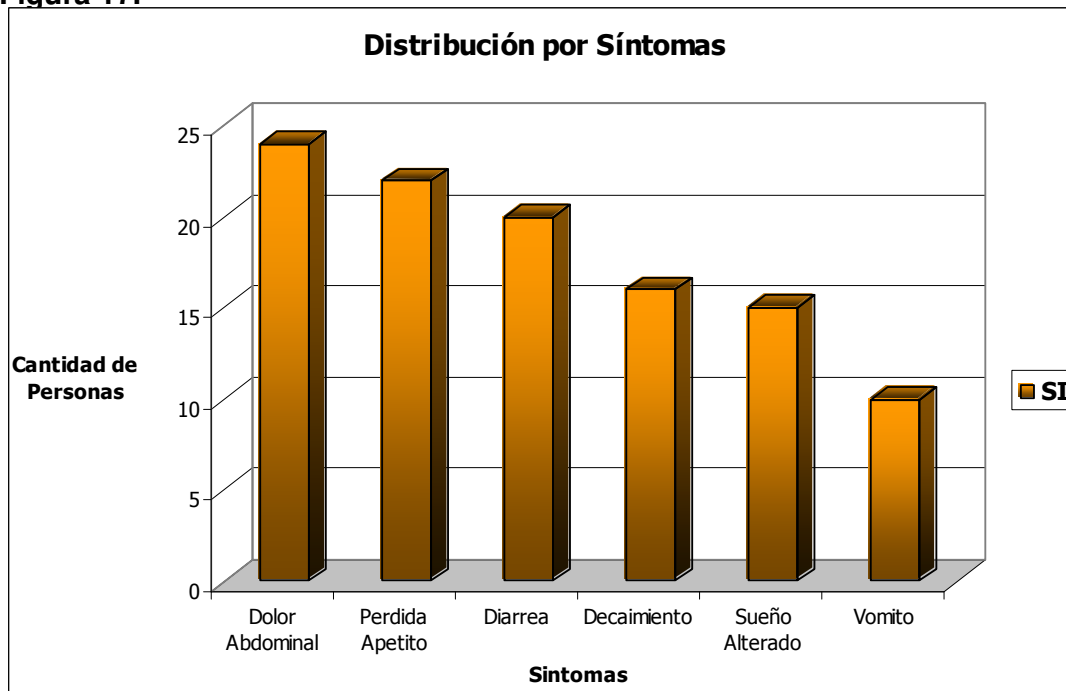


El 100% de las personas genotipo All estaban también parasitadas con *Blastocystis hominis* solamente. En el caso de genotipo B, un 37,5% (15/40) estaban parasitadas con *Enterobius vermicularis*, un 32,5% (13/40) con *Blastocystis hominis*, un 17,5% (7/40) con *Entamoeba coli*, un 10% (4/40) con *Ascaris lumbricoides*, un 5% (2/40) con *Trichuris trichiura* y un 5% (2/40) con *Strongiloides stercoralis*.

Signos y síntomas:

La frecuencia de los síntomas o signos en las 43 personas afectadas de giardiosis se muestra en la Figura 17.

Figura 17.



Respecto a los signos y síntomas, el 100% de las personas con genotipo A II refirieron solamente decaimiento y pérdida de apetito. Las personas con genotipo B refirieron dolor abdominal 24/40 (60%), diarrea 20/40 (50%), pérdida de apetito 19/40 (47,5%), sueño alterado 15/40 (37,5%), decaimiento 13/40 (32,5%) y vómitos 10/40 (25%).

Las personas que únicamente estaban parasitadas con *Giardia* (genotipo B) fueron 8 niños de la zona urbana y 6 de la zona rural de General Mansilla y un niño del asentamiento precario de la Plata. Refirieron diarrea 9/15 (60%), dolor abdominal 7/15 (46,66%), sueño alterado 6/15 (40%), decaimiento 6/15 (40%), pérdida de apetito 6/15 (40%), vómitos 5/15 (33,33%). Dos niños (13,33%) no refirieron ningún signo/síntoma.

Entre los adultos estudiados, una mujer que además de *Giardia* tenía *Strongiloides stercoralis* manifestó sueño alterado y pérdida de apetito; un varón que tenía además *B. hominis* refirió sueño alterado, dolor abdominal y pérdida de apetito y una mujer que tenía además *E. coli*, *E. vermicularis* y *B. hominis* negó la presencia de algún síntoma o signo.

DISCUSIÓN

El presente estudio reporta, por primera vez en nuestro país, información preliminar sobre la presencia de genotipos A y B de *Giardia* en humanos y animales.

