

RECUPERACIÓN DE QUISTES Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Giardia intestinalis* EN ALIMENTOS

Lucio-Salazar Mayra Montserrat¹, Cuéllar-Mata Patricia²

¹Universidad de Guanajuato, pc3_ary@hotmail.com, ²Universidad de Guanajuato mata@ugto.mx

RESUMEN

Giardia intestinalis es un parásito involucrado en enfermedades intestinales asociadas al consumo de agua y alimentos contaminados. Vegetales como la lechuga, son vehículos potenciales de transmisión. Debido a que en México no existe una técnica estandarizada confiable para detectar al patógeno, aquí trabajo se desarrolló un procedimiento sencillo encaminado a recuperar la mayor cantidad de quistes del parásito y posteriormente, optimizar su detección. Para ello, el parásito se cultivó induciendo su enquistamiento e inoculando una cantidad conocida de quistes en lechugas. Se probaron tres métodos de recuperación utilizando diferentes extractantes: glicina 1M, PAS y detergentes (SDS y Tween Polisorbato 80). Se obtuvieron porcentajes similares de recuperación de quistes con glicina y con PAS (71-77%), el método que utiliza detergentes rindió un porcentaje más bajo. En todos se obtuvieron productos de amplificación característicos de *Giardia* con los quistes recuperados, pero el método de PAS se prefirió dada su sencillez y eficiencia.

PALABRAS CLAVE

Extracción, quistes de *Giardia*, lechuga

INTRODUCCIÓN

Giardia es un parásito protozoario intestinal, cuya presencia como contaminante en alimentos ha quedado demostrada desde 1970. Su ciclo de vida consta de dos fases: una fase reproductiva, que tiene lugar en el intestino y una fase transmisora, donde se excreta al ambiente por las heces con posibilidades de infectar a otros hospederos [1].

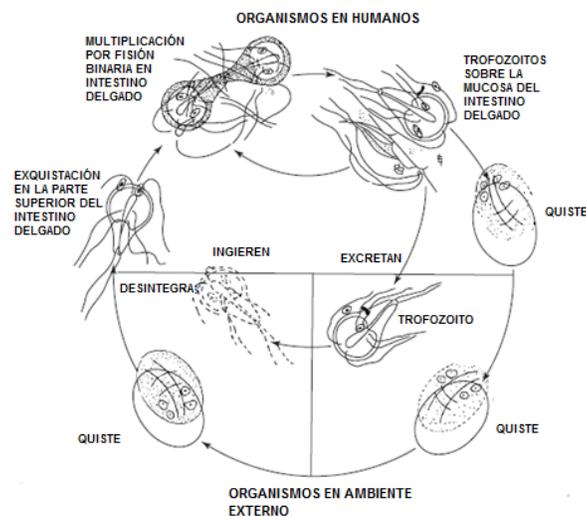


Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia*. Se pueden observar las dos formas morfológicas del parásito: quiste y trofozoito [1].

La enfermedad ocasionada por este parásito es conocida como Giardiasis, que es endémica en todo el mundo [2], pero tiene más prevalencia en lugares donde los hábitos de higiene son escasos o inadecuados. Afecta a personas de todas las edades pero es más frecuente en niños. Las áreas específicas donde se ha detectado un alto riesgo de incremento en la infección son la Unión Soviética, Sureste y Sur de Asia, África Tropical, México y el Oeste de América del Sur debido al elevado índice de viajeros que transitan [2]. La infección de *Giardia* es el origen de varios trastornos intestinales en países desarrollados y en desarrollo con una estimación de 2.8×10^8 casos en humanos por año. La ingestión de tan solo 10 quistes de *Giardia* puede ocasionar giardiasis, a través de comida o agua contaminada con los quistes [3].

Por lo general, los vegetales se consumen crudos, proporcionando mayor cantidad de vitaminas, minerales y fibra dietética, por lo que se han considerado un grupo importante para el mantenimiento de la salud humana [4], pero también se ha demostrado que constituyen un vehículo de transmisión de una amplia gama de parásitos, entre los cuales se encuentra no solo *Giardia* sino otros protozoarios y helmintos [5]. Los vegetales pueden ser contaminados durante su producción si son regados con agua residual no tratada y utilizando como fertilizante el estiércol, que es una práctica común en algunas regiones de los países en desarrollo [6].

