

ARTÍCULO ORIGINAL

## Identificación de antígenos de quistes y trofozoítos de aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis* reconocidos por IgA

Rosana Natalia Olmos <sup>1</sup>, Sofía Duque <sup>1,2</sup>, Myriam Consuelo López <sup>1,2</sup>, Adriana Arévalo <sup>1</sup>, Rafael Guerrero <sup>3</sup>, Martha Patricia Velandia <sup>4</sup>, Ruben Santiago Nicholls <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>2</sup> Unidad de Parasitología, Departamento de Salud Pública y Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>3</sup> Gastroenterología Pediátrica, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>4</sup> Centro de Control de Enfermedades, Subdirección de Epidemiología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

Se conoce poco acerca del papel de la IgA en la respuesta inmune de la giardiosis. El propósito de este trabajo fue identificar los antígenos estimuladores de la producción de IgA anti-*Giardia duodenalis* de aislamientos colombianos del parásito. Se realizó separación de proteínas de quistes y trofozoítos mediante SDS-PAGE y su antigenicidad se determinó por electroinmunotransferencia. El perfil de proteínas de quistes mostró 24 proteínas en un rango de 23-270 kDa sin 2-mercaptoetanol (2-ME) y 35 polipéptidos en un rango de 22-241 kDa con 2-ME. Los trofozoítos revelaron 16 proteínas en un rango de 24-270 kDa sin 2-ME y 45 proteínas en un rango de 18-241 kDa con 2-ME. La identificación de 20 y 29 antígenos en quistes y trofozoítos de *G. duodenalis*, respectivamente, permite sugerir que los aislamientos colombianos de *G. duodenalis* pueden inducir una respuesta inmune humoral específica en el hospedero. Los antígenos de 31, 57, 110, 133 y 170 kDa reconocidos por IgA anti-*Giardia* simultáneamente en quistes y trofozoítos son compartidos con aislamientos de *Giardia* circulantes en otras regiones geográficas mientras que los de 35, 38, 43, 45, 49, 52, 60, 62, 65, 72, 82, 99, 145, 155 y 185 kDa son específicos de los aislamientos colombianos. Esto sugiere que los antígenos de 57, 65, 145 y 170 kDa, reconocidos por IgA anti-*G. duodenalis* en quistes (frecuencias entre 82% y 98%) y trofozoítos (frecuencias entre 86% y 97%), podrían ser los más indicativos de infección.

**Palabras clave:** giardiosis, antígenos, inmunoglobulina A, inmunoelectrotransferencia.

### **Cyst and trophozoite antigen identification in Colombian *Giardia duodenalis* isolates recognized by IgA**

Little is known about the role of IgA in the immune response against *Giardia duodenalis* infection. The current study identified the antigens of Colombian *G. duodenalis* isolates which stimulate the production of IgA anti-*G. duodenalis*. Cyst and trophozoite stage proteins were separated by SDS-PAGE and their antigenicity was determined by Western blot. Without 2-mercapto ethanol (2-ME), the protein profile of the cyst stage showed 24 proteins within a molecular weight range of 23-270 kDa; with 2-ME, 35 polypeptides ranging from 22 to 241 kDa were distinguished. The trophozoite stage protein profile without 2-ME was formed by 16 proteins within the range of 24-270 kDa; with 2-ME, 45 proteins were present between 18 and 241 kDa. The identification of 20 and 29 antigens from the cyst and trophozoite stage, respectively, suggested that *G. duodenalis* stimulates a specific humoral immune response in the human host. The antigens of 31, 57, 110, 133, and 170 kDa recognized by anti-*G. duodenalis* IgA in both cysts and trophozoites corresponded with *G. duodenalis* isolates from other geographic regions, whereas those of 35, 38, 43, 45, 49, 52, 60, 62, 65, 72, 82, 99, 145, 155, and 185 kDa seemed specific to Colombian isolates. This indicated that antigens of 57, 65, 145, and 170 kDa, recognized by anti-*G. duodenalis* IgA antibodies in cysts (with frequencies between 82% and 96%) and trophozoites (with frequencies between 86% and 97%) can be considered identification markers for *G. duodenalis* infections.