De las 60 muestras de personas analizadas, se aislaron un 66,7% de genotipo B, 5% de genotipo AII y no amplificó el 28,3%. Los porcentajes de no amplificación son superiores a los reportados por Amar y colaboradores en el 2002 (22%) quienes utilizaron los mismos primers pero trabajaron con heces totales sin conservantes. Cuando este mismo grupo de investigadores trabajó con quistes tomados de preparados coloreados tuvieron un 41% de no amplificación debido, según los propios autores, al bajo número de quistes presentes en estos preparados. El-Shazly y colaboradores (2004) refieren un porcentaje de no amplificación del 26,7% también trabajando con heces sin conservantes. Si bien en nuestro estudio el promedio de quistes/mm³ presentes en las muestras que no amplificaron parece menor a aquel presente en las muestras que amplificaron, esta diferencia no resultó significativa. Probablemente otros factores tales como la concentración del conservante o la presencia de sustancias inhibidoras que pueden estar presentes en algunas muestras de materia fecal, deben haber influido en la ausencia de amplificación.

Las prevalencias de genotipos A y B en estudios llevados a cabo en diversos países difieren en su mayoría respecto a los resultados de este trabajo. Sí coinciden en que la población estudiada es predominantemente pediátrica. Un estudio llevado a cabo en Alemania (Karanis and Ey, 1998) reportó cinco aislamientos AI, seis AII y solo un genotipo B. En China, Lu y colaboradores (1998) demostraron dos aislamientos B y un aislamiento mixto (AI + B), mientras que Yong y colaboradores (2000) publicaron la detección de cuatro aislamientos A y dos B en este mismo país. Este último grupo también

estudió siete aislamientos en Korea resultando todos pertenecientes al genotipo A. En Italia, Caccio y colaboradores (2002) identificaron tres genotipos A y cuatro B. Ponce Macotella y colaboradores (2002) alertan sobre un predominio absoluto de aislamientos All en 22 personas de Méjico. También, diversos estudios realizados en Uganda, Nueva Zelanda, Egipto, Portugal y Méjico reportan un absoluto predominio de genotipo A (Graczyk et al, 2002; Learmonth et al, 2003; El Shazly et al, 2004; Ceu Souza et al, 2004; Lalle et al., 2005). Por otra parte, Read y colaboradores (2004) estudiaron a 23 personas en Australia encontrando el genotipo B en 14 de ellas, el All en 5 y el AI en 4. En Canadá, Guy y colaboradores (2004) encontraron 9 aislamientos B, 3 A y 3 mixtos (A+B). Los resultados mas similares a los reportados en este estudio fueron publicados por Ng y colaboradores (2005) en un estudio llevado a cabo en aislamientos en Bangladesh, donde encuentran 32 pertenecientes al genotipo B y 3 al genotipo A. Los resultados de todos los estudios no pueden ser estrictamente comparables debido a que las amplificaciones se han llevado a cabo sobre diferentes genes de *Giardia* y en algunos de ellos las características de la población estudiada difieren porque no son estudios poblacionales (que deberían incluir a personas con y sin síntomas) sino limitados a grupos de personas concurrentes a servicios hospitalarios.

Si bien el genotipo All solo fue encontrado en niños de entre 7 y 13 años, y todos los adultos estudiados estuvieron afectados por el genotipo B, nuestra metodología de selección de muestras no permite concluir que exista una diferencia en la distribución de ambos genotipos en relación con la edad. Sin embargo es importante resaltar que al igual que con el genotipo All, el genotipo B tuvo una mayor distribución en la población infantil (menores de 15 años). Respecto al sexo, la frecuencia de distribución de los genotipos fue similar.

El genotipo All solo se detectó en tres hermanos que vivían en un asentamiento precario urbano, sugiriendo que la transmisión es predominantemente directa e interhumana. Se necesitan más estudios para confirmar estas hipótesis. La distribución del genotipo B fue similar en personas que vivían en la zona urbanizada respecto a las que vivían en las zonas rurales, siendo ocho los núcleos familiares (pareja o hermanos) que compartían el genotipo sugiriendo que la transmisión puede ser tanto directa (persona a persona) o por contaminación de una fuente (agua, alimentos, suelo, etc).

Las personas que vivían en malas condiciones sanitarias presentaron ambos genotipos, mientras que aquellos que tenían condiciones sanitarias buenas y regulares solo presentaron genotipo B. Read y colaboradores (2004), refieren que en estudios longitudinales se ha reportado que la mezcla de los dos genotipos no se perpetúa, siendo siempre uno más exitoso que el otro. Basados en estudios *in vitro* llevados a cabo por Ceu Souza y colaboradores (2004), que han demostrado que el genotipo A presenta una velocidad de crecimiento mayor que el genotipo B, estos autores sugieren que el genotipo A desplazaría al B en una hipotética mezcla. En este sentido, podemos suponer que los hermanos del asentamiento precario, por sus condiciones sanitarias deficientes, han estado también expuestos al genotipo B, pero el genotipo A (probablemente de transmisión directa) ha predominado en ellos. Si el genotipo A fuera también de transmisión indirecta, a través de una fuente común de

infección, los niños del asentamiento precario presentarían este genotipo ya que todos vivían en malas condiciones sanitarias.

En el caso de las personas con condiciones sanitarias buenas y regulares se refuerza la idea de una probable fuente de infección pues, por ejemplo, se conoce que los quistes de *Giardia* resisten el clorinado habitual del agua de consumo. La población de General Mansilla obtiene el agua del acuífero Puelche y solamente la clorinan para distribuirla a su población. En el medio rural el agua se extrae por medio de bombas domiciliarias para el caso de personas con regulares condiciones sanitarias.

Con respecto a los animales estudiados, con diagnóstico microscópico de giardosis, solo se detectó la presencia del genotipo B, en una muestra canina. Este resultado sugiere que la transmisión zoonótica de esta parasitosis no es frecuente en la población estudiada. Sin embargo un estudio más detallado de la prevalencia de giardosis en animales debería incluir el análisis de los genotipos C y D, que se encuentran exclusivamente en caninos, y del genotipo E, de ganado vacuno, los que se revelan por amplificación del gen de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*). En un estudio llevado a cabo en Inglaterra sobre humanos y perros de la misma comunidad (Hopkins et al, 1997) se encontró que los aislamientos humanos fueron A o B, y que todos los aislamientos de perro, salvo uno; fueron C o D. La excepción tenía una infección mixta (B y C), sugiriendo que quizá el perro fue infectado de una fuente humana. Thompson (2000) afirma que en el medio rural los perros tienen su genotipo y que en el medio urbano comparten el genotipo humano aduciendo que en un medio rural el contacto perro-perro es mas frecuente que en el urbano. En este estudio el perro que presentó una giardosis tenía el mismo genotipo que una persona que vivía en estrecho contacto con él, y pertenecía a la zona rural. Traub y colaboradores (2004) demostraron el mismo genotipo (A II) de *Giardia* en un perro y todos los miembros de una familia de la India. Un estudio en Japón sobre perros encontró solamente el genotipo D, específico de perro (Abe et al., 2003).

Respecto a estudios genéticos de Giardias aisladas del ganado vacuno, se ha detectado el genotipo E con una prevalencia que oscila entre 56 y 57% (O'Handley et al., 2000). Este genotipo no tiene aparente riesgo zoonótico para el hombre, por lo tanto no existen evidencias que soporten el rol del ganado vacuno como reservorio de infección para el hombre. Los resultados de este estudio son coincidentes con esta afirmación pues ninguna de las materias fecales de vaca con *Giardia* amplificaron los genotipos buscados (Matsubayashi et al., 2005).

El hacinamiento estuvo presente en todos los casos afectados por el genotipo AII reforzando la posibilidad de transmisión directa interhumana. En los casos de genotipo B, la mayoría (70%) no presentaba hacinamiento, sugiriendo la posibilidad de transmisión a partir de una fuente contaminada como puede ser el agua o los alimentos. El hecho de que las personas afectadas por el genotipo AII nunca estuvieran expuestas al anegamiento y sí lo estuvieran la mayoría de las que fueron afectadas por el genotipo B, refuerza estas conclusiones.

La diversidad de parásitos en materia fecal junto con *Giardia* genotipo All fue mínima y siempre se encontró *Blastocystis hominis*, mientras que para genotipo B fue mayor, con registro tanto de helmintos como de protozoos.

Los síntomas pérdida de apetito y decaimiento fueron referidos por todas las personas con *Giardia* de genotipo All. Ninguna de ellas presentó diarrea, dolor abdominal, sueño alterado y/o vómitos; signos o síntomas que sí se registraron en personas con genotipo B.

Amar y colaboradores (2002) determinaron que el genotipo B fue responsable de un brote de diarrea en una guardería de Inglaterra. Por el contrario, un estudio longitudinal llevado a cabo en Australia por Read y colaboradores (2002) reportó que los niños infectados con el genotipo A tuvieron 26 veces mas probabilidades de tener diarrea. En Holanda, Homan y Mank (2001) encontraron que la infección por el genotipo B estuvo asociada con diarrea crónica, mientras que las infecciones con genotipo A se relacionaron con diarrea intermitente. Pero la edad de los individuos en los estudios no coincide, siendo los de Inglaterra menores de 5 años, los de Holanda de 8 a 60 años y los de Australia mas jóvenes. Eligio García y colaboradores (2002) no encontraron correlación entre manifestaciones digestivas y genotipos en un estudio llevado a cabo sobre pacientes de 6 a 12 años. Lo mismo refiere Ceu Souza y colaboradores (2004) en un estudio realizado en Portugal.

No se conoce por qué algunos individuos desarrollan giardiosis clínicas mientras que otros permanecen oligosintomáticos o asintomáticos. Probablemente tanto factores del huésped como variaciones del parásito estén involucrados. Los genotipos A y B están distribuidos por todo el mundo, aunque el B esta restringido a endemias localizadas (Thompson, 2000). Este estudio fue llevado a cabo en personas con y sin síntomas digestivos y demuestra que tomar muestra solamente de individuos con diarrea no da la verdadera estimación de la prevalencia de *Giardia* y en particular, el rol epidemiológico que juegan los diferentes genotipos. Si una persona es oligo/asintomática, sigue concurriendo a la escuela, guardería, lugar de trabajo, lugar de recreación, etc. Lo que permite la potencial transmisión dentro de esos ámbitos y de estos hacia la comunidad produciendo endemias localizadas. La correlación entre un genotipo de *Giardia* y diarrea no necesariamente implica que un genotipo en particular sea más virulento, por que una infección crónica probablemente se relaciona con desórdenes nutricionales y alteración en el desarrollo de los niños. Esto origina la pregunta ¿cuál es el más virulento?, un aislamiento de *Giardia* asociado a un episodio agudo de diarrea o un aislamiento asociado a una infección crónica de un paciente que no concurre a la atención médica (Thompson, 2000).

Para Beatriz Gottlieb (en Atias y Neghme, 1993) el factor más importante en la ingestión de nutrientes, además de la disponibilidad de alimentos, es el apetito. La influencia de una enfermedad aguda en el apetito es habitualmente súbita y tiende a ser de corta duración. En cambio, el impacto nutricional de la infección parasitaria crónica es más lento, de larga duración, provocando un déficit nutricional constante que a la larga, al agotarse los depósitos, produce un efecto nutricional detectable, especialmente en los niños. Esta misma autora, basándose en un trabajo de Rosenberg y Bowman (1982), refiere que

el metabolismo parasitario altera el sentido del gusto y por eso produce pérdida de apetito. Además, debemos tener en cuenta que *Giardia* dificulta la absorción de nutrientes.

Los resultados de este estudio implican al genotipo AII en cuadros de giardiosis oligosintomáticos y al genotipo B en cuadros polisintomáticos. Probablemente las personas parasitadas con genotipo B concurren a la consulta médica y aquellas con genotipo AII no lo hagan, produciéndose un lento deterioro en el estado de salud de estas últimas.

CONCLUSIONES FINALES.

Este trabajo corresponde a un ensayo preliminar sobre la prevalencia y distribución de los genotipos de *Giardia lamblia*. En particular, hemos detectado la presencia de los genotipos AII y B de *G. lamblia* tanto en personas como en animales de La Plata y General Mansilla.

El objetivo inicial de este trabajo fue optimizar y evaluar las técnicas de purificación y ruptura de quistes de *Giardia* spp a partir de heces formoladas para la obtención de ADN. La materia fecal filtrada fue sometida a 3 técnicas de purificación, utilizando soluciones de formol-éter, sacarosa y formol-éter más sacarosa. La solución de sacarosa permitió aislar los quistes con menos detritos. Los quistes purificados fueron tratados con 3 técnicas para la ruptura de los mismos: shock osmótico y calor, degradación química y shock térmico más acción enzimática. Solamente con la técnica de shock térmico y acción enzimática se observaron bandas fluorescentes en geles de agarosa.

Además, se evaluaron tres procedimientos de extracción de ADN de quistes de *Giardia*, respecto a la cantidad y pureza de ADN obtenido, complejidad y tiempos de procesamiento y costos. Se probaron tres métodos de extracción de DNA: fenol: cloroformo: isoamílico; chelex 100 y kit comercial. La técnica utilizando Chelex resultó ser la más eficiente teniendo en cuenta los criterios de rendimiento y pureza de DNA. Además esta metodología resultó ser una técnica sencilla y de bajo costo. Lamentablemente, no pudo ser utilizada para la técnica de PCR-RFLP porque las muestras de materia fecal con diagnóstico de giardiosis por microscopía óptica no amplificaron. Si lo hicieron cuando se utilizó el kit comercial que resultó entonces, el procedimiento que se siguió previo a la PCR.

Para la genotipificación se adaptó la metodología de PCR-RFLP publicada por Amar y colaboradores (2000) logrando una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad aceptable.

Luego de procesar 60 muestras fecales de personas y 10 de animales (8 perros y 2 vacas) con diagnóstico de giardiosis por microscopía óptica se logró la amplificación en 43/60 de las muestras humanas y en un perro. Se detectaron los genotipos AII y B.

El **genotipo AII** presentó baja prevalencia en la población estudiada (7%) afectando a tres niños entre 7 y 13 años que convivían en una vivienda precaria de de La Plata. Este genotipo no fue hallado en animales, y las personas en las que se lo detectó eran oligosintomáticas y ninguna de ellas presentó diarrea. Se postula que los casos de giardiosis provocados por el genotipo AII, probablemente se deban a una transmisión directa interhumana porque se presentaron en hermanos convivientes y no en los otros niños del mismo barrio.

