



**Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

TESIS

**“IDENTIFICACION DE *Giardia lamblia* POR LA TECNICA DE
REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN
MUESTRAS DE HECES”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

BACHILLER: CHÁVARRI VARGAS, Flor del Rocío.

ASESORA: MG. MINAYA GALARRETA, Angélica Karina.

**LIMA – PERÚ
2016**

Dedicatoria

A Dios a mis padres, por estar en mi mente y corazón. A Jaime y mis hermanos que incondicionalmente siempre me apoyaron y alentaron a seguir adelante.

Agradecimiento

A todos quienes apoyaron en la culminación de mi proyecto de tesis, a la entidad que me brindó el apoyo para el desarrollo de la parte experimental al Laboratorio Certilab AP S.A.C.

RESUMEN

Se evaluó la Identificación de *Giardia lamblia* por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en 30 muestras fecales positivas y negativas a *G.lamblia* todos residentes del Hospital Cayetano Heredia, voluntarios de ambos sexos con edades comprendidas entre 3 y 5 años.

Giardia lamblia, es un protozoario parásito que habita el intestino delgado de los seres humanos y de muchos otros vertebrados y es una de las más comunes causas de diarrea en todo el mundo. Constituye un problema de salud pública, especialmente en países en desarrollo. La Reacción en Cadena de la Polimerasa ha sido la principal herramienta diagnóstica, que ha aprovechado las bondades de la biología molecular a tal punto de alcanzar gran valor y versatilidad como técnica de análisis debido en parte, a su adaptabilidad y aplicabilidad. El presente trabajo aborda los principales requisitos que se deben tener en cuenta para lograr una correcta estandarización mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa, así como generalidades importantes de la técnica que son imprescindibles tener en cuenta siempre que se desee emplear para identificar parásitos. Se describen las consideraciones que se deben tener para la elección del ADN molde, enzima, cebadores, dNTPs, cloruro de magnesio, así como las concentraciones necesarias de cada uno de ellos.

Palabras Clave: Identificación, PCR convencional, *Giardia lamblia*.

ABSTRACT

Identification of *Giardia lamblia* by the technique of polymerase chain reaction (PCR) in 30 fecal samples positive for *G.lamblia* all residents Cayetano Heredia Hospital's volunteers of both sexes aged between 3 and 5 years were evaluated. *Giardia lamblia* is a protozoan parasite that habits the small intestine of humans and several other vertebrates and is one of the most common causes of diarrhea worldwide. It constitutes a public health problem, especially in developing countries. The polymerase chain reaction has been the primary diagnostic tool that has leveraged the benefits of molecular biology to the point of reaching great value and versatility as analysis technique due in part to its adaptability and applicability. This study addresses the key requirements to be taken into account for proper standardization by polymerase chain reaction, and significant overview of the art to be essential to take into account whenever you want to use to identify. Considerations to be taken to the choice of template DNA, enzyme, primers, dNTPs, magnesium chloride, and the necessary concentrations of each are described.

Keywords: Identification, Conventional PCR, *Giardia lamblia*.

INDICE

CARÁTULA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	ix
INTRODUCCIÓN	xi
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
1.1 Descripción de la Realidad Problemática.....	12
1.2 Formulación del Problema.....	13
1.2.1 Problema General.....	13
1.2.2 Problemas Secundarios.....	13
1.3 Objetivos de la Investigación.....	13
1.3.1 Objetivo General.....	13
1.3.2 Objetivos Específicos.....	13
1.4 Hipótesis de la Investigación.....	13
1.4.1 Hipótesis General.....	13
1.4.2 Hipótesis Secundarias.....	13
1.5 Justificación e Importancia de la Investigación.....	14
1.5.1 Justificación.....	14
1.5.2 Importancia.....	14
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	15
2.1 Antecedentes de la Investigación.....	15
2.1.1 Antecedentes Nacionales.....	15
2.1.2 Antecedentes Internacionales.....	16
2.2 Bases Teóricas.....	19
2.2.1 Recuento histórico de Giardiasis.....	19

2.2.2 Agente etiológico.....	19
2.2.3 Epidemiología.....	20
2.2.4 Ciclo biológico.....	21
2.2.5 Trofozoito de <i>G. lamblia</i>	22
2.2.6 Quiste de <i>G. lamblia</i>	23
2.2.7 Clasificación de <i>G. lamblia</i>	24
2.2.7.1 Genoma de <i>G. lamblia</i>	24
2.2.7.2 Beta Giardina.....	24
2.2.8 Clasificación de <i>G. lamblia</i>	24
2.2.8.1 Caracterización mediante Estudios de Laboratorio.....	24
2.2.9 Fisiopatogenia de la giardiasis.....	25
2.2.10 Diagnóstico de la giardiasis.....	26
2.2.11 Manifestaciones clínicas de la giardiasis.....	26
2.2.12 Tratamiento.....	27
2.2.13 Prevención de Giardiasis.....	28
2.2.14 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	29
2.2.15 Ciclos de Amplificación.....	29
2.2.15.1 Ciclos.....	29
2.2.16 Precauciones Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	30
2.2.17 Electroforesis y Amplificación de la prueba de PCR.....	30
2.3 Definiciones de Términos Básicos.....	31
2.3.1 PCR.....	31
2.3.2 ADN.....	31
2.3.3 Primers.....	31
2.3.4 Desoxinucleótidos Trifosfato.....	31
2.3.5 Par de Bases.....	31
2.3.6 Concentración de Cloruro de Magnesio.....	31
2.3.7 Termociclador.....	32
2.3.8 Ciclos.....	32
2.3.9 Geles de Agarosa.....	32
2.3.10 Electroforesis en Gel de Agarosa.....	32
2.3.11 Bromuro de Etidio.....	32
2.3.12 Transiluminador.....	32

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	33
3.1 Tipo de Investigación.....	33
3.1.1 Método.....	33
3.1.2 Técnica.....	33
3.1.3 Diseño.....	33
3.2 Población y Muestreo de la Investigación:	33
3.2.1 Población.....	33
3.2.2 Muestra.....	34
3.3 Variables e Indicadores.....	34
3.4 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.....	35
3.4.1 Técnica.....	35
3.4.1.1 PCR convencional.....	35
3.4.1.2 Estandarización de la Técnica de PCR.....	35
3.4.1.3 Electroforesis de los productos de amplificación de PCR.....	35
3.4.1.4 Diseño de cebadores específicos.....	36
3.4.1.5 Instrumentos.....	36
3.5 Desarrollo.....	38
3.5.1 Extracción de ADN genómico de muestras.....	40
3.5.2 Preparación del gel de agarosa para electroforesis.....	44
3.5.3 Protocolo de la Técnica PCR.....	45
3.5.4 Metodología por Observación Cualitativa.....	48
3.5.5 Extracción de ADN por Shock Térmico.....	49
CAPITULO IV: PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	51
4.1 Resultados.....	51
Discusión.....	57
Conclusiones.....	61
Recomendaciones.....	62
Referencias bibliográficas.....	63
Anexos.....	66
Matriz de consistencia.....	67
Glosario de términos.....	77

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1	Resultados positivos y negativos de otros parásitos encontrados.....	51
Tabla N°2	Sensibilidad y Especificidad por la Técnica de cualitativa para identificar <i>G.lambli</i> a.....	52
Tabla N°3	Sensibilidad y Especificidad por la Técnica de PCR para identificar <i>G.lambli</i> a.....	53
Tabla N°4	Condiciones del envío de la muestra según el tipo y tiempo de demora en llegar al laboratorio para el diagnóstico parasitológico.....	71
Tabla N°5	Algoritmos para el examen parasitológico.....	72
Tabla N°6	Muestras de heces para el examen parasitológico con fijador.....	73
Tabla N°7	Límites permisibles para piel y ojos (longitud de onda de 320 nm a 400 nm).....	74

INDICE DE FIGURAS

Figura N°1:	Tipos de clasificación de genotipos de <i>G. lambli</i> a.....	25
Figura N°2:	Recolección, manejo y conservación de muestras de heces.....	41
Figura N°3:	Procedimiento de extracción de ADN de muestras de heces.....	42
Figura N°4:	Uso del kit Gene JET Genomic DNA Purificación.....	42
Figura N°5:	Convección térmica por medio de Baño María.....	43
Figura N°6:	Obtención del ADN en muestras de heces.....	43
Figura N°7:	Preparación del gel agarosa al 1.5%.....	45
Figura N°8:	Preparación del master mix (2x).....	47
Figura N°9:	Amplificación en el termociclador LightCycler [®] Software 4.1.....	47
Figura N°10:	Electroforesis y visualización en el transiluminador.....	48
Figura N°11:	Cuantificación de ADN por medio de corrida electroforetica.....	48
Figura N°12:	Procedimiento para extracción de ADN mediante Shock Térmico.....	50
Figura N°13:	Visualización con microscopio utilizando aumento 40x y 100x.....	53
Figura N°14:	Resultados de la amplificación por PCR en gel de agarosa al 2%.....	54
Figura N°15:	Resultados por el Técnica Cualitativa de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.....	54
Figura N°16:	Resultados por la observación Técnica Cualitativa de ADN mediante la extracción de Shock térmico.....	55
Figura N°17:	Lectura del ADN en el Equipo Nano Drop 2000c en el INS.....	56

Figura N°18:	Características de <i>Giardia lamblia</i>	68
Figura N°19:	Ciclo biológico de <i>Giardia lamblia</i>	68
Figura N°20:	Estructura del trofozoito de <i>Giardia lamblia</i>	69
Figura N°21:	Microfotografía del quiste de <i>Giardia lamblia</i>	69
Figura N°22:	Reacción en cadena de la polimerasa.....	70
Figura N°23:	Observación al microscopio con aumento de 40x y 100x.....	74

INTRODUCCIÓN

Giardia fue descrita inicialmente en 1681 por van Leeuwenhoek al examinar heces diarreicas en el microscopio óptico. Lambl (1859) describió con gran detalle a este parásito y lo llamó *Cercomonas intestinalis*. Luego Kunstler (1882) le otorgó el nombre de Giardia. Blanchard (1888) propuso *Lambliia intestinalis* y Stiles (1902) eligió *Giardia duodenalis*. Finalmente, Kofoed y col. (1915) propusieron el nombre *Giardia lamblia*. En los años 50, Filice describió 3 especies de Giardia: *G. duodenalis*, *G. muris* y *G. agilis* basándose en criterios morfológicos al microscopio óptico. ⁽¹⁾

Con el advenimiento del microscopio electrónico de barrido (SEM), se reconocieron dos nuevas especies *G. ardeae* y *G. psittaci*. Años más tarde, Feely (1988) describió una nueva especie denominada *G. microti* que se diferencia de *G. lamblia* en la morfología del quiste y en la subunidad pequeña del ribosoma (SSU-ADNr). ⁽²⁾

El nombre *Giardia lamblia* se aceptó extensamente en los años 70. Después a los años 80, algunos han animado el uso del nombre *Giardia duodenalis* y en los años 90 el nombre *Giardia intestinalis*. En este tiempo el término *Giardia lamblia* se ha aceptado extensamente en la literatura médica y científica. ⁽³⁾

En resumen, actualmente se reconocen 6 especies de Giardia: *G. lamblia*, *G. agilis*, *G. muris*; *G. psittaci*, *G. ardeae* y *G. microti* con distinta especificidad de huésped. ⁽¹⁾

La giardiosis, causada por *Giardia lamblia* (sinónimo: *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*), constituye una parasitosis de gran importancia epidemiológica y clínica por su alta prevalencia y patogenicidad, fundamentalmente entre la población infantil. El interés por este protista flagelado se ha incrementado a partir de la segunda mitad del siglo XX con el reconocimiento de su potencial patógeno. Asimismo, los estudios de secuenciación del gen que codifica la subunidad pequeña o 18S rRNA (SS rRNA), utilizados en los actuales sistemas de clasificación molecular de los microorganismos eucariotas, señalan a Giardia como el organismo eucariota más primitivo conocido en la escala evolutiva entre los procariotas y eucariotas. ⁽⁷⁾

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la Realidad Problemática

La giardiasis es una enfermedad diarreica ocasionada por Giardia intestinales conocido también como Giardia lamblia, parásito microscópico unicelular que vive en el intestino de las personas (intestino delgado en su porción anterior (duodeno)) y se transmite en las heces de una persona o animal infectado. Este parásito está protegido por una cobertura exterior que le permite sobrevivir fuera del cuerpo y en el medio ambiente por largos períodos. Es un parasitismo de amplia dispersión mundial, de gran importancia epidemiológica y clínica por su alta prevalencia y patogenicidad, sobre todo entre la población infantil.

Giardia lamblia es el protozoo que con mayor frecuencia se encuentra en exámenes coproparasitoscópicos. A nivel mundial se ha estimado una frecuencia de 200.000.000 individuos infectados, de los cuales 500.000 sufren enfermedad. Es la causa de diarrea en hasta un 20% de los casos en países en vías de desarrollo, pero sólo de un 3 a 7% en países desarrollados, en donde es frecuente la contaminación de agua o alimentos con materia fecal.

Giardia lamblia presenta siete genotipos (A, B, C, D, E, F, G) morfológicamente indistinguibles al microscopio óptico pero con diferentes características genotípicas y fenotípicas. Si bien, estos genotipos presentan diferente especificidad de huésped, solamente los genotipos A y B producen enfermedad en el hombre.

Entre las manifestaciones clínicas de este flagelo tenemos su frecuente asociación con cuadros de diarreas, síndrome de malabsorción, disgammaglobulinemia y malnutrición por defecto, que constituye una afección que tiene una alta incidencia de morbilidad y mortalidad en los países subdesarrollados, donde representa un grave problema de salud en la población.

1.2 Formulación del Problema

1.2.1 Problema General:

- ¿Se podría identificar *Giardia lamblia* por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en muestras de heces en niños de 3 a 5 años?

1.2.2 Problemas Secundarios:

- ¿Sería sensible la técnica de PCR para identificación de *Giardia lamblia*?
- ¿Sería específica la técnica de PCR para identificación de *Giardia lamblia*?

1.3. Objetivos de la Investigación

1.3.1. Objetivo General:

- Identificar *Giardia lamblia* por la técnica de PCR en muestras de heces en niños de 3 a 5 años.

1.3.2. Objetivos Específicos:

- Determinar la sensibilidad de la técnica de PCR para *Giardia lamblia*.
- Determinar la especificidad de la técnica de PCR para *Giardia lamblia*.

1.4. Hipótesis de la Investigación

1.4.1 Hipótesis General:

- Se podría identificar *Giardia lamblia* por la Técnica de reacción en Cadena de Polimerasa en muestras de heces en niños de 3 a 5 años.

1.4.2 Hipótesis Secundaria:

- La sensibilidad de determinación de la técnica de PCR para *Giardia lamblia* será significativa.
- La especificidad de determinación de la técnica de PCR para *Giardia lamblia* será significativa.

1.5. Justificación e Importancia de la Investigación

1.5.1 Justificación:

Esta investigación es conveniente y de relevancia en el campo de parasitología y bioquímica. Da cuenta de los aspectos en relación a la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa y su capacidad de identificación de *Giardia lamblia* en muestras de heces.

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad, parásitos o bacterias causantes de una enfermedad, identificar sobre el ADN amplificado *Giardia lamblia*. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, sobre todo en el ámbito de la investigación.

El objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, para obtener óptimos resultados. Con los alcances dados a lo largo de la investigación, será posible conocer y recordar la técnica de PCR convencional para su aplicación.

1.5.2 Importancia:

El desarrollo y la automatización de los métodos de PCR abren una gran oportunidad para su aplicación. Debido a su rapidez, alta sensibilidad, especificidad, repetitividad, análisis de muchas muestras y eficiencia para la detección temprana de los parásitos, bacterias, agentes patógenos etc. Estandarizar esta técnica que luego puede ser útil como herramientas analíticas en parasitología, microbiología y control de calidad de los alimentos. De modo que contribuirán notablemente a la prevención tanto de ETA como de sus consecuencias.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1 Antecedentes Nacionales:

- La investigación realizada por Giancarlo Eduardo Rojas Hinostroza (2014) **EVALUACIÓN DE TRES PRIMERS PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE GIARDIA INTESTINALIS EN MUESTRAS FECALES HUMANAS** hace referencia que *Giardia intestinalis* es el protozooario intestinal más común a nivel mundial y su diagnóstico parasitológico está basado en el examen microscópico, sin embargo, debido al carácter intermitente de la excreción del parásito en las heces el método puede revelar baja sensibilidad, esto ha motivado la búsqueda de nuevas alternativas de diagnóstico entre las que destacan aquellas que tiene como base la biología molecular. Objetivos: Evaluar 3 primers para la detección molecular de *G. intestinalis* en muestras fecales. Lugar: Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión”, UNMSM. Procedimiento: Se evaluaron primers que amplifican las regiones de la beta-giardina y de la proteína de choque térmico 70 del ADN de *G. intestinalis*. Principales medidas de resultados: Se recolectó muestras fecales positivas y negativas a *G. intestinales* y a otros parásitos, las cuales fueron concentradas por centrifugación, luego almacenadas a -20°C y posteriormente analizadas mediante la técnica de PCR convencional. Resultados: Concluye que el límite de detección para los primers evaluados mostro que a mayor concentración de quistes de *G. Intestinalis* no se observó banda, como es el caso de los primers de la beta-giardina con una dilución de 1/1024. Estos solo mostraron bandas a partir de una concentración de 87,3 ng/ µl y 24,1 ng/ µl. Las muestras amplificadas para la betagiardina revelaron solo 13.3% de positividad, esto tiene relación con los estudios realizados por Rochelle Paul y Col, quienes mostraron que la PCR puede identificar entre 1 a 10 quistes para los genes de beta giardina, por ende sería necesario realizar mayores diluciones. Se observó un mejor límite de detección para el primer GHSP70-1 identificándose bandas en 7 diluciones con una sensibilidad y especificidad mayor que para el primer de la beta-giardina. Las muestras amplificadas para la betagiardina revelaron (13.3% de positividad) mientras que para el primer GHSP70-I (36.36% de positividad) ⁽⁴⁾

-La investigación realizada por Eleuterio Jacinto, Edwin Aponte, Víctor Arrunátegui – Correa (2012). **PREVALENCIA DE PARÁSITOS INTESTINALES EN NIÑOS DE DIFERENTES NIVELES DE EDUCACIÓN DEL DISTRITO DE SAN MARCOS, ANCASH, PERÚ** hace referencia a la Investigación de la prevalencia de parasitosis intestinal en estudiantes del Distrito de San Marcos, en el departamento de Ancash, Perú. Material y métodos: Se analizaron en total 1303 muestras de heces de niños de nivel inicial, primario y secundario, mediante examen directo. Resultados: Se encontró uno o más parásitos intestinales en 65,0% de los estudiantes. De las 845 muestras positivas para parásitos, se encontró un parásito en 82,0% dos en 18,0% predominando los protozoarios sobre los helmintos. Los enteroparásitos patógenos encontrados según su frecuencia fueron: *Giardia lamblia* 23,7%, *Ascaris lumbricoides* 16,9% e *Hymenolepis nana* 9,6%. La frecuencia del enteroparásito no patógeno *Entamoeba coli* fue 31,8%. Conclusiones: Existe un alto índice de parasitismo en la población rural de la sierra de Ancash, lo que estaría en relación con las deficientes condiciones de saneamiento ambiental en esta zona, por lo que es necesario que en los colegios de la zona, se dé educación sobre higiene personal y además, mejorar las condiciones de saneamiento. ⁽⁵⁾

2.1.2 Antecedentes Internacionales:

-La investigación realizada por María Jesús Alcaraz Soriano Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Doctor Peset Aleixandre. Valencia (2012) **GIARDIA Y GIARDIASIS** hace referencia al método de identificación de los quistes en un examen con microscopía óptica. Con menor frecuencia, es posible observar los trofozoítos en muestras de heces. Los exámenes se realizan directamente en fresco o tras un proceso previo de concentración (formol-éter acetato, sulfato de zinc, formol-éter-etílico, etc.), en heces no conservadas o conservadas [formol 10%, alcohol polivinílico o mertiolato-yodo-formaldehído MYF)]. Debido al carácter intermitente y, en general, al bajo nivel de excreción de quistes en la giardiosis, la sensibilidad del examen de una única muestra de heces es del 35-50%. La realización de 6 técnicas de concentración y el estudio de dos o tres muestras de heces seriadas incrementa la sensibilidad al 70%. En pacientes con giardiosis persistente se recomienda realizar exámenes seriados de heces durante cuatro semanas; en estos casos, la sensibilidad del estudio microscópico alcanza el 97%.

Se han desarrollado diversos métodos inmunológicos encaminados a detectar diversos antígenos de *G. lamblia* en las heces. Así, la contraínmunolectroforesis, cuya sensibilidad y especificidad son del 90% y 95%, respectivamente. En la actualidad existen diversos enzimoínmunoensayos (EIA) comerciales con una especificidad superior al 99% (99,3 -100%), una sensibilidad que varía entre el 88,6% y 100%. La sensibilidad y especificidad de los mismos depende fundamentalmente de tipo de antígeno utilizado (trofozoítos intactos, extracto de trofozoítos o proteínas purificadas de *Giardia lamblia*).⁽⁶⁾

- La investigación realizada por Edwin Cardona, Silvia Castañeda, María Elena Álvarez, Jorge Enrique Pérez, Fredy Arvey Rivera Páez, Germán Ariel López Gartner, (2013) **COMPARACIÓN DE MÉTODOS CONVENCIONALES Y MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE GIARDIA LAMBLIA EN HECES HUMANAS** hace referencia a los protozoarios del género *Giardia lamblia*, la detección del parásito, se fundamenta generalmente en los métodos por concentración y microscopía convencional, estas técnicas presentan limitaciones por su baja sensibilidad e especificidad en el diagnóstico. En procura de mejorar los métodos de diagnóstico, las técnicas moleculares se perfilan como una alternativa promisoría. En este estudio se analizaron 88 muestras de heces provenientes de pacientes de una empresa prestadora de servicios de salud (ASSBASALUD) de la ciudad de Manizales (Caldas). Para la detección de *Giardia lamblia* en heces se compararon tres métodos diferentes por medio del porcentaje de positividad: Los métodos convencionales de concentración de la muestra y observación microscópica, análisis por inmunoensayo (ELISA indirecto) y finalmente la amplificación de dos secuencias génicas nucleares por PCR. Se obtuvieron tres muestras positivas por concentración y microscopía convencional, dos por inmunoensayo y 26 por técnicas moleculares. El estudio sugiere que las pruebas diagnósticas rutinarias basadas en microscopía convencional e inmunoensayo, tienen más bajo porcentaje de detección de este parásito y que esta deficiencia puede ser compensada por medio de la implementación de métodos de diagnóstico molecular basados en PCR, como una estrategia complementaria de apoyo en el diagnóstico de este protozoo.⁽⁷⁾

- La investigación realizada por Nora Beatriz Molina. (2009) **EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Giardia lamblia* EN COMUNIDADES URBANAS Y RURALES DE BUENOS AIRES Y MENDOZA, ARGENTINA**. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP.

Hace referencia que *Giardia lamblia* (*G. duodenalis*; *G. intestinalis*), es un parásito del intestino delgado que afecta principalmente a niños y produce cuadros clínicos de variada intensidad desde la infección asintomática hasta cuadros graves de diarrea crónica con síndrome de malabsorción. Si bien, en los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la fisiopatogenia de la infección por *Giardia*, hasta el momento, los factores que determinan la variabilidad de las manifestaciones clínicas de giardiosis no están completamente esclarecidos. *Giardia lamblia* presenta siete genotipos (A, B, C, D, E, F, G) morfológicamente indistinguibles al microscopio óptico pero con diferentes características genotípicas y fenotípicas. Si bien, estos genotipos presentan diferente especificidad de huésped, solamente los genotipos A y B producen enfermedad en el hombre. En este trabajo de Tesis se analizó la distribución de los genotipos de *Giardia lamblia* presentes en el país y las eventuales relaciones entre el genotipo hallado y las características clínico-epidemiológicas de las comunidades estudiadas. ⁽⁸⁾

- La investigación realizada por Berta Alicia Borrego Ponce (2009) ***INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES Y DESNUTRICIÓN EN PARASITOSIS INTESTINALES EN PREESCOLARES DE CENTROS MUNICIPALES DE BIENESTAR INFANTIL EN CIUDAD JUÁREZ***. Instituto de Ciencias Biomédicas Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Hace referencia que el propósito fue evaluar la influencia de diversos factores ambientales y la presencia de desnutrición, en la ocurrencia de parasitosis en niños adscritos a centros de bienestar infantil (CBI) en Ciudad Juárez. Se realizó un estudio transversal, prospectivo, observacional y analítico, en una muestra probabilística (n=53) de niños ≤5 años. Se calcularon los indicadores de peso (P/E) y talla para la edad (T/E) e índice de masa corporal [peso (kg)/ Talla² (m²)] para la edad (IMC/E), según la OMS. Se colectaron muestras de heces y se realizó el análisis parasitológico por técnicas de observación directa, flotación y tinción comunes. Los factores ambientales como la condición de vivienda, servicios públicos e higiene personal, así como otros factores socios demográficos y alimentarios fueron evaluados mediante un cuestionario validado. Se encontró una prevalencia de parasitismo del 64%. *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis* y *Áscaris lumbricoides* estuvieron presentes en 79.4, 23.5, 14.7 y 2.9% de las muestras analizadas. ⁽⁹⁾

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 RECUENTO HISTÓRICO DE GIARDIASIS:

Es posible afirmar que la historia de la protozoología nació a mediados del siglo XVII, cuando Anthon Van Leeuwenhoek de Delphis; comerciante holandés y tallador aficionado de lentes observó por primera vez a través de los rudimentarios microscopios fabricados por él mismo, un organismo que por su descripción, muy probablemente correspondía a *Giardia lamblia*. Este “animalículo”, como él lo denominó, lo encontró al examinar sus propias evacuaciones diarreicas. La giardiosis, causada por *Giardia lamblia*, constituye una parasitosis de gran importancia epidemiológica y clínica por su alta prevalencia y patogenicidad, fundamentalmente entre la población infantil. La giardiasis ocurre en todo el mundo y especialmente entre los niños y en sitios en que las condiciones sanitarias son deficientes. Su prevalencia en los países industrializados es generalmente de 2 a 4% pero llega hasta 15% o más en los niños de los países en desarrollo. ⁽¹⁰⁾

A pesar de que durante los últimos tiempos se ha venido ganando en conciencia sobre la importancia para la Salud Pública de la infección por *Giardia* y de que ha aumentado el interés por las investigaciones sobre este protozoo, existen aún muchas cuestiones que no han sido elucidadas totalmente, como son el riesgo potencial de la transmisión zoonótica, ciertos mecanismos de patogenicidad, algunos procesos de reacción del huésped frente a la infección, y la respuesta inmune. Por otra parte, se continúa la búsqueda de nuevos recursos terapéuticos para combatir y prevenir la infección tanto en el hombre como en los animales. ⁽¹¹⁾

2.2.2 AGENTE ETIOLÓGICO:

TAXONOMÍA: *Giardia lamblia*, es un protozoo flagelado patógeno perteneciente al orden Diplomonadida que parasita el tracto digestivo de humanos y otros mamíferos, produciendo una patología denominada giardiosis, giardiasis o lambliaisis. ⁽¹²⁾

- **Reino:** Protista.
- **Subreino:** Protozoa.

- **Phyllum: *Sarcomastigophora*.**- Protozoos que presentan un solo tipo de núcleo, reproducción asexual, cuando existe, esencialmente singámica. Poseen flagelos, pseudópodos, o ambos tipos de organelas locomotrices.
- **Subphyllum: *Mastigophora*.**- Trofozoitos que poseen típicamente uno o más flagelos, reproducción asexual, la que básicamente se produce por fisión binaria longitudinal; en algunos grupos presentan reproducción sexual.
- **Clase: *Zoomastigophorea*.**- Cloroplastos ausentes, uno o varios flagelos presentes, formas ameboides con o sin flagelos en algunos grupos.
- **Orden: *Diplomonadida*.**- Con uno o dos cariomastigontes cada uno, con uno o cuatro flagelos; al menos uno de esos flagelos es recurrente con dos núcleos sin mitocondrias o aparato de Golgi. Con quistes pueden ser parasitarias o de vidas libres.
- **Familia: *Hexamitidae*.**- De 6 a 8 flagelos, dos núcleos y algunas veces axostilos y cuerpos medianos o parabasales; presentan simetría bilateral.
- **Género: *Giardia*.**- Difieren de otros miembros de la familia *Hexamitidae* porque poseen un disco adhesivo, el que sirve como una organela para la fijación, en la superficie ventral del trofozoito.
- **Especie: lamblia.**- Es la única especie del género que ha sido descrita en humanos.

2.2.3 EPIDEMIOLOGÍA:

G. lamblia es el parásito productor de diarrea diagnosticado con más frecuencia en todo el mundo. Afecta principalmente a los niños y produce infecciones de espectro clínico variable, desde cuadros asintomáticos hasta diarreas graves con malabsorción. La giardiosis es una infección cosmopolita de tipo zoonótico cuya prevalencia varía entre 2 y 5% en países industrializados y puede superar el 30% en países en desarrollo.

Según la OMS, la giardiosis tiene una distribución global estimada en 2,8x10⁸ casos anuales y *G. lamblia* es el parásito intestinal más frecuentemente detectado en seres humanos. En Asia, África y Latinoamérica, alrededor de 2x10⁸ personas presentan giardiosis sintomática y se diagnostican 5x10⁵ nuevos casos por año. La infección en el huésped se inicia cuando el quiste es ingerido a través de agua y alimentos contaminados o también por contacto fecal-oral.

La fuente de infección de *G. lamblia* es la materia fecal contaminada con quistes proveniente de humanos o animales como perros, gatos, ovejas, cabras, vacas, cerdos, caballos, entre otros. Por otro lado, una persona infectada puede eliminar hasta $9,0 \times 10^8$ quistes por día, una cantidad mucho mayor que la necesaria para causar infección (100 quistes). Es una de las causas más frecuentes de diarrea del viajero.
(13)

2.2.4 CICLO BIOLÓGICO:

Como otras especies de este género, el ciclo biológico de *G. lamblia* incluye dos fases o estados: El trofozoíto (forma vegetativa) y el quiste (forma de resistencia e infecciosa).

La infección del huésped comienza cuando los quistes ingresan por la vía oral, los trofozoítos liberados atraviesan la barrera de moco, se adhieren al epitelio intestinal y se alimentan captando nutrientes de la luz intestinal mediante vesículas pinocitóticas.

Esta predilección de los trofozoítos por el yeyuno sugiere que requieren una alta concentración de nutrientes para su supervivencia y proliferación, entre ellos el colesterol, elemento fundamental para la biogénesis de sus membranas y en el proceso de enquistamiento. Luego los trofozoítos se multiplican y colonizan en la superficie intestinal. Ante ciertos estímulos como la exposición a sales biliares, algunos de ellos se enquistan en el yeyuno. Las condiciones específicas que promueven el enquistamiento incluyen el pH levemente alcalino y sales biliares conjugadas con ácidos grasos. *Giardia lamblia* presenta un tamaño inferior a $20 \mu\text{m}$, carece de ciertos orgánulos como son las mitocondrias y el aparato de Golgi.

Únicamente tiene un hospedador (monoxeno), es cosmopolita y tiene dos formas de vida en su ciclo vital.

Los quistes son formas resistentes y son responsables de la transmisión del giardiasis. Los quistes y los trofozoítos se encuentran en las heces, son resistentes y pueden sobrevivir varios meses en agua fría. La infección ocurre por la ingestión de quistes en el agua contaminada, alimento, o por la vía fecal-oral (las manos o los fomites). En el intestino delgado la exquistación libera trofozoítos (cada quiste produce dos trofozoítos).

Por último, los quistes formados son eliminados con las heces, completando el ciclo biológico al infectar un nuevo huésped.⁽⁷⁾

2.2.5 TROFOZOITO DE *G LAMBLIA*

El trofozoito de *Giardia lamblia* es la forma parasitaria que habita la luz del intestino, es móvil y tiene forma de pera, tiene aproximadamente 12 a 15 μm de largo y 5 a 9 μm de ancho y 2 a 4 μm de espesor. El citoesqueleto incluye un cuerpo medio, cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral) y un disco suctor ventral responsable de la adherencia del parásito a la pared intestinal.

El disco ventral es una estructura cóncava formada ultraestructuralmente por microtúbulos, ocupa casi la totalidad de la superficie ventral y debe sus características contráctiles a las proteínas actina y tropomiosina. Los trofozoitos tienen dos núcleos que están localizados anteriormente y son simétricos y en el citoplasma se encuentran las vacuolas lisosomales, así como los gránulos ribosomales y de glicógeno, además se han demostrado evidencias de complejos de Golgi. ⁽¹⁾

MORFOLOGÍA:

Dentro del trofozoíto de *Giardia lamblia* se distinguen las siguientes estructuras:

- Núcleos.- Posee dos núcleos ovoides, situados simétricamente a cada lado de la línea media, con un gran cariosoma central. Se determinó que ambos núcleos poseen aproximadamente la misma cantidad de ADN.
- Citoplasma.- El citoplasma de los trofozoítos se encuentra constituido por una gran cantidad de gránulos, algunos de ellos son grandes, de 300 \AA , de aspecto denso considerados como glucógeno, otros pequeños de 150 a 200 \AA de aspecto claro que corresponden a ribosomas. Presenta retículo endoplásmico rugoso. No existe aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso, cuerpos de pigmento, ni mitocondrias. Además contiene una gran cantidad de vacuolas ovoides y circulares limitadas por una membrana; se disponen en hilera en la periferia dorsal y ventral, están interconectadas formando una red de canales intracitoplasmáticos que conforman el sistema digestivo de *G. lamblia*.

- Flagelos.- Los trofozoítos presentan 8 flagelos dispuestos en 4 pares simétricos, 2 anterolaterales, dos postero-laterales, 2 ventrales y un par caudal. Éstos tienen su origen en 8 cuerpos parabasales colocados simétricamente a los lados de la línea media, a la altura del borde superior de los núcleos.
- Disco adhesivo.- En la porción anterior se encuentra el disco suctor, que mediante complejos mecanismos de hidroadhesión le confieren al parásito su capacidad de adherencia a la mucosa intestinal. El disco mide de 8 a 10 micrómetros, no es simétrico bilateralmente, se encuentra integrado por microtúbulos espirales.

En el disco se encuentra una abertura posterior donde los flagelos expelen fluido desde la cavidad bajo el disco hacia el canal ventral y exterior.

2.2.6 QUISTE DE *G. LAMBLIA*

MORFOLOGÍA:

Los quistes, formas de resistencia infectantes ovoides miden entre 11-14 μm de longitud y contienen 4 núcleos y estructuras residuales de la forma vegetativa (axonemas, restos de disco adhesivo y cuerpos medianos). La resistente pared quística está formada por una capa filamentosa externa y una capa membranosa interna. Su grosor es de 0.3 – 05 μm .⁽¹⁴⁾

Quiste: Estadio infectante.

- Ovoides con pared quística.
- Transparentes.
- 4 núcleos.
- Axonema.

2.2.7 CLASIFICACIÓN DE *G. LAMBLIA*

2.2.7.1 GENOMA DE *G. LAMBLIA*:

El trofozoíto de *G. lamblia*, al igual que otros parásitos del orden Diplomonadida es binucleado; ambos núcleos poseen idéntico contenido de ADN y son transcripcionalmente activos.

El contenido total de ADN de este parásito se estima en 1,34x10⁸ pares de bases (bp) y un tamaño haploide de aproximadamente 1,2x10⁷ bp (12 Mb).

Utilizando electroforesis en gel con campo pulsante (PFGE) y sondas específicas para cada cromosoma, se determinó que *G. lamblia* posee 5 cromosomas, cuyo tamaño varía entre 1,6 y 3,8 Mb. Estos resultados sugieren que el trofozoíto contiene entre 30 y 50 moléculas de ADN y por ende de 8 a 12 copias de cada cromosoma.⁽¹⁵⁾

2.2.7.2 BETA-GIARDINA:

Estudios previos demuestran que es específica para *G. lamblia*, siendo la más usada junto con la rRNA para el análisis genotípico.

El procedimiento adecuado para el uso de los primers que amplifican una región del gen que codifica a la beta-giardina es para la detección molecular.

2.2.8 CLASIFICACIÓN DE *G. LAMBLIA*

2.2.8.1 Caracterización mediante estudios de laboratorio:

Los primeros avances en la caracterización de *G. lamblia* fueron realizados mediante electroforesis de enzimas. La mayoría de los estudios electroforéticos han tenido limitada utilidad debido al estudio de pocos caracteres, el análisis de pocas muestras o ambos. Diversos autores han utilizado electroforesis de isoenzimas o aloenzimas demostrando una gran heterogeneidad genética dentro de *G. lamblia*.

Se ha encontrado el mismo patrón de bandas electroforéticas en aislamientos de *G. lamblia* provenientes de humanos y animales, cuestionando la validez de los zimodemas como marcador taxonómico para evaluar la especificidad por el huésped.

La mayoría de los estudios posteriores mostraron un amplio grado de homogeneidad entre aislamientos y no han detectado ninguna

correlación entre el curso de la enfermedad y el patrón de zimodemas de los aislamientos de Giardia.

A la fecha, los aislamientos de *G. lamblia* identificados como patógenos humanos son los genotipos A y B. Estos genotipos se asocian con enfermedad en el hombre y presentan potencial zoonótico. ⁽⁸⁾

Figura N°1: Tipos de clasificación de genotipos de *G lamblia*.

Genotipos de <i>Giardia lamblia</i>	Huéspedes involucrados
A	humanos - perros - gatos - bovinos - ovinos - porcinos- chinchillas - alpacas - caballos - castores
B	humanos - perros - chinchillas - ratas - castores
C - D	perros
E	vacas - ovejas - cerdos
F	gatos
G	ratas - ratones

Fuente: Clasificaciones de los genotipos de *G. lamblia*, extraído de Adam (2001)

2.2.9 FISIOPATOGENIA DE LA GIARDIASIS

Se ha investigado ampliamente la patogenia de la giardiosis y la interacción entre el parásito y el huésped. Si bien, el mecanismo por el cual *Giardia* produce diarrea no ha sido completamente caracterizado, se postula que este proceso es multifactorial y ocurre por combinación de varios factores. Entre ellos, aumento de la permeabilidad epitelial, acortamiento o atrofia de las vellosidades; disrupción de las microvellosidades del epitelio, hiperplasia de las criptas, reducción de la actividad de las disacaridasas y de las proteasas intestinales; inflamación de la mucosa intestinal y sobrecrecimiento de la flora intestinal. Utilizando diversos modelos experimentales, demostraron que la adhesión de los trofozoítos al epitelio es crucial para el aumento de la permeabilidad epitelial.

2.2.10 DIAGNÓSTICO DE GIARDIASIS

El diagnóstico de certeza se basa en la detección de los quistes o trofozoítos de *Giardia lamblia* en las muestras clínicas. Para el diagnóstico de giardiosis, la muestra de elección es la materia fecal recolectada en forma seriada porque permite aumentar la sensibilidad del estudio ya que los quistes parasitarios son liberados con las heces en forma intermitente o en cantidades variables. Para el diagnóstico en materia fecal formada, los métodos coproparasitológicos de concentración son muy útiles para la búsqueda de formas quísticas, dando los mejores resultados para este fin los métodos de flotación de Faust y el de sedimentación de Ritchie.

El 60% de los niños infectados con *G. lamblia* desarrollan sintomatología asociada con meteorismo, dolor epigástrico, deshidratación, dolor abdominal y diarrea crónica con heces espesas o esteatorreicas que contienen gran cantidad de moco y grasa. Que se ha atribuido a la intermitencia en la eliminación quística, eliminación que puede ser intensa, baja o mixta de expulsión de trofozoítos y quistes en heces es necesario a veces recurrir a otros métodos como la observación directa del protozoo en aspirado de líquido duodenal observado al microscopio.

Reacción en cadena de la polimerasa sirve para identificar (con el fin de encontrar) el ARN o el ADN del parásito, con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 99%.⁽⁶⁾

2.2.11 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA GIARDIASIS

El período de incubación en la giardiasis sintomática oscila entre 3 y 45 días. La infección puede evolucionar de forma aguda, subaguda o crónica.

En las formas de giardiasis crónica los síntomas predominantes son el malestar abdominal acompañado de dolor epigástrico difuso. La diarrea puede persistir o alternar con estreñimiento y puede acompañarse de pérdida de peso. Muchas personas infectadas con giardiasis son asintomáticas, la patología se presenta más en lactantes, niños e inmunocomprometidos.

Desde el punto de vista clínico, otros pueden desarrollar manifestaciones que van desde trastornos digestivos ligeros hasta diarrea crónica, anorexia, vómitos, pérdida de peso, decaimiento

general, síndrome de malabsorción intestinal con retardo en el crecimiento infantil.

En adultos procedentes de países desarrollados que viajan a zonas endémicas, al regresar a su lugar de origen la enfermedad se presenta en fase aguda: hay diarrea acuosa, náuseas, vómitos, dolor epigástrico, meteorismo y anorexia, pasando, luego de 3 a 4 días sin tratamiento, a la fase crónica con cuadro diarreico, con 4 ó 5 deposiciones diarias muy fétidas, Puede producir duodenitis, caracterizada por dolor abdominal tipo cólico y diarrea pastosas de color claro, con anorexia y dolor abdominal persistente, y pérdida de peso.⁽⁶⁾

2.2.12 TRATAMIENTO

Para el tratamiento de esta protozoosis intestinal, en nuestro país se utilizan ampliamente fármacos antiparasitarios.

- **El metronidazol.-** Se administra en dosis de 15 a 20 mg/kg/día fraccionado en 3 dosis por un periodo de 7 días por v.o. Este fármaco, de manera ocasional, puede provocar cefalea, náuseas, vértigo, diarrea, sabor metálico. Se presenta en tabletas y solución en jarabe para niños.
- **La quinacrina (mepacrina o atebrina).-** Es la droga recomendada en Estados Unidos y en otros países donde no se han comercializado los nitroimidazoles. La dosis es 100 mg 3 veces al día en adultos y 2 mg/kg 3 veces al día en niños por 5 ó 7 días. Puede producir efectos colaterales y toxicidad.
- **El tinidazol.-** Antiprotozoario oral aprobado por la FDA para tratamiento de giardiasis, amebiasis intestinal en niños menores de 3 años, se emplea a una dosis de 30 a 50 mg/kg/día administrado en dosis única o bien en esquema de 2 días. El medicamento se recomienda de preferencia después de la cena. En estudios in vitro, el tinidazol ha demostrado ser superior a metronidazol; sin embargo, su sabor amargo dificulta su administración en niños.
- **La furazolidona.-** Es otro fármaco útil que se usa a dosis de 7 mg/kg/día fraccionado en 3 dosis durante 7 días. El fármaco es bien tolerado. usada en diarreas bacterianas, se emplea también

en esta parasitosis a la dosis de 5 mg/kg/día en niños, dividida en 4 tomas diarias por 7 días.

- **Paramomicina.-** Fármaco útil en amebiasis intestinal, se usa dosis de 25 - 35 mg/kg/día VO C/8 horas por 7 días en niños. Paciente adulto hasta 700 mg VO C/6 horas.
- **El secnidazol.-** Dosis de 30 mg/kg/día, administrado en dosis única via oral, es un anti-giardiasico y tricomonocida eficaz sobre enfermedades oportunistas que derivan de ella en las formas quísticas y trofozoíticas de la ameba, por lo cual una sola dosis es suficiente para el tratamiento de las parasitosis por protozoarios como *Giardia lamblia*.
- **El albendazol.-** Descrito ampliamente como antihelmíntico, es efectivo en giardiosis en dosis de 400 mg/día por 5 días. Después de concluido el tratamiento, puede haber persistencia de la sintomatología durante algunos días, a pesar de existir la cura parasitológica. A esta condición se le conoce con el nombre de síndrome post-giardiasico.

2.2.13 PREVENCIÓN DE GIARDIASIS

Las mejores medidas siempre estarán encaminadas a evitar la contaminación de agua y alimentos por excretas, lográndose por medio de un manejo adecuado de las mismas, evitar el riego de hortalizas con aguas negras es una medida necesaria, ya que esta práctica se sigue permitiendo en muchos lugares.

La detección de portadores asintomáticos y en especial de aquellos que tienen contacto con alimentos, es fundamental, ya que este grupo de personas que preparan alimentos y los expenden en la vía pública, también son los que menos educación sanitaria tienen. Estos individuos deberán de ser tratados mediante capacitaciones para evitar que sigan transmitiendo las formas infectantes del parásito.

2.2.14 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA:

Es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis. Su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original o molde para obtener muchas de copias de ADN in vitro.

La PCR consiste en una serie de cambios repetidos de temperatura llamados ciclos, por lo general el número de ciclos es de 20 a 35, cada ciclo consiste en tres cambios de temperatura. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo, dependen de algunos parámetros en los que se incluye, la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y dNTPs en la reacción así como la temperatura de unión de los iniciadores.

Permite que un solo patógeno pueda ser detectado con suficiente sensibilidad para un buen diagnóstico clínico. Sin embargo la sensibilidad analítica de los distintos primers dependerá que tan específicos son para *G. lamblia*, pudiendo por lo general detectar de 1 a 10 quistes por mezcla de reacción.

Las pruebas de PCR presentan una alta fiabilidad, detectando el gen blanco que es amplificado, lo que permite no tener falsos positivos pero esto depende de la calidad y la confección de los primers a utilizar. ⁽¹⁶⁾

2.2.15 CICLOS DE AMPLIFICACIÓN:

La Reacción en Cadena de Polimerasa, es un método utilizado mayormente para la genotipificación de aislados del parásito que permite la detección específica de DNA de *Giardia lamblia* en muestras de heces y comparar los resultados con técnicas de microscopía convencionales y de detección de antígenos, determinando que la PCR es más sensible y específica.

2.2.15.1 CICLOS:

- **Desnaturalización:** Se desnaturaliza el ADN (se separan las dos cadenas de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95 °C) por 1 minuto la forma más habitual.

- **Alineamiento o unión del cebador:** A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 40-68 °C durante 20-45 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento.
- **Extensión o elongación de la cadena:** Actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN con una extensión final de 72°C por 7 minutos.

2.2.16 PRECAUCIONES REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA:

Este es un aspecto muy importante a tener en cuenta cuando se trabaja con esta técnica, que al ser muy sensible, es de gran importancia evitar contaminaciones, ya que es posible que el ADN no deseado (aunque se encuentre en una cantidad muy pequeña) se amplifique y obtengamos un resultado que no es real, por lo que una de sus mayores ventajas, se convierte a la vez en el principal inconveniente. Existen una serie de normas que ayudan a evitar las contaminaciones y la aparición de falsos positivos: Lugar físico e instrumental exclusivo para la realización del ensayo, utilización de reactivos y tubos estériles, así como puntas para micro pipetas, uso de guantes de látex nitrilo, colocar controles de agua, además de colocar muestras negativas conocidas. Para evitar la aparición de resultados falsos positivos o falsos negativos, producidos generalmente por errores al pipetear y/o presencia de inhibidores, se recomienda emplear controles internos que compiten con la muestra problema controles de blanco se añade agua en lugar de ADN.⁽¹⁶⁾

2.2.17 ELECTROFORESIS Y AMPLIFICACIÓN DE LA PRUEBA DE PCR:

La electroforesis en gel de agarosa, es un método que se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas, describe la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico.

Es un método normalizado que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN, se trata de una técnica sencilla y rápida que permite diferenciar fragmentos de ADN que no pueden separarse adecuadamente con otros procedimientos. Por otra parte, el ADN puede localizarse en el gel de agarosa tiñendo con una concentración

baja de bromuro de etidio, que es un agente intercalante fluorescente que se utiliza como colorante. ⁽¹⁷⁾

2.3 DEFINICIONES DE TERMINOS BÁSICOS:

2.3.1 PCR: La técnica se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en sentido 5´- 3` usando un molde de cadena sencilla pero a partir de una región de doble cadena. ⁽¹⁸⁾

2.3.2 ADN: Acido desoxirribonucleico, en el ADN hay cuatro nucleótidos o bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Estas bases forman pares específicos (A con T y G con C) la unión de estos pares de bases forman la estructura del ADN. ⁽¹⁸⁾

2.3.3 PRIMERS: Para crear estas regiones de doble cadena, se utilizan los denominados iniciadores (cebadores). Estos son una pareja de oligonucleótidos diseñados de tal manera que sean complementarios a cada uno de los extremos del fragmento de ADN que se quiere amplificar. ⁽¹⁸⁾

2.3.4 DESOXINUCLEÓTIDOS TRIFOSFATO: Los dNTPs es el sustrato para polimerizar nuevo ADN, deben ser añadidos en la reacción en iguales concentraciones, puesto que los mismos pueden captar iones Mg^{2+} . Por lo general la concentración final más utilizada de dNTPs en un volumen de reacción de 50 μ l es de 0.2 mM. ⁽¹⁹⁾

2.3.5 PAR DE BASES: Moléculas que se llaman nucleótidos, en hebras opuestas de la doble hélice del ADN, que forman enlaces químicos entre si que funcionan como escalones en una escalera y ayudan a unir las dos hebras del ADN. ⁽¹⁸⁾

2.3.6 CONCENTRACIÓN DE CLORURO DE MAGNESIO: Iones divalentes, se suele usar magnesio (Mg^{2+}) agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Actúa como cofactores de la polimerasa, la concentración de magnesio es un factor crucial que afecta el funcionamiento de la enzima Taq ADN polimerasa. ⁽¹⁹⁾

2.3.7 TERMOCICLADOR: Es un aparato que permite calentar y enfriar los tubos o capilares de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción, permite realizar los ciclos de temperaturas usado en Biología Molecular. ⁽¹⁹⁾

2.3.8 CICLOS: Alternados de temperaturas altas y bajas, que permiten separar las hebras de ADN formadas entre sí tras cada fase de replicación y la unión nuevamente de estas hebras con la polimerasa para que vuelvan a duplicarse. ⁽¹⁶⁾

2.3.9 GELES DE AGAROSA: Permiten una electroforesis rápida, pero con una resolución limitada por cuanto las bandas que se forman en los geles ya que tienen tendencia a ser difusas y a esparcirse, ello obedece al tamaño de los poros y a veces no puede controlarse. Los geles se obtienen por suspensión de agarosa seca en polvo en un tampón acuoso, tras lo cual se hace hervir la mezcla hasta que la agarosa se funde y se convierte en una solución transparente. ⁽¹⁷⁾

2.3.10 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA: Es el método más empleado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN y ARN. Por otra parte, el ADN puede localizarse en el gel de agarosa tiñendo con una concentración baja de bromuro de etidio. ⁽¹⁷⁾

2.3.11 BROMURO DE ETIDIO: El (BrEt) es el colorante más utilizado para la visualización del ADN, es un agente químico muy usado en técnicas de biología molecular para teñir geles de agarosa y poder apreciar bandas de ADN; ya sean de los productos de extracción de ADN ó de PCR. ⁽¹⁷⁾

2.3.12 TRANSILUMINADOR: Es un equipo necesario que usa luz UV con diferentes longitudes de onda como recurso para observar, analizar y tomar fotografías de proteínas, aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos (ADN) en geles de agarosa con colorantes como el bromuro de etidio. ⁽¹⁷⁾

CAPITULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACION

3.1 Tipo de investigación:

3.1.1 Método:

- Deductivo. Se partirá de información de antecedentes, artículos científicos, información general establecida procedente de normas, técnicas; para obtener conclusiones finales.

3.1.2 Técnica:

- Descriptivo. Se describe detalladamente lo realizado durante el desarrollo de la investigación.

- Correlacional. Porque los resultados de las muestras de los pacientes a los cuales se les extrajo el ADN no se conocen si efectivamente eran positivos a *Giardia lamblia*.

- Observacional. Son estudios de observación cualitativa y cuantitativa, en la que se puede observar cualquier cosa que pueda ser medida, como cambios de tamaño, color o cantidad.

3.1.3 Diseño:

- No experimental. Debido a que no se altera las variables solo identifica *Giardia lamblia* en heces.

3.2 Población y Muestreo de la Investigación:

3.2.1 Población:

- Muestras fecales de niños de 3 a 5 años positivas a *Giardia lamblia*, que fueron diagnosticadas por microscopia óptica por la Técnica de Ritchie (centrifugación con formol-éter) del Hospital Cayetano Heredia.

3.2.2 Muestra:

$n = 30$ muestras de heces.

Formula de la muestra:

$$n = t^2 \times p (1-p) / m^2$$

Dónde:

n = tamaño de la muestra.

t = valor estándar 1.96

p = Prevalencia estimada de *Giardia lamblia* 0.02% o 2%.

m = error (valor estándar 0.05)

Reemplazando valores:

$$n = (1.96)^2 \times 0.02 (1 - 0.02) / (0.05)^2$$

$$n = 0.07526 / 0.0025$$

$$n = 30$$

3.3 Variables e indicadores:

VARIABLE	INDICADORES
VARIABLE INDEPENDIENTE (Y) Y: Presencia de <i>Giardia lamblia</i> .	Y1: Concentración mínima de detección. Y2: Diseño de los primers.
VARIABLE DEPENDIENTE (X) X: Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.	X1: La sensibilidad de determinación por la técnica de PCR para <i>Giardia lamblia</i> seria de un 80 %. X2: La especificidad de determinación por la técnica de PCR para <i>Giardia lamblia</i> seria de un 100%.

3.4 Técnica e instrumentos de Recolección de Datos:

3.4.1 Técnica:

3.4.1.1 PCR convencional:

La PCR es una técnica de gran sensibilidad, es decir, necesita una mínima cantidad de ADN para obtener un gran número de copias. Además, puede ser muy propensa a errores si se lleva a cabo en condiciones inadecuadas de esterilidad, que conduzcan a la amplificación de ADN no correspondiente a la muestra a analizar, los productos se mantuvieron a -20°C hasta el momento de la visualización mediante electroforesis en gel de agarosa.

La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador LightCycler, (Roche) Rodenstock con la utilización de tubos capilar de PCR de $0.2\ \mu\text{L}$ que permite alcanzar las temperaturas rápidamente en el interior del termociclador.

Las condiciones de reacción se optimizaron mediante la combinación de un Primer forward y un Primer reverse específico para segmentos del genoma de Giardia. Para ello se hizo un Master Mix que es una solución lista para su uso premezclada que contiene $0.05\ \text{U}/\mu\text{L}$ Taq DNA polimerase, reaction buffer, $4\ \text{mM}$ MgCl_2 , $0.4\ \text{mM}$ of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP and dTTP) y tampones de reacción a concentraciones óptimas para la amplificación eficiente de plantillas de ADN por PCR.

Las condiciones de la PCR fueron: Una denaturación (94°C por 1 minuto), hibridación (60°C por 1 minuto) y extensión (72°C por 1 minuto); seguido de 35 ciclos y una extensión final de 72°C por 7 minutos para permitir que todos los segmentos específicos de ADN terminen de amplificarse. Al término de la reacción de amplificación, los productos se mantuvieron a -20°C hasta el momento de la visualización mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

3.4.1.2 Estandarización de la Técnica de PCR:

A fin de determinar la concentración óptima de reactivos para la obtención de una amplificación adecuada de 334 bp para el gen que codifica para la beta giardina.

3.4.1.3 Electroforesis de los productos de amplificación de PCR:

Los productos de la reacción de la prueba de PCR se sometieron a electroforesis en una cámara electroforética horizontal horizontal BIO RAD. Sub – Cell GT. (Cámara 03) haciendo uso de un gel de agarosa al 1.5 %. Se aplicó un voltaje de 110 V por 30 minutos.

Al término de la corrida electroforética cada gel fue teñido con bromuro de etidio y se expuso a rayos UV (transiluminador) para la visualización final de los productos de amplificación de la PCR, mediante una cámara electroforética. Para el cálculo de los pesos moleculares de los productos de amplificación, se utilizó un marcador de peso molecular de 334 bp.

3.4.1.4 Diseño de cebadores específicos:

Los cebadores se diseñan basándose en secuencias complementarias deben tener un tamaño entre los 18 y 30 pb. Composición de bases: el contenido promedio (G+C) en el rango 50-60%; evitar regiones ricas en secuencias (A+T) y (G+C). Optimizar el emparejamiento de bases es importante para que la estabilidad del extremo 5' sea alta y la de 3' sea baja para evitar "falsa" hibridación. La T_m de los primers no deben diferenciarse más de 2 – 3 °C entre sí, como también minimizar la posibilidad de formación de estructuras secundarias: Horquillas y dímeros.

3.4.1.5 Instrumentos:

- Puntas de pipetas estériles desechables.
- Vaso beaker.
- Guantes descartables.
- Micro pipeta.
- Tubos (columnas).
- Tubos descartadores.
- Micro tubos de PCR de 0.2 ml.
- Gradilla.

Equipos:

- Equipo para baño maría.
- Centrifuga.
- Agitador vortex.
- Fuente de poder.
- Cámara de Electroforesis.
- Transiluminador.
- Termociclador.
- Refrigeradora.
- Cámara digital.
- Nano Drop.

Reactivos:

- Kit Gene JET Genomic DNA Purification.
- Lys Solution 24 ml.
- Elution Buffer 30 ml.
- Wash Buffer I 10 ml.
- Wash Buffer II 10 ml.
- Digestion Solution 11ml.
- RNase A Sol 10 mg/ ml.
- Proteinase K Solution 1.2 ml.
- CSL- Runsafe- Pack ager 1 ml/vial.
- Primer Pair (with probe purchase) Salt-Free (up to 30 bases each)
Salt- Free 50 nmol 20-40 nmol.
- Primer Forward.

- Primer Reverse.
- Beta-giardina-1F: 5' _d AGATGATCAAGGACGCCATC^{3'}
- Beta-giardina-1R: 5' _d GTGCTTTGTGACCATCGAGA^{3'}
- 10 X TBE Buffer (Tris- borate-EDTA) 1L.
- RNase AND ase and protease-free (10 mg/ ml) 10 mg.
- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder 50 ug.
- PCR Master Mix (2X) 200 rxns.
- Water Molecular biology grade.
- LE Agarose. Multi-Purpose A garose.
- Proteinase K (recombinant) PCR grade 1 ml.
- Thermo Scientif Gene Ruler 100 pb Ladder.

3.5. DESARROLLO:

a) Tipo de muestra: Para este estudio la muestra fue de tipo no probabilístico intencionado para una población finita de 30 muestras fecales humanas (niños edades de 3 a 5 años de ambos sexos) que se recolectaron del Hospital Cayetano Heredia, mediante preservante PVA. Las muestras fecales recolectadas se almacenaron a - 20°C, como máximo 15 días.

b) Tamaño de la Muestra: Se obtuvieron 15 muestras fecales positivas a *G. lamblia* y 15 muestras positivas a otras parasitosis o que no presentaron ningún parásito.

c) Examen parasitológico de las muestras fecales: Método de Ritchie, es un método que consiste en la sedimentación de parásitos intestinales en heces se logra por centrifugación y flotación (mixto, con fijador). Se basa en la concentración de los quistes y huevos por sedimentación mediante la centrifugación, con la ayuda de formol y éter para separar y visualizar los elementos parasitarios.

Conduciendo a la recuperación de todos los protozoarios. Concentra bien estas formas y elimina bastantes detritus orgánicos. Aunque se inactivan las formas móviles de los protozoarios, se mantiene la

integridad de los organismos. Es efectivo aún en heces con cantidades excesivas de grasas.

Sin embargo, durante la sedimentación, aparte de concentrarse los parásitos, se quedan reunidos también algunos otros artefactos durante la observación.

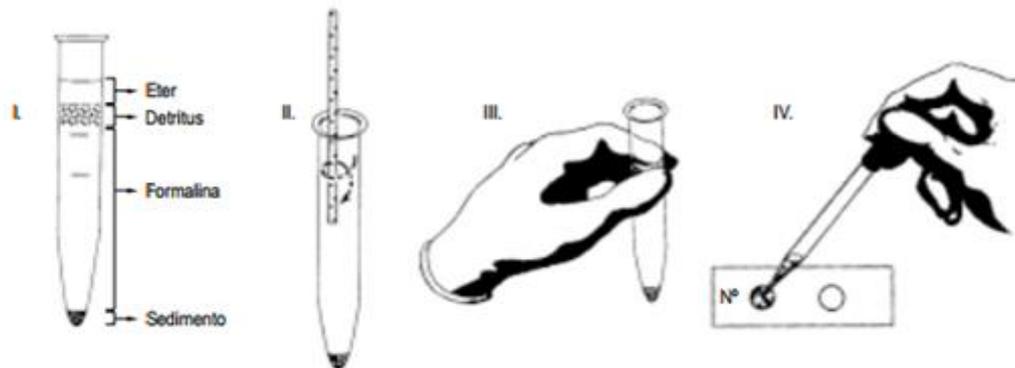
Instrumentos:

- Gradilla de tubos de ensayo.
- Tubos de ensayo 13 x 100.
- Lámina portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Hisopos.
- Solución de formol 10%.
- Éter.
- Formalina.
- Sedimento.
- Solución fisiológica.
- Éter etílico.
- Lugol.
- Bajalengua o bagueta.
- Microscopio binocular.

Desarrollo:

- Colocar en el tubo de ensayo 1 a 2 g de muestra de heces, agregar 8 mL de solución fisiológica, homogeneizar y centrifugar a 2 000 rpm por 2 a 3 minutos.
- Descartar el sobrenadante y repetir varias veces el paso anterior hasta que se observe el sobrenadante limpio.
- Decantar el sobrenadante, agregar al sedimento 6 mL de solución de formol al 10%, homogeneizar y dejar reposar 5 minutos, luego de los cuales se agrega 3 mL de éter.
- Taponar el tubo y agitar cuidadosamente para evitar la salida del material.
- Eliminar las capas formadas de sobrenadante, de ser necesario, con ayuda de un hisopo.
- Retirar la tapa, centrifugar el tubo de 2 000 a 3 000 rpm por 3 minutos.

- Depositar una gota de lugol en la lámina portaobjeto, y con ayuda de una pipeta Pasteur, tomar una porción del sedimento para mezclarlo con la solución de lugol.
- Cubrir con una laminilla cubreobjetos y observar al microscopio.



Observación: Se pueden observar quistes, ooquistes, trofozoitos.

3.5.1 Extracción de ADN genómico de muestras: Para la extracción de ADN de *G.lambliá* conservados en un fijador PVA, se utilizó el kit de Gene JET Genomic DNA Purification.

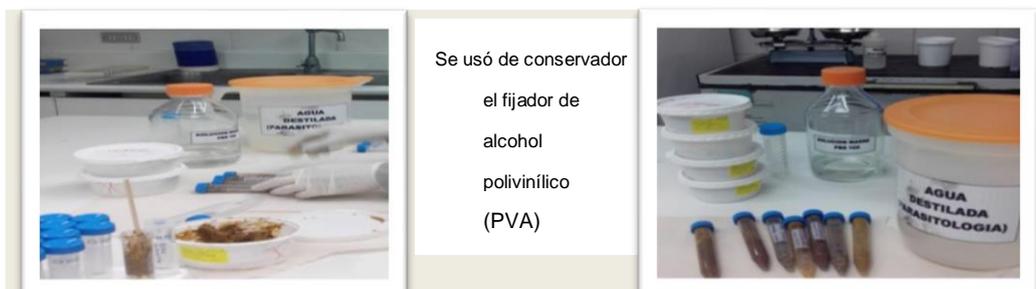
El ADN extraído y purificado se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso con el PCR.

Procedimiento:

1. Se agregó 20 mg de heces a los tubos Eppendorf: 13 muestras positivas, 15 muestras negativas y 2 controles positivos de un Pool de parásitos.
2. Se adiciono 180 μL de Digestión Solution, a cada muestra.
3. Se agregó 20 μL de Proteinasa K solution.
4. Luego se llevó al Agitador vortex las 30 muestras. Se agito por 1 minuto cada uno de los tubos con las muestras.
5. Se llevó las muestras al Equipo para Baño María por el lapso de 1 hora a 56°C .

6. Se agregó 20 μL de RNase y se agito en el vortex por 10 minutos los tubos.
7. Se agregó 200 μL de Lys Solution luego se colocó los tubos en el vortex por 5 minutos.
8. Luego se agrega etanol puro, a los pomos de los reactivos. Wash Buffer I y Wash Buffer II. Se trasfiere a los Tubos Columnas el preparado de las muestras luego de haber pasado los pasos del 2 al 7.
9. Centrifugar las columnas conteniendo las muestras de heces, a 13 000 rpm por 1 min, descartar todo el sobrenadante sin tocar el sedimento de ADN. Colectar con cuidado el sobrenadante (aprox. 150 – 200 μL), transferirlo en tubos descartadores, a un vaso beaker para su desecho.
10. Luego agregar un volumen igual de Wash Buffer I. Centrifugar las columnas a 13 000 rpm por 1 min, descartar todo el sobrenadante.
11. Se agrega 200 μL de Wash Buffer II, lavar el sedimento, por 3 minutos a 13 000 rpm en la centrifuga.
12. Adicionar 200 μL de Elution Buffer, centrifugar a 13 000 rpm por 5 min.
13. Colectar la fase liquido con cuidado (parte inferior) y transferirla a un micro tubo de PCR de 0.2 ml las 30 muestras tanto positivas y negativas a *Giardia lamblia*.
14. La solución de (ADN) extraído a las 30 muestras 25 μL , guardar a -20°C hasta el momento de su uso para el PCR.

FIGURA N° 2 Recolección, manejo y conservación de muestras de heces.



Fuente: Obtenido del trabajo de investigación

FIGURA N° 3 Procedimiento de extracción de ADN de muestras de heces.



Fuente: Obtenido del trabajo de investigación.

FIGURA N° 4 Uso del Kit Gene JET Genomic DNA Purification.



Fuente: Obtenido del trabajo de investigación.

FIGURA N° 5 Convección térmica por medio de Baño María.



Fuente: Obtenido del trabajo de investigación.

FIGURA N° 6 Obtención del ADN en muestras de heces.



Fuente: Obtenido del trabajo de investigación.

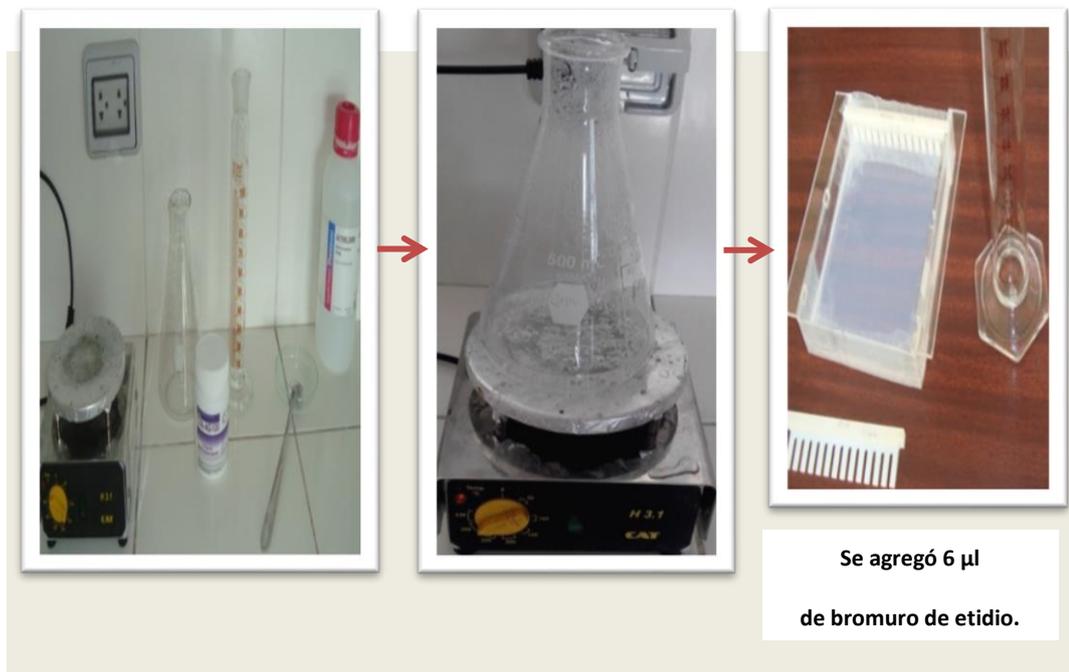
3.5.2 Preparación del gel agarosa para electroforesis:

La agarosa es un polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de las algas de los géneros Gellidium y Gracillaria, que permitan separar moléculas de ADN mediante electroforesis.

Para la preparación de un gel de agarosa se precisan en los siguientes pasos:

1. La agarosa en polvo se pesa 1.6 gr.
2. Medir en una probeta 72 ml de agua destilada más 8 ml de Buffer TBE, en un matraz.
3. Llevar a fuente de calor cocinilla hasta que no se forme burbujas.
4. Colocar 6 µl de bromuro de etidio al gel de agarosa.
5. Vaciar en una cubeta o molde hasta solidificar y colocar el peine.
6. El gel de agarosa con su pocillo una vez cargadas las muestras en el orden establecido, se colocó en una solución amortiguadora TBE con pH de 8.3.
7. Se coloca la cubierta de la cubeta de electroforesis en los terminales de los electodos. Se inserta la clavija del cable negro en la entrada de color negro (polo negativo) y la clavija del cable rojo en la entrada de color rojo (polo positivo), de la fuente de alimentación.
8. Se conecta la fuente a la red y se genera una corriente eléctrica
9. Se confirma su funcionamiento con la visualización de las burbujas que se generan en el cátodo. Como la visualización mediante el transiluminador fotografiar las imágenes.

FIGURA N° 7 Preparación del gel agarosa al 1.5 %.



Fuente: Obtenido del trabajo de investigación

3.5.3 Protocolo de la Técnica PCR:

Procedimiento:

- Colocar en la cabina de flujo laminar, los reactivos en hielo, necesarios para la realizar la PCR: Agua molecular, 0.05 U/µL Taq DNA polimerase, reaction buffer, 4mM MgCl₂, 0.4 mM of each dNTP, iniciadores Forward y Reverse del gen que se quiere detectar, secuencia de ADN blanco o diana, de manera que haya la cantidad necesaria de µL por muestra, tanto para el control positivo y el control negativo y se coloca en los capilares. Colocar los capilares en el termociclador y programar los ciclos adecuados para el gen que se quiere detectar. Realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, cargando en cada pocillo del gel 25 µL de la muestra obtenida de la reacción de amplificación.

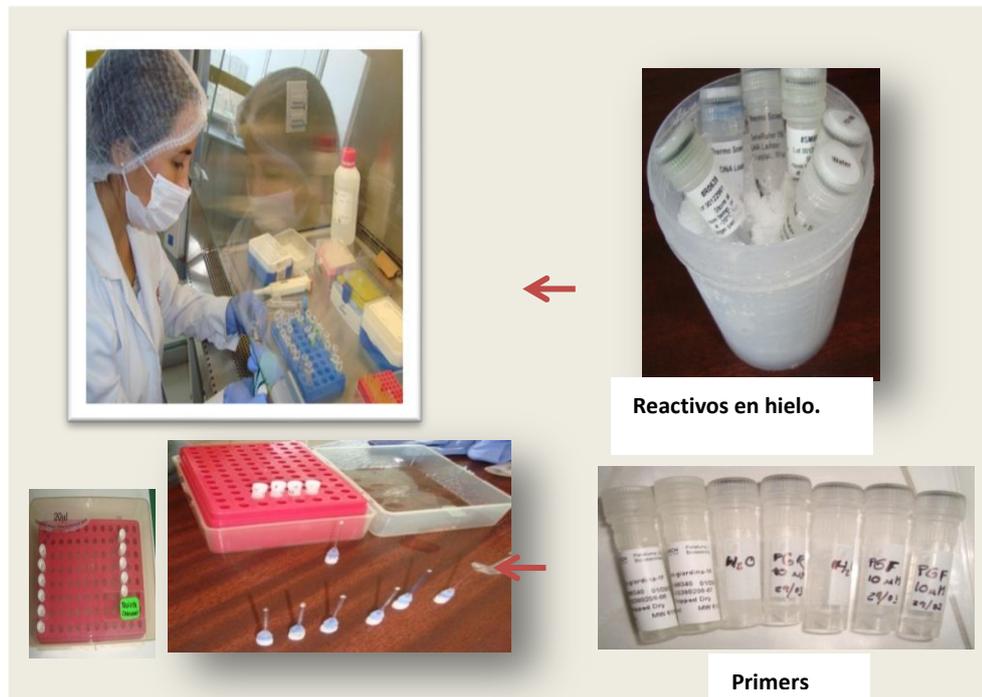
Una vez cargadas las muestras en el marcador, poner el voltaje a 110 V, adecuado para que se produzca la migración. Teñir los geles de agarosa con 10 µL de bromuro de etidio y visualizar el ADN en el transiluminador UV. Se considerará un resultado positivo si en las muestras problema aparecen bandas.

Mezcla utilizada en la reacción de PCR para amplificar:

PCR Master Mix (2X)	1X	10X
Buffer	12.5 µL	125 µL
Forward primer	5.5 µL	55 µL
Reverse primer	2 µL	20 µL
H2O	2 µL	20 µL
ADN molde		3 µL

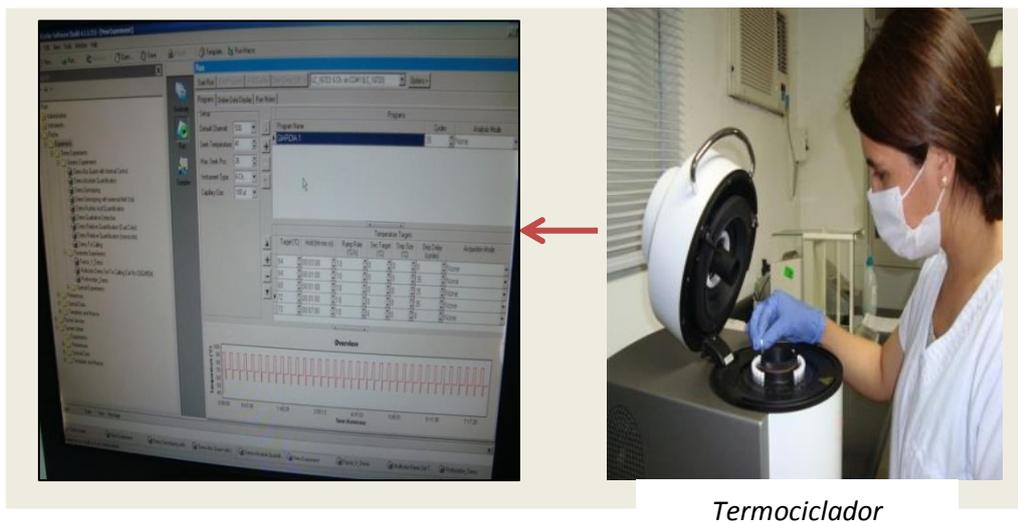
PASOS	TEMPERATURA °C	TIEMPO	NUMERO DE CICLOS
Denaturación	94 °C	1-3 min	35
Hibridación	60 °C	1 min	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	5 -15 min	1

FIGURA N° 8 Preparación del Master Mix (2X)



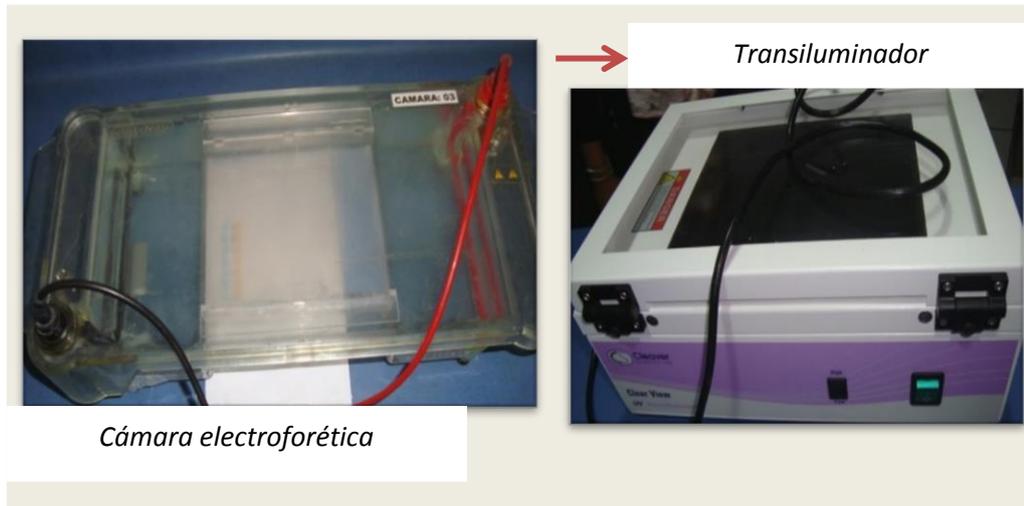
Fuente: Obtenido del trabajo de investigación

FIGURA N° 9 Amplificación en el termociclador LightCycler® Software 4.1



Fuente: Obtenido del trabajo de investigación

FIGURA N° 10 Electroforesis y visualización en el transiluminador.



Fuente: Obtenido del trabajo de investigación

3.5.4 Metodología por Observación Cualitativa:

Para determinar cantidad de la concentración de ADN.

- a. Alicuotar las muestras y correr el gel de agarosa al 1.5%, al voltaje predeterminado (a 110 voltios) en la cámara electroforética. Vaciar en una cubeta o molde hasta solidificar el gel, agregar 8 μ l de bromuro de etidio y colocar el peine hasta que solidifique.
- b. Sembrar en cada pocillo 5 μ l de ADN extraído, más 3 μ l de 6X DNA Loading Dye más agua molecular.
- c. El gel final se puede fotografiar y guardar la imagen.

FIGURA N° 11 Cuantificación de ADN por medio de corrida electroforética



	Total de μ l	Concentraciones usadas para la corrida electroforética					
		M1	4x	M2	4x	M3	4x
ADN de las muestras		2 μ l		3 μ l		4 μ l	
Agua molecular		10	18.4	3.8	15.2	3.0	12
6x DNA Loading Dye		1.5 μ l		2.5 μ l		3.5 μ l	

Fuente: Obtenido del trabajo de investigación.

3.5.5 Extracción del ADN por Shock Térmico:

La técnica de la PCR es un ensayo enzimático en el cual, la enzima Taq DNA Polimerasa puede ser inhibida ya sea por una excesiva cantidad de ADN (en muestras muy concentradas es bueno realizar dilución previa para un máximo de 50 o 60 ng/ul o menos); la enzima también es inhibida por una serie de inhibidores presentes en las heces, por ejemplo compuestos fenólicos presentes en los vegetales y mioglobina proveniente de la carne. Para ello, es bueno adicionar BSA (albumina sérica bovina) al agua PCR para una concentración de 400 ng /ul. El BSA interactúa con los inhibidores, ayudando a la enzima polimerasa para que amplifique bien al ADN.

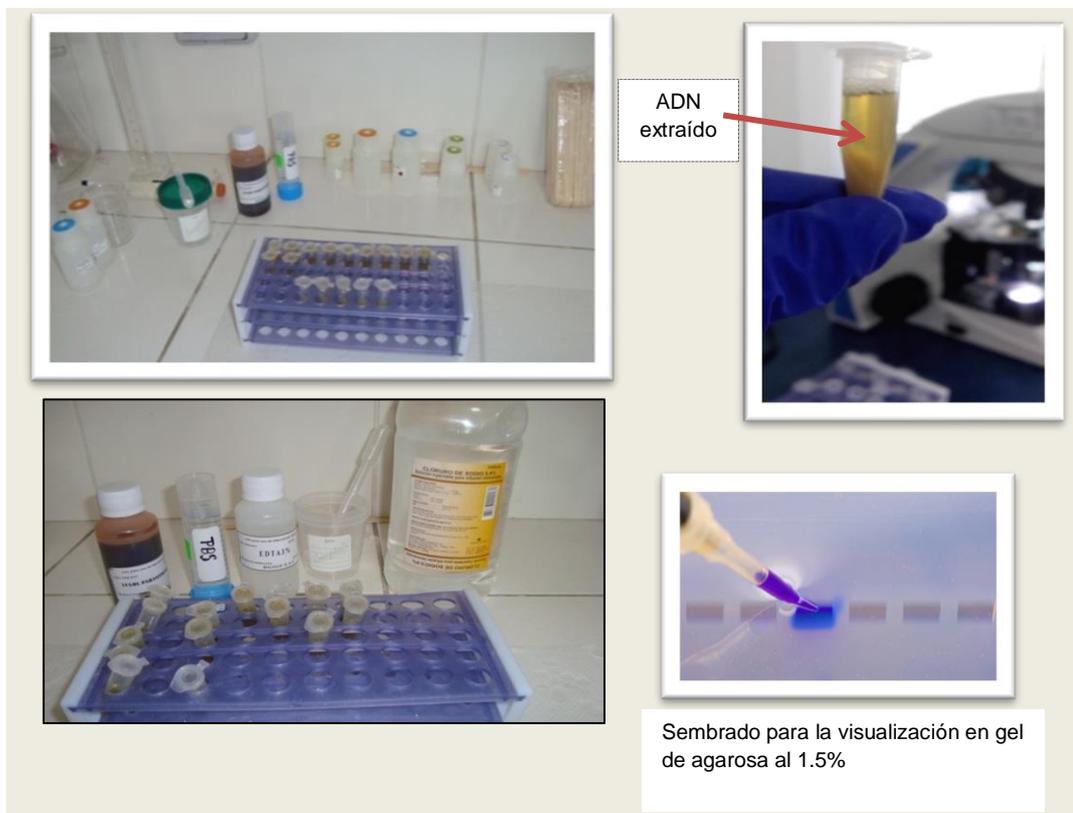
El ADN extraído y purificado se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso con el PCR como plantilla.

Procedimiento:

- Se agregó 20 mg de heces a 16 tubos Eppendorf 1.5 ml; de muestra positiva de *Giardia lamblia* de tres cruces en las Columnas.
- Se hace una sedimentación rápida de las heces, diluyendo 1 volumen de heces + 20 volúmenes de solución salina y luego centrifugar a 2,000 rpm x 5 minutos, para eliminar las bacterias de la flora. Realizar este lavado por lo menos unas 3 veces. Trabajar con el sedimento resuspendiendolo Vol: vol en una solución buffer de lisis (TrisHCl 0.05M, EDTA 0.01M, SDS al 2%o tritón x-100 al 2%).
- Realizar por lo menos 3 ciclos de Shock Térmico (5 minutos a 90°C en Baño María y luego congelarlos por 5 minutos a -20°C y así se repitió los pasos 3 veces).
- Este procedimiento es importante para ablandar o destruir la pared quística del parásito o para lisar los trofozoitos que puedan estar contenidas en la muestra fecal.
- Se usó un Buffer lisis: Adicionar 180 µL de Digestión Solution, a cada muestra de los 16 tubos.
- Se agregó 30 µL de Proteínasa K solution.
- Luego se llevó al Agitador vortex las 16 muestras. Se agito por 1 minuto cada una.
- Se llevó las muestras al Equipo para baño maría por el lapso de 1 hora a 56 °C.
- Se agrega 300 µL de Lys Solution. Se agita en el agitador vortex por 15 minutos.

- Centrifugar las columnas conteniendo las muestras de heces, a 20 000 rpm, descartar todo el sobrenadante sin tocar el sedimento de ADN.
- Colectar con cuidado el sobrenadante (aprox. 150 – 200 μ L), transferirlo en tubos descartadores, a un vaso beaker.
- Luego agregar un volumen de 600 μ L igual de Wash Buffer I. Centrifugar las columnas a 14 000 rpm por 1 min, descartar todo el sobrenadante.
- Se agrega 200 μ L de Wash Buffer II, lavar el sedimento, por 3 minutos a 14 000 rpm en la centrifuga.
- Adicionar 120 μ L de Elution Buffer, centrifugar a 14 000 rpm por 5 min.
- Colectar la fase liquido con cuidado (parte inferior) y transferirla a un micro tubo de PCR de 0.2 ml.
- Guardar a -20°C hasta el momento de su uso para el PCR.

FIGURA N° 12 Procedimiento para extracción de ADN mediante Shock térmico.



Fuente: Obtenido del trabajo de investigación

CAPITULO IV

PRESENTACION, ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

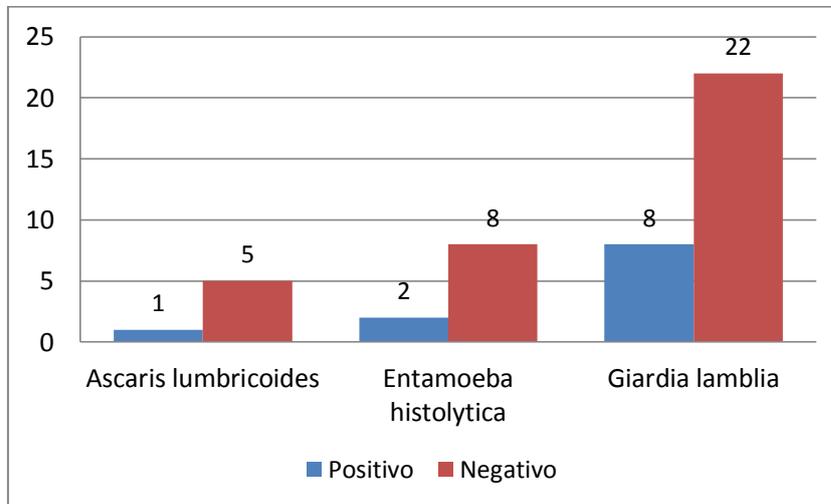
4.1 RESULTADOS

El manejo de la base de datos y análisis estadísticos fueron realizados utilizando Microsoft Excel ®.

Tabla N°1 Resultados positivos y negativos de otros parásitos encontrados.

	Total	Giardia lamblia +	
		Positivo	Negativo
		(n=8)	(n=22)
Ascaris lumbricoides	6	1	5
Entamoeba histolytica	10	2	8
Giardia lamblia	30	8	22

+ Examen coprológico.



Fuente: Datos obtenidos del trabajo de investigación. Elaboración propia

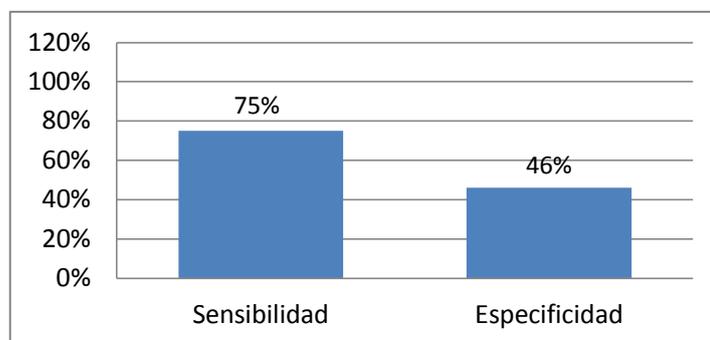
Interpretación y resultados.- Relación entre el número de infectados con genotipo B con y sin sintomatología en relación al grupo etario (n=30). Grupo: niños de 5 años.

Tabla N°2 Sensibilidad y Especificidad por técnica cualitativa para identificar *G.lamblia*.

TECNICA CUALITATIVA	Giardia lamblia		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	3	14	17
Negativo	1	12	13
Total	4	26	30

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Positivos detectados por Técnica cualitativa}}{\text{Total de positivos}} = \frac{3}{4} = 0.75$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Negativos detectados por Técnica cualitativa}}{\text{Total de negativos}} = \frac{12}{26} = 0.46$$



Fuente: Datos obtenidos del trabajo de investigación. Elaboración propia

Interpretación y resultados.- Según los cálculos estadísticos la sensibilidad de la técnica reporta mayor sensibilidad que especificidad. La sensibilidad obtenida se refiere a la cantidad mínima de ADN necesaria para que se produzca la amplificación, es decir, para obtener una banda. Se relaciona con los falsos negativos, ya que puede que una muestra sea positiva pero sea dada como negativa porque no se ha amplificado por no tener suficiente cantidad de ADN.

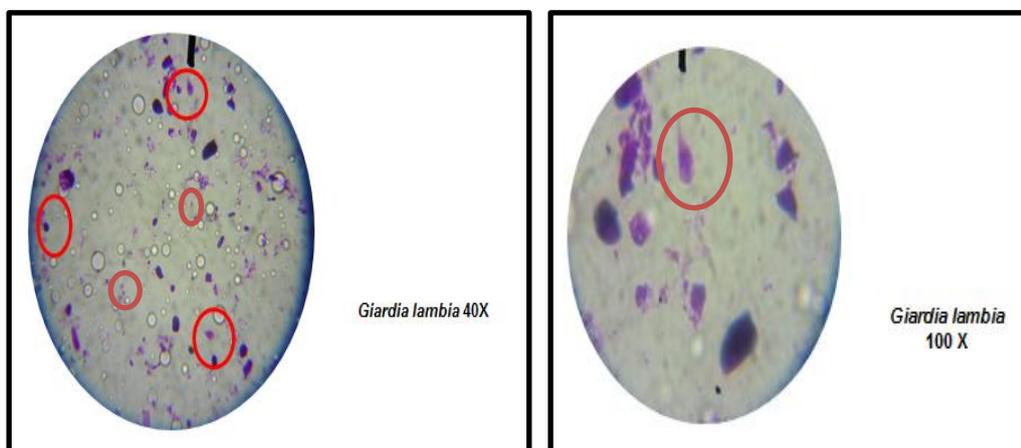
Tabla N°3 Sensibilidad y Especificidad por la Técnica de PCR para identificar *G.lamblia*.

PCR	Giardia lamblia		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	0	13	13
Negativo	2	15	17
Total	2	28	30

Fuente: Datos obtenidos del trabajo de investigación. Elaboración propia

Interpretación y resultados.- Se dio una inhibición de la PCR por agentes que interfirieron en el correcto transcurso de la amplificación. Tomando en cuenta aspectos como la contaminación y algún fallo en la hibridación de los primers, pudo haber otras complejidades que afectaron a llegar a resultados finales.

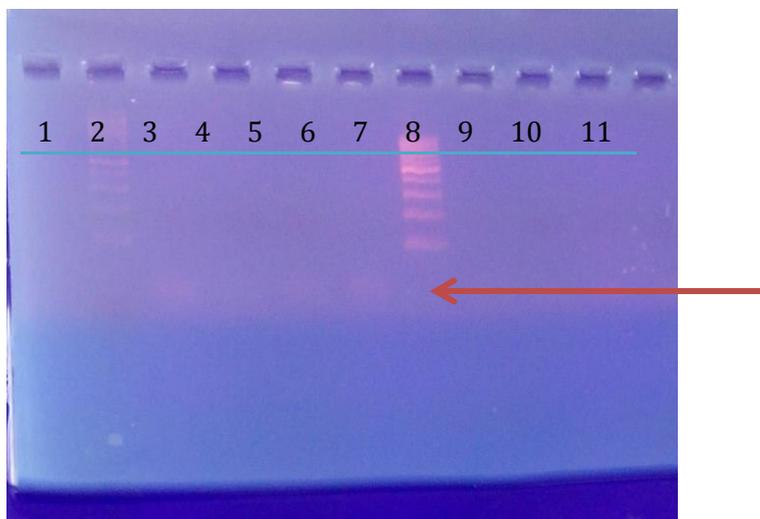
FIGURA N°13 Visualización con microscopio utilizando aumentos de 40x y 100 x.



Quistes y trofozoitos de *Giardia lamblia*. Se presentan muestras positivas diferentes que proceden del método de concentración y microscopia. En círculos rojos se señalan algunos.

Fuente: Obtenido del trabajo de investigación.

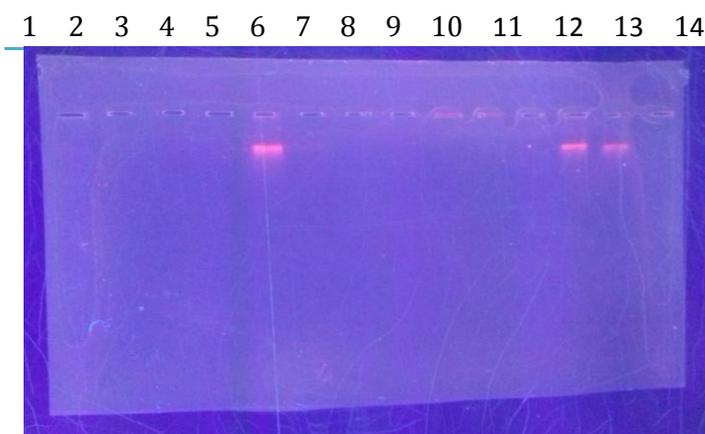
FIGURA N°14 Resultados de la amplificación por PCR en gel de agarosa del 2 %.



Dando como resultado ausencia de bandas.

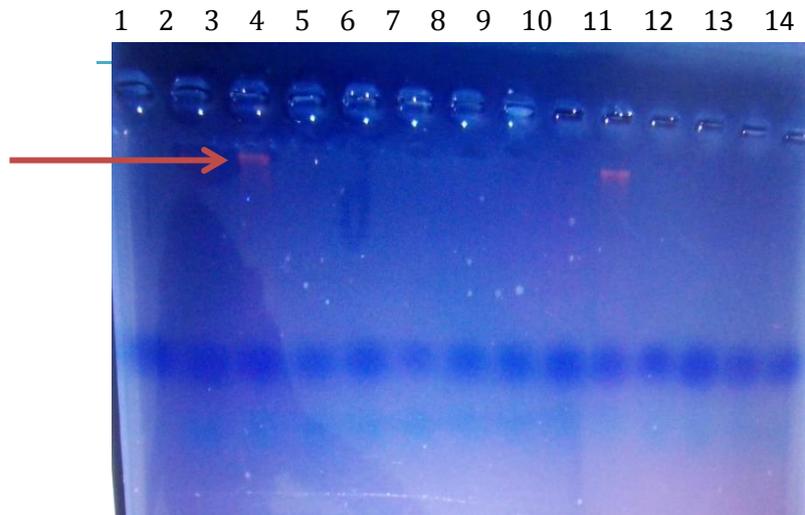
Fuente: Obtenido del trabajo de investigación.

FIGURA N°15 Resultados por la Técnica Cualitativa de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa del 1.5 %.



Dando como resultado presencia de ADN se formaron 3 bandas.

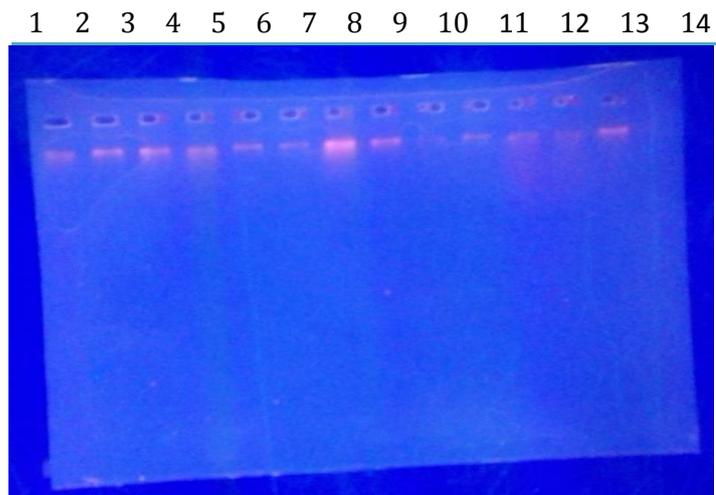
Fuente: Obtenido del trabajo de investigación.



Dando como resultado presencia de ADN se formaron 2 bandas.

Fuente: Obtenido del trabajo de investigación.

FIGURA N°16 Resultados por la observación Técnica Cualitativa de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa del 1.5 % de la plantilla de la extracción por Shock térmico.



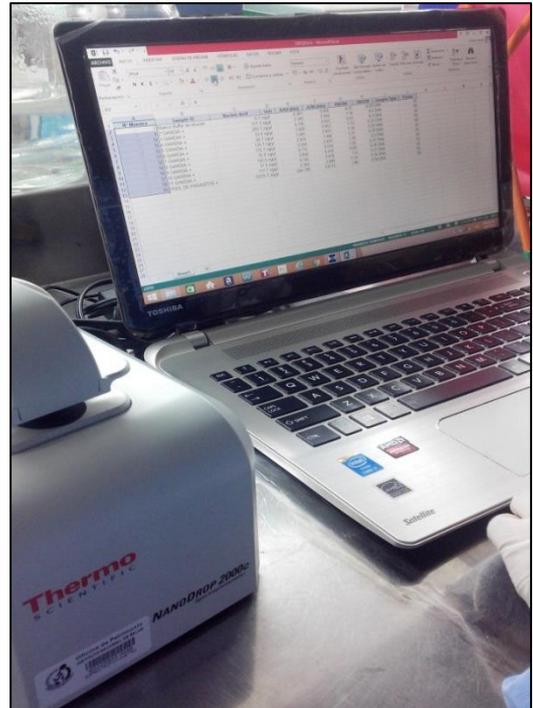
Dando como resultado presencia de ADN se formaron 7 bandas.

Fuente: Obtenido del trabajo de investigación

FIGURA N°17 Lectura del ADN en el Equipo Nano Drop 2000c en el INS.

N° Muestra	Sample ID	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type	Factor
8	Blanco Buffer de elusión	-0.1	ng/ul	-0.001	0.004	-0.27	-0.09	DNA	50
9	2 GIARDIA +	117.3	ng/ul	2.345	2.049	1.14	0.4	DNA	50
19	3 GIARDIA +	209.7	ng/ul	4.195	4.633	0.91	0.3	DNA	50
15	4 GIARDIA +	53.4	ng/ul	1.068	0.953	1.12	0.33	DNA	50
10	5 GIARDIA +	54.1	ng/ul	1.081	0.931	1.16	0.35	DNA	50
11	6 GIARDIA +	130.7	ng/ul	2.614	1.994	1.31	0.39	DNA	50
12	7 GIARDIA +	172.7	ng/ul	3.454	2.491	1.39	0.5	DNA	50
14	8 GIARDIA +	35.8	ng/ul	0.715	0.574	1.25	0.41	DNA	50
16	9 GIARDIA +	192.9	ng/ul	3.858	8.418	0.46	0.38	DNA	50
17	10 GIARDIA +	37.2	ng/ul	0.745	0.618	1.2	0.37	DNA	50
18	11 GIARDIA +	117.7	ng/ul	2.354	2.068	1.14	0.36	DNA	50

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando Microsoft Excel ®.



Determinación de la concentración de ácidos nucleicos, dando como resultado presencia de ADN en las muestras.

Fuente: Obtenido del trabajo de investigación.

DISCUSION

Según Eleuterio Jacinto, Edwin Aponte, Víctor Arrunátegui-Correa (2012). **“Prevalencia de parásitos intestinales en niños de diferentes niveles de educación del distrito de San Marcos, Áncash, Perú”** concluye que la prevalencia de parasitosis intestinal en estudiantes del Distrito de San Marcos, en el departamento de Ancash, Perú, mediante examen directo se encontró uno o más parásitos intestinales en 65,0% de los estudiantes. Predominando los protozoarios sobre los helmintos. Los enteroparásitos patógenos encontrados según su frecuencia fueron: *Giardia lamblia* 23,7%, *Ascaris lumbricoides* 16,9% e *Hymenolepis nana* 9,6%. La frecuencia del enteroparásito no patógeno *Entamoeba coli* fue 31,8%. Conclusiones: Existe un alto índice de parasitismo en la población rural de la sierra de Ancash, lo que estaría en relación con las deficientes condiciones de saneamiento ambiental.

Según lo que se aplicó en el presente trabajo; se hizo mediante examen coproparasitario; método de concentración por sedimentación Ritchie. Encontrándose *Ascaris lumbricoides*, *Entamoeba histolytica* y en mayor porcentaje *Giardia lamblia*, muestras que se usaron para la extracción de ADN. Entre las alternativas diagnósticas y estudio parasitológico de muestras fecales, hay un conjunto de Técnicas Complementarias, que permiten demostrar la presencia de diferentes formas evolutivas de los enteroparásitos: Trofozoitos, quistes, ooquistes, larvas etc. Se señala también la técnica basada en los principios de la biología molecular que, busca brindar apoyo en la obtención de resultados, acortando tiempos de entrega de los mismos, donde es importante mencionar que a pesar de estas ventajas también tienen sus desventajas, dichos métodos no sustituyen, sino que complementan los métodos de diagnóstico tradicional.

Según Rojas Hinostroza Giancarlo (2014). En su trabajo de investigación **“Evaluación de tres primers para la detección molecular de *Giardia intestinalis* en muestras fecales humanas”**. Concluye que el límite de detección para los primers evaluados mostro que a mayor concentración de quistes de *G Intestinalis* no se observó banda, como es el caso de los primers de la beta-giardina con una dilución de 1/1024. Estos solo mostraron bandas a partir de una concentración de 87,3 ng/ µl y 24,1 ng/ µl.

Las muestras amplificadas para la betagiardina revelaron solo 13.3% de positividad, esto tiene relación con los estudios realizados por Rochelle Paul y Col, quienes mostraron que la PCR puede identificar entre 1 a 10 quistes para los genes de beta giardina, por ende sería necesario realizar mayores diluciones para llegar a obtener mejores resultados, lo que permitiría una mejor correlación con otros estudios descritos.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo; en donde se aplica para la detección, observación microscópica como Gold estándar, con el fin de identificar *G.lambli*a, mediante la extracción del ADN de este parásito protozoo, con un kit Gene Jet Genomic DNA Purification y después de realizar el proceso por triplicado para disminuir el porcentaje de error; hacer la amplificación para luego por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y visualización de las bandas mediante GeneRuler 100 bp DNA Ladder, no se obtuvieron los resultados esperados al 100 % esto se concluyó debido a la gran cantidad de inhibidores presentes en las muestras o también siendo un factor las bajas concentraciones de ADN que se obtuvo de la extracción de ADN de las muestras o concentración de los primers utilizados en la preparación del Master Mix. A concentraciones menores de 40 ng/ µl la PCR puede verse inhibida, como también un fallo en la hibridación de los primers provocando dímeros o a la mala fidelidad que pudo cometer la ADN polimerasa durante la amplificación en el termociclador ya que se hizo lectura del ADN en el equipo Nano Drop demostrando que si había ADN en las muestras. No obstante el método de PCR si se llega a una buena estandarización, sería de muy buena aplicación en los laboratorios de Parasitología debido a su rapidez, repetitividad y análisis de muchas muestras a la vez para la detección de este parásito *Giardia lamblia*, contribuyendo a su prevención y tratamiento.

Según Edwin Cardona, Silvia Castañeda, María Elena Álvarez, Jorge Enrique Pérez, Fredy Arvey Rivera Páez, Germán Ariel López Gartner, (2013) "**Comparación de métodos convencionales y moleculares para la detección de giardia lamblia en heces humana**" Concluye que los protozoarios del género *Giardia lamblia*, la detección del parásito, por métodos por concentración y microscopía convencional, presentan limitaciones por su baja sensibilidad e especificidad en el diagnóstico. En procura de mejorar los métodos de diagnóstico, las técnicas moleculares se perfilan como una alternativa promisoría. Para la detección de *Giardia lamblia* en heces se compararon tres métodos diferentes.

Por observación microscópica, análisis por inmunoensayo (ELISA indirecto) y finalmente la amplificación de dos secuencias génicas nucleares por PCR. Se obtuvieron tres muestras positivas por concentración y microscopía convencional, dos por inmunoensayo y 26 por técnicas moleculares.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, en donde se aplica para la detección, observación microscópica, con el fin de identificar *G.lambli*a, sugiriendo que las pruebas diagnósticas rutinarias basadas en microscopía convencional e inmunoensayo, para la detección de este parásito y que esta deficiencia puede ser compensada por medio de la implementación de métodos de diagnóstico molecular basados en PCR, como una estrategia complementaria de apoyo en el diagnóstico de este protozoo.

Adicionalmente, debe tenerse en cuenta que la efectividad de una PCR es también resultado del trabajo con soluciones puras de ácidos nucleicos, con la extracción de ADN por un kit y Extracción de ADN por Shock térmico que se aplicó en el trabajo de investigación, es factible deducir que la sensibilidad y especificidad de la técnica puede verse reducida y puede producir errores. Es por ello que se hizo una observación mediante técnica cualitativa para ver cuanta concentración, cantidad y calidad de ADN hubo en las muestras positivas a *G. lambli*a mediante la corrida electroforetica en gel de agarosa al 1.5% con un tiempo de 30 minutos en la cámara electroforetica y visualización mediante el transiluminador, por este método la estimación se realiza contrastando intensidades de luz entre las muestras, los cuales se realiza visualmente; en los resultados obtenidos se evidencia una sensibilidad de 75% y una especificidad de 46%. Como también se realizó una cuantificación de las muestras, con la ayuda del Equipo Thermo Scientific Nano Drop 2000c dando los resultados de la lectura del ADN en ng/ul.

Según Berta Alicia Borrego Ponce (2009) "***Influencia de factores ambientales y desnutrición en parasitosis intestinales en preescolares de centros municipales de bienestar infantil en ciudad Juárez***" Concluye que el propósito fue evaluar la influencia de diversos factores ambientales y la presencia de desnutrición, en la ocurrencia de parasitosis en niños adscritos a centros de bienestar infantil (CBI) en Ciudad Juárez. Se realizó un estudio transversal, prospectivo, observacional y analítico, en una muestra probabilística (n=53) de niños ≤5 años.

Se calcularon los indicadores de peso (P/E) y talla para la edad (T/E) e índice de masa corporal [peso (kg)/ Talla² (m²)] para la edad (IMC/E), según la OMS. Se colectaron muestras de heces y se realizó el análisis parasitológico por técnicas de observación directa, flotación y tinción comunes.

Los factores ambientales como la condición de vivienda, servicios públicos e higiene personal, así como otros factores socios demográficos y alimentarios fueron evaluados mediante un cuestionario validado. Se encontró una prevalencia de parasitismo del 64%. *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis* y *Áscaris lumbricoides* estuvieron presentes en 79.4, 23.5, 14.7 y 2.9% de las muestras analizadas.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, se realizaron análisis por la técnica convencional por observación directa bajo el microscopio utilizando el método de concentración Ritchie (centrifugación con formol- éter) debido a su bajo costo. Sin embargo la aplicación de herramientas moleculares como es el que se aplicó PCR si bien son costosas, en varias partes del mundo se ha incrementado estas técnicas con el fin de identificar *Giardia* en humanos, en diversos animales y en muestras medioambientales, con miras a prevenir su difusión mejorar el diagnóstico para un tratamiento adecuado y oportuno.

Dentro de los problemas de salud pública que el país debe enfrentar es el parasitismo intestinal, debido a la pobreza y el bajo nivel educativo, en sectores poblacionales donde hay deficiencia de saneamiento ambiental que permite la presencia y expansión del parasitismo intestinal, siendo en el grupo etáreo los de menor edad más común.

CONCLUSIONES

El empleo de método parasitológico de concentración como el método de Ritchie (formol-éter/acetato de etilo), aumentan considerablemente la sensibilidad del examen parasitológico. Se pudo demostrar que la técnica del examen directo es de gran utilidad para la identificación de quistes de *G.lambliá*.

Siendo la Técnica más utilizadas en los Laboratorios de Parasitología, para la identificación o detección de parásitos por concentración la "microscopia". Los métodos moleculares de amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) si bien; es una técnica que permite llevar a cabo la síntesis in vitro de fragmentos de ADN que produce múltiples copias (amplificación) de un mismo fragmento de ADN, presentan algunas dificultades en la identificación de *Giardia lamblia* en muestra de materia fecal, principalmente por la alta presencia de inhibidores de la PCR, la degradación del ADN por nucleasas o la baja concentración de ADN del parásito en la muestra; no deja de ser una técnica que en países extranjeros es muy utilizada .

Hay métodos convencionales como también moleculares en estas las concentraciones adecuadas de ADN de las muestras y reactivos utilizadas en el Master Mix son fundamentales, para que se refleje una banda en el gel de agarosa que demuestra presencia del parásito, mientras que las concentraciones muy bajas no permiten evidenciar bien la presencia de este, pero diversos factores pueden alterar su integridad, degradándolo en fragmentos cada vez más pequeños. Tener en cuenta cuando se trabaja con esta técnica que al ser muy sensible, es de gran importancia evitar contaminaciones porque se podría obtener falsos positivos.

La parasitosis intestinal entero patógena, representa un importante problema de salud pública y ambiental en los Países en vías de desarrollo ya que contribuyen a la morbilidad cuando están asociados a la mala nutrición y saneamiento ambiental.

RECOMENDACIONES

No se recomienda almacenar las muestras de heces por largos periodos de tiempo, debiéndose realizar el análisis de PCR o por microscopia óptica de inmediato. Esto permitiría evitar el deterioro del material genómico de *G.lambli*a y evitar falsos negativos y/o positivos.

Se recomienda realizar el procedimiento siempre por duplicado triplicado para disminuir el porcentaje de error.

Es necesario realizar los controles respectivos durante cada procedimiento. Los tubos Eppendorf y puntas desechables para micro pipetas deben estar estériles para evitar contaminación cruzada con residuos de otro ADN.

De ser posible trabajar en una estación de PCR o en una cámara de flujo laminar equipada con sistema de luz UV para evitar contaminación. Los tubos y puntas deben estar estériles para evitar contaminación cruzada con residuos de otro ADN y la degradación por parte de las DNAsas.

Trabajar con elementos de protección personal indumentaria; mandil de laboratorio, gorro, guantes de nitrilo, mascarilla y lentes con protección UV.

El bromuro de etidio es un reactivo mutagénico cancerígeno, por lo que se deberá usar los guantes en todo momento y manejarlo con cuidados extremos.

Si es posible contar con más viabilidad de recursos y equipos para la Técnica PCR convencional para continuar la investigación hacerlo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adam RD. 2001. Biology of Giardia lamblia. Clin Microbiol Rev. 14: 447-475.
2. Adams PJ, Monis PT, Elliot AD, Thompson RCA. 2004. Cyst morphology and sequence analysis of the small subunit rDNA and ef1 identifies a novel Giardia genotype in a quenda (Isodon obesulus) from Western Australia. Infect Genet Evol 4: 365-370.
3. Departments of Medicine and of Microbiology and Immunology, University of Arizona College. 2001. Biology of Giardia lamblia. Clinical Microbiology Reviews 14 (3): 447-475.
4. Giancarlo Eduardo Rojas Hinojosa. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Medicina E. A. P. de tecnología médica “Evaluación de tres primers para la detección molecular de Giardia intestinalis en muestras fecales humanas” 2014.
5. Eleuterio Jacinto, Edwin Aponte, Víctor Arrunátegui-Correa. Prevalencia de parásitos intestinales en niños de diferentes Niveles de Educación del Distrito de San Marcos, Ancash, Perú. 2012.
6. María Jesús Alcaraz Soriano Servicio de Microbiología. Giardia y Giardiosis Hospital Universitario Doctor Peset Aleixandre. Valencia.
7. Edwin Cardona, Silvia Castañeda, María Elena Álvarez, Jorge Enrique Pérez, Fredy Arvey Rivera Páez, Germán Ariel López Gartner. Comparación de Métodos Convencionales y Moleculares para la detección de Giardia lamblia en heces humanas. Recibido el 30 de mayo de 2013 y aprobado el 18 de septiembre de 2013.
8. Nora Beatriz Molina. (2009) Epidemiología Molecular de Giardia lamblia en comunidades urbanas y rurales de Buenos Aires y Mendoza, Argentina. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP.

9. Bertha Alicia Borrego Ponce. Influencia de Factores Ambientales y Desnutrición en Parasitosis Intestinales en preescolares de Centros Municipales de Bienestar Infantil en Ciudad Juárez. Instituto de Ciencias Biomédicas Universidad Autónoma de Ciudad Juárez 2009.
10. Oscar Vásquez Tsuji, Teresita Campos Rivera. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. Facultad Mexicana de Medicina, Universidad La Salle 2009.
11. Fidel Ángel Núñez Fernández, Carlos M. Finlay Villalbilla, Jorge Sarracent Pérez. (2004). Estudio de factores asociados con la reinfección por Giardia lamblia en niños de círculos infantiles. Instituto de medicina tropical "pedro kouri". Departamento de Parasitología. La Habana.
12. Sydney Aguilera Gonzales. Prevalencia de Giardia lamblia en individuos de la comuna de Pelarco, según el abastecimiento de agua. Talca- Chile 2005.
13. Thompson RCA.2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of giardia and giardiasis. Vet Parasitol 126:15-35.
14. Teresa Uribarren Berrueta. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. 2016.
15. Meredith L. Carpenter, Zoe June Assaf, Stéphane Gourguechon, and W. Zacheus Cande. Nuclear inheritance and genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite Giardia intestinalis. J Cell Sci. 2012.
16. Mullis, Kary. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American 262 (4): 56-61, 64-5. 1990.
17. Edisson Castillo. Electroforesis en gel de agarosa para determinar cantidad y calidad de ADN en Anadara tuberculosa. Universidad de Nariño. 2013.
18. Gonzalo Cañarte. Reacción en cadena de polimerasa y ADN.Academia.edu. [Sede web] acceso 2016. Disponible en: <http://www.cultex.com/inf/otros/soluciones/DNArecombinante/Tecnica%20DNA>.

19. Coleman, WB y Tsongalis, GJ (2006). Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian. Humana Press. ISBN 1-58829-356-4.pgs. 47-56 y 65-74.
20. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre elaboración. Laboratorio de Enteroparásitos División de Parasitología Centro Nacional de Salud Pública Instituto Nacional de Salud. Serie de Normas Técnicas N°37 Lima – 2003.
http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud_publica/nor_tec/37.pdf.
21. Reglamento sobre Condiciones Sanitarias y Ambientales Básicas en los lugares de trabajo. Regido por el Decreto 594, del 1999, actualizado el 10 de noviembre del 2003, dictamina en el Título IV. Párrafo III. N° 7.3 lo siguiente con respecto a la luz UV.

FUENTES DE INTERNET:

- Ver en YouTube: <http://www.youtube.com/watch?v=V9PtQlp-e7g>

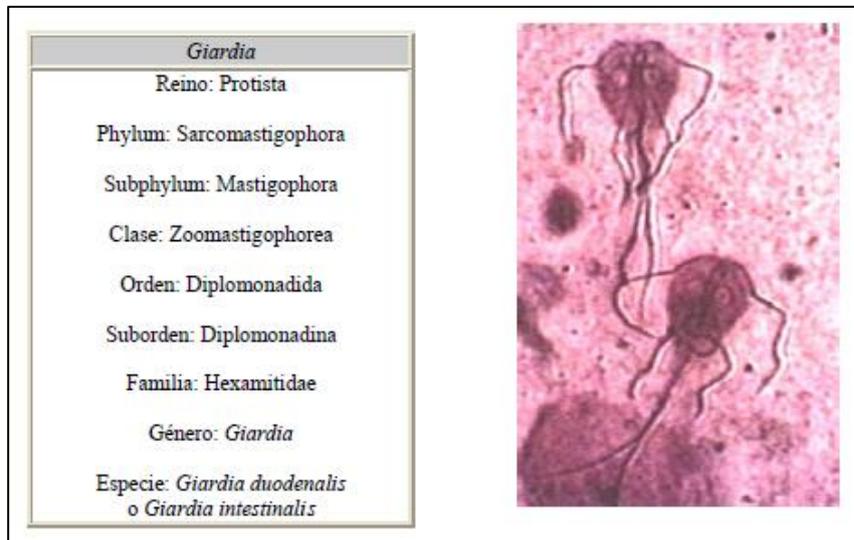
ANEXOS

MATRIZ DE CONSISTENCIA
TÍTULO DE TESIS: IDENTIFICACION DE *Giardia lamblia* POR LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN MUESTRAS DE HECES

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACION	METODO Y DISEÑO DE INVESTIGACION	VARIABLES	POBLACION Y MUESTRA
¿Se podría identificar <i>Giardia lamblia</i> por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en muestras de heces en niños de 3 a 5 años?	Identificar <i>Giardia lamblia</i> por la técnica de PCR en muestras de heces en niños de 3 a 5 años.	Se podría identificar <i>Giardia lamblia</i> por la Técnica de reacción en Cadena de Polimerasa en muestras de heces en niños de 3 a 5 años.	TIPO DE INVESTIGACION Descriptivo. Correlacional. Observacional.	METODO DE INVESTIGACION Deductivo.	VARIABLE INDEPENDIENTE(Y) Y: Presencia de <i>Giardia lamblia</i> . INDICADORES Y1: Concentración mínima de detección. Y2: Diseño de los primers.	POBLACION : Muestras fecales de niños de 3 a 5 años positivas a <i>Giardia lamblia</i> .
PROBLEMA SECUNDARIOS ¿Sería sensible la técnica de PCR para identificación de <i>Giardia lamblia</i> ? ¿Sería específica la técnica de PCR para identificación de <i>Giardia lamblia</i> ?	OBJETIVOS ESPECÍFICOS Determinar la sensibilidad de la técnica de PCR para <i>Giardia lamblia</i> . Determinar la especificidad de la técnica de PCR para <i>Giardia lamblia</i> .	HIPÓTESIS SECUNDARIA La sensibilidad de la determinación de la técnica de PCR para <i>Giardia lamblia</i> será significativa. La especificidad de la determinación de la técnica de PCR para <i>Giardia lamblia</i> será significativa.	NIVEL DE INVESTIGACION Aplicativo.	DISEÑO DE INVESTIGACION No experimental.	VARIABLE DEPENDIENTE(X) X: Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa. INDICADORES X1: La sensibilidad de determinación por la técnica de PCR para <i>Giardia lamblia</i> sería de un 80%. X2: La especificidad de determinación por la técnica de PCR para <i>Giardia lamblia</i> sería de un 100%.	MUESTRA: n= 30 muestras de heces.

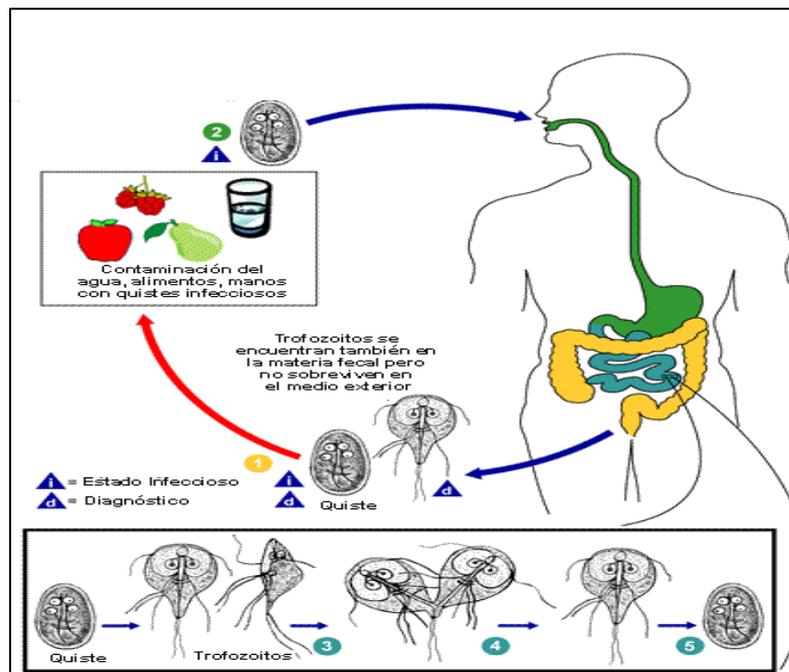
1. ANEXO FIGURAS:

FIGURA N°18 Características de *Giardia lamblia*.



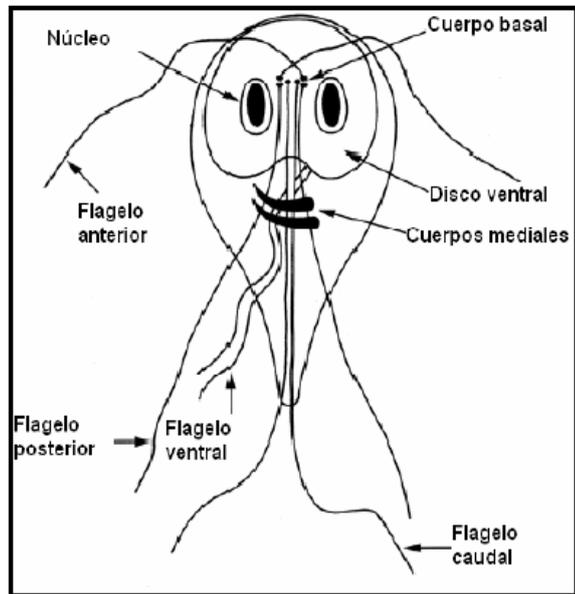
Fuente: Taxonomía de giardia lamblia (rivera et, al 2002)

FIGURA N°19 Ciclo biológico de *Giardia lamblia*.



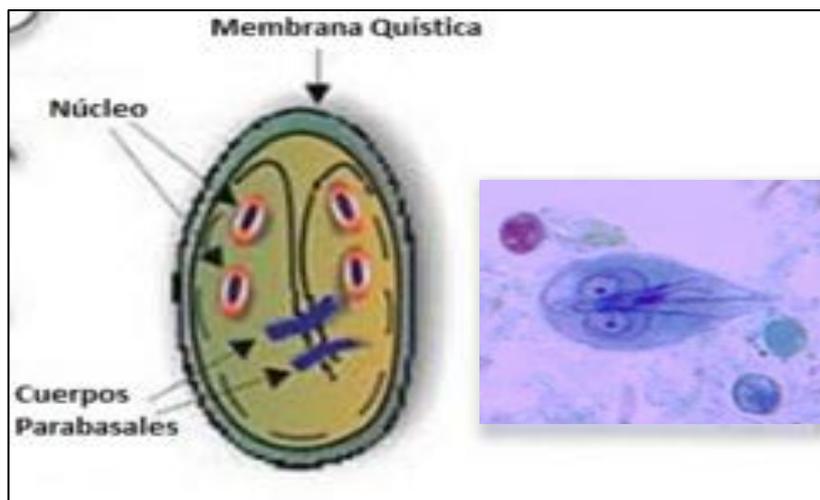
Fuente: http://fladegiardiasis.blogspot.pe/2013_08_01_archive.html

FIGURA N°20 Estructura del Trofozoito de *G lamblia*.



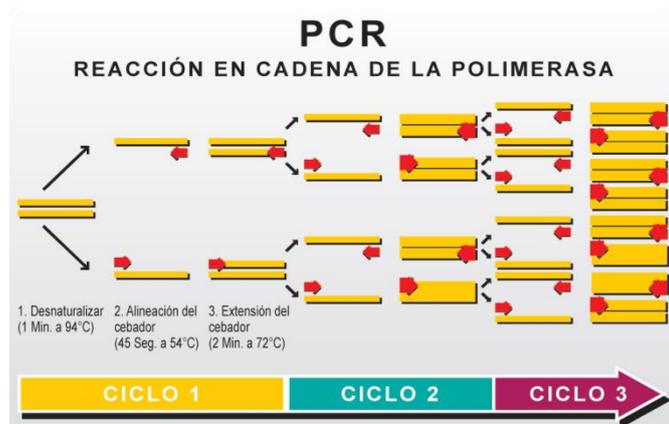
Fuente: Trofozoito de *G lamblia*. Extraído de Faubert (2000).

FIGURA N°21 Microfotografías del quiste de *Giardia lamblia*.



Fuente: http://fladegiardiasis.blogspot.pe/2013_08_01_archive.html

FIGURA Nº22 Reacción en Cadena de la Polimerasa.



Fuente: <http://www.fitolab.com.mx/fitolabSiteRecs/esquemaPCR.jpg>

2. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD EN EL AMBIENTE DE TRABAJO

Antes de realizar el procedimiento de trabajo, se verifico con cumplir con las medidas establecidas de Normas de Bioseguridad.

Campo de aplicación:

- Manipular con guantes la obtención, recepción y tratamiento de las muestras frescas.
- Vestir siempre mandil dentro del laboratorio y quitárselo para transitar por otras áreas.

Obtención de la muestra: Para observar los trofozoitos, quistes u oquistes de los protozoarios, así como las larvas y huevos de helmintos, se debe usar microscopio, es importante obtener una buena muestra fecal, así como la conservación óptima del espécimen.

Condiciones específicas: Las muestras deben mantenerse en un ambiente fresco y lejos de luz solar, se deben evitar las temperaturas extremas o el desecamiento, deben contener cantidades óptimas y estar en frascos o contenedores rotulados y con soluciones fijador conservador.

Control de calidad: Preparados extendidos finos de heces que contengan estadios de protozoos de determinada especie previamente identificada o de cultivos de protozoos; una coloración bien hecha depende de una fijación correcta y destaca claramente las características del núcleo y las inclusiones citoplasmáticas.

Guardar toda muestra de heces y toda lamina positiva, debidamente identificada, para referencia y control.

Neutralización y eliminación del material biológico: En caso de derrames de agarosa, tampón de electroforesis, muestras, colorantes etc. Eliminar en el contenedor de la fracción inorgánica. Lavar con agua y lejía las superficies de derrame. Las pipetas, puntas de pipeta, etc; todos los plásticos se eliminan en el contenedor de recogida selectiva del plástico.

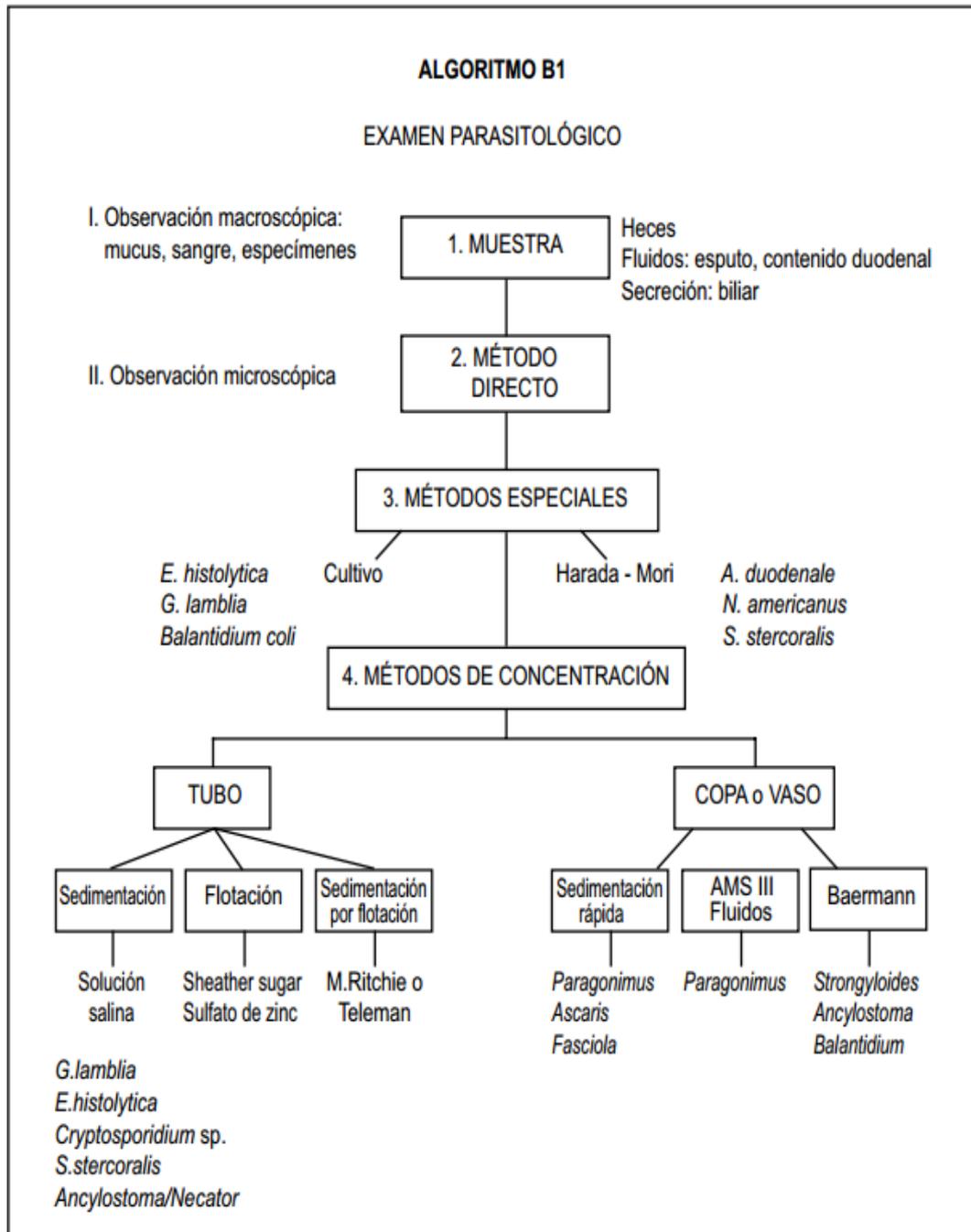
3. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LOS PARÁSITOS INTESTINALES DEL HOMBRE. SERIE DE NORMAS. TÉCNICAS N°37. INS. LIMA-2003.

TABLA N°4 Condiciones del envío de la muestra según el tipo y tiempo de demora en llegar al laboratorio para el diagnóstico parasitológico.

TIPO DE MUESTRA	TIEMPO QUE DEMORA EN LLEGAR AL LABORATORIO		AGENTES PARASITARIOS
	< 24 horas	≥ 24 horas	
Helmintos	T°ambiente	Nematodos en alcohol 70 %, cestodos y trematodos en formol 10%.	Ascaris, Trichuris, Taenia, Paragonimus, Fasciola y otros.
Suero	4°C	Hielo seco o congelar	E. Histolytica, Giardia, Paragonimus, Fasciola y otros.
Heces	T° ambiente	PAF, PVA, Formalina 10%, Cary Blair, Bicromato de potasio al 2,5 % MIF.	E.histolytica, Giardia, Cryptosporidium, Enterocytozoon y otros.

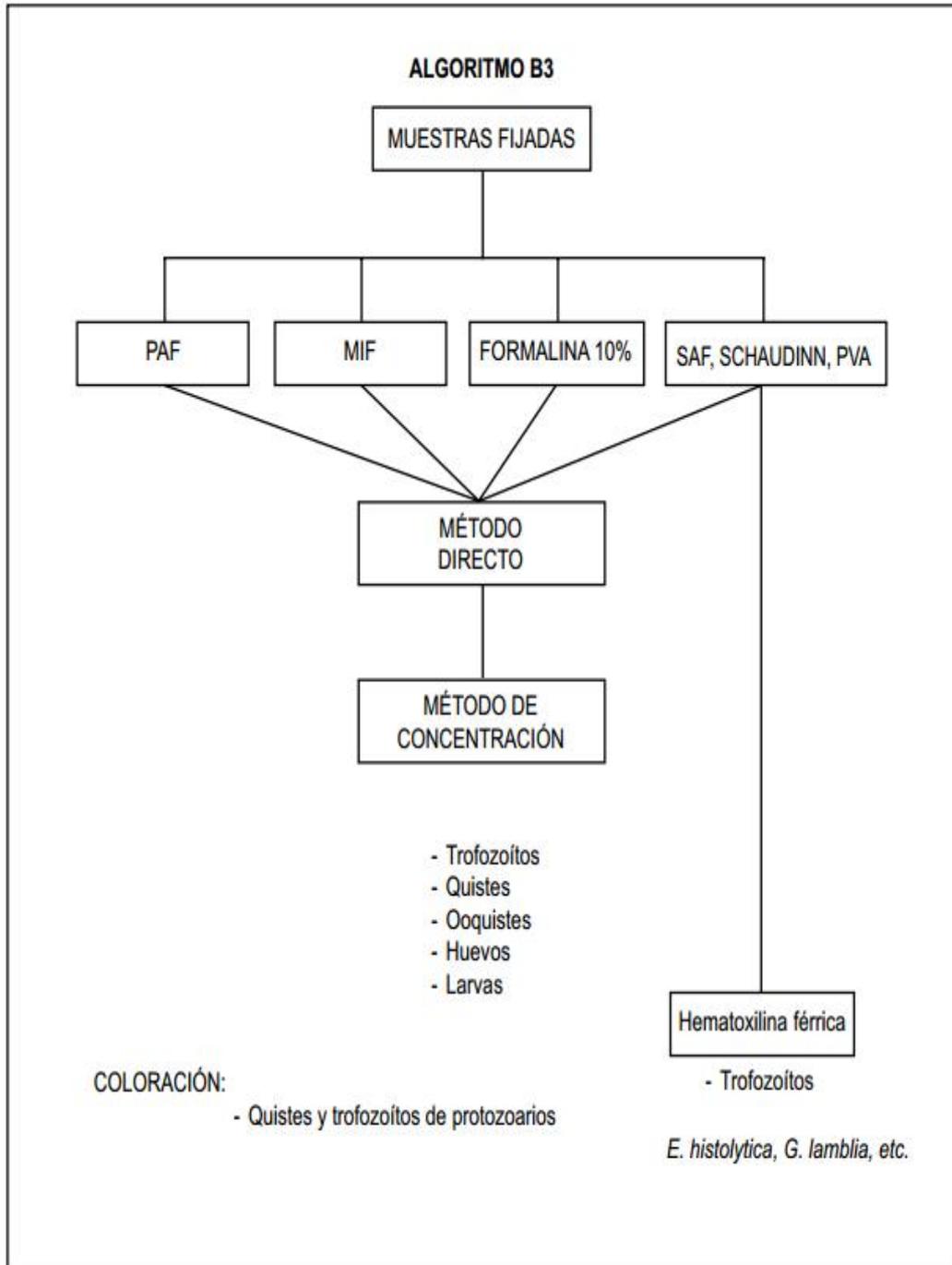
Fuente: Condiciones del envío de la muestra al laboratorio para el diagnóstico parasitológico ⁽²⁰⁾

TABLA N°5 Algoritmos para el examen parasitológico.



Fuente: Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre ⁽²⁰⁾

TABLA N°6 Muestras de heces para el examen parasitológico con fijador.



Fuente: Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre ⁽²⁰⁾

FIGURA N°23 Observación al microscopio con aumento de 40x y 100x.



Fuente: Obtenido del trabajo de investigación.

4. REGLAMENTO SOBRE CONDICIONES SANITARIAS Y AMBIENTALES BÁSICAS EN LOS LUGARES DE TRABAJO. REGIDO POR EL DECRETO 594, DEL 1999, ACTUALIZADO EL 10 DE NOVIEMBRE DEL 2003, DICTAMINA EN EL TÍTULO IV. PÁRRAFO III. N° 7.3 LO SIGUIENTE CON RESPECTO A LA LUZ UV.

Artículo 109: El limite permisible máximo para exposición ocupacional a radiaciones ultravioleta, dependerá de la región del espectro de acuerdo a la siguiente tabla:

TABLA N°7 Límites permisibles para piel y ojos (Longitud de onda de 320 nm a 400 nm)

TIEMPO DE EXPOSICIÓN	DENSIDAD DE ENERGÍA O DE POTENCIA
Menor de 16 minutos	1J/cm ²
Mayor de 16 minutos	1mW/cm ²

Fuente: Reglamento sobre condiciones sanitarias y ambientales básicas en los lugares de trabajo ⁽²¹⁾

5. ANEXO FOTOGRAFÍAS:

Literatura de los Primers usados en el trabajo de investigación.



BIOSEARCH
TECHNOLOGIES

CERTIFICATE OF ANALYSIS
Custom Oligonucleotide Synthesis



SS380208-06

Customer: Gen Lab/J. Ramirez

Purchase Order: BIO-16-001

Sales Order: 166340

Sequence Name (Customer Supplied): Beta-giardina-1F

Sequence: ✓ 5' d AGATGATCAAGGACGCCATC 3'

Reference Number:	SS380208-06	Scale:	50 nmol
Oligo Type or Function:	Custom Oligonucleotide	Purification:	Salt Free
This sequence contains:	7 A's 5 C's	Status of Trityl Group:	Off
	5 G's 3 Ts		
5' Modification:	λ max: (± 5 nm)		
3' Modification:	λ max: (± 5 nm)		

The following physical parameters apply:

Oligo Molecular Weight: (No Counter-ions)	6115.87	Total OD260:	9.52
		nmol/OD260:	4.89
Oligo Molecular Weight: (Fully Protonated)	6135.06	Total nmol:	46.60
		Micrograms/OD260:	39.44
Oligo Molecular Weight: (for Et3NH salt)	8057.67	Total Micrograms:	375.49
ε₂₆₀: (Extinction Coefficient)	204210 M ⁻¹ cm ⁻¹	Concentration:	Shipped Dry

Released by: Cameron Ferguson

Date: 2/1/2016

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Data for certain oligonucleotide modifications are based on estimated values and are subject to change.

2199 South McDowell Blvd, Petaluma, CA 94954-6904 USA
415.883.8400 | 800.GENOME.1 | 415.883.8488 (fax)

www.biosearchoctech.com

Fotografía 1. Secuencia de beta giardina 1F.



SS380208-07

Customer: Gen Lab/J. Ramirez

Purchase Order: BIO-16-001

Sales Order: 166340

Sequence Name (Customer Supplied): Beta-giardina-1R

Sequence: 5' d GTGCTTTGTGACCATCGAGA 3'

Reference Number:	SS380208-07	Scale:	50 nmol
Oligo Type or Function:	Custom Oligonucleotide	Purification:	Salt Free
This sequence contains:	4 A's	4 C's	Status of Trityl Group: Off
	6 G's	6 T's	
5' Modification:	λ max: (± 5 nm)		
3' Modification:	λ max: (± 5 nm)		

The following physical parameters apply:

Oligo Molecular Weight: (No Counter-ions)	6128.87	Total OD260:	7.88
		nmol/OD260:	5.25
Oligo Molecular Weight: (Fully Protonated)	6148.06	Total nmol:	41.39
		Micrograms/OD260:	42.39
Oligo Molecular Weight: (for Et3NH salt)	8070.67	Total Micrograms:	334.05
ε ₂₆₀ : (Extinction Coefficient)	190314 M ⁻¹ cm ⁻¹	Concentration:	Shipped Dry

Released by: Cameron Ferguson
Date: 2/1/2016

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Data for certain oligonucleotide modifications are based on estimated values and are subject to change.

Fotografía 2. Secuencia de beta giardina 1R.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Parasito: Es un organismo que vive sobre un organismo huésped o en su interior y se alimenta a expensas del huésped.

Protozoos: Organismos unicelulares microscópicos de vida libre o naturaleza parasitaria, la transmisión de protozoos que viven en el intestino humano generalmente ocurre por la vía fecal-oral.

Trofozoito: Forma vegetativa, libre y en movimiento de los protozoos.

Quiste: Forma de resistencia de los protozoos, los cuales se rodean de una membrana dura e impermeable.

Fijador PVA: Alcohol polivinílico, para conservar los parásitos en muestras fecales.

Ácido desoxirribonucleico: Es una secuencia de repetición de nucleótidos y cada nucleótido contiene tres partes. Formada por una unidad de azúcar y fosfato que se repite y cada azúcar tiene una base nitrogenada. Hay 4 bases nitrogenadas guanina, citosina, adenina y timina.

Sensibilidad: Se refiere a la cantidad mínima de ADN necesaria para que se produzca la amplificación, es decir, para obtener una banda.

Especificidad: Se refiere a la obtención de un solo producto amplificado. Viene determinada por los oligos y la especificidad con la que se unen al ADN molde. De esta forma, si los oligos tienen más de un sitio al que se pueden unir aparecerá más de un producto amplificado.

Eficiencia: Se refiere a la amplificación máxima que se puede obtener en un número determinado de ciclos.

Fidelidad: Se refiere a los errores que comete la ADN polimerasa durante la amplificación. Este concepto es de especial importancia en la secuenciación. Una buena fidelidad permite evitar falsos positivos y/o negativos.

Agarosa: Es un producto natural que forma una matriz inerte y no tóxica que supone una herramienta indispensable en gran cantidad de técnicas de biología molecular. Su uso más extendido es para

construir geles que permitan separar moléculas de ADN mediante electroforesis.

Buffer Loading 6x: Thermo Scientific 6X ADN colorante de carga se utiliza para preparar los marcadores de ADN y las muestras para la carga en agarosa o geles de agarosa.

Contiene dos colorantes diferentes (azul de bromofenol y xileno cianol FF) para el seguimiento visual de la migración del ADN durante la electroforesis. La presencia de glicerol se asegura de que el ADN de la escalera y de la muestra forma una capa en la parte inferior del pozo.

Concentración de Mg^{2+} . El aumento de la $[Mg^{2+}]$ tiene el efecto neto de disminuir la severidad de la unión de los primers y, las bajas $[Mg^{2+}]$ pueden originar una pobre eficiencia de la reacción. Puesto que las soluciones de $MgCl_2$ tienden a precipitar después de los ciclos de congelación-descongelación.

Desoxinucleótidos Trifosfato (dNTPs). La concentración óptima de dNTPs debe determinarse empíricamente y conjuntamente con la $[Mg^{2+}]$. De forma general, la $[dNTPs]$ varía entre 20 y 200mM, teniendo en cuenta que concentraciones demasiado elevadas pueden originar una menor especificidad y concentraciones demasiado bajas pueden provocar un bajo rendimiento de los productos de amplificación.

Primers. Un partidor, iniciador o primer es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Y a partir de ellos la DNA polimerasa utilizada inicia la polimeración en dirección 5' – 3'.

Concentración de los primers. Si la concentración de primers es baja puede ocasionar un pobre rendimiento de la reacción. Si es demasiado alta puede ocasionar una disminución de la especificidad que se manifiesta por un incremento en los productos de amplificación inespecíficos; además, puede favorecer la formación de dímeros de primers.

Interacciones primer-primer. El término "primer-dimer" o "dímeros de primers" se refieren a la acumulación de productos pequeños de PCR y que miden aproximadamente igual que dos primers unidos uno a continuación de otro. Incluso en reacciones muy optimizadas, se

pueden obtener pequeñas cantidades de estos artefactos, pero en elevadas cantidades pueden disminuir la sensibilidad de la reacción al competir por los componentes de la misma.

Dímeros: De primers son un obstáculo frustrante para encontrar mientras se ejecutan reacciones en cadena de polimerasa o PCR.

Bromuro de etidio. Es un agente mutagénico de efecto acumulativo, es nocivo por ingestión, tóxico por inhalación e irritante para los ojos, la piel y las vías respiratorias.