En nuestro país no existe una técnica estandarizada y segura para detectar este patógeno probablemente por la falta de métodos de análisis sencillos, confiables y a la dificultad para recuperar suficientes quistes detectables. Existen algunos trabajos realizados con este fin utilizando glicina 1M a diferentes pH; se ha propuesto que este procedimiento puede ser utilizado para análisis de rutina en lechugas o productos de ensaladas en busca de uno o más parásitos [7]. Experimentos con variaciones de este método utilizando glicina 1M a pH 5.5, sugirieron que la elección del pH es crítica, pues éste maximiza la cantidad de quistes recuperados de alimentos, no sólo en su extracción de la matriz alimenticia sino también en su concentración por separación inmunomagnética (IMS) [8]. En Bélgica, se analizó la presencia y diversidad de protozoarios de vida libre en lechugas del género *Lactuca sativa*, utilizando una solución salina de ameba de Page (PAS); con esta solución se extrajeron con éxito cinco grupos de protozoarios [9]. Otro método para analizar legumbres utilizó los detergentes SDS y Tween- Polisorbato 80, tal como lo indica la FDA (Food and Drug Administration) para la recuperación de parásitos de frutas y verduras, donde se evaluaron vegetales durante 6 meses, tanto lavados como no lavados, obteniendo resultados positivos para la detección de quistes de *Giardia* [4].

La presencia de quistes de *Giardia* en vegetales crudos, la frecuencia de la enfermedad, así como la distribución del parásito en nuestro país, fue el motivo para buscar un método que sea rápido, efectivo y sencillo para su detección en alimentos. En este trabajo nos propusimos investigar qué método proporciona la mayor recuperación de quistes para obtener un DNA útil en ensayos de PCR. De esta manera, se inocularon experimentalmente quistes de *Giardia* en lechugas y se evaluó el porcentaje de su recuperación por los tres métodos mencionados como base para el diseño de una prueba de detección del parásito [8,4,9].

MATERIALES Y MÉTODOS

- ▶ Cultivo de trofozoítos: Se realizó la resiembra del parásito a partir de una cepa de *Giardia intestinalis* donada por el Instituto Nacional de Pediatría. Se inocularon 200 μ L en tubos de cultivo con tapa de rosca de 8 mL previamente llenados con medio de crecimiento TYI-S-33 pH 7, se incubaron a 37°C y se revisaron al tercer día. La resiembra se llevó a cabo según el grado de confluencia observado.
- ▶ Congelamiento de trofozoítos: Una vez que se formó la monocapa de trofozoítos se decantó el medio y se añadió medio nuevo TYI-S-33 pH 7, se incubó en hielo por 15 minutos para desprender las células, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para sedimentar los trofozoítos, se decantó el sobrenadante y los quistes se resuspendieron en 2 mL de medio TYI-S-33 pH 7 adicionado con DMSO (al 5%). El medio

se distribuyó en 2 viales y se colocaron en un contenedor de congelación previamente preparado con isopropanol y éste se colocó a -70°C durante 3 días. Finalmente los viales se pasaron a nitrógeno líquido para su almacenamiento.

- ▶ Obtención de quistes: Una vez que se formó la monocapa de trofozoítos se incubaron los tubos en hielo por 15 min, se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 min, se desechó el medio bajo condiciones de esterilidad y se adicionó medio de enquistamiento TYI-S-33 pH 8. Las células se incubaron durante 18 h a 37°C y posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 min. Se decantó el medio bajo la campana de flujo laminar, se adicionó medio fresco TYI-S-33 pH 7 y las células se incubaron nuevamente durante 6 h a 37°C . Los quistes formados ya en esta etapa, se concentraron por centrifugación a 2000 rpm durante 15 min y se colectaron en un solo tubo al cual se le adicionó SDS al 10% para romper los trofozoítos residuales. Los quistes se lavaron tres veces con agua estéril, centrifugando a 13000 rpm durante 5 min en cada lavado. Finalmente se resuspendieron en 200 μL de agua estéril y se almacenaron a 4°C .
- ▶ Cuento de quistes: Se colocaron 10 μL de la suspensión de quistes en la cámara de Neubauer y se contaron bajo el microscopio con un aumento de 40x.
- ▶ Recuperación de quistes: Se plantearon tres métodos diferentes de recuperación de quistes a partir de vegetales realizando tres experimentos por duplicado de cada método.
- ▶ 1. Método de Glicina [8]: Se pesaron 50 g de lechuga en una bolsa de polipropileno limpia, se inocularon 1000 quistes contenidos en 100 μL de agua mediante 10 pipeteos y se dejó reposar la lechuga inoculada durante 1 h a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 mL de glicina 1M pH 5.5 y los quistes se eluyeron apretando la bolsa durante 30 segundos. Se removió la lechuga de la solución de glicina, tratando de recuperar la mayor cantidad de líquido, el cual se colocó en tubos de 50 mL y éstos se centrifugaron a 2500xg durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y todos los sedimentos se colocaron en un microtubo resuspendiéndolos en 100 μL de agua desionizada estéril.
- ▶ 2. Método de PAS [9]: Se pesaron 50 g de lechuga en la canastilla de la centrífuga de lechugas previamente higienizada con solución de cloro y agua estéril, se inocularon 1000 quistes mediante 10 pipeteos y se dejaron reposar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 mL de PAS (Page's Amoeba Saline, [9]) y se recuperó todo el líquido centrifugando la lechuga durante 15 segundos. Este líquido se colocó en tubos de 50 mL y éstos se centrifugaron a 2500xg durante 10 min. Se descartó el sobrenadante, se colocaron todos los sedimentos en un microtubo y se resuspendieron en 100 μL de agua desionizada estéril.
- ▶ 3. Método de Detergentes [4]: Se pesaron 50 g de lechuga y se inocularon 10,000 quistes en 1000 μL en 10 pipeteos, la lechuga se dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió una solución de detergente SDS 1% y Tween Polisorbato 80 al 0.1%, se colocó en el sonicador durante 10 minutos, se colectó el líquido en tubos de 50 mL y se centrifugó durante 15 min a 2500xg. Se colectaron los sedimentos en un microtubo y se resuspendieron en 100 μL de agua desionizada estéril.

En todos los casos se realizó el conteo de quistes y se calculó el porcentaje de recuperación.

- ▶ Rompimiento de quistes, precipitación y PCR.
Los quistes recuperados se rompieron mediante lisis alcalina (KOH 1M, DTT 1M) y la solución se neutralizó con HCl al 25%. Se centrifugó a 13000xg durante 5 min y se utilizó 1 μL del sobrenadante como DNA templado para los ensayos de PCR [10].
La PCR se llevó a cabo bajo las condiciones establecidas en nuestro grupo (2.5 μL de buffer 10X sulfato de amonio, 1.5 μL de MgCl_2 25 mM, 2 μL de DNTP mix (10 mM), 0.4 μL de Taq Polimerasa recombinante, 0.5 μL de iniciadores de la B- giardina y 16.6 μL de agua) [10]. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se aprecia en la figura 2, se obtuvieron porcentajes similares de recuperación de quistes cuando se utilizó glicina ($76.38 \pm 37.7\%$) o solución salina de PAS ($71.66 \pm 32.8\%$). Si bien, con el uso de glicina aparentemente se recuperaron más quistes, la diferencia que presenta este método con el método de PAS no es muy grande dada la desviación estándar en ambos casos, lo que sugiere que los dos pueden dar buenos resultados. En cambio, el uso de detergentes claramente demostró ser inferior pues el porcentaje de recuperación de quistes fue bastante menor (26.56 ± 16.7).

El porcentaje de quistes que en este trabajo se logró obtener fue ligeramente mayor que en el trabajo anterior [8]. Por ejemplo, en el caso del método de la glicina, se obtuvo un 61.5% de los quistes inoculados, debido probablemente a la diferencia en los volúmenes de muestra utilizados. Los resultados del método de PAS, por su parte, mostraron una recuperación previa de hasta 2.4×10^5 NMP/g protozoarios totales en lechugas tratadas y no tratadas, en el anterior reporte, aunque no se pudieron comparar con nuestros datos. En cuanto al uso de detergentes como método de recuperación de quistes [4], en el método original se obtuvo un porcentaje de quistes de *Giardia* de 1.3% en vegetales crudos; en nuestro caso, el porcentaje de recuperación fue bastante superior a esta cifra ($26.56 \pm 16.7\%$), sin embargo, con este procedimiento se recuperaron menos quistes que con los otros dos métodos probados.

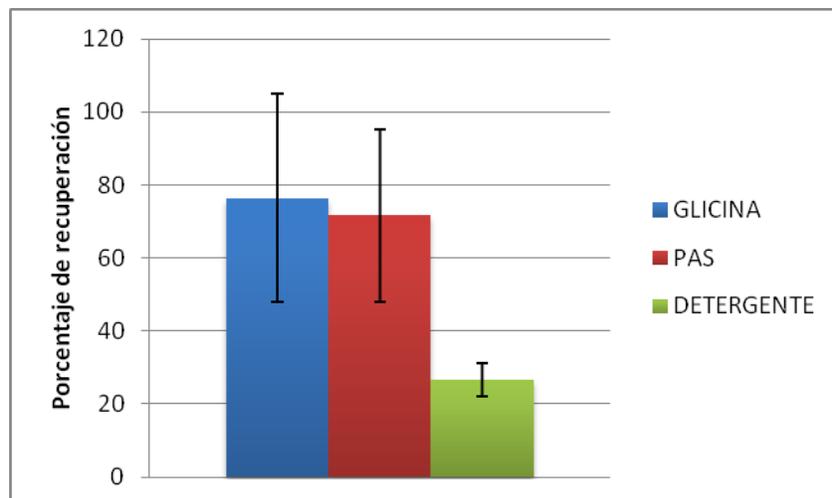


Figura 2. Porcentaje de recuperación de quistes de *Giardia* de acuerdo a la técnica empleada. Se muestra el promedio de los resultados obtenidos de tres experimentos por duplicado.

Los resultados obtenidos del conteo de los quistes recuperados de las tres técnicas utilizadas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla. Quistes de *Giardia* recuperados de la lechuga de acuerdo a cada uno de los métodos seleccionados.

Método	Porcentaje de recuperación (%) con desviación estándar
Glicina	(76.38±37.7)
PAS	(71.66±32.8)
Detergentes	(26.56±16.7)

La recuperación de un mayor número de quistes no garantiza que el DNA requerido como templado sea eficiente en la amplificación del fragmento de *Giardina* deseado; es importante considerar la pureza con que son obtenidos ya que diversos factores presentes podrían dificultar la reacción de la polimerasa en la PCR. Por ello, el DNA obtenido en cada caso se utilizó para obtener el producto de amplificación característico para la identificación de *Giardia* (261 pb).

En la Figura 3, se puede observar que de los métodos probados, el DNA de los quistes obtenidos con el método 3 dio la banda más intensa, seguida por la señal del método de PAS y finalmente, la de los quistes obtenidos con glicina. Cabe aclarar que el rompimiento de los quistes se llevó a cabo tomando el mismo número de quistes en cada caso, lo que habrá de considerarse para la selección del método más adecuado. Otro criterio que deberá considerarse es el costo de las soluciones, siendo el método de la glicina el más elevado.

La solución de Detergentes se considera de bajo costo pero la técnica es ligeramente más complicada pues la manipulación de los quistes es más difícil debido a la cantidad de espuma generada durante el proceso, lo cual explicaría la pérdida de algunos quistes.

Debido a que el método de PAS se lleva a cabo con mayor facilidad, es accesible, tiene un porcentaje de recuperación de quistes relativamente elevado y permite la obtención de un DNA útil para los ensayos de PCR, podría ser el método de elección en la recuperación de los quistes para el diseño de una prueba de identificación de *Giardia* en alimentos.

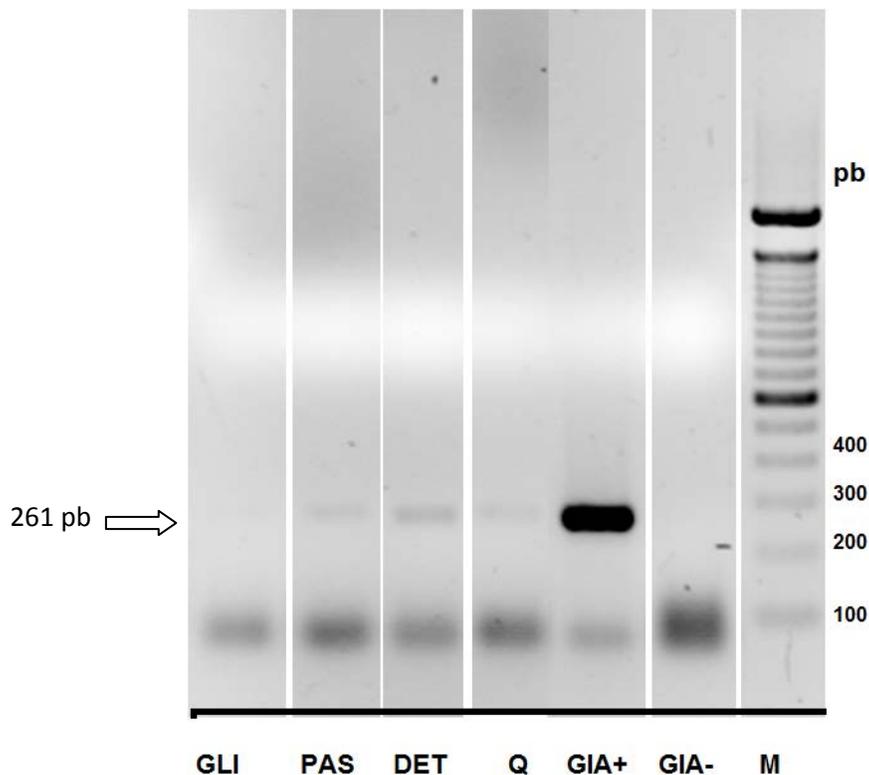


Figura 3. Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación del fragmento de B-Giardina (261 pb). DNA usado como templado: DNA de quistes obtenidos con Glicina (GLI), con la solución de PAS (PAS), con detergentes (DET). DNA obtenido de quistes puros (Q), DNA puro de trofozoítos de *Giardia* (GIA+), sin DNA (GIA-), control negativo.

CONCLUSIONES

La concentración de quistes presentes en lechugas contaminadas se logró fácil y eficientemente utilizando la solución salina PAS. El DNA crudo obtenido de estos quistes fue útil para la detección de *Giardia* mediante técnicas de PCR.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Martha Ponce Macotela, del Instituto Nacional de Pediatría, quien generosamente donó la cepa de *Giardia* utilizada. A la M.C. Lourdes Ramírez, por su valioso y constante apoyo en la realización de este trabajo. Al M.C. Luis Mario Olmos Ortiz, por su invaluable asesoría en el manejo y cultivo del parásito. A la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado por todas las facilidades otorgadas. Este proyecto fue apoyado por fondos obtenidos dentro de la Convocatoria Institucional 2011 de la UG.

REFERENCIAS

- [1] Blackburn C., McClure P. (2002), *Foodborne pathogens, hazards, risk analysis and control*, Woodhead Publishing Limited, pp. 453-478.
- [2] Wolfe M.S., (1992), *Giardiasis*, *Clinical Microbiology Reviews* 5 (1): 93-100
- [3] Mark-Carew M., Khan Y., Wade S. E., Schaaf S., Mohammed H. O., (2010) *Incidence of and risks associated with Giardia infections in herds on dairy farms in the New York City watershed*, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52:44. doi: 10.1186/1751-0147-52-44.
- [4] Shahnazi M., Jafari-Sabet M., (2010), *Prevalence of Parasitic Contamination of Raw Vegetables in Villages of Qazvin Province, Irán*, *Foodborne Pathogens and Disease* 7(9): 1025-1030
- [5] Erdogrul O., Sener H., (2004), *The contamination of various fruit and vegetable with Enterobiusvermicularis, Ascaris eggs, Entamoebahistolyca cysts and Giardia cysts*, *Food Control* 16: 559-562.
- [6] Oliveira C. A., Thomaz-Soccol V., Paulino R. C., Alcántara de C. E., (2009), *Effect of vinegar on the viability of Giardia duodenalis cysts*, *International Journal of Food Microbiology* 128: 510-512.
- [7] Cook N., Nichols R. A. B., Wilkinson N., Paton C. A., Barker K., Smith H. V., (2007), *Development of a Method for Detection of Giardia duodenalis Cysts on Lettuce and for Simultaneous Analysis of Salad Products for the Presence of Giardia cysts and Cryptosporidium Oocysts*, *Applied and environmental microbiology* 73 (22): 7388-7391.
- [8] Amorós I, Alonso J.L., Cuesta G., (2010), *Cryptosporidium Oocysts and Giardia cysts on Salad Products Irrigated with Contaminated Water*, *Journal of Food Protection* 73 (6): 1138-1140.
- [9] Vaerewijck Mario J.M., Sabbe K., Baré J., Houf K., (2011), *Ocurrence and diversity of free-living protozoa on butterhead lettuce*, *International Journal of Food Microbiology* 147: 105-111.
- [10] Olmos-Ortiz L.M. (2012). Obtención, amplificación y reconocimiento de DNA de quistes de *Giardia intestinalis* como estrategia de identificación del parásito. Tesis de Maestría. Universidad de Guanajuato.