El **genotipo B** fue el de mayor prevalencia en humanos (93% de los casos estudiados) y afectó tanto a niños entre 1 y 12 años como a adultos entre 26 y 33 años. Este genotipo fue encontrado en personas polisintomáticas

muchas de las cuales presentaron diarrea. Fue hallado en humanos y solamente en un animal (perro) de los 10 analizados, por lo que su potencial zoonótico se considera escaso. Su transmisión pudo ocurrir a través de una fuente común de infección pues se encontró en personas de diferentes viviendas pero que comparten el mismo tipo de suministro de agua y tenían anegamiento de sus viviendas. Sin embargo, no se puede descartar una transmisión directa interhumana porque también existen casos de convivientes con el mismo genotipo.

Estudios llevados a cabo sobre un mayor número de muestras, tanto de personas como de animales, provenientes de diferentes regiones incrementarán la comprensión de la epidemiología de giardiosis en nuestro país. Sería importante que estos estudios no solo abarquen mayor número de individuos, sino también que puedan realizarse seleccionando de manera aleatoria a la población, colectando la materia fecal sin conservantes e incluyendo individuos sintomáticos y asintomáticos, para determinar los genotipos predominantes y su relación con las diversas variables clínicas y epidemiológicas.

REFERENCIAS

- Abe N, Kimata I, Iseki M. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. J Vet Med Sci 2003, 60: 29-33.
- Adam RD. The *Giardia lamblia* genome. Int J Parasitol 2000, 30: 475-484.
- Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev 2001, 14: 447-475.
- Amar C, Dear P, Pedraza Diaz S, Looker N, Linnae E., McLauchlin J. Sensitive PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. J Clin Microbiol 2002, 40: 446-452.
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K, editores Short Protocols in Molecular Biology. Compendium of Methods from Current protocols in Molecular Biology, 1992. Second Edition. Harvard Medical School.
- Barr CS, Bowman DD. Giardiasis. Selecciones veterinarias Virtual 3 (1). 1994. http://www.seleccionesveterinarias.com/articulos/art3_1.htm
- Baruch AC, Isane-Renton J, Adam RD. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. J Infect Dis 1996, 174:233-236.
- Basso WU, Venturini L, Risso MA. Comparación de técnicas parasitológicas para el examen de heces de perro. Parasitol Día 1998, 22: 52-56.
- Baszler TV, Gay LJC, Long MT, Mathison BA. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. J Clin Microbiol 1999, 37: 4059-4064.
- Becher K, Robertson I, Fraser D, Palmer D, Thompson R. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in western Australia. Vet Parasitol 2004, 123: 1-9.
- Bernander R, Palm JE, Svard SG. Genome ploidy in different stages of *Giardia lamblia* life cycle. Cell Microbiol 2001, 3: 55-62.
- Bertram MA, Meyer EA, Lile JD, Morse SA. A comparison of isozymes of five axenic *Giardia* isolates. J Parasitol 1983, 69: 793-801.
- Bienz M, Siles-Lucas M, Wittwer P, Muller N. Vsp gene expression by *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7 during antigenic variation in vivo and in vitro. Infect Immun 2001, 69: 5278-5285.

- Brodsky RE, Spencer HC, Schultz MG. Giardiasis in American travelers in the Soviet Union. J Infect Dis 1974, 130: 319-323.
- Brusés BL, Lucero H, Aguirre MV, Gorodner J. Comparación de técnicas de extracción de DNA para la detección de *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica de PCR. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000 (cited 2004). Available from: URL: http://www.unne.edu.ar/cyt/2000/3_medicas/m_pdf/m_011.pdf
- Caccio S, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a PCR-RFLP assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int J Parasitol 2002, 32: 1023-1030.
- Carnevale S, Velázquez JN, Labbé JH, Chertcoff A, Cabrera MG, Rodríguez MI. Diagnosis of *Enterocytozoon bienersi* by PCR in stool samples eluted from filters paper disks. Clin Microbiol Rev 2000, 7: 504-506.
- Carranza P, Feltes G, Ropolo A, Quintana S, Touz M, Lujan H. Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation. Infect Immun 2002, 70: 5265-5268.
- Ceu Souza M, Poiars da Silva J. Characterization of human isolates of *Giardia lamblia* from Portugal. Int J Infect Dis 2004, 8 suppl 1, p 218.
- Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. Nucl Acid Res 1999, 27: 12-15.
- Crompton DWT. How much human helminthiasis is there in the world?. J Parasitol 1999, 85: 397-403.
- Cueto Rua E, Feldman R. Giardia lamblia. En: Microbiología y Parasitología Biomédica. Basualdo, Coto y de Torres. Editorial Atlante. Argentina. 1996. ISBN: 950-9539-30.8, pp 915-921.
- Davis-Hayman S, Nash TE. Genetic manipulation of *Giardia lamblia*. Mol Biochem Parasitol 2002, 122: 1-7.
- Deng MQ, Cliver DO. Rapid DNA extraction methods and new primers for randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Giardia duodenalis*. J Microbiol Methods 1999, 37: 193-200.
- Dowd SE, Gerba CP, Enriquez FJ, Pepper IL. PCR amplification and species determination of Microsporidia in formaline-fixed feces after immunomagnetic separation. Appl Environ Microbiol 1998, 64(1): 333-336
- Eligio-García L, Galván S, Jiménez-Cardoso E. Distancia filogenética de aislados de *Giardia intestinalis* de niños sintomáticos y asintomáticos. Rev Invest Clin 2002, 54: 113-118.

- El-Shazly A, Mowafy N, Soliman M, El-Bendary M, Morsy A, Ramadan N, Arafa W. Egyptian genotyping of *Giardia lamblia*. J Egypt Soc parasitol 2004, 34: 265-280.
- Faubert G. Immune Response to *Giardia duodenalis*. Clin Microbiol Rev 2000, 13: 35-54.
- Feldman RE, Guardis M. (1990) Diagnóstico coproparasitológico. Fundamentos, normas, metodología, bioseguridad, control de calidad. Nueva guía práctica. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires, La Plata. Argentina 1990, p. 18-22
- Fraser D, Bilenko N, Deckelbaum RJ, Dagan R, el-On J, Naggan L. *Giardia lamblia* carriage in Israeli Bedouin infants: risk factors and consequences. Clin Infect Dis 2000, 30: 419-424.
- Gamboa M, Basualdo J, Cordoba M, Pezzani B, Minvielle M, Lahitte H. Distribution of intestinal parasitoses in relation to environmental and sociocultural parameters in La Plata, Argentina. J Helminthol 2003, 77: 15-20.
- Gioffré A, Meichtri L, Zumarraga M, Rodriguez R, Cataldi A. Evaluation of a QIAamp DNA stool purification kit for Shiga-toxigenic *Escherichia coli* detection in bovine fecal swabs by PCR. Rev Arg Microbiol 2004, 36: 1-5.
- Gottlieb Beatriz. Nutrición y parasitosis. En: Parasitología Clínica. Atías-Neghme. (3ra edición). Editorial Mediterráneo. Santiago de Chile. 1993, pp445-447.
- Graczyk T, Bosco-nizayi J, Ssebide B, Thompson R, Read C, Cranfield M. Anthropozoonotic *Giardia duodenalis* genotype (assemblage) a infections in habitats of free-ranging human-habituated gorillas, Uganda. J Parasitol 2002, 88: 905-909.
- Greenspoon S, Scarpetta m, Drayton M, Turek S. QIAamp spin columns as a method of DNA isolationa for forense casework. J Forensic 1998, 43: 1024-1030.
- Guimaraes S, Sogayar M, Franco M. *Giardia duodenalis*: inter strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nuclei acids. Rev. Inst Med Trop Sao Paulo 1999, 41: 45-55.
- Guy R, Xiao C, Horgen P. Real time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. J Clin Microbiol 2004, 42: 3317-3320.
- Homan W, Mank T. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. Int J parasitol 2001, 31: 822-826.

- Hopkins RM, Meloni RP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. J Parasitol 1997, 83: 44-51.
- Ionas G, Farrant KJ, McLenachan PA, Clarke JK, Brown TJ. Species differentiation of *Giardia* by PCR. OECD Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water. Interlaken 1998.
- Karanis P, Ey PL. Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. Parasitol Res 1998, 84: 442-449.
- Lalle M, Jimenez-Cardosa E, Caccio S, Pozio E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. J Parasitol 2005, 91: 203-205.
- Lanfredi-Ramgel A, Attias M, de Carvalho T, Kattenbach W, de Souza W. The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. J Struct Biol 1998, 123: 225-235.
- Learmonth J, Ionas G, Pita A, Cowie R. Identification and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* strains in human and dairy cattle in Waikato region of New Zealand. Water Sci Technol 2003, 47: 21-26.
- Leber AL, Novak SM. Intestinal and Urogenital Amebae, Flagellates and Ciliates. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, Manual of Clinical Microbiology 7th ed, ASM Press Washington DC, 1999, p. 1391-1405.
- Le Blancq SM, Kase RS, Van der Ploeg H. Analysis of a *Giardia lamblia* rRNA encoding telomere with TAGGG as the telomere repeat. Nucleic Acid Res 1991, 19: 5790-5792.
- Le Blancq SM, Adam RD. Structural basis of karyotype heterogeneity in *Giardia lamblia*. Mol Biochem Parasitol 1998, 97: 199-208.
- Le Chevallier MW, Norton WD, Siegel JE, Abbaszadegan M. Evaluation of immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. Appl Environ Microbiol 1995, 61: 690-697.
- Lu S, Baruch A, Adam R. Molecular comparison of *Giardia lamblia* isolates. Int J Parasitol 1998, 28: 1341-1345.
- Lu S, Li J, Zhang Y, Wen J, Wang F. The intraspecific difference of triose phosphate isomerase (tim) gene from *Giardia lamblia*. Chin Med J (Engl) 2002, 115: 763-766.

- Lujan HD, Marotta MR, Mowatt MR, Sciaky N, Lippincott-Schwartz J, Nash T. Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. J Biol Chem 1995, 270: 4612-4618.
- Lujan HD, Mowatt MR, Byrd LG, Nash TE. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93: 7628-7633.
- Lujan H, Touz M. Protein trafficking in *Giardia lamblia*. Cell Microbiol 2003, 5: 427-434.
- Matsubayashi M, Kimata I, Abe N. identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from humans and calf in Japan. J Vet Med Sci 2005, 67: 337-340.
- Maryhofer G, Andrews R, Ey P, Chilton N. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. Parasitology 1995, 111: 11-17.
- McArthur AG, Morrison HG, Nixon EJ, Passamaneck NQE, Kim U, Hinkle G, Crocker MK, Holder ME, Farr R, Reich CL, Olsen GE, Aley SB, Adam RD, Gillin FD, Sogin ML. The *Giardia* genome project database. FEMS Microbiol Lett 2000, 189: 271-273.
- McGlade TR., Robertson ID., Elliot AD., Thompson RCA. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. Vet Parasitol 2003, 110: 197-205.
- Meloni BP, Thompson RC. Comparative studies on the axenic in vitro cultivation of *Giardia* of human and canine origin: evidence for intraspecific variation. Trans R Soc Trop Med Hyg 1987, 81: 637-640.
- Mintz ED, Hudson-Wragg M, Mshar P, Cartter ML, Hadler JL. Foodborne giardiasis in a corporate office setting. J Infect Dis 1993, 17: 250-253.
- Minvielle M, Pezzani B, Cordoba M, De Luca M, Apezteguía M, Basualdo J. Epidemiological survey of *Giardia* spp and *Blastocystis hominis* in an Argentinian rural community. Korean J. Parasitol 2004, 42: 61-66.
- Monis PT., Andrews R., Maryhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. Mol Biol Evol 1999, 16: 1135-1144.
- Monis P, Thompson R. *Cryptosporidium* and *Giardia* zoonosis: fact or fiction?. Infect Genet Evol 2003, 3: 233-244.
- Nash T, McCutchan T, Keister D, Dane J, Conrad J, Gillin F. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. J Infect Dis 1985, 152: 64-73.

- Nash TE, Banks SM, Alling DW, Meritt JW. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. J Immunol 1988, 141: 636-641.
- Ng C, Gilchrist C, Iane A, Roy S, Haque R, Hompt E. Multiplex real-time PCR assay using scorpion probes and DNA captures for genotype-specific detection of *Giardia lamblia* on fecal samples. J Clin Microbiol 2005, 43: 1256-1260.
- Noemí I, Atías A. Giardiasis. En: Parasitología Clínica. Atías-Neghme. (3ra Edición). Editorial mediterráneo. Santiago de Chile. ISBN: 956-220-066-2, 1993, pp145-151.
- O'Handley RM, Olson ME, Fraser D, Adams P, Thompson RC. Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. Vet Parasitol 2000, 90: 193-200.
- Pezzani B, Minvielle M, Laplace R, Cotter G, Basualdo J. Presencia de elementos parasitarios en contenido intestinal de muridos de la ciudad de La Plata. Iº Congreso de Zoonosis de la Provincia de Buenos Aires. La Plata. 2003. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, Supl 1: 84, 2003
- Pierangeli N, Manacorda A, Soriano S, Pezzani B, Minvielle M, Basualdo J. Estacionalidad de parásitos intestinales en suelos periurbanos de la ciudad de Neuquen, Patagonia, Argentina. Trop Med Int Health 2003, 8: 259-263.
- Polverino D, Molina NB, Minvielle MC, Lozano ME, Basualdo JA. Técnicas de purificación y ruptura de quistes de *Giardia* spp. Rev Arg Microbiol 2004, 36: 97-100.
- Ponce-Macotella M, Martinez-Gordillo M, Bermúdez-Cruz R, Salazar-Schettino P, Ortega-Pierres G, Ey P. Unusual prevalence of *Giardia intestinalis* All subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. Int j parasitol 2002, 32: 1201-1202.
- Proctor E, Isaac-Renton J, Boyd J, Wong Q, Bovie W. Isoenzyme analysis of human and animals isolates of *Giardia duodenalis* from British Columbia, Canada. Am J Trop Med Hyg 1989, 41: 411-415.
- Read CM, Walters J, Robertson ID, Thompson RCA. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. Int J Parasitol 2002, 32: 229-231
- Read CM, Monis PT, Thompson RCA. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect Genet Evol 2004, 4: 125-130.
- Rimhanen-Finne R, Horman A, Ronkainen P, Haninen ML. An IC-PCR method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural surface waters in Finland. J Microbiol Methods 2002, 50: 299-303.

- Rivera M, de la Parte M, Hurtado P, Magaldi L, Collazo M. Intestinal giardiasis. Mini review. Invest Clin 2002, 43: 119-28.
- Roger AJ, Svard SG, Tovar J, Clark CG, Smith MW, Gillin FD, Sogin ML. A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95: 229-234.
- Sambrook J & Russell D. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001
- Solari A, Rahn M, Saura A, Lujan H. A unique mechanism of nuclear division in *Giardia lamblia* involves components of the ventral disk and the nuclear envelope. Biocell 2003, 27: 329-346.
- Sarafis K, Isaac-Renton J. Pulse-field gel electrophoresis as a method of biotyping of *Giardia duodenalis*. Am J Trop Med Hyg 1993, 48: 134-144.
- Stranden A., Eckert J., Kolher P. Electrophoretic characterization of *Giardia* isolated from humans, cattle, sheep and a dog in Switzerland. J Parasitol 1990, 76: 660-668.
- Stemmer C, Beau-Faller M, Pencreac'h E, Guerin E, Schneider A, Jaqmin D, Quoix E, Gaub M, Oudet P. Use of magnetic beads for plasma cell-free DNA Extraction: toward automation of plasma DNA analysis for molecular diagnostics. Clin Chem 2003, 49: 1953-1955.
- Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. Int J Parasitol 2000, 30: 1259-1267.
- Traub R, Monis P, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson R. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. Parasitology 2004, 128: 253-262.
- Troll H, Marti H, Weiss N. Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate-acetic acid formalin concentration and PCR. J Clin Microbiol 1997, 35: 1701-1705.
- Upton SJ. In vitro cultivation. En: Fayer R (Ed), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, CRC Press Inc., 1997, p. 181-207.
- van Keulen H, Campbell SR, Erlandsen SL, Jarroll EL. Cloning and restriction enzyme mapping of ribosomal DNA of *Giardia duodenalis*, *Giardia ardeae* and *Giardia muris*. Mol Biochem Parasitol 1991, 46: 275-284.

- van Keulen H, Feely DE, Macechko PT, Jarroll EL, Erlandsen SL. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. J Parasitol 1998, 84: 294-300.
- van Keulen H., Macechko PT., Wade S, Schaaf S, Wallis P, Erlandsen S. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggest a zoonotic potential for giardiasis. Vet Parasitol 2002, 108: 97-107.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organism: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87: 4576-4579.
- Yong T, Park S, Hwang U, Yang H, Lee K, Min D, Rim H, Wang Y, Zheng F. Genotyping of *Giardia lamblia* isolates from humans in China and Korea using ribosomal DNA sequences. J Parasitol 2000, 86: 887-891.

Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados en:

“Comparación de tres técnicas de extracción de ADN de quistes de *Giardia lamblia*”.

XVII Congreso Latinoamericano de Parasitología, IV Congreso Argentino de Parasitología, XXIX Jornadas Internacionales de Hidatidología. (2005)

“Reproducibilidad en la amplificación del gen *tpi* por PCR de *Giardia lamblia*”.

XVII Congreso Latinoamericano de Parasitología, IV Congreso Argentino de Parasitología, XXIX Jornadas Internacionales de Hidatidología. (2005)

"Técnicas de purificación y ruptura de quistes de *Giardia* spp".

Revista Argentina de Microbiología. 36 (3): 97-100 (2004).

Agradecimientos:

Deseo expresar mi agradecimiento a:

- Todos los docentes-investigadores de la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP por el permanente apoyo a mi trabajo. En especial a Daniela y a Nora sin cuya colaboración me hubiera sido muy difícil lograr los objetivos propuestos.
- Las no-docentes Evangelina, Verónica, Cristina y María por su colaboración en la confección de gráficos, figuras y análisis estadístico de los datos.
- Los Doctores Harry van Keulen y Pablo Perez que cedieron desinteresadamente los controles utilizados en este trabajo.
- Mi Director, Mario Lozano, quién sin conocerme, aceptó dirigirme y “soportar” mi inexperiencia en técnicas aplicadas a biología molecular.
- Juan Basualdo, quien confió plenamente en mí para iniciar una nueva línea de trabajo en la Cátedra que dirige.
- Mi esposo Guillermo y mis hijos, Martín y Cecilia quienes siempre apoyaron mis proyectos académicos (este es el quinto).
- Mi madre, Nelly y mi padre, Roberto; quienes me dieron la oportunidad (hace ya 30 años) de estudiar una carrera universitaria.

Marta Cecilia Minvielle