**Key words:** giardiasis, antígenos, Ig A, Western blot.

La giardiasis, causada por el protozoario *Giardia duodenalis*, es una de las diez principales parasitosis que afectan la salud humana en el mundo (1). *G. duodenalis* en el humano induce respuesta inmune humoral y celular (2,3). Sin embargo, es limitado el conocimiento acerca de los mecanismos inmunes involucrados en la giardiasis humana debido a que la mayoría de los estudios de la respuesta inmune se han realizado utilizando gerbil (3) y ratón (4) como modelos animales.

La identificación de antígenos de *G. duodenalis* involucrados en la respuesta inmune ha sido difícil, en primer lugar, porque el trofozoito generalmente no invade tejidos y habita en la luz del intestino delgado, lo que indica que la respuesta del hospedero a la presencia del parásito requiere de mecanismos efectores que son luminalmente activos en la luz del intestino (3,5); en segundo lugar, por la variación antigénica de la superficie de la membrana del trofozoito, estrategia del parásito para evadir la respuesta inmune descrita por primera vez por Nash *et al.* (6) y observada *in vitro* (6) e *in vivo* (7,8), y, en tercer lugar, por la dificultad de comparar los resultados obtenidos por diferentes laboratorios. Los investigadores utilizan diferentes aislamientos de *Giardia* spp., diferentes tipos de anticuerpos para la detección de antígenos del parásito y diversas pruebas para estudios de la respuesta inmune.

La mayoría de las personas infectadas por *G. duodenalis* producen niveles detectables de anticuerpos. Sin embargo, el papel de los anticuerpos específicos contra *G. duodenalis* en la respuesta clínica del hospedero no ha sido completamente determinado. La IgA anti-*G. duodenalis* es de gran importancia para la defensa

del hospedero contra el parásito (5) y se correlaciona con la eliminación de *G. duodenalis* después de una reinfección, impidiendo la adhesión del trofozoito al intestino (9,10); su ausencia se asocia con el fracaso para resolverla (10).

La respuesta IgA anti-parásito por parte del hospedero se logra a pesar de la variación antigénica, posiblemente por la respuesta del hospedero a los antígenos no variables (5,8).

Poco se conoce de la identificación y expresión de antígenos de *G. duodenalis* reconocidos por IgA sérica humana. Se han reconocido antígenos de superficie e intracelulares de *Giardia* spp. por anticuerpos IgA anti-*Giardia* spp. (11). Char *et al.* (12,13) y Soliman *et al.* (14) han informado once antígenos de trofozoito de *G. duodenalis* con pesos moleculares de 31 a 170 kDa, reconocidos por IgA anti-*G. duodenalis* presente en suero de pacientes infectados, aunque no realizaron pruebas con quistes del parásito.

El quiste de *G. duodenalis* es resistente a las condiciones del medio ambiente, pues sobrevive más de dos meses a 4 °C y, por lo menos, cuatro días a 37 °C (15) y a los ácidos gástricos del hospedero (9). Sin embargo, ello no implica que en su estructura como tal no posea proteínas antigénicas que puedan ser reconocidas por las inmunoglobulinas desarrolladas por el hospedero al estar en contacto con este estadio.

No se conocen los antígenos de quistes y de trofozoitos de aislamientos colombianos de *G. duodenalis* reconocidos por las inmunoglobulinas anti-*G. duodenalis*. Dada la importancia de la inmunoglobulina IgA anti-*G. duodenalis* en la resolución de la infección, se describen los antígenos tanto de quistes como de trofozoitos de *G. duodenalis* reconocidos por IgA sérica de pacientes con giardiasis comprobada parasitológicamente.

## Materiales y métodos

### Sueros

Todas las muestras de suero humano utilizadas en el estudio fueron suministradas por el banco

Reproducido con autorización de la revista *Médica Sanitas* 2003;6(3):26-50).

Correspondencia:

Ruben Santiago Nicholls, Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 No 51-60 CAN, Bogotá, D.C., Colombia  
Teléfono: 220 7700, extensión 455; fax: 220 0901  
rnicholls@ins.gov.co

Recibido: 02/10/02; aceptado: 04/07/03

de muestras del Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud (INS). A los sueros del banco de muestras previamente se les habían detectado anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* mediante inmunodifusión e IgA anti-*G. duodenalis* por ELISA.

Se seleccionaron sueros de 72 pacientes que simultáneamente tenían infección por *G. duodenalis* confirmada parasitológicamente y presencia de quistes o trofozoítos del parásito, así como 20 muestras de pacientes con sospecha clínica de giardiosis e infección con otras parasitosis diferentes a *G. duodenalis* (muestras negativas-reacción cruzada).

Los controles negativos de pacientes sin giardiosis comprobada parasitológicamente fueron 49 muestras de cordón umbilical recién cortado y eliminado de neonatos de diferentes edades gestacionales y 20 sueros de adultos con ausencia de anticuerpos IgA anti-*G. duodenalis* determinada en la muestra de suero mediante ELISA.

#### **Quistes y trofozoítos de *Giardia duodenalis***

Un grupo de quistes y uno de trofozoítos de *G. duodenalis* de 24 aislamientos se obtuvieron del banco de muestras del Laboratorio de Parasitología del INS. Cada grupo había sido previamente elaborado con una población de  $5 \times 10^6$  parásitos/ml en solución reguladora de fosfatos (PBS) (16).

#### **Preparación de antígeno de quistes y trofozoítos de *Giardia duodenalis***

Los quistes y trofozoítos del parásito se congelaron por separado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se descongelaron a temperatura ambiente mediante agitación con vórtice. La congelación y descongelación se realizó 3 veces consecutivas. Se centrifugaron a  $2.000\text{ g}/4\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$  y se conservó el sobrenadante (antígeno). La concentración de proteínas del antígeno se determinó mediante el método de Bradford (17).

#### **Separación de proteínas de quistes y de trofozoítos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Se realizó la separación de antígenos de los dos estadios siguiendo el método descrito por Laemmli

(18): se utilizó poliacrilamida en concentraciones de 5% y 10% para elaborar el gel concentrador y el gel separador de proteínas, respectivamente. Se adicionaron los marcadores de peso molecular y las diluciones de antígeno de quistes y trofozoítos de *G. duodenalis* entre 0,4 y 1,2 mg/ml en presencia y en ausencia de 2-mercaptoetanol (2-ME). Se realizó la electroforesis a  $18\text{ }^{\circ}\text{C}/35\text{ mA}/75\text{ voltios}/3\text{ vatios}/1\text{ hora y }10\text{ minutos}$ . El gel se coloreó sumergiéndolo en 10 ml de azul de Coomassie por 1 minuto. El exceso de colorante se eliminó mediante inmersión del gel en solución decoloradora de etanol-ácido acético (3:1).

#### **Identificación de antígenos de quistes y trofozoítos por inmunoelectrotransferencia**

La identificación de antígenos de quistes y trofozoítos se realizó siguiendo la metodología descrita por Towbin *et al.* (19).

Las proteínas de quistes y trofozoítos separadas mediante SDS-PAGE fueron transferidas por separado a una membrana de nitrocelulosa (MNC) a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}/200\text{ mA}/130\text{ voltios}/26\text{ vatios}/2\text{ horas}$ . Se observó que la concentración óptima tanto de quistes como de trofozoítos de *G. duodenalis* por utilizar para la separación de proteínas fue de 0,8 mg/ml.

Se verificó la transferencia de las proteínas de cada estadio del parásito a la MNC, coloreando ésta con rojo Ponceau S durante 30 segundos y agitando constantemente y, luego, se decoloró con agua. Se bloqueó la MNC con leche descremada al 4% a temperatura ambiente por 1 hora y se lavó enseguida tres veces consecutivas con solución reguladora de fosfatos más 0,1% Tween 20 (PBS-T), agitando constantemente durante 5 minutos.

Se adicionaron diluciones de 1:50, 1:100 y 1:200 de las muestras de suero humano disueltas en leche descremada al 4%. Se realizó incubación a temperatura ambiente por 18 horas. La dilución óptima de suero que permitió diferenciar cualitativamente por la resolución de las bandas obtenidas una muestra sin anticuerpos IgA anti-*G. duodenalis* (suero de neonatos y de adultos sin giardiosis) de una muestra que poseía anticuerpos fue de 1:50. Se lavó la MNC como se describió anteriormente.

Se agregó anti-IgA humana unida a fosfatasa alcalina (Bio-Rad) en diluciones de 1:400, 1:800 y 1:1.600 previamente elaboradas con PBS-T y se incubó durante 30 minutos. La dilución óptima de conjugado fue de 1:400. Se lavó la MNC dos veces con PBS-T y una vez con solución reguladora Tris-NaCl-MgCl. Se visualizó la reacción utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) y azul de nitro tetrazolio (NBT).

**Análisis de resultados**

La lectura y análisis de las bandas para determinar el perfil electroforético de las proteínas de quistes y trofozoítos, obtenido mediante SDS-PAGE, y los antígenos de cada estadio reconocidos por IgA anti-*G. duodenalis* en suero de pacientes infectados se realizó utilizando el programa Quantity One® mediante análisis de regresión lineal.

En el análisis de resultados se establecieron los antígenos (kDa) de quistes y trofozoítos de *G. duodenalis* propios de cada estadio y los comunes entre sí; las frecuencias de reconocimiento de cada uno de los antígenos de quistes y trofozoítos del parásito por IgA anti-*G. duodenalis* de pacientes con giardiasis confirmada parasitológicamente, y el total de antígenos de quistes y trofozoítos de *G. duodenalis* reconocidos simultáneamente por IgA anti-*G. duodenalis* de pacientes infectados con el parásito.

**Resultados**

**Perfil electroforético de quistes y trofozoítos**

El perfil electroforético de quistes y trofozoítos de *G. duodenalis* estuvo conformado por 47

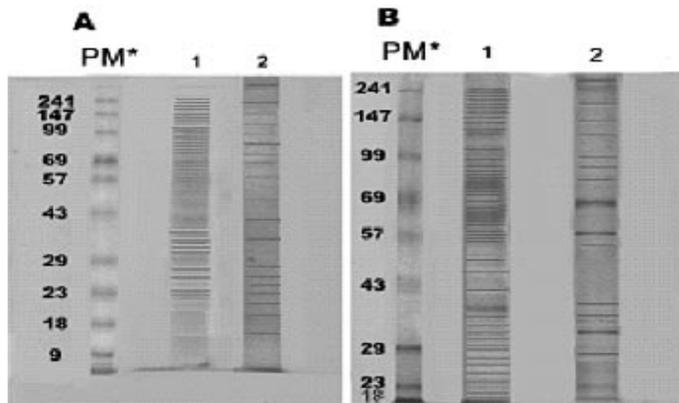
polipéptidos con un rango de pesos moleculares de 18 a 270 kDa.

El perfil de proteínas de quistes de *G. duodenalis* estuvo conformado por polipéptidos de pesos moleculares en un rango de 22 a 270 kDa. Al utilizar el agente reductor 2-ME se encontraron 35 polipéptidos de pesos moleculares de 22, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 35, 38, 42, 43, 45, 49, 52, 57, 60, 62, 65, 68, 72, 75, 78, 82, 89, 99, 110, 133, 145, 155, 170, 180, 185, 200 y 241 kDa, mientras que sin utilizar el 2-ME se encontraron 24 proteínas con pesos moleculares de 23, 24, 26, 27, 30, 31, 35, 38, 42, 43, 45, 49, 52, 57, 65, 72, 82, 99, 110, 129, 145, 170, 230 y 270 kDa (figura 1).

El perfil de polipéptidos de trofozoítos de *G. duodenalis* se encontró en el rango de 18 a 270 kDa. Utilizando el 2-ME se observaron 45 polipéptidos con pesos moleculares de 18, 20, 22, 23, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 35, 38, 40, 42, 43, 45, 49, 52, 57, 60, 62, 65, 68, 69, 72, 74, 75, 78, 82, 89, 94, 99, 105, 110, 129, 133, 145, 155, 170, 180, 185, 200, 230 y 241 kDa, mientras que en ausencia de 2-ME se encontraron 16 proteínas de 24, 27, 31, 35, 38, 52, 57, 65, 82, 94, 99, 129, 145, 170, 241 y 270 kDa (figura 1).

**Discriminación diagnóstica de antígenos de quistes y trofozoítos**

*Pacientes con giardiasis comprobada parasitológicamente.* Los antígenos tanto de quistes como de trofozoítos de *G. duodenalis* reconocidos por IgA presente en suero de 72 pacientes infectados con el parásito fueron 20 proteínas inmunogénicas con pesos moleculares de 31, 35, 38, 43, 45, 49,



**Figura 1.** Perfil de proteínas de quistes y trofozoítos de *Giardia duodenalis* concentración de proteínas 0,8 mg/ml. A. Antígeno de quiste, carril 1: con adición de 2-ME; carril 2: sin adición de 2-ME. B. Antígeno de trofozoíto, carril 1, con adición de 2-ME; carril 2, sin adición de 2-ME.

52, 57, 60, 62, 65, 72, 82, 99, 110, 133, 145, 155, 170 y 185 kDa (figura 2). La IgA anti-*G. duodenalis* además reconoció en trofozoítos los antígenos con pesos moleculares de 25, 27, 29, 40, 69, 74, 94, 129, y 180 kDa.

**Pacientes con sospecha clínica de giardiosis y otras parasitosis intestinales, IgA ANTI-Giardia duodenalis positivos.** Los anticuerpos IgA desarrollados por el hospedero al contacto de parásitos intestinales como *Endolimax nana*, *Blastocystis hominis*, *Iodamoeba butschlii*, *Entamoeba coli*, complejo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *Trichomonas hominis* y uncinarias reconocieron polipéptidos antigénicos con pesos moleculares de 25, 29, 35, 38, 45, 49, 52, 57, 62, 72, 82, 99, 105, 133, 145, 155, 170, 180 y 185 kDa tanto en quistes como en trofozoítos. Los antígenos de 18 y 43 kDa fueron reconocidos solamente en quiste y los de 60 y 74 kDa sólo en trofozoíto.

Todos los polipéptidos antigénicos descritos anteriormente no fueron considerados inespecíficos, ya que en las muestras de suero de estos pacientes se detectó IgA anti-*G. duodenalis* por ELISA y, por ende, no se podía asegurar que los pacientes no hubiesen estado en contacto con el parásito en el momento de toma de la muestra (figura 2).

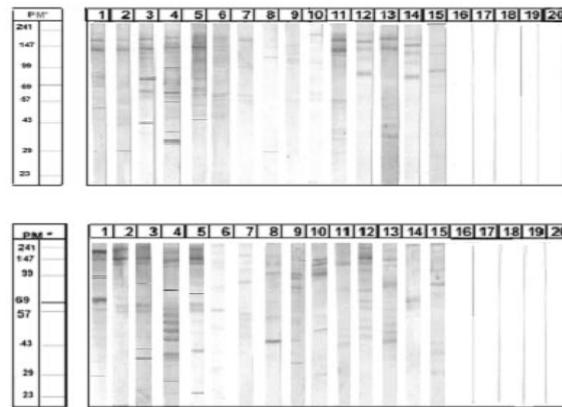
**Pacientes sin giardiosis.** Ninguna proteína antigénica de quistes ni de trofozoítos de *G. duodenalis* fue reconocida por los 49 sueros de neonatos utilizados como controles negativos (figura 2). En adultos, catorce polipéptidos con pesos moleculares de 31, 38, 45, 49, 57, 60, 72, 99, 110, 133, 145, 170, 180 y 185 kDa fueron reconocidos por IgA. El polipéptido de 180 kDa fue reconocido sólo al utilizar trofozoítos (figura 2). Estos polipéptidos antigénicos se consideraron inespecíficos, ya que en las muestras de suero de los pacientes no se detectó IgA anti-*G. duodenalis* por ELISA.

**Frecuencia de reconocimiento de antígenos (kDa) de quistes y trofozoítos**

Los anticuerpos IgA anti-*G. duodenalis* presentes en el suero reconocieron los antígenos de quistes con una frecuencia entre 7% y 96% y los de trofozoítos en el rango de 3% a 97% (figura 3).

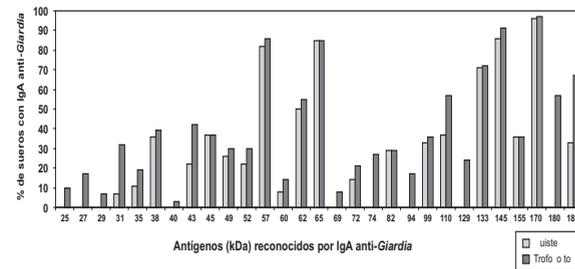
Los antígenos más frecuentemente reconocidos en quistes fueron los de 57, 65, 133, 145 y 170 kDa con frecuencias de 82%, 85%, 71%, 86% y 96%, respectivamente. Los mismos polipéptidos antigénicos de 57, 65, 133, 145 y 170 kDa fueron reconocidos en trofozoítos pero con frecuencias del 86%, 85%, 72%, 91% y 97%, respectivamente.

Los polipéptidos antigénicos de quistes con menor frecuencia de reconocimiento fueron los de 60 y 35 kDa con 8% y 11%, respectivamente. Los antígenos de trofozoítos con pesos moleculares

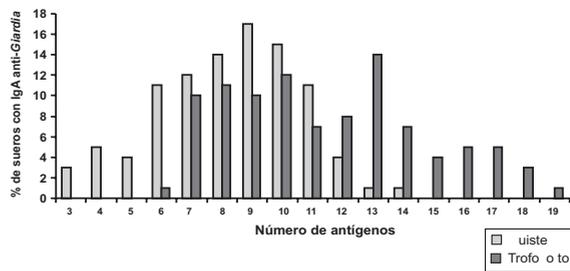


**Figura 2.** Discriminación diagnóstica. A. Utilizando quistes de *Giardia duodenalis*. Identificación de antígenos, carriles 1-5: reconocidos por IgA anti-*Giardia*; 6-10: reconocidos por IgA en pacientes adultos sin giardiosis; 11-15: reconocidos por IgA de pacientes con sospecha clínica de giardiosis y otras parasitosis intestinales; 16-20: reconocidos por IgA de pacientes sin giardiosis (neonatos). B. Utilizando trofozoítos de *Giardia duodenalis*.

B. Identificación de antígenos, carriles 1-5: reconocidos por IgA; 6-10: reconocidos por IgA de pacientes sin giardiosis (adultos); 11-15: reconocidos por IgA de pacientes con sospecha clínica de giardiosis y otras parasitosis intestinales; 16-20: reconocidos por IgA de pacientes sin giardiosis (neonatos).



**Figura 3.** Frecuencia de reconocimiento de antígenos (kDa) de quistes y trofozoítos.



**Figura 4.** Número de antígenos de quistes y trofozoitos de *Giardia duodenalis* reconocidos simultáneamente por IgA.

de 40, 29, 69, 25, 60, 27 y 94, 35 kDa fueron reconocidos con frecuencias de tan sólo 3%, 7%, 8%, 10%, 12%, 14%, 17% y 19%, respectivamente.

#### Número de antígenos de quistes y trofozoitos

El número de antígenos reconocidos simultáneamente por anticuerpos IgA anti-*G. duodenalis* varió de 3 a 14 para quistes y de 6 a 19 para trofozoitos, y se encontró que las mayores frecuencias de reconocimiento simultáneo fueron entre 6 y 11 polipéptidos para quistes y entre 7 y 13 para trofozoitos (figura 4).

#### Discusión

Hasta donde se conoce, no se ha informado un perfil de proteínas de quiste de *Giardia duodenalis*. El estudio estableció tanto un perfil de proteínas de quistes como de trofozoitos de los aislamientos colombianos del parásito en presencia y ausencia del agente reductor 2-ME. Los perfiles de proteínas de aislados de *Giardia* spp. se han realizado utilizando el trofozoito del parásito, el cual estimula constantemente la respuesta humoral del hospedero.

El perfil de proteínas de trofozoitos de aislamientos de *G. lamblia* P-1, WB, LT y RS, utilizando agentes reductores, oscila entre 10-140 kDa (20). Este rango también fue observado por Taylor y Wenman al utilizar el aislamiento WB de *G. lamblia* (21) y diferente al de 34-180 kDa informado por Janoff *et al.* al estudiar el mismo aislamiento del parásito (22). Un perfil de proteínas entre 20-100 kDa fue informado por Forrest *et al.* al utilizar cuatro aislamientos canadienses, uno australiano y los aislamientos P-1 y WB de *G. lamblia* (23). El perfil polipeptídico de los

aislamientos colombianos al usar 2-ME difiere de los informados por otros investigadores en que se inicia con proteínas de peso molecular de 18 kDa y finaliza con polipéptidos de 241 kDa. Igual comportamiento se presenta sin adicionar el agente reductor. Se conoce que los perfiles proteicos pueden variar según el aislamiento del parásito, aunque en general conservan similitudes (20).

Los polipéptidos de quistes observados en los aislamientos se encuentran incluidos en el perfil de proteínas de los trofozoitos del parásito y los polipéptidos de 18, 20, 25, 40, 69, 74, 94 y 105 kDa parecen ser propios sólo del estadio de trofozoito. Los quistes y trofozoitos poseen once polipéptidos de 27, 31, 35, 38, 52, 57, 65, 82, 99, 145 y 170 kDa que se mantienen estables aún en presencia del agente reductor, lo cual sugiere que esta estabilidad es una propiedad inherente a la estructura de la molécula. Por ello, sería importante tenerlos en cuenta para estudios bioquímicos y moleculares.

Las proteínas de quiste y trofozoito de los aislamientos que fueron reconocidas por anticuerpos IgA pueden ser consideradas como proteínas inmunogénicas (antígenos). Los polipéptidos antigénicos de quiste reconocidos por IgA se encontraron también en su totalidad en el trofozoito del parásito además de los 9 reconocidos exclusivamente en este estadio, lo que quizá se deba a que el quiste generalmente permanece en la luz intestinal y el trofozoito, al hacer contacto con la mucosa del intestino delgado, origina una respuesta inmune contra otros epítomos antigénicos presentes en la estructura propia del trofozoito (3).

Los antígenos de 31, 57, 110, 133 y 170 kDa de trofozoitos reconocidos por IgA parasitológicamente son compartidos con aislamientos de *Giardia* spp. de otras regiones geográficas (12-14). En cambio, los antígenos de 25, 27, 29, 35, 38, 40, 43, 45, 49, 52, 60, 62, 65, 69, 72, 74, 82, 94, 99, 129, 145, 155, 180 y 185 kDa de los aislamientos colombianos no han sido informados en aislamientos del parásito circulantes en otras localidades geográficas, de acuerdo con la información disponible hasta la fecha. La diferencia

podría estar dada por la avidez y afinidad del anticuerpo IgA anti-*Giardia* al reconocer epítomos antigénicos del parásito y, a su vez, por la respuesta individual del hospedero a los antígenos estimulantes de cada una de los aislamientos de *Giardia* spp. circulantes en las diferentes áreas geográficas del mundo y a la variabilidad genética existente entre aislamientos de *Giardia* spp. (24,25).

Los antígenos de trofozoítos con pesos moleculares de 29, 31, 35, 38, 40, 49, 57, 60, 65, 82, 94, 155, 170 y 180 kDa han sido localizados por otros autores en diferentes estructuras del trofozoíto del parásito. Así, forman parte de la superficie del trofozoíto los antígenos de 29 kDa (26), 31 kDa (21,22,27), 35 y 38 kDa (27), 49 kDa (28,29), 82 kDa (27), 170 kDa (30) y 180 kDa (27). El antígeno de 57 kDa se encuentra situado en el citosol del trofozoíto y parece ser una proteína inmunogénica característica de infección (12). Char *et al.* informaron que la infección aguda en niños presenta una respuesta de IgG e IgA contra el determinante antigénico de 57 kDa conocido como el antígeno de choque térmico (13). Los antígenos de 60 kDa (31), 155 y 170 kDa (32) son parte del citoesqueleto, los de 40 y 49 kDa son proteínas constitutivas del parásito y el de 94 kDa es un antígeno regulador que expresa el parásito expuesto a las condiciones intestinales (33). El antígeno de 65 kDa es una molécula estable y específica de *G. duodenalis* (22) caracterizada por Rosoff y Stibbs (34) en eluido de materia fecal de pacientes con giardiosis.

Los antígenos tanto de quistes como de trofozoítos de los aislamientos colombianos de *G. duodenalis* reconocidos por IgA anti-*G. duodenalis* son específicos del parásito. Esta especificidad se expresó en las muestras de suero de adultos sin giardiosis comprobada tanto parasitológicamente como por la ausencia de IgA anti-*G. duodenalis* mediante ELISA; en las de neonatos, al no haber estado nunca en contacto con el parásito, y carecen de IgA anti- *G. duodenalis*, y en las de pacientes con sospecha clínica de giardiosis y con otras parasitosis intestinales.

Se conoce que los trofozoítos de *E. histolytica* invaden la mