

# Diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas y parasitarias\*

## I. Introducción

Salvador Said-Fernández\*\*

Las enfermedades infecciosas y parasitarias siguen siendo uno de los problemas más importantes de salud pública en los países en desarrollo. Algunas de ellas, como la tuberculosis y el SIDA, muestran una franca tendencia a incrementarse a nivel mundial, incluso en las naciones industrializadas.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, esta preocupante situación podría mejorarse notablemente, si a su vez se mejorasen e incrementasen los programas oficiales de vacunación. Además se requieren permanentemente de medicamentos y vacunas más efectivos.

Sin embargo, todo lo anterior no es suficiente: es un hecho bien aceptado que todos los recursos tecnológicos para el control de las enfermedades infecciosas deben ser usados adecuada y racionalmente. El surgimiento de cepas resistentes a múltiples sustancias, por ejemplo, es el resultado del abuso de antibióticos. Ello se debe, al menos en parte, a la automedicación y a la prescripción médica inadecuada.

Con cierta frecuencia, la falta de un tratamiento específico se debe a la dificultad que enfrenta el médico clínico para establecer un diagnóstico preciso y oportuno.

Los métodos de diagnóstico juegan un papel determinante en esta tarea. Se dispone ahora de métodos y biorreactivos de calidad muy superior a la de los clásicos; sin embargo, permiten identificar con mucha mayor precisión y oportunidad a los agentes causales de una gran cantidad de enfer-

medades y la lista de ellas se incrementa constantemente.

Ahora se dispone de dos tipos de moléculas que tienen la propiedad de unirse específicamente a otras moléculas del organismo invasor o cuya producción se indujo en el organismo del paciente por efecto del agente infeccioso. Me refiero, a los oligonucleótidos y a los anticuerpos monoclonales y antígenos puros.

Los oligonucleótidos se usan como sondas para hibridarlas con el DNA o RNA del agente infeccioso. Estos son específicos de género o de especie. Este principio es el fundamento de todas las técnicas de la biología molecular que se usan para el diagnóstico y la razón de su ampliamente reconocida especificidad. Una vez lograda la hibridación de la sonda con los ácidos nucleicos de los agentes infecciosos, se puede revelar directamente la presencia de los híbridos, amplificar millones de veces los oligonucleótidos portadores de señales radiactivas o fluorescentes, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o identificar *in situ* al agente infeccioso, mediante la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH), por sus siglas en inglés. Esto que se consigue en unas horas, detectando hasta una sola bacteria o parásito, confirmando a estas técnicas su rapidez y sensibilidad, respectivamente.

Las proteínas son otro tipo de moléculas que se utilizan para el diagnóstico, éstas son proteínas aisladas de los agentes infecciosos y anticuerpos circulantes cuya síntesis se induce en el organis-

Presentado el 14 de junio de 1995

\*\* Académico numerario.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Salvador Said Fernández, Programa conjunto ANMCON-VESTAV, Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, Admon. Correos 4, Apdo 20, Col. Independencia, 64720 Monterrey, N.L. (83)44 41 16.

mo por efecto de estos antígenos. Estas moléculas para su uso en técnicas clásicas de inmunoprecipitación o métodos modernos, como inmunotransferencia, agregan una más a nuestra lista de ventajas de los métodos modernos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas o parasitarias: no se requiere el aislamiento de los agentes causales, sólo una pequeña muestra de sangre.

De acuerdo con lo anterior, prácticamente todas las enfermedades infecciosas y parasitarias pueden ser diagnosticadas al menos con uno de los métodos antes mencionados, con las adecuaciones que cada caso requiera.

En este simposio hemos querido ofrecer a ustedes un panorama general sobre este tema, con ejemplos de las técnicas que existen para el diagnóstico molecular de enfermedades producidas por virus, bacterias y protozoarios. Hablaremos específicamente de la identificación de papilomavirus, una de las causas de cáncer cervicouterino, bacterias pertenecientes al género *Brucella*,

responsables de graves infecciones en el hombre y severas pérdidas económicas en la industria pecuaria, así como de dos protozoarios, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*, cuya importancia médica es ampliamente conocida.

Deseo expresar mi agradecimiento a los miembros de la mesa directiva por la oportunidad y el honor de mostrar a ustedes nuestros resultados dentro del programa académico de la Academia Nacional de Medicina y a las autoridades del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados, mi alma mater, por brindarnos la ocasión de compartir y disfrutar de una jornada plena de estimulantes actividades, durante la celebración de nuestra reunión conjunta. Agradezco cumplidamente a los distinguidos investigadores, M. en C. Carlos Leal Garza, Dr. Hugo Barrera Saldaña y Dra. Guadalupe Ortega Pierres, sus valiosas contribuciones que seguramente enriquecerán esta sesión con su experiencia y conocimientos.

## II. Detección molecular del virus del papiloma humano en mujeres con cáncer cervicouterino

Carlos H. Leal-Garza\*, Elva I. Cortés-Gutiérrez\*

Los virus son organismos que pueden causar una gran variedad de infecciones y pueden sobrevivir solamente dentro de las células vivas. Hay una diversidad de tipos, pero todos ellos compartiendo características comunes: están formados de material genético (ADN o ARN) y este material está protegido por una cápside protéica que lo reviste. Se han identificado varias familias de virus sobre la base de su estructura, composición química y por sus similitudes en su contenido genético.

Un virus que puede ser transmitido a su hospedero de varias formas: inhalado, tragado o transmitido a través de las relaciones sexuales y formas menos comunes tales como penetrar a través de la

piel o por inoculación directa en sangre, pero una vez dentro de la célula, el virus puede integrar su material genético a la célula hospedera, produciendo cambios que permiten a ellos reproducirse y causar una enfermedad.

Se ha estimado que un buen porcentaje (5 al 10%) de todos los cánceres en la población, están asociados con algún tipo de virus, y que algunos de ellos contribuyen al cambio de una célula normal en una cancerosa, conociéndoseles a este grupo como virus oncogénicos. En algunos casos pueden actuar directamente sobre la célula causándole pérdida en la habilidad de control de crecimiento, por lo que ésta continúa dividiéndose, formando masas

\*Centro de Investigación Biomédica del Noroeste.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Carlos H. Leal Garza, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México. Admon. Correos 4, Independencia, 64720 Monterrey, NL.

de tejido anormal (tumores). En otros casos los virus pueden actuar directamente dañando células del sistema inmune y logrando que el organismo sea incapaz de mantener la división celular normal.

Anivel mundial, cerca de 500 mil nuevos casos de carcinoma invasor del cuello uterino son diagnosticados anualmente, y en países subdesarrollados es la enfermedad neoplásica más frecuente y responsable aproximadamente del 25% de todos los casos de cáncer que se presentan en el sexo femenino.

La lesión precursora del Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu) es la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) dependiendo del grado de anormalidad celular son clasificados como NIC grado I (displasia leve), NIC grado II (displasia moderada), y NIC III (displasia severa o carcinoma *in situ*) y cuando las células cancerosas epiteliales invaden tejido subyacente se le denomina cáncer invasor.<sup>2</sup>

El tiempo de evolución entre NIC I hasta llegar a carcinoma invasor es de 10 a 20 años, pero hay lesiones precursoras que reversionen o regresan espontáneamente a su estado normal o pueden permanecer sin modificarse durante casi toda la vida.

En diversos estudios clínicos y epidemiológicos se ha mostrado que el virus del papiloma humano, principalmente el transmitido por vía sexual, está involucrado en una gran proporción de los CaCu, así también se le ha detectado en las lesiones precursoras NIC I, II y III y del condiloma del cérvix.<sup>3,4</sup>

Los papilomavirus humanos (VPH) son un grupo de más de 70 tipos de virus y su nombre proviene porque ellos son causantes de las verrugas o papilomas que son tumores benignos. Diferentes tipos de VPH causan las verrugas comunes que crecen en manos y pies, así como los que se desarrollan en boca y áreas genitales. Algunos VPH genitales, transmitidos sexualmente han sido asociados a procesos neoplásicos tanto en mujeres como en hombres.

Los VPH no son los únicos virus que se les ha implicado en el CaCu, ya que se ha asociado el virus del herpes simple tipo 2; sin embargo, existe evidencia de que los VPH son un agente más serio de factor de riesgo para el CaCu que el herpes.<sup>5</sup>

El genoma de los VPH está constituido de ADN doble cadena, circular en su forma y posee aproximadamente 8 mil pares de bases, la estructura entre ellos es similar con una homología de se-

cuencia que va del margen de 45% a una homología alta del 85%. En ellos se han identificado marcos de lectura abierta (ORF), los cuales están organizados en regiones de expresión temprana (E) que codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), transcripción (E2) y la transformación celular (E6 y E7) y las regiones de expresión tardía (L) que codifican para proteínas de la cápside (L1 y L2).<sup>6</sup>

De los tipos diferentes de VPH que se conocen hay los llamados de "bajo riesgo", es decir, aquellos que causan papilomas o verrugas alrededor de los genitales y el ano tanto en hombres como en mujeres y son asociados con los tipos números 6 y 11, ya que se ha observado que raramente desarrollan cáncer. Otros conocidos como virus de "alto riesgo" han sido asociados con la aparición de neoplasias, y aquí se incluyen principalmente los tipos números 16, 18, 31, 33, 35 y otros que presentan altos índices de asociación con el NIC y con carcinoma *in situ* o invasor en un 90%, de éstos del 50 al 90% corresponden al tipo 16 y 18, y de esos dos el primero es más frecuente.

Han causado gran interés los recientes estudios que indican que la proteína celular p53 es capaz de unirse a la proteína E6 principalmente en el virus VPH tipo 16.<sup>7</sup> La asociación de p53 con la carcinogénesis humana está empezando a establecerse, el gen que codifica para la fosfoproteína nuclear p53 ha sido localizado en el cromosoma 17 en su región p13. Este gen fue originalmente considerado como un oncogene, pero ahora se cree que tiene propiedades de un gen supresor de tumores. Mutaciones en él representan las anomalías genéticas más comunes observadas en tumores, tales mutaciones causan pérdida de la función supresora.<sup>8</sup>

Hay funciones que apoyan la teoría de que la proteína p53 se une a la proteína E6 de los VPH tipos 16/18 en el citoplasma celular, y de este modo previene la función suresora del tumor en el núcleo.<sup>9</sup>

Como dato interesante podemos mencionar que pocos estudios cromosómicos han sido hechos en el CaCu, debido a la dificultad para obtener preparaciones cromosómicas adecuadas en tumores sólidos. Anormalidades en la estructura de los cromosomas 1, 4, 5 y 11 son comunes, pero además se han observado anomalías numéricas en estructura.<sup>10-12</sup>

La infección por tipos definidos de VPH no es suficiente para la producción del CaCu, algunas observaciones apoyan lo anterior, ya que el progreso a cáncer es una rara consecuencia de la infección por VPH por sí sola, además, el período latente entre la infección y el desarrollo del proceso neoplásico puede estar en el orden de 20 hasta los 50 años,<sup>13</sup> hay estudios epidemiológicos que han implicado como factores de riesgo al hábito de fumar, así como al uso de los anticonceptivos orales entre otros factores.<sup>14</sup>

Para el diagnóstico de una infección por VPH podemos echar mano de varios métodos, uno de ellos es la clásica técnica citológica y la histopatología en donde la presencia de koilocitos caracterizados por una gran zona clara perinuclear y a menudo binucleación, son un fuerte indicio de la presencia del virus, así como se ha informado que partículas virales o sus antígenos son detectados sólo en una pequeña proporción en tales células afectadas por medio de la técnica de la peroxidasa-anti peroxidasa.<sup>15</sup>

La colposcopia es un método que permite visualizar el cérvix adecuadamente, es útil sobre todo para la detección de VPH por la lesión tisular que éstos producen,<sup>16</sup> es una herramienta diagnóstica muy útil para aclarar dudas que no se puedan resolver con la clínica.

La introducción de la biología molecular a los laboratorios de histopatología ha resultado en un diseño de métodos innovadores en la patología molecular. Mientras que características clínicas pueden indicar una infección viral, el diagnóstico definitivo debe basarse sobre la demostración directa de la presencia del virus, ya sea por cultivo o por detección por inmunocitoquímica. Para la mayoría de los virus su cultivo es extremadamente tedioso y consumen tiempo, incluso a veces es imposible lograrlo como es el caso de los VPH.

La detección inmunológica de los antígenos de las cápsidas virales ha mostrado que es del todo confiable, en la mayoría de los casos, por la complejidad de la infección viral.

Por medio de las técnicas de hibridación *in situ* de los ácidos nucleicos utilizando sondas radioactivas (HP, y S) específicas para las secuencias de ADN viral, es posible identificar y localizar al virus en las células o tejidos infectados. Las sondas radioactivas en general, aunque muy útiles tienen

sus desventajas: el tiempo de exposición en la autorradiografía es largo, la resolución morfológica puede ser pobre y el uso de material radioactivo requiere condiciones especiales en el laboratorio, aunque el uso de sondas marcadas con S han mostrado tener una resolución y una sensibilidad excelente.

Es preferible utilizar las técnicas de hibridación *in situ* por métodos no radioactivos utilizando para ello la sonda de ADN viral marcada con biotina o digoxigenina, misma que después de ser hibridada con la muestra de ADN por analizar, es detectada inmunológicamente incubando con un complejo formado por estreptavidina acoplado con fosfatasa alcalina o peroxidasa y sustancia cromógena para revelar la hibridación.<sup>17-20</sup>

La sensibilidad para detectar secuencias de ADN viral 6, 11, 16 y 18 en secciones de tejido incluidas en parafina en biopsias de áreas genitales con este sistema de sondas con marcaje no radioactivo, es comparable a la obtenida con aquellas marcadas con <sup>35</sup>S en la localización de híbridos a nivel celular.<sup>20-24</sup>

La hibridación usando la técnica de Southern blot de sondas de ADN extraídas de tejidos frescos, ha sido quizá la prueba más utilizada y sensible tanto para la detección de la presencia como para la identificación de subtipos de VPH y además nos puede dar información si el genoma viral está en las células como epísimos o está integrado al genoma celular,<sup>25</sup> esta técnica requiere una intensa labor en el laboratorio.

La técnica dot-blot hibridación slot-blot,<sup>26</sup> también se utiliza ADN puro de células o tejido infectado, mismo que es desnaturalizado y colocado directamente como mancha o gota en una membrana o papel filtro de nitrocelulosa, esto evita los pasos de la electroforesis en gel y la transferencia de la hibridación Southern, y después de esto, el ADN es sometido a la hibridación con la sonda marcada y denaturalizada.

Otras variantes de esta técnica de hibridación utilizan células exfoliadas que son filtradas sobre una membrana de nitrocelulosa, desnaturalizada e hibridada a alta temperatura,<sup>27</sup> o pueden utilizar cortes de tejidos que habían estado incluidos en parafina, esta técnica es la única en la cual la señal es vista con relación topográfica a la lesión patológica.<sup>28</sup>

El número de tipos distintos de VPH identificados ha ido en aumento rápidamente durante los últimos 15 años, en la actualidad excede de los 70<sup>29</sup> y aproximadamente la mitad de ellos ha sido aislada de áreas genitales. Se considera un nuevo tipo de VPH sólo si su genoma completo ha sido aislado y establecido su secuencia nucleotídica de sus genes E6, E7 y L1 y que sea diferente en más del 10% de cualquiera de los VPH descritos previa-

Se requiere de métodos alternativos para una evaluación rápida y eficiente de detección e identificación, para esto se emplea un método que permite la amplificación de secuencias génicas presentes en muy pequeñas cantidades de material a investigar; a este método se le ha dado el nombre de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y consiste en que el ADN de doble cadena es calentado hasta su desnaturalización, las cadenas simples se aparean con un par de oligonucleótidos sintéticos específicos llamados iniciadores, que son complementarios uno en el extremo 5' del gen o fragmento del gen que se desea amplificar, y el otro en el extremo 3' del mismo, pero en la cadena opuesta, estos oligonucleótidos actúan como cebadores para la ADN polimerasa que sintetiza dos nuevas cadenas de ADN complementarias con las cadenas originales. Estos sucesos se repiten hasta 30 veces, lográndose doblar en cada ciclo la cantidad de ADN blanco. Después de esto se realiza un análisis directo por cortes con enzimas de restricción o hibridación con sondas no radioactivas para comprobar la identidad del gen amplificado.<sup>31</sup>

El uso de esta técnica con iniciadores o cebadores consenso (MY11, MY09) pueden amplificar una gran gama de tipos de VPH. Los iniciadores blanco de los VPH son genes de la región L1 que codifican para la cápside viral, para detectar los productos de la amplificación son usadas sondas consenso de más de 400 pares de bases y los tipos individuales de virus que pueden ser diferenciados con sondas de pocos oligonucleótidos.<sup>32,33</sup>

La aplicación de las técnicas moleculares de detección han reafirmado el papel importante que desempeñan los VPH en el desarrollo del CaCu. Aun cuando la identificación de los tipos, subtipos y variantes de los VPH es complicada y a menudo compleja, es importante el continuar con este tipo

de estudios, así como los encaminados al avance de las lesiones preneoplásicas, la evolución y el tipo específico de virus asociado a ellas, para tener en un futuro, un protocolo de manejo adecuado que permita un diagnóstico oportuno, la profilaxis, así como el control definitivo de los carcinomas genitales.

## Referencias

- Peto R. Introduction: geographic patterns and trends. En: Peto R, zur Hausen H. eds. *Viral etiology of cervical cancer*. Banbury Report 21, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; 3-15.
- Nelson JH, Averette HE, Richart RM. Dysplasia, carcinoma in situ and early invasive cervical carcinoma, *Cancer J Clinicians* 1984; 34:306-315.
- Koutsky LA, Galloway DA, Holmes KK. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev* 1988; 10:122-162.
- Muñoz N, Bosch X, Kaldor JM. Does human papillomavirus cause cervical cancer? The state of the epidemiological evidence. *Br J Cancer* 1988; 57:1-5.
- Vonka V, Kanka J, Roth Z. Herpes simple type 2 virus and cervical neoplasia. *Ad Cancer Res* 1987; 48:149-91.
- García-Carrancá A, Gariglio PV. Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cervicouterino. *Rev Inv Clin* 1993; 45:85-92.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248:76-79.
- Vogelstein B, Kinzler J. p53 function and dysfunction. *Cell* 1993; 70:523-526.
- Liang XH, Volkman M, Klein R, Herman B, Lockett SJ. Colocalization of the tumour-suppressor protein p53 and human papillomavirus E6 protein in human cervical lines. *Oncogene* 1993; 8:2645-2652.
- Atkin Nb, Baker MC. Chromosome 1 in 26 carcinomas of the cervix uterin. *Cancer* 1979; 44:604-613.
- Atkin Nb, Baker MC. Nonrandom chromosome changes in carcinoma of the cervix uterin I. Nine near diploid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 7:209-222.
- Atkin Nb, Baker MC. Nonrandom chromosome changes in carcinoma of the cervix uterin II. Ten tumors in the triploid-tetraploid range. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 13:189-207.
- Zur Hausen H. Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient control of papillomavirus infection. *Lancet* 1986; 2:489-491.
- Vessey MP. Epidemiology of cervical cancer: role of hormonal factors, cigarette smoking and occupation. En: Peto R, Zur Hausen H. eds. *Viral etiology of cervical cancer*. Banbury Report 21. Cold Spring Harbor, New York, 1986; 29-43.
- Morin C, Braun L, Casas-Cordero M, Shan KV, Roy M, Fortier M. Confirmation of the papillomavirus etiology

- of condylomatous cervix lesions by the peroxidase-antiperoxidase technique. JNCI 1981;66:831-842.
16. Schanfelder A, Hotz M, Gissmann L. Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. Int J Cancer 1987;40:198.
  17. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci. USA 1986;83:2934.
  18. Lewis FA, Griffiths S, Dunicliff R, Wells M, Dudding N, Bird CC. Sensitive *in situ* hybridization technique using biotin-streptavidin polyalcaline phosphatase complex. J Clin Pathol 1987;40:163.
  19. Allan GM, Tood D, Smyth JA, Mackie DP, Burns J, McNulty MS. *In situ* hybridization: an optimized detection protocol for a biotinylated DNA probe render it more sensitive than a comparable <sup>35</sup>S-labelled probe. J Virol Methods 1989;24:181.
  20. Heino P, Hukkanen V, Arstila P. Detection of human papillomavirus (VPH) DNA in genital biopsy specimens by *in situ* hybridization with digoxigenin-labeled probes. J Virol Methods 1989;26:331-338.
  21. Amortegui AJ, Meyer MP, McIntyre K, Locker J. Detection of human papillomavirus DNA in cervical lesion by *in situ* hybridization using biotinylated DNA probes. Int J Gynecol Pathol 1990;9:306-315.
  22. Furutay Y, Shinohara T, Sano K, Meguro M, Magashima K. *In situ* hybridization with digoxigenin labelled DNA probes for detection of viral genomes. J Clin Pathol 1990;43:806-809.
  23. Sarkar S, Verma K, Kaur H, Seth P. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 DNA in cervical lesions of indian women using *in situ* hybridization. Indian J med Res 1992;96:356-360.
  24. Handley JM, Maw RD, Lawter H, Horner T, Bharucha H, Dinsmore WW. Human papillomavirus DNA detection in primary anogenital warts and cervical low-grade intraepithelial neoplasias in adults by *in situ* hybridization. Sex Transm Dis 1992;19:225-229.
  25. Shah KV, Howley PM. Papillomaviruses. En: Fields Virology Vol. 2. Bernard N. Fields Ed. Raven Press, N. Y. 1990;59:1651-1676.
  26. Wickenden C, Steele A, Malcom Ad, Coleman DV. Screening for wart infection in normal and abnormal cervixes by DNA hybridization of cervical scrapes. Lancet 1985;1:65-67.
  27. Wagner D, Ikenberg H, Boehm N, Gissmann L. Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid *in situ* hybridization. Obstet Gynecol 1984;64:767-772.
  28. Gupta JW, Gupta PK, Rosenshein N, Shah K. Detection of human papillomavirus in cervical smears. A comparison of *in situ* hybridization, immunocytochemistry, and cytopathology. Acta Cytol 1987;31:387-396.
  29. De Villiers EM. Heterogeneity in the papillomavirus group. J Virol 1989;63:4898-4903.
  30. Van Ranst Ma, Tachezy R, Delius H, Burk RD. Taxonomy of the human papillomaviruses. Papilloma-virus Rep 1993;4:61-65.
  31. Barrera HA. Medicina Molecular. En Barrera H. Información genética, estructura, función y manipulación, México CONACYT 1992;53-62.
  32. Bauer HM, Manos MM. PCR detection of genital human papillomavirus. En: Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. editores. American society for microbiology, Washington, D. C. 1993;407-413.
  33. Hans-Ulrich B, Shih-Yen Ch, Manos MM. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, RFLP, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. J Infect Dis 1994;170:1077-1085.

### III. Diagnóstico de brucelosis por la reacción en cadena de la polimerasa

Hugo A. Barrera-Saldaña\*, Ana María Sifuentes-Rincón\*, Agnés Revol-de Mendoza\*

La brucelosis, fiebre de malta o fiebre ondulante, es una zoonosis causada por bacterias del género *Brucella* y es considerada como un problema económico y de salud pública muy importante, sobre todo en los países en vías de desarrollo. Aunque es fundamentalmente una enfermedad de animales domésticos, el hombre puede infectarse de forma

secundaria, siendo *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, y *Brucella abortus*, las principales especies responsables.

La infección por brucelas en humanos tiene una distribución prácticamente mundial. Sin embargo, existen diferencias geográficas importantes según las especies implicadas: *Bbrucella melitensis*

\* ULIEG, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.A.N.L.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Hugo A. Barrera Saldaña. Av. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, C.P. 64460. A.P. 3-4125, Monterrey, N.L. Tel. (81)329-4173 y Fax: (81) 333-7747. E-Mail: hbarrera@ccr.dsi.uanl.mx

es la responsable de la mayoría de los casos en España y la especie predominante en los países ribereños del Mediterráneo, África, Centroamérica y Sudamérica. *Brucella abortus* es el agente principal de la enfermedad en el norte y centro de Europa y su difusión ha aumentado hacia los Estados Unidos en los últimos años; *Brucella suis* es relativamente frecuente en diversos estados de la unión americana.<sup>1</sup> Por lo que en México, respectivamente, la enfermedad en brucelosis humana varía con el tiempo y la entidad. En general se considera que la brucelosis se encuentra distribuida en todo el país con morbilidad diversa.<sup>2</sup>

En el humano, el diagnóstico de la brucelosis es primeramente clínico. Este se hace con base en el patrón típico de enfermedad febril, combinado con la revisión del historial clínico, para buscar una posible exposición. Además, este primer paso se debe confirmar con pruebas serológicas y lo con el aislamiento de la bacteria. La mayoría de las pruebas serológicas emplean como antígeno a la bacteria. Sin embargo, todas estas pruebas presentan el problema de inespecificidad y baja sensibilidad.<sup>2</sup>

El diagnóstico más confiable depende del aislamiento del microorganismo. El cultivo de sangre es el método de elección, pero las muestras deben ser obtenidas en la fase o período temprano de la enfermedad y los cultivos tienen que ser incubados por lo menos por tres semanas.

En México, aun cuando es bien conocida la baja confiabilidad de los resultados obtenidos por métodos serológicos, se le da una mayor confiabilidad a la prueba de aglutinación en placa con Rosa de Bengala, como prueba de tamizaje. A ésta le sigue una comprobación con otras pruebas, como la de aglutinación estándar en tubo y su variación en presencia de 2-B-mercaptoetanol. Es así que se consigue diagnosticar a un enfermo agudo en una zona donde la brucelosis es endémica.<sup>2,3</sup>

Cabe señalar que la búsqueda cotidiana de *Brucella* mediante su aislamiento, es prácticamente nula, especialmente en las instituciones del sector público, lo que trae como consecuencia que el porcentaje de falsos positivos sea muy alto.<sup>3</sup>

Dadas las ventajas de la especificidad y sensibilidad que ofrece la PCR, muchos grupos de investigación se han avocado a establecer métodos diagnósticos basados en esta nueva tecnología para la detección de *Brucella*.<sup>4,5,6</sup> Sin embargo,

la mayoría de estas pruebas no son especificadas para el género, mas no para las especies, o bien, se inclinan a lograr la diferenciación de las especies locales de mayor importancia epidemiológica.<sup>7</sup>

Estudios realizados en nuestro laboratorio<sup>8</sup> empleando la PCR para detectar secuencias del genoma de *Brucella abortus*, a partir de muestras de sangre de vacas lecheras infectadas con esta bacteria, abrieron una nueva posibilidad para establecer un método diagnóstico basado en esta poderosa técnica. Lo anterior fue logrado al practicar la PCR utilizando un par de iniciadores derivados de la secuencia reportada para el locus *Omp2*, que codifica para una proteína de la membrana externa (porina) de *Brucella abortus*.<sup>8</sup> La inclusión en los ensayos de PCR de un tercer iniciador que generó una banda adicional sólo en algunas de las especies estudiadas, dejó entrever la factibilidad de detectar al menos tres especies de este género: *Brucella abortus* (cepas S19 y S44), *Brucella melitensis* (cepa Rev-1) y *Brucella suis* (cepa 1330). Con estos antecedentes y tales observaciones preliminares, nos propusimos en este trabajo, establecer un método de PCR para detectar y diferenciar todas las especies del género *Brucella*.

## Resultados y discusión

Con el fin de comprobar la especificidad de la prueba de PCR originalmente implementada en nuestro laboratorio,<sup>8</sup> los fragmentos de amplificación de 200 pb generados por ésta, fueron clonados y se les determinaron sus secuencias nucleótidas, mismas que al ser comparadas con la reportada para *Brucella abortus*,<sup>8</sup> permitieron establecer que las regiones amplificadas para estas cepas si correspondían al locus *Omp2*.

Como siguiente paso y para ampliar el poder de detección y diferenciación de la prueba originalmente implementada, se capitalizó en sitios de restricción polimórficos (particularmente *Kpn I*) dentro del locus *Omp2* de las especies del género. Aprovechando la variación genética que presenta el locus *Omp2* blanco para la PCR, se diseñó un cuarto oligonucleótido capaz de generar bandas de amplificación en la mayoría, más no en todas las especies. El uso conjunto de ambos recursos permitió la detección-diferenciación de las seis especies del género (*Cuadro I*).

Cuadro I. Detección y diferenciación de brucelas por PCR-RFLP

Patrón	Bandas de amplificación	RFLP para Kpn I	Especie
A	3	(+)	<i>Brucella melitensis</i>
A	3	(-)	<i>Brucella suis</i>
A	3	(+)	<i>Brucella neotomae</i>
B	2	(-)	<i>Brucella canis</i>
C	1	(-)	<i>Brucella ovis</i>
D*	3		<i>Brucella abortus</i>

\* Los patrones A y D difieren en el tamaño de una de las tres bandas.

Una vez lograda la detección diferencial de las diferencial de las seis especies del género, se evaluó la especificidad de la prueba practicándola en las condiciones establecidas con los ADN de especies diferentes a *Brucella*, obteniéndose resultados negativos en todas ellas. También se determinó el límite de detección de la prueba, quedando establecido como de 1 ng de ADN bacteriano.

El método diagnóstico diferencial ha sido aplicado a la detección de *Brucella*, utilizando como blanco el ADN genómico proveniente de las muestras de sangre de humano y los resultados obtenidos a la fecha, muestran que la metodología aquí implementada podrá, una vez validada, ser una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico estudio de la brucelosis.

## Referencias

1. López-Merino A. Brucelosis Avances y Perspectivas. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos 1991; Publicación INDRE #6, 53pp.
2. Pumarola A, Rodríguez-Torres A, García-Rodríguez JA, Pédrola-Angulo G. Microbiología y Parasitología Médica. 2a edición 1991; De. Masson-Salvat. Barcelona, España.
3. Canales-Muñoz JL, Aguilar-Benavides S, Flores-Cásarea G, Boeta-Guerrero MA, Vázquez-Castellanos T. Estudio de un brote de brucelosis y valoración diagnóstica de las pruebas de laboratorio. Rev Méd 1993; 31:4:272-277.
4. Fekete A, Bantle J, Halling SM, Sanborns MR. Preliminary development of a diagnostic test for brucella using polymerase chain reaction. J of Appl Bacteri 1990; 69: 216-227.
5. Fekete A, Bantle J, Halling SM, William-Stich R. Amplification fragment length polymorphism in brucella strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. J of Bacteri 1992; 174:23:7778-7783.
6. Romero C, Gamazo C, Pardo M, López-Goñi I. Specific detection of brucella DNA by PRC. J of Clin Microbiol 1995; 33:3615-617.
7. Bricker JB, Halling SM. Differentiation of *Brucella suis* by I by PCR. 1994. J of Clin Microbiol 1994;32:11:2660-2666.
8. Martínez-Soriano JP, Cab-Barrera EL, Tamez-González R, Leal-Klevezas DS. Detección de *Brucella abortus* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Bioquímica 1993; XVIII:72:10-16.
9. Ficht AT, Bearden SW, Sowa BA, Adams LG. DNA Sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. Infection Immun 1989;57:11:3281-3291.

# IV. Avances en el estudio del material genético de *Giardia duodenalis* y su aplicación potencial en epidemiología y diagnóstico molecular de la giardiosis

Raúl Argüello-García\*, María Guadalupe Ortega-Pierres\*

## Introducción

Las infecciones ocasionadas por el protozoario parásito causante de la giardiosis humana, *Giardia duodenalis* (= *G. lamblia*, *G. intestinalis*), representan actualmente un campo de estudio de importancia creciente en materia de salud pública. Entre otras causas, resaltan el hecho de que la giardiosis presenta un cuadro clínico bastante variable. Este abarca desde cuadros agudos y crónicos que se asocian frecuentemente a episodios diarreicos y síndrome de malabsorción intestinal hasta cuadros de individuos portadores sin sintomatología concomitante.<sup>1,2</sup> Desde el punto de vista epidemiológico, se reconoce que esta infección tiene distribución cosmopolita y está ubicada entre las 20 principales enfermedades infecciosas en países en vías de desarrollo y es la parasitosis intestinal más frecuente en países desarrollados, además de que en México la población infantil en etapa preescolar es el núcleo más afectado.<sup>3,4</sup> Asimismo, la principal medida de control de esta parasitosis en la práctica médica es el empleo de agentes quimioterápicos, los cuales si bien han mostrado resultados eficaces en muchas instancias, actualmente se ha detectado una tasa frecuentemente mayor de casos refractarios al tratamiento,<sup>5</sup> por lo que se requiere abordar el campo de diseño racional de drogas anti-Giardia.

En este sentido, el análisis integral de los factores mencionados debe ser abordado con base en un conocimiento de los aspectos fundamentales bioquímicos, de su metabolismo y aquellos que regulan la expresión de moléculas relevantes en *Giardia duodenalis*. Como se describirá en el pre-

sente trabajo, dentro de las principales estrategias de estudio básico se encuentran las metodologías de ingeniería genética y DNA recombinante, cuya aplicación ha proporcionado hasta ahora valiosos aportaciones en el estudio del parásito. No obstante, en la actualidad aún se requieren análisis y en su caso consensos en relación a aspectos como: filogenia, dinámica poblacional, función nuclear, ploidía y determinantes genéticos de mecanismos de patogenicidad del parásito, así como el potencial zoonótico, la epidemiología y el diagnóstico moleculares de la giardiosis.

## DNA, RNA Y GENES DE *G. duodenalis*

El conocimiento detallado del contenido genético y los procesos de expresión genética en este parásito ha sido aportado básicamente por la clonación de diversos genes, en virtud de hasta ahora se ha visto limitada la obtención de mutantes con deficiencias fisiológicas y metabólicas relevantes, además de que no se ha reportado el empleo de estrategias experimentales de transformación con DNA exógeno en este parásito.

Así, los datos sobre caracterización del genoma del parásito han sugerido un contenido de  $0.144 \pm 0.018$  pg DNA/trofozoito binucleado ( $0.072$  pg DNA/núcleo) y de  $0.313 \pm 0.003$  pg DNA/quiste tetranucleado ( $0.078$  pg DNA/núcleo).<sup>6</sup> El DNA total puede ser separado en dos poblaciones de diferente composición y densidad en gradientes de CsCl,<sup>7</sup> y su contenido de G+C oscila de un 42-48%,<sup>8,9</sup> aunque a nivel de DNA éste es del 75%<sup>10</sup> y en la generalidad de los genes que codifican para proteí-

\* Departamento de Genética y Biología Molecular Centro de Investigación y de Estudios Avanzados IPN, México, DF. Correspondencia: solicitudes sobre títulos, Dra. María Guadalupe Ortega Pierres, Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, Av. IPN No. 2508 Col. San Pedro Zacatenco, 07300 México, DF.

nas estructurales, funcionales y metabólicas reportados hasta ahora (cuadro I) los valores oscilan de 49-60%. Se asume que las regiones no codificantes son por consiguiente ricas en A+T. Con base en el análisis de ocho genes que han sido secuenciados, se ha observado un uso de codones tendiente al empleo de codones sinónimos, aunque en un 42.1% de ellos se trata de codones NNC. Esto último se asemeja más al caso de arqueobacterias como *Halobacterium halobium*, presenta semejanza parcial con *Trypanosoma brucei* y existe una gran diferencia con *Entamoeba histolytica* y *Plasmodium falciparum*.<sup>11</sup> El número máximo de cromosomas por núcleo detectados por microscopía es de 56 y la electroforesis de DNA tipo cromosomal en gel de campos pulsantes (EGCP) ha revelado algunas bandas minoritarias adicionales.<sup>12</sup> Asimismo, se ha estimado que el tamaño cromosómico oscila entre  $1 \times 10^6$  y  $4 \times 10^6$  pb, y que cada trofozoíto contiene de 30-50 moléculas de DNA cromosomal. Por otra parte, los datos sobre complejidad genómica (de  $3 \times 10^7$  hasta  $8 \times 10^7$  pb) y de ploidía (haploide, diploide o poliploide) han resultado controversiales (revisado por Adam<sup>13</sup> y Thompson y Reynolds<sup>14</sup>). En este sentido, los polimorfismos detectados en el tamaño de los cromosomas, así como en la detección de esquemas por análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PLFR)<sup>8,15,16,17</sup> y de zimodemos por separación electroforética de isoenzimas<sup>18,19</sup> han permitido sugerir que la heterogeneidad biológica y fenotípica observada en *Giardia duodenalis* tiene una base genética. Esta última puede surgir de mutaciones durante eventos de reproducción asexual o por intercambio genético, sin excluir por consiguiente la posibilidad de eventos de reproducción sexual en este protozoario.<sup>20</sup>

Por su parte, el fraccionamiento de RNA total de *Giardia duodenalis* resulta en la obtención de dos poblaciones mayoritarias (los RNAr de subunidad mayor [21S] y los RNAr de la subunidad menor [15S]), además de una variedad de RNAs inusualmente pequeños.<sup>21</sup> Dentro de las poblaciones de transcritos en este parásito, el RNAr resulta particularmente interesante por varias razones. Por una parte, éste es más pequeño en longitud que aquellos de otros eucariontes e, incluso, que los de eubacterias.<sup>8,22</sup> El gene de DNAr consta de 5566 pb<sup>10</sup> y está repetido en bloques dentro del

genoma, tiene localización telomérica y sufre rearrreglos frecuentes (hasta del 3% por división en cultivos clonados) lo cual explica, al menos parcialmente, el polimorfismo en los cromosomas donde se ubican.<sup>23</sup> El I gene correspondiente en *Giardia muris* y *Giardia ardae* contiene una región espaciadora intergenómica más grande que origina un tamaño de 7600 pb, además de que difieren en regiones codificantes del RNAr 5.8S y en la región 3 del RNAr 28S de la subunidad mayor,<sup>24</sup> principalmente en el caso de *Giardia muris*. De manera especial, la secuencia y estructura del gene que codifica para el RNAr tipo 16S de la subunidad menor se ha empleado en la clasificación de *Giardia duodenalis*, ubicándolo como el eucarionte aparentemente más primitivo,<sup>25</sup> y la región 3' del mismo ha sido reconocida como blanco de la actividad de antibióticos del tipo de los aminoglicósidos (v.g. paromomicina e higromicina).<sup>26</sup> En forma concordante, la secuencia del dominio V del RNAr de la subunidad mayor ha presentado correlación con la sensibilidad del parásito a inhibidores de la peptidil transferasa y de la peptidil translocasa.<sup>27</sup>

El proceso de traducción de RNAm en este protozoario no ha sido estudiado en extenso. No obstante, los datos proporcionados por los experimentos de secuenciación de genes y la caracterización de la región 5' por extensión de iniciadores y/o mapeo por endonucleasa S 1 han permitido obtener datos importantes (cuadro I). Así, se han detectado secuencias líder no traducidas muy cortas (1-6 nucleótidos) en la región 5', como se ha detectado en algunos genes de *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*,<sup>28,29</sup> y una estructura cap metilada en el nucleótido 5', lo cual sugiere que la unión ribosoma-RNAm y el inicio de la traducción en este parásito se encuentran más estrechamente relacionados, en los cuales dichos RNAm no se traducen eficientemente. Sin embargo, el RNAm de *G. duodenalis* ha podido ser traducido in vitro en un lisado de reticulocitos de conejo.<sup>21,30</sup> En este sentido, el procesamiento de RNAm por *trans-splicing* de secuencias líder que se ha reportado en protozoarios kinetoplastidos no ha sido reportado en *Giardia*. Asimismo, la presencia de secuencias de reconocimiento de ribosoma procariontico (Shine-Dalgarno, consenso UAAGGAGG) han sido propuestas en algunos genes, aunque no se tiene una consistencia en cuanto a la localización de éstas

respecto al codón de iniciación,<sup>13</sup> además de que la presencia de secuencias líder cortas no podría explicar con certeza una interacción del ribosoma con regiones río arriba del sitio de inicio de la traducción. De esta forma, se ha asumido que este proceso en *Giardia* es semejante con lo que ocurre en los demás eucariontes presentando, no obstante, características particulares.

En su caso, el análisis del proceso de transcripción en este parásito también ha sido abordado por secuenciación de genes (cuadro I). En general, se considera que este parásito puede presentar mecanismos de regulación transcripcional semejantes al modelo eucarionte, aunque la presencia de intrones en genes codificantes para proteínas es rara en organismos protozoarios,<sup>13</sup> y en *Giardia* spp. éstos no han sido identificados. En este contexto, varios autores han reportado presumiblemente la presencia de una caja TATAA como posible sitio de reconocimiento para RNA polimerasa,<sup>31-33</sup> localizada entre 9-134 bases río arriba del codón de inicio. En la región 3' se han observado señales de poliadenilación potenciales AGTPuAA<sup>34</sup> que implican la presencia de una pirimidina en la siguiente base. Como un ejemplo, en vertebrados la Lantaa la señal de poliadenilación consenso (AATAAA) se encuentra localizada invariablemente de 10-30 bases de la cola de poli(A).<sup>35</sup> En *Giardia duodenalis*, esta señal se encuentra separada por 6-19 bases del codón de terminación y, a partir de éste, después de una región 3' no traducida corta (7-10 bases) se encuentra el inicio de la cola de poli(A).

#### Perspectivas sobre el empleo del material genético de *Giardia duodenalis* en el diagnóstico y epidemiología molecular

Los estudios reportados sobre el empleo de secuencias de DNA o RNA de *Giardia*, preferencialmente, se han dirigido a la detección del parásito o material biológico del mismo en muestras clínicas y/o medio-ambientales. De esta forma, se han abordado estrategias específicas en cada caso.

#### Epidemiología molecular

*Giardia duodenalis* es la especie que más se ha estudiado en cuanto a su heterogeneidad biológica,

la cual incluye diferencias fenotípicas (morfología, especificidad de hospederos, capacidad infectiva y patrón de infección, crecimiento *in vivo* e *in vitro*, sensibilidad a drogas, perfiles antígenicos) y genotípicas (cariotipos, esquizodemos y zimodemos) [revisado por Thompson y Meloni<sup>20</sup>]. Se ha sugerido que estas últimas se presentan debido a que las cepas siguen rutas evolutivas distintas a la selección de poblaciones ante presiones ambientales (presencia en distintos hospederos, en diferentes áreas geográficas) y también por la prescripción de diversos fármacos. En especial, la diversidad genética puede mantenerse al ser alterados los sistemas de competencia clonal que ocurren en poblaciones de *Giardia* así como de muchos otros organismos<sup>36,37</sup> y, particularmente, debe mencionarse el efecto mutagénico de agentes en cuestión como el metronidazol,<sup>38</sup> hasta ahora la droga que más se usa en el tratamiento de la giardiasis. Los estudios recientes se han concentrado sobre tres aspectos fundamentales: (a) la comparación molecular de aislados de distinto origen epidemiológico, clínico y geográfico con cepas de referencia, (b) tratar de entender mediante datos de análisis molecular la dinámica de interacción entre *Giardia*, su hospedero y el medio ambiente, e (c) implementar sistemas de detección del parásito con alta sensibilidad y especificidad.

Un primer nivel de estudio ha consistido en la comparación de las características del material genético de las distintas especies de *Giardia* definidas por agrupación morfológica: *Giardia ardeae* (aves), *Giardia duodenalis* (mamíferos principalmente), *Giardia muris* (roedores), *Giardia psittaci* (aves) y *Giardia agilis* (anfibios). De éstas, las tres primeras han sido más analizadas. La separación de moléculas cromosomales de *Giardia duodenalis*, *Giardia muris* y *Giardia ardeae* por dos variantes de EGCP han mostrado diferencias significativas en el número aparente y tamaño de cromosomas, e incluso se han obtenido sondas de DNA total con patrones de hibridación selectiva hacia uno o dos de las especies, aún bajo condiciones de alta astringencia<sup>39</sup> (figura 1). Asimismo, el análisis del DNA r ha mostrado ser similar entre aislados de *Giardia duodenalis*, pero distinto de aquél de *Giardia muris* y *Giardia ardeae* como se mencionó previamente.<sup>24</sup> De la misma forma, la amplificación de distintas secuencias del gene de *giardin* por reac-

ción en cadena de la polimerasa (RCP) y subsecuente hibridación con sondas de DNA sintéticas han mostrado resultados experimentales alentadores, ya que permitió diferenciar *Giardia duodenalis* de *Giardia muris*, y su uso ha permitido detectar hasta un quiste por muestra analizada.<sup>40</sup>

Entre los aspectos que más abordado empleando el material genético de este protozooario se encuentra la diferenciación de aislados y/o cepas de *Giardia duodenalis* en función de su relevancia epidemiológica y diagnóstica. Por lo general, se han analizado aislados obtenidos de humanos, gatos, castores, perros, roedores y otras especies de hospederos. El estudio de moléculas cromosomales ha permitido obtener datos interesantes. Así, se han observado en seis aislados variaciones en el tamaño de los cromosomas, especialmente en las bandas minoritarias;<sup>12</sup> asimismo, en un estudio donde se analizaron 54 aislados, se ha encontrado mayor correlación con el origen geográfico del aislado que con el hospedero infectado, lo cual es concordante con la amplitud del espectro de hospederos de este parásito;<sup>41</sup> y en otro estudio en el que se analizó el cariotipo de 20 aislados por EGCP, se encontró relación complementaria entre los patrones obtenidos de hospederos involucrados en un brote epidémico de giardiasis con transmisión zoonótica.<sup>42</sup>

Cuadro I. Genes clonados que codifican para proteína de *C. duodenalis*

Proteína <sup>a</sup>	Secuencia del Sitio probable de iniciación <sup>b</sup>	Extensión de la secuencia 5' no traducida <sup>c</sup>	Secuencia 3' no Traducida <sup>d</sup>	Contenido C+G de la porción que codifica la proteína (%)
<b>Proteínas Estructurales</b>				
a-Tubulina (g, c)	ATAAAAATGCGT	6		
β-Tubulina (g, c)	TTAAAAATGCGT	6	TAGCCTTGAGCGAGTAAATTC	67
α <sub>1</sub> -Giardina (g)	TTAAAAATGCCG	3	TAGGGGTTAGTGAACGCTTTAG	60
α <sub>2</sub> -Giardina	TAGAAAATGCCG	3	TAGGCGCTTACTGCGGGGTTCTTCGCT AGTGAATGCCTAGCGGGT	57
β-Giardina (g, c)	CGGTCTATGTTG		TAACGCCTCGAGTAA	59
γ-Giardina	AAGAAAATGAAG		TAAGGGCTGGTGAATATTCCTATAGC	53
<b>Proteínas de superficie</b>				
CRP 170 (g, c)	GCCTCAATGTTG	1	TGACTTAGGTAGTGAATGCCTGAC(A)	65.56 <sup>e</sup>
TSA 417 (g)	GGCCTAATGTTG		TAGATGTACTTAGATAGTAAACCGTCATCGATG	53
CRP 72 (c)			TGACTTAGGTAGTGAATGCTATAC(A)	55
VSP 1267 (c, g)	ACYYCAAATGTTG	1	TGACTTAGGTAGTAAACCGCTCACTGT(A)	49
Proteínas de choque térmico (g)	AGTAGGATGCCT			50
Glutamato Oeshidrogenasa (g, c)	TTTAAAAATGCCT	3-6	TGAGGGCTGAAGTGAATATTTACCTTTTC	

<sup>a</sup> g, DNA genómico; c, cDNA

<sup>b</sup> En cada caso, el primer ATG fue usado como el sitio de iniciación de la traducción y lo fue en la forma de lectura abierta. Para la α<sub>1</sub>-Giardina la confirmación de la iniciación de la traducción fue obtenida por secuenciación del N-terminal de la proteína. Para los genes cc la proteína de la γ-tubulina la comparación con los genes de la tubulina de otros organismos fue constante con el sitio putativo de inicio de la traducción que se propuso.

<sup>c</sup> Longitud en nucleótidos. Determinado por la extensión del iniciador y/o protección de la nucleasa S1.

<sup>d</sup> El codón de paro y la posible señal de poliadenilación (AGTPuAAPy) esta subrayada.

<sup>e</sup> El contenido C+G de las regiones repetidas y 3' del gene CRP 170 estan separadas

(Tomado de Adam, 1991)

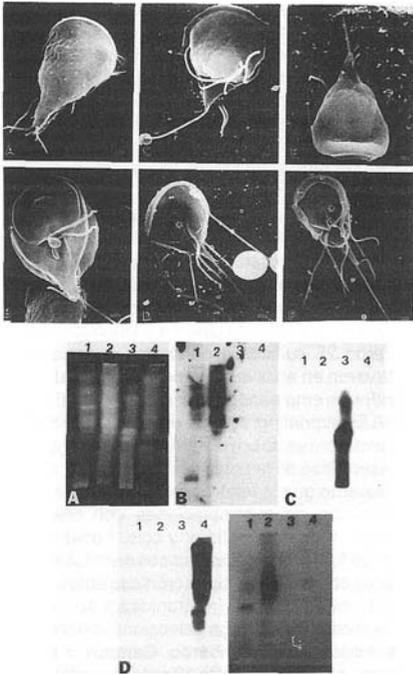


Figura 1. Diferenciación de especies de *Giardia* definidas morfológicamente por microscopía electrónica de barrido (MEB) y por análisis de EGCP e hibridación con sondas de DNA específicas de especie. (1) MEB de trofozoitos de *Giardia*. Las superficies dorsales se presentan en "A", "C" y "E", mientras que las superficies ventrales se presentan en "B", "D", "F", "G", "H" y "I". *G. duodenalis* ("A" y "B") tiene dos flagelos caudales y carece de un surco profundamente indentado en el disco adherente ventral, mientras que *G. muris* ("C" y "D") y *G. ardeae* ("E" y "F") tienen solamente un flagelo caudal completo y otro rudimentario (cabezas de flecha), además de presentar el surco indentado (asteriscos). (2) Análisis por EGCP (electroforesis en geles de alternamiento de campos ortogonales) e hibridación con sondas de DNA total. En "A" se muestran los cariotipos de 2 aislados de *G. duodenalis* (carriles 1 [cepa Portland-1-CCW], y 2 [cepa Portland 1]), *G. muris* (carril 3) y *G. ardeae* (carril 4). En los siguientes casos (autorradiogramas), este material se transfirió a papel de nitrocelulosa y se ensayó por hibridación tipo Southern con sondas radioactivas de DNA total de: *G. duodenalis* (cepa Portland 1 ("B"), *G. muris* ("C"), *G. ardeae* ("D") y una sonda presumida de un gen de proteína adictiva del esqueleto de *G. duodenalis* ("E"). (Tomado de Campbell y cols, 1990)

Por otro lado, la presencia de esquizodemas por análisis de PLFR se ha observado en varios estudios. En uno de ellos, una sonda obtenida por digestión de DNA de la cepa WB con BamHI y clonada en el plásmido pBR322 se usó para agrupar 15 aislados en nueve esquizodemas.<sup>43</sup> En estudios similares, se han analizado y clasificado aislados en solamente dos grupos con base en el uso de sondas únicas de DNAr44 o de múltiples sondas, entre ellas dos sintéticas de giardina y tubulina (figura 2, panel 1),<sup>45</sup> o bien con elemento de dos sondas no relacionadas (del antígeno de *tsf 11* y de un repetido genómico).<sup>46</sup> Los análisis anteriores se pueden optimizar, i.e. detectar PLFR únicos con el uso de sólo una sonda, con el empleo de la técnica de impresión digital de DNA (DNA fingerprinting, también llamado aquí "fenotipo de DNA en virtud de que analiza secuencias repetidas transcricionalmente inertes). En un análisis de 3 aislados genotípicamente relacionados se encontraron diferencias en sus patrones de hibridación con la sonda del fago M13, así como en estudios posteriores con otros 19 aislados (figura 2, panel 2)<sup>16,47</sup> mientras que en otro estudio se analizaron cinco aislados, presentando cada uno de ellos polimorfismos exclusivos por DNA fingerprinting a pesar de que habían sido inicialmente caracterizados con PLFR semejante.<sup>48</sup>

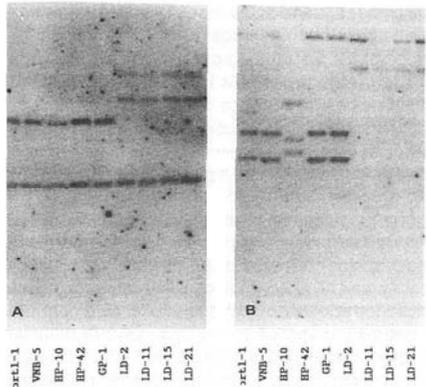


Figura 2, panel 1

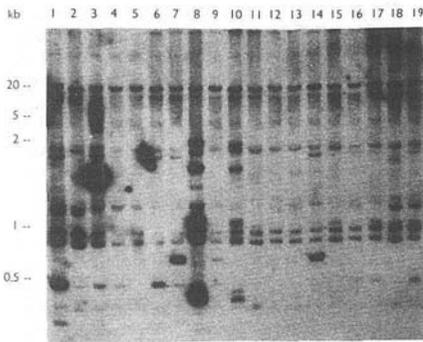


Figura 2, panel 2

Figura 2. Diferenciación de aislados de *Giardia duodenalis* por análisis de esquizodemas y de impresión digital de DNA. (1) Análisis por PLFR. Autorradiograma de ensayos de hibridación tipo Southern de DNA genómico total de 9 aislados (indicados en la parte inferior) digerido con la enzima PstI, transferido a papel e incubado con sondas de oligonucleótidos de giardina ("A") y tubulina ("B"). (2) Análisis por DNA fingerprinting. El DNA genómico total de 19 aislados de *Giardia duodenalis* fue digerido con la enzima RsaI, transferido a papel e hibridado con una sonda radiactiva conteniendo una región repetitiva de 1446 pb del DNA de forma replicativa del fago M 13 (Tomados de *Homan y cols., 1992 [1]* y *Carnaby y cols., 1994 [2]*)

En fechas recientes, se han implementado metodologías basadas en RCP para amplificar distintas secuencias blanco de DNA con la finalidad de diferenciar aislados dentro del grupo *G. duodenalis*. En un caso se empleó un fragmento de 183 pb del gene de RNA r 18S y se identificaron tres patrones en 35 aislados de humanos y animales cultivados *in vitro*, así como en muestras fecales de pacientes, "permitiendo detectar el equivalente de DNA de menos de un parásito. En otro estudio se amplificó una región semiconservada de un gene codificante para un antígeno de 68-72 kilodaltones del trofozoito usando iniciadores de secuencias conservadas de los genes homólogos *tspl1* y *tsa417*, encontrándose diferencias en nueve aislados analizados y clasificados previamente en cuatro grupos por otras técnicas y se pudo detectar el producto amplificado a partir de 2-4 trofozoítos.<sup>49</sup> En el mismo contexto, se ha empleado para dicho fin una técnica derivada del análisis por RCP, esto

es, el análisis de DNA polimórfico amplificado al azar (DPAA). Esta técnica, a diferencia de la RCP, no requiere el conocer la secuencia de la secuencia blanco a amplificar: empleando diferentes iniciadores, se han podido observar diferencias en los patrones de DPAA en clonas derivadas de un mismo aislado<sup>50</sup> así como en distintos aislados, donde se han identificado hasta 10 perfiles o rapdemos.<sup>51</sup>

Asimismo, en estudios recientes se ha generado controversia al tratar de explicar la heterogeneidad genotípica en parásitos obtenidos en una misma infección, con el objeto de identificar éstos como una causa parcial del espectro clínico variable de la giardiosis. Inicialmente Uproft y Upcroft<sup>52</sup> establecieron 25 cultivos a partir de un paciente y observaron en ellos la presencia de dos patrones genotípicos empleando técnicas de PLFR, EGCP y DNA fingerprinting, aunque una población sirnple de *Giardia* presentó un genotipo predominante y no representativo de la población original, por lo que concluyeron que la heterogeneidad obedece a la coexistencia de subpoblaciones con diferente genotipo. Inclusive, Butcher y cols.<sup>53</sup> observaron patrones fenotípicos y genotípicos distintos en dos aislados obtenidos de casos crónicos antes y después de tratamiento con metronidazol, sugiriendo que la presión de la droga seleccionó la población más resistente. Sin embargo, Carnaby y cols.<sup>54</sup> analizaron los genotipos de 19 aislados y clonas de éstos tanto *in vitro* como *in vivo* mediante DNA fingerprinting, observando que factores como tratamiento de infecciones crónicas con metronidazol, tiempo de cultivo axénico y presión por bilis son capaces de modificar los perfiles genotípicos del parásito, por lo que establecen que la plasticidad del genoma de *Giardia*, más que la presencia de poblaciones mezcladas, es la causante de la heterogeneidad genotípica del parásito observada en casos clínicos. En contraste más pronunciado, en estudios comparativos de cariotipos por EGCP de 22 aislados obtenidos de individuos con distinto cuadro clínico de giardiosis, se determinó que las infecciones crónicas pueden involucrar parásitos genéticamente semejantes, implicando recurrencia de infecciones ocultas o reinfección a partir de una misma fuente.<sup>55</sup>

Un aspecto de gran importancia en el control de las parasitosis es la detección de los agentes

infecciosos en el medio ambiente. En el caso de *Giardia duodenalis*, los estudios moleculares al respecto son limitados y se han enfocado a la detección de material genético, particularmente de la fase de quiste, en muestras de agua de consumo doméstico. En este contexto, se ha evaluado la eficacia de una sonda de DNAc, de 265 pb correspondiente al gene codificante del RNAr 16S de la subunidad menor, en la detección de quistes procesados diferencialmente mediante hibridación en gota (dot blot) en muestras de agua concentrada, encontrándose una sensibilidad del orden de 1-5 quistes/ml.<sup>56</sup> Asimismo y como se mencionó con anterioridad, el uso de secuencias de genes de *giardina* amplificadas por RCP e hibridadas con sondas sintéticas son capaces de detectar hasta un quiste por muestra<sup>40</sup> e, incluso, diferenciar quistes viables de aquellos no viables.<sup>57</sup> Si bien estos ensayos son potencialmente útiles desde el punto de vista epidemiológico, se requiere su evaluación en condiciones de rutina para poder estimar con certeza su efectividad.

#### Diagnóstico molecular

Entre los aspectos de mayor interés clínico y epidemiológico de la giardiosis, y hasta ahora no resuelto completamente, ha sido la detección eficiente de *G. duodenalis* en individuos con infección activa. Si bien las técnicas coproparasitoscópicas son a la fecha el método directo de elección, se ha documentado la frecuente falla diagnóstica de éstas.<sup>13,58,59</sup> Por esta razón, se han propuesto métodos inmunológicos de tipo alternativos o complementarios que incluyen la detección de anticuerpos séricos o de antígeno en muestras fecales (revisado por Thompson y Reynolds<sup>64</sup>) y más recientemente la detección de DNA del parásito en preparaciones coprológicas empleando distintos protocolos.

Los estudios iniciales se realizaron generando clones de un fragmento de 2 kb de DNA genómico digerido con BamH 1 y empleando éste como sonda en preparaciones fecales crudas o enriquecidas en quistes por flotación en sacarosa empleando ensayos de hibridación en gota. En la estandarización del ensayo, se detectó un mínimo de 1 ng de DNA (equivalente a 5000 trofozoítos), pero el DNA sólo fue detectable en muestras fecales enriquecidas con un mínimo de 100,000 quistes/g.,

ya que el procedimiento de lisis de quistes en las suspensiones no fue eficiente.<sup>60</sup> Cuando se empleó un protocolo similar, aunque utilizando DNA genómico total radiomarcado, se obtuvieron resultados de sensibilidad y especificidad semejantes al estudio anterior, excepto que la sensibilidad fue superior en 1 orden de magnitud para la detección de quistes (figura 3).<sup>61</sup> Una innovación metodológica notable ha sido reportada por Weiss y cols.,<sup>17</sup> quienes analizaron 24 muestras de heces fijadas en formalina provenientes de individuos con o sin infección intestinal y con *Giardia* y/o otros parásitos detectados microscópicamente, empleando RCP e hibridación con sondas complementarias a un fragmento de 183 pb del gene del RNAr 18S (figura 4). De éstas, el 75% de muestras (9/12) positivas por microscopia presentaron amplificación y detección del fragmento, mientras que en el 25% de muestras (3/12) microscópicamente negativas presentaron reactividad. La detección de *Giardia duodenalis* en estas sondas fue específica, ya que al analizar muestras con una variedad de otros parásitos intestinales, se encontraron resultados consistentemente negativos, así como en preparaciones conteniendo material de *G. muris* y *G. ardeae*. Como se mencionó previamente, la estandarización del ensayo permitió la detección del fragmento a partir del equivalente de menos de un parásito. Considerando esto, el sistema de detección por RCP e hibridación con sondas es, al menos preliminarmente, adecuado en términos de especificidad y sensibilidad para su desarrollo y aplicación potencial en el diagnóstico de giardiosis.

#### Conclusiones

El conocimiento del material genético y de la regulación de la expresión genética en *G. duodenalis*, si bien es parcial actualmente, permite establecer consideraciones convenientes para el empleo de éste en campos de interés biológico, clínico y epidemiológico. No obstante, se requiere profundizar más y, en algunos casos, tener un consenso en varios aspectos como el estudio del genoma de este parásito (p.ej. función nuclear, ploidía, regulación de genes relevantes en patogenicidad) y sus implicaciones a nivel filogenético-taxonómico, así como en la epidemiología y el diagnóstico molecular de la giardiosis.

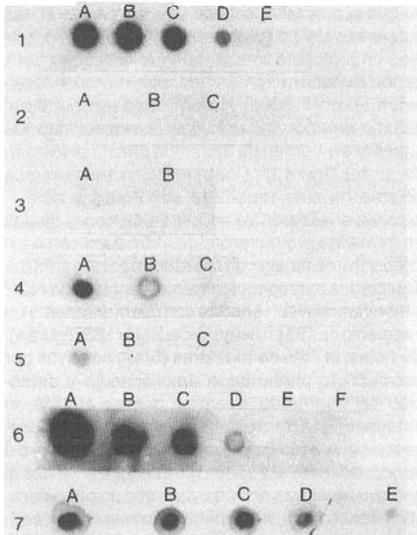
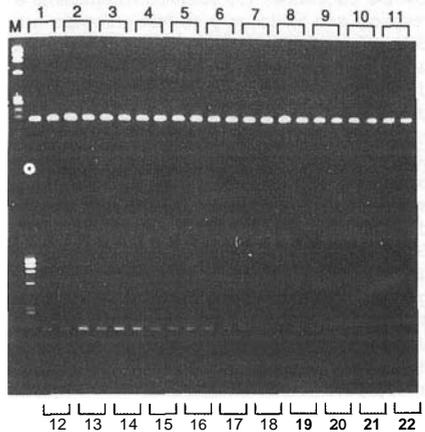


Figura 3. Detección de DNA de *Giardia duodenalis* mediante hibridación en gota con sonda de DNA genómico total. Soluciones con distintas cantidades de extracto de DNA (de "A" en adelante en orden decreciente de cantidad) fueron aplicadas por goteo simple a un Eiltro de nylon, se desnaturizaron y unieron covalentemente al filtro con aplicación de luz UV. Las tiras de filtros se incubaron con una sonda de DNA genómico total de *Giardia duodenalis* radiomarcada con posterior autorradiografía. Tira 1: extracto de DNA de *Giardia duodenalis* ("D": 10 ng); tira 2: extracto de DNA de *T. vaginalis* ("C": 50 ng); tira 3: extracto de DNA de trofozoitos de *E. histolytica* ("B":  $6 \times 10^4$  células); tira 4: extracto de DNA de *T. cruzi* ("B": 0.5 µg); tira 5: extracto de DNA de rata ("A": 5 µg); tira 6: trofozoitos completos de *Giardia duodenalis* ("D": 104 células); tira 7: quistes de *Giardia duodenalis* tratados con tiocianato de guanidina ("D": 104 quistes). (Tomado de Lewis y cols., 1990)

Por una parte, la estructura de población clonal propuesta para *Giardia*<sup>62</sup> puede constituir una fuente importante de la variación genotípica y fenotípica observada en los aislados. En este sentido, los análisis dezimodemos, esquizodemos y rapdemos han permitido dilucidar los niveles de diversidad genética en este protozooarioe, incluso, se propone que el uso de métodos como el DNA fingerprinting podrían ser de suma utilidad como procedimiento estándar en la diferenciación de aislados y la determinación de patrones de transmisión de la infección en estudios epidemiológicos, aunque su empleo aún ha sido limitado.<sup>36</sup>

#### Amplificación por PCR con JW1/JW2



#### Hibridización con la sonda <sup>32</sup>P-RDR34

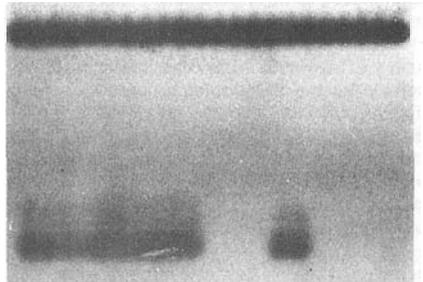


Figura 4. Detección de DNA de *Giardia duodenalis* por RCP e hibridación con sondas de oligonucleótidos. Se realizó la amplificación por RCP (figura superior) de fragmentos de 183 pb del gene del RNAr 18S empleando los iniciadores JW1/JW2, a partir del DNA de distintas cepas de *Giardia duodenalis* (carriles 1-16 y 19) y de *Giardia muris* (carril 17), así como de otros organismos: *T. foetus* (carril 18), *Leishmania major* (carril 20) y *Escherichia coli* (carril 21). El carril 22 es una reacción control negativa. El autorradiograma de la hibridación tipo Southern con la sonda radiomarcada RDR34 aparece en la figura inferior. (Tomado de Weiss y cols., 1992)

Asimismo, las características de los procesos celulares fundamentales estudiados en este organismo (transcripción y traducción principalmente) plantean la utilidad de ciertas biomoléculas en función de su aplicación potencial en varios campos. Un ejemplo son las giardinas, proteínas del citoesqueleto género-específicas, localizadas en el disco adherente característico de *Giardia* y que esclaveen su patogenicidad. Estas proteínas han sido caracterizadas en detalle tanto bioquímica como molecularmente,<sup>63-67</sup> y pueden ser empleadas para la detección específica y sensible de *Giardia duodenalis*,<sup>40</sup> de clases de aislados dentro de esta especie,<sup>45</sup> así como para diferenciar quistes en términos de su viabilidad.<sup>57</sup> Por otro lado, las secuencias de los genes de DNA se han utilizado en varios aspectos y tienen aplicaciones potenciales, como la del RNAr 16S en filogenia<sup>25</sup> y monitoreo medio-ambiental,<sup>68</sup> la de los RNAr 5.8S, 18S y 28S en taxonomía de especies<sup>24</sup> y de aislados<sup>17,44</sup>, la de los RNAr 16S y 28S en el diseño de drogas,<sup>26,27</sup> y la del RNA 18S en diagnóstico molecular.<sup>17</sup>

En el campo de la epidemiología molecular existen avances en cuanto a la diferenciación de especies de *Giardia*, la clasificación de aislados en *Giardia duodenalis*, así como en relación con la participación de la variación poblacional genética en el desarrollo de la giardiasis clínicamente caracterizada, aunque este último punto es aún controversial. En estos casos, la caracterización de cariotipos, esquizodemos y patrones de DNA fingerprinting han sido las herramientas metodológicas más utilizadas para establecer perfiles taxonómicos moleculares en este parásito, sin olvidar que las metodologías de uso más reciente derivadas de amplificación por RCP (p. ej. DPAA50 y análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla [PCCS]<sup>17</sup>) también han sido aplicadas exitosamente. Considerando lo anterior, se requiere aún un consenso en el establecimiento de metodologías estandarizadas de uso cotidiano con propósitos epidemiológicos, además de tener que contemplar aspectos básicos como: facilidad de realización, confiabilidad en la interpretación de datos y un balance costo-beneficio favorable.

En el mismo sentido, la detección de *Giardia* en muestras medio-ambientales (agua de consumo doméstico) ha sido abordada utilizando técnicas como hibridación en gota<sup>65</sup> y RCP-hibridación

con sondas sintéticas<sup>40,66</sup> y, ciertamente, estos ensayos tienen potencial para estudios rutinarios generalizados.

El diagnóstico molecular de la giardiasis, estrictamente determinado como la posibilidad metodológica de detectar parásitos en muestras clínicas (muestras de heces), no ha sido abordada en estudios a gran escala. Sin embargo, los ensayos reportados han sido optimizados paulatinamente en términos de sensibilidad y especificidad, siendo por ahora el protocolo de RCP-hibridación el más adecuado en estos términos. Este último podría ser más práctico a nivel de diagnóstico personalizado, ya que la detección de *Giardia duodenalis* empleando sondas de ácidos nucleicos podría ser más práctico cuando se aplica al análisis de un número mayor de individuos. Sin embargo, todavía se requiere optimizar la metodología en el último caso. Asimismo, existe la posibilidad de incrementar la eficacia y beneficio de los ensayos empleando estrategias como: (a) implementación de indicadores de reacción no radioactivos (p. ej. substratos quimioluminiscentes) y (b) estandarización de otros protocolos de amplificación de secuencias de DNA blanco de alta eficiencia y selectividad, entre ellos la reacción en cadena de la ligasa (RCL), el sistema de replicasa Q $\beta$ , la replicación de secuencia auto-sostenida (RSAS), y la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (ABSAN).<sup>68</sup> Así, las estrategias de diagnóstico molecular de la giardiasis que se puedan establecer en un futuro deberán combinarse con metodologías de diagnóstico etiológico y clínico, no solamente de manera complementaria sino alternativa, esto es, que se permita la detección de la parasitosis en aquellos casos donde los procedimientos rutinarios sean ineficientes.

## Referencias

1. Rendtorff RC. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am J Hyg* 1954;59:209-220.
2. Wolfe MS. *Giardiasis*. *N Engl J Med* 1978;319:321.
3. Warren KS. Selective primary health care and parasitic diseases. En: McAdam KPWJ (ed): *New strategies in parasitology*. Churchill Livingstone. Edimburgh 1989;217-231
4. Instituto Mexicano del Seguro Social. *Boletín Epidemiológico Anual. Años 1980-1990*. IMSS 1990.

5. **Uporoff** JA, Upcroft P. Drug resistance and *Giardia*. Parasitol Today 1993;9:187-190.
6. Erlandsen SL, Rasch EM. The DNA content of trophozoites and cysts of *Giardia lamblia* by microdensitometric analyses. J Histochem Cytochem 1994;42:1413-1416.
7. Ortega-Pierres MG, **Alonso RA**, **Cervantes L**, **Montañez C**. Characterization of two DNA populations of *Giardia lamblia*. Mol Microbiol 1990; 4: 1985-1991.
8. Nash TE. comunicación personal.
9. Boothroyd JC, Wang A, Campbell DA, Wang CC. An unusually compact ribosomal DNA repeat in the protozoan *Giardia lamblia*. Nucl Acids Res 1987;15: 4065-4084.
10. Healey A, **Mitchell R**, **Upcroft JA**, Boreham PFL, **Upcroft P**. Complete nucleotide sequence of the ribosomal RNA tandem repeat unit from *Giardia intestinalis*. Nucl Acids Res 1990;18:4006.
11. Char S, **Farthing MJG**. Codon usage in *Giardia lamblia*. J Protozool 1992;39:642-644.
12. Adam RD, Nash TE, **Wellems TE**. The *Giardia lamblia* trophozoite contains sets of closely related chromosomes. Nucl Acids Res 1988;16:4555-4567.
13. Adam RD. The Biology of *Giardia* spp. Microbiol Rev 1991;55:706-732.
14. Thompson RCA, Reynoldson JA, Mendis AHW. *Giardia* and *Giardiasis*. En: Baker JR y Muller R (eds): Advances in Parasitology. Academic Press, Gran Bretaña 1993;32:71-160.
15. De Jonckheere JF, Gordts B, **Kasprzak W**, Majewska AC, **Michels PAM**. Cloning of a 1.8 kb repeated sequence for the identification and comparison of *Giardia intestinalis* isolates. Eur J Protist 1989;24:162-167
16. Uporoff JA, Uporoff P, Boreham PFL. Drug resistance in *Giardia intestinalis*. Int J Parasitol 1990;20:489-496.
17. Weiss JB, van Keulen H, Nash TE. Classification of subgroup of *Giardia lamblia* based upon ribosomal RNA gene sequence using the polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1992;54:73-86.
18. Bertram MA, **Meyer EA**, **Lile JD**, **Morse SA**. A comparison of isozymes of five axenic *Giardia* isolates. J Parasitol 1983;69:793-801.
19. Proctor EM, **Isaac-Renton JL**, **Boyd J**, Wong Q, Bowie WR. Isoenzyme analysis of human and animal isolates of *Giardia duodenalis* from British Columbia, Canada. Am J Trop Med Hyg 1989;41:411-415.
20. **Thompson RCA**, **Meloni BP**. Molecular variation in *Giardia*. Acta Trop 1993;53:167-184.
21. Montañez C, Cervantes L, Ovando C, Ortega-Pierres MG. Properties of *Giardia lamblia* RNAs. En: Wallis PM y Hammond BR (eds): Advances in *Giardia* Research. University of Calgary Pres, Calgary 1988; 181-185.
22. **Edlind TD**, Chakraborty PR. Unusual ribosomal RNA of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. Nucl Acids Res 1987;15:7789-7901.
23. **Le Blancq SM**, **Korman SH**, **Van der Ploeg LHT**. Frequent rearrangements of rRNA-encoding chromosomes in *Giardia lamblia*. Nucl Acids Res 1991; 19:4405-4412.
24. van Keulen H, Campbell SR, Erlandsen SL, Jarroll EL. Cloning and restriction enzyme mapping of ribosomal DNA of *Giardia duodenalis*, *Giardia ardeae* and *Giardia muris*. Mol Biochem Parasitol 1991;46:275-284.
25. **Sogin ML**, **Gunderson JH**, **Elwood HJ**, **Alonso RA**, **Peattie DA**. Phylogenetic menaing of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. Science 1989;243:75-77.
26. Edlind TD. Susceptibility of *Giardia lamblia* to aminoglycoside protein synthesis inhibitors: correlation with rRNA structure. Antimicrob Agents Chemother 1989;33:484-488.
27. Edlind TD, Cha ME, Prah GN, Katiyar SK. Domain V of *Giardia lamblia* large-subunit rRNA: structure of the peptidyl transferase loop from an early-branching eukaryote and correlation with antibiotic sensitivity. Gene 11993;124:67-74.
28. Huber M, Gariñkel L, Gitler C, **Mirelman D**, Revel M, **Rozenblatt S**. Nucleotide sequence analysis of an Entamoeba *histolytica* ferredoxin gene. Mol Biochem Parasitol 1988;31:27-34.
29. Johnson PJ, **d'Oliveira CE**, **Correll TE**, **Muller M**. Molecular analysis of the hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. Proc Natl Acad Sci (USA) 1990;87:6097-6101.
30. **Aggarwal A**, Nash TE. *Giardia lamblia*: RNA translation products. Exp Parasitol 1987;64:336-341
31. Kirk-Mason KE, **Turner MJ**, **Chakraborty PR**. Evidence for unusually short tubulin mRNA leaders and characterization of tubulin genes in *Giardia lamblia*. Mol Biochem Parasitol 1989;36:87-100.
32. **Aggarwal A**, **de la Cruz VF**, **Nash TE**. A heat shock protein gene in *Giardia lamblia* unrelated to HSP70. Nucl Acids Res 1990;18:3409.
33. **Gillin FD**, Hagblom P, Haiwood J, **Aley SB**, **Reiner DS**, **McCaffery M**, So M, Guiney DG. Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. Proc Natl Acad Sci 1990;87:4463-4467.
34. **Peattie DA**, **Alonso RA**, **Hein A**, **Caulfield JP**. Ultrastructural localization of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequences of alpha giardin. J Cell Biol 1989;109:2323-2335.
35. Proudfoot N. Poly (A) signals. Cell 1991; 64:671-674.
36. Thompson RCA. Echinococcus and *Giardia*: variation on a theme. Int J Parasitol 1991;21:291-297.
37. Weider UJ. Disturbance, competition and the maintenance of clonal diversity in *Daphnia pulex*. J Evol Biol 1992;5:505-522.
38. Speck WT, Stein AB, **Rosenkranz HS**. Mutagenicity of metronidazole: presence of several active metabolites in human urine. J Natl Cancer Inst 1976;56:283-284.
39. **Campbell SR**, **van Keulen H**, **Erlandsen SL**, **Senturia JR**, Jarroll EL. *Giardia* sp.: comparison of electrophoretic karyotypes. Exp Parasitol 1990;71:480-482.
40. Mahbubani MG, **Baj AK**, Perlin MG, Schaefer FW, Jakubowski W, Atlas RM. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. J Microbiol 1992;30:74-78.

41. Uporoft J, Boreham PFL, Upcroft P. Geographic variation in *Giardia* karyotypes. *Int J Parasitol* 1989;19:519-527.
42. Sarafis K, Isaac-Renton J. Pulsed-field electrophoresis as a method of biotyping of *Giardia duodenalis*. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:134-144.
43. Nash TE, McCutchan T, Keister D, Dame JB, Conrad JD, Gillin FD. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. *J Inf Dis* 1985;152:64-73.
44. De Jonckheere JF, Majewska AC, Kasprzak W. *Giardia* isolates from primates and rodents display the same molecular polymorphism as human isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1990;39:23-28.
45. Homan WL, van Enckevort FHJ, Limper L, van Eys GJJM, Schoone GJ, Kasprzak W, Majewska AC, van Knapen F. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitol Res* 1992;78:316-323.
46. Ey PL, Khanna K, Andrews RH, Manning PA, Mayrhofer G. Distinct genetic groups of *Giardia* intestinalis distinguished by sexstiction tagment length polymorphisms. *J Gen Microbiol* 1992;138:2629-2637.
47. Uporoft P. DNA fingerprinting of the human intestinal parasite *Giardia* intestinalis with hypervariable minisatellite sequences. En: Burke T, Dolf G., Jeffries AJ y Wolff R (eds): DNA fingerprinting: approaches and applications. Birkhauser, Basel 1991;70-83.
48. Archibald SC, Mitchell RW, Upcroft JA, Boreham PFL, Upcroft P. Variation between human and animal isolates of *Giardia* as demonstrated by DNA fingerprinting. *Int J Parasitol* 1991;21:123-124.
49. Ey PL, Andrews RH, Mayrhofer G. Differentiation of major genotypes of *Giardia* intestinalis by polymerase chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoite surface antigen. *Parasitology* 1993;106:347-356.
50. van Bellicum A, Homan W, Limper L y Quint WGV. Genotyping isolates and clones of *Giardia duodenalis* by polymerase chain reaction: implications for the detection of genetic variation among protozoan parasite species. *Mol Biochem Parasitol* 1993;61:69-78.
51. Morgan UM, Constantine CC, Greene WK, Thompson RCA. RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis of *Giardia* DNA and correlation with isoenzyme data. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87:702-705.
52. Uporoft JA, Uporoft P. Two distinct varieties of *Giardia* in a mixed infection with a single human patient. *J Euk Microbiol* 1994;4:189-194.
53. Butcher PD, Cevallos AM, Carnaby S, Alstead EM, Swarbrick ET, Farthing MJ. Phenotypic and genotypic variation in *Giardia lamblia* isolates during chronic infections. *Gut* 1994;35:51-54.
54. Carnaby S, Katelaris PH, Naeem A, Farthing MJ. Genotypic heterogeneity within *Giardia lamblia* isolates demonstrated by M13 DNA fingerprinting. *Infect Immun* 1994;62:1875-1880.
55. Korman SH, Le Blancq SM, Deckelbaum RJ, van der Ploeg LH. Investigation of human giardiasis by karyotype analysis. *J Clin Invest* 1992;89:1725-1733.
56. Abbaszadegan M, Gerba CP, Rose JB. Detection of *Giardia* cysts with a cDNA probe and applications to water samples. *Appl Environ Microbiol* 1991;57:927-931.
58. Burke JA. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1977;7:373-391.
59. Goka AKJ, Rolston DDK, Mathan VI, Farthing MJG. The relative merits of faecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990;84:66-67.
60. Butcher PD, Farthing MJG. DNA probes for the faecal diagnosis of *Giardia lamblia* infections in man. *Biochem Soc Trans* 1988;17:363-364.
61. Lewis DJM, Green EL, Ashall F. Total genomic DNA probe to detect *Giardia lamblia*. *Lancet* 1990;336:257.
62. Tibayrenc M, Ayala FJ. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today* 1991;7:228-232.
63. Holberton DV, Ward AP. Isolation of the cytoskeleton from *Giardia*. Tubulin and a low molecular-weight protein associated with microribbon structures. *J Cell Sci* 1981;47:139-166.
64. Alonso RA, Peattie DA. Nucleotide sequence of a second alpha giardin gene and molecular analysis of alpha giardin genes and transcripts in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 1992;50:95-104.
65. Peattie DA. The giardins of *Giardia lamblia*: genes and proteins with promise. *Parasitol Today* 1990;6:52-56.
66. Baker DA, Holberton DV, Marshall. Sequence of a giardin subunit cDNA from *Giardia lamblia*. *Nucl Acids Res* 1988;16:7177.
67. Aggarwal A, Adam RD, Nash TE. Characterization of a 33-kilodalton structural protein of *Giardia lamblia* and localization to the ventral disk. *Infect Immun* 1989;57:1305-1310.
68. Wilson SM. Application of nucleic acid-based technologies to the diagnosis and detection of disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87:609-611.

# V. Diagnóstico molecular de amibiasis

Salvador Said-Fernández\* y M. Socorro Flores-Castarieda\*\*

## Introducción

La amibiasis es una enfermedad parasitaria, cuyo agente causal es el protozoario *Entamoeba histolytica*.<sup>1</sup> Se caracteriza por la destrucción de tejidos en las zonas circundantes a los sitios invadidos por las amibas.<sup>2</sup>

Se distribuye en todo el mundo, y no existe relación entre su ubicación y la altitud o el clima.<sup>3</sup>

Se estima que en el mundo existen 500 millones de personas infectadas por *E. histolytica*,<sup>3</sup> pero sólo el 10% de ellas muestra síntomas de la enfermedad.<sup>4</sup>

Ello podría explicarse, al menos parcialmente, porque el hombre puede ser parasitado por amibas capaces de invadir y destruir tejidos, cepas patógenas<sup>4</sup> y cepas que no tienen esta propiedad, cepas no patógenas.

Unas y otras son indistinguibles desde el punto de vista morfológico. Sin embargo, cada uno de estos tipos de amibas tienen patrones enzimáticos característicos, lo que permite identificarlas y agruparlas en zimodemos patógenos y zimodemos no patógenos.<sup>5</sup> Se han identificado también proteínas de superficie que son características de cada uno de estos grupos. Estas diferencias tienen una clara correspondencia con la estructura del material genético.<sup>6</sup>

Todo lo anterior ha servido de base para proponer que los zimodemos patógenos y los zimodemos no patógenos pertenecen en realidad a especies diferentes, *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*, respectivamente.<sup>7</sup>

La existencia de *Entamoeba dispar* fue propuesta por Brumpt en 1925<sup>8</sup>, y ahora es un concepto aceptado por la generalidad de los investiga-

res. Esta situación plantea importantes preguntas que deberán responderse a nivel de investigación epidemiológica, clínica, básica y de servicios de salud.

La presencia de dos especies parásitas del hombre, indistinguibles desde el punto de vista morfológico y que producen reacciones serológicas cruzadas, al menos con las técnicas clásicas de laboratorio, presentó a los investigadores un nuevo reto: desarrollar nuevos métodos capaces de distinguir entre *E. histolytica* y *E. dispar*. Estos nuevos métodos deben ser muy específicos, sensibles, pero además sencillos, para aplicarlos en encuestas seroepidemiológicas que permitan definir las tasas de parasitosis debidas a *E. histolytica* y/o a *E. dispar*. Como se mostrará en este trabajo, estas técnicas ya existen, aunque aún son susceptibles de ser mejoradas.

## Criterios generales para el diagnóstico de la amibiasis

Para integrar un diagnóstico es importante considerar los siguientes elementos de juicio:<sup>7</sup>

- Signos y síntomas sugerentes de la enfermedad.
- Las lesiones características.
- Las imágenes diagnósticas.
- El análisis de laboratorio.

En no raras ocasiones es muy difícil para el médico observar las lesiones intestinales. Sobre todo cuando el endoscopio no llega al sitio indicado. Los signos y síntomas y las imágenes diagnósticas pueden confundirse con otras enfermedades, so-

\* División de Biología Celular Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Laboratorio de Inmunología, Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.  
Correspondencia y solicitudes de sobretiros: Salvador Said-Fernández, División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ave. 2 de Abril San Luis Potosí, Col. Independencia Apdo. Postal 020-E, Monterrey C.P. 64720, N.L. Tel. y Fax (91-8) 3-44-41-16.

bre todo con cáncer hepático, en el caso de absceso hepático amibiano o con cáncer intestinal, en el caso de los amebomas. De ahí la importancia del análisis clínico, sobre todo para identificar al parásito o detectar su presencia.<sup>7</sup>

Métodos clásicos **para** la identificación de Entamoeba *histolytica*.

Estos métodos consisten en lo siguiente:

- a) La observación directa de quistes o trofozoítos en heces o de éstos últimos en los tejidos invadidos.
- b) Métodos de inmunoprecipitación.

Estos últimos permiten:

- a) La detección de anticuerpos anti-Entamoeba *histolytica*.
- b) La detección de antígenos de estos parásitos, sobre todo en heces.

En zonas endémicas, títulos de anticuerpos anti-Entamoeba *histolytica* de mayores de 1:512 son sugerentes de que el paciente padece amibiasis. Pero este concepto tiene excepciones muy importantes, como discutiremos más adelante.

La detección de antígenos amibianos en material obtenido de las lesiones o de heces es un método que sí ofrece información sobre la presencia de las amibas en el organismo del paciente. Este enfoque pertenece a métodos desarrollados recientemente y requieren la recuperación de proteínas. Siendo el DNA un material mucho menos lábil que las proteínas, los métodos modernos de diagnóstico que emplean ácidos nucleicos resultan más prácticos.

Técnicas más usuales de *serodiagnóstico*<sup>7</sup>

Estas son las siguientes:

Hemaglutinación indirecta. Emplea eritrocitos de carnero o psonizados con antígeno de *E. histolytica*. La reacción positiva consiste en una aglutinación de los eritrocitos en presencia de  $\gamma$ -globulinas anti-*E. histolytica* presentes en el suero del paciente.

Inmunofluorescencia. Se usan  $\gamma$ -globulinas anti-Entamoeba *histolytica* marcadas con compuestos fluorescentes. Para esta prueba se requiere tener los antígenos de Entamoeba *histolytica*.

Inmunofluorescencia indirecta. En este método se incuba el suero de los pacientes con el antígeno amibiano. Si en el suero del paciente existen anticuerpos contra Entamoeba *histolytica* se formarán los complejos específicos antígeno-anticuerpo. Estos complejos se visualizan haciéndolos reaccionar con  $\gamma$ -globulinas de carnero a alguna otra especie animal dirigidas contra las  $\gamma$ -globulinas humanas las cuales fueron marcadas previamente con algún compuesto fluorescente (por ejemplo isotiocianato de fluoresceína).

ELISA. Llamada así por sus siglas en Inglés (Enzyme Linkage Immunosorbent Assay). Para la prueba se utiliza antígeno de Entamoeba *histolytica* inmovilizado en el fondo de los pozos de placa para microensayo. Estas placas se incuban con el suero problema, se lavan para eliminar la mayor parte de las moléculas que no formaron los complejos antígeno-anticuerpo específicas y se incuban con el conjugado de  $\gamma$ -globulinas de carnero u otra especie anti- $\gamma$ -globulinas humanas acopladas a una enzima, en presencia de un sustrato específico. La enzima puede ser, por ejemplo, peroxidasa de rábano. En tal caso se usaría peróxido de hidrógeno el cual libera oxígeno al ser hidrolizado por la peroxidasa. En este caso, al agregar a la mezcla de reacción un compuesto que adquiera color en un medio oxidado, como el ácido salicílico, se podrá revelar la reacción. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de  $\gamma$ -globulinas anti-Entamoeba *histolytica* en el suero del sujeto de estudio. Estas placas pueden leerse muy rápidamente con un aparato automatizado (lector de ELISA).

Radioinmunoensayo. Para esta prueba se utilizan  $\gamma$ -globulinas de carnero u otra especie anti- $\gamma$ -globulinas humanas marcadas con [<sup>125</sup>I]. La radiactividad determinada en un contador de radiaciones gamma es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-Entamoeba *histolytica* en el suero del paciente.

Todas las pruebas mencionadas siguen siendo muy útiles. Sobre todo cuando se usan antígenos purificados aislados directamente de las amibas,<sup>8</sup> anticuerpos monoclonales<sup>7</sup> o proteínas recombinantes. Estas últimas se obtienen después de haberseleccionado la secuencia que codifica para el antígeno de interés, generalmente de una biblioteca de ADNc, la cual, al colocarla en un vehículo de expresión puede producirse masivamente y de ahí purificarse para su uso como biorreactivo. Algunas proteínas de superficie son características de zimodemos patógenos y otras de zimodemos no patógenos. Y podrían utilizarse para realizar encuestas seroepidemiológicas. Algunas de estas proteínas son las siguientes:

- RecM17 (9, 10)
- RecSREHP (11, 12)
- RecEHP1 (13).

### **Métodos modernos para la identificación de Entamoeba Histolytica**

En este trabajo no referiremos a dos métodos en especial, la reacción en cadena de la polimerasa y una técnica de electroinmunotransferencia. (*Westernblot Immunoblotting*) para el diagnóstico de absceso hepático amibiano (método patentado):<sup>14,15</sup>

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

El fundamento de esta técnica ya fue ampliamente discutido en otros trabajos de este simposio. Por lo tanto nos referiremos aquí sólo a algunas de las sondas descritas hasta ahora y a los resultados más sobresalientes obtenidos con ellas. Samuelson en 1989<sup>16</sup> describió dos pares de sondas de DNAC, uno para zimodemos patógenos y otro para zimodemos no patógenos. Utilizando estos dos pares de sondas Acuña-Soto et al.<sup>17</sup> estudiaron 201 aislados de DNA de heces en el estado de Chiapas. Con estas sondas no sólo fueron capaces de distinguir entre Entamoeba histolytica y otras especies de amibas parasitas del intestino humano, sino que además identifica-

ron zimodemos no patógenos y zimodemos patógenos en los aislados. Los resultados correspondieron a un 96% de sensibilidad y un 86% de especificidad. Se han descrito otras sondas con buenos índices de sensibilidad y especificidad, aunque no se han probado en condiciones de campo en forma tan amplia como lo hicieron Acuña-Soto et al.<sup>17</sup> Algunas de estas sondas son (a) la cEHP1 y la cEHP1,<sup>18</sup> (b) una clona de cDNA de 0.7 kb<sup>19</sup> y (c) sondas de DNA P145 y B133.<sup>20</sup>

### **Electroinmunotransferencia**

Esta técnica fue desarrollada para el diagnóstico de absceso hepático amibiano.<sup>14,15</sup>

A diferencia de otros trabajos realizados con la técnica de inmunotransferencia, no se utilizaron proteínas purificadas, sino extractos totales de Entamoeba histolytica.

La estrategia fundamental para la implementación del método de diagnóstico mediante electroinmunotransferencia fue la búsqueda e identificación de las moléculas amibianas inmunodominantes que son reconocidas por los anticuerpos presentados solamente en los pacientes con amibiasis extraintestinal. Es decir, fue posible realizar una buena discriminación entre los sueros analizados porque los anticuerpos detectados en pacientes con amibiasis invasora no fueron detectables en los sueros de sujetos con amibiasis asintomática. Esta discriminación fue muy clara, a pesar de que los pacientes asintomáticos tenían anticuerpos dirigidos contra otros antígenos amibianos. En el desarrollo experimental de este trabajo se combinaron el uso de técnicas de alta resolución y alta sensibilidad; como son, la electroforesis en geles de poliacrilamida-dodesil sulfato de sodio e inmunoelectrotransferencia. Para los análisis se partió de una pastilla liofilizada de trofozoitos cultivada en medio PEHPS<sup>21</sup> y obtenida mediante un método de producción masiva en suspensión;<sup>22</sup> de la que previamente se eliminó el 92% de la actividad proteolítica original.<sup>14, 15, 23, 24</sup> Las proteínas de éste extracto se separaron en geles de PAA-SDS y se transfirieron a papeles de acetato de nitrocelulosa. Estos papeles se incubaron con sueros de pacientes con disenteria o absceso hepático amibiano,

con sueros de pacientes portadores de quistes perosintomas clínicos de amebiasis o sueros de testigos sin síntomas de amebiasis y con examen coproparasitoscópico negativo.<sup>24</sup> Después se revelaron las bandas donde hubo uniones específicas de antígeno-anticuerpo y se analizaron los patrones resultantes.<sup>14,15</sup>

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Se identificó un patrón antigénico reconocido exclusivamente por los anticuerpos presentes en los pacientes con absceso hepático amebiano o disentería amebiana. El patrón está constituido por seis bandas antigénicas y no es reconocido por los anticuerpos presentes en los sueros de los sujetos sin amebiasis que habitan en una zona endémica ni por los anticuerpos de los portadores de quistes sin síntomas clínicos.

Por otro lado, se observó que el patrón característico de amebiasis invasora, arriba mencionado, no mostró correlación con los títulos de anticuerpos determinados por la técnica de hemaglutinación indirecta. Por ejemplo, en el suero de algunos pacientes con absceso hepático amebiano se encontró un patrón característico de amebiasis invasora y títulos de anticuerpos de 1:512 o menores (considerados como negativos). Lo cual sugiere fuertemente que el método de inmunoelectrotransferencia, aquí descrito, es más sensible y confiable para sustentar un diagnóstico de absceso hepático amebiano que el método de hemaglutinación indirecta.

Actualmente el método de inmunoelectrotransferencia ya ha apoyado al diagnóstico de más de 100 pacientes con absceso hepático amebiano en el Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León y se están realizando estudios de doble ciego para analizar la validez del método.

El método de inmunotransferencia mencionado es útil para establecer un diagnóstico más preciso de absceso hepático amebiano en beneficio de los pacientes. Sobre todo en casos dudosos. La purificación, clonación molecular y producción masiva de los antígenos que constituyen el patrón reconocido por pacientes con amebiasis invasora facilitan la implementación de métodos de inmunodiagnóstico más sencillos y posiblemente más económicos.

## Referencias

1. Kean BH. A story of amebiasis. En: Ravdin J.I., ed. *Amebiasis Human Infection* by E. histolytica. John Wiley & Sons. New York. 1988:1-10.
2. Martínez-Palomo A, González A, Chávez B. Cell Biology of The cytopathic effect of *Entamoeba histolytica*. En: Kretschmer R.R. ed. *Amebiasis: Infection and Disease* by *Entamoeba histolytica*. CRC Press, Boston. 1990:43-58.
3. Sepúlveda B. Amebiasis. Host pathogen Biology. *Rev. Infect. Dis.* 1982;4:836-842.
4. Walsh JA. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. En: Ravdin J.I. ed. *Amebiasis, Human Infection* by *Entamoeba histolytica*. G John Wiley & Sons. New York. 1988:93-105.
5. Sargeant P. Zymodemes of *Entamoeba histolytica*. En: Ravdin J.I. ed. *Amebiasis, Human Infection* by *Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons. New York. 1988:370-387.
6. Peithory JC, Brumt LC, Poujade F. *Entamoeba histolytica* (Schaudinn 1903) and *Entamoeba dispar* (E. Brumt 1925) are 2 different species. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1994;87:231-237.
7. Said-Fernández S, Martínez-Rodríguez H. Técnicas y Biorreactivos para el diagnóstico de la amebiasis. En: Álvarez-de la Cuadra J, ed. *Biología Hoy*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México D.F. 1992:99-110.
8. Merino EW, Glender R, del Muro R, Ortiz-Ortiz L. Evaluation of the ELISA test for detection of *Entamoeba histolytica* in feces. *T. Clin Lab. Analysis.* 1990;4:39-42.
9. Edman V, Meraz MA, Rauser S y col. Characterization of an immunodominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Exptl. Med.* 1990;172:879-888.
10. Ruiz-Palacios GM, Castañón G, Bojallí R, Tercero y col. Low risk of invasive amebiasis in cyst carriers. A longitudinal molecular seroepidemiological study. *Arch. Med. Res.* 1992;23:280-291.
11. Stanley SL Jr, Jackson TFGH, Reed SL y col. Serodagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein. *JAMA* 1991;266:1984-1986.
12. Myung K, Burch D, Jackson TFGH, Stanley SL Jr. Serodagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen-based ELISA. *Arch Med Res.* 1992;23:285-288.
13. Lotter H, Mannweiler E, Tannich E. Sensitive and specific serodiagnosis of invasive amebiasis by using a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen protein. *J. Clin Microbiol* 1992;30:3163-3167.
14. Flores-Castañeda M S. Universidad Autónoma de Nuevo León. Procedure to preserve antigens of *Entamoeba*

- histolytica* without enzyme inhibitors. Patent No. 5459042. Patent and Trademark Office of United States of America. 1995.
15. Flores de **Castañeda MS**. Universidad Autónoma de Nuevo Leon. Procedimiento para la preservación de moléculas antogénicas sin el uso de inhibidores enzimáticos. Expediente No. 928019, SECOFI/INPI, Mexico. 1992).
  16. Samuelson J, **Acuña-Soto R**, Reed S y col. DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 1989;27:671-676.
  17. Acuña-Soto R, Samuelson J, De **Girolami P** y col. Applications of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:58-70.
  18. **Tannich E**, **Horstmann D**, **Knobloch J**, **Arnolf HH**. Genomic DNA differences between pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1989;86:5118-5122.
  19. **Tachibana H**, **Ihara S**, **Kobayashi S** y col. Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991;29:2234-2239.
  20. **Garfinkel LJ**, **Giladi M**, **Huber My** col. DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. *Infect Imm* 1989;57:926-931.
  21. **Said-Fernández S**, **Vargas-Villarreal J**, **Castro-Garza J et al**. PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1988;82:249-253.
  22. **Said-Fernández S**, **Mata-Cárdenas BD**. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* in suspension. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1992;86:173-174.
  23. Said-Fernandez S, **López-Revilla R**. Characteristic protein electrophoretic patterns of four *Entamoeba strains*. *Z. Parasitenk.* 1978;56:219-225.
  24. **Flores-Castañeda MS**, **Leal CG**, **Mena-Benitez G**, **Castañeda F**, **Said-Fernández S**. Preservation of *Entamoeba histolytica* trophozoite antigens in cell-free extracts with out using protease inhibitors. En prensa.
  25. **Flores-Castañeda MS**, **Yañez-Rodríguez A**, **Torres-López E**, **Medina de la Garza CE**, **Salinas-Carmona MC**. Enteroparasites in a student population from Monterrey, N.L. metropolitan area. *Board Epidemiol. Bull OPS. OMS* (1991); Issue No. 5, pp. 1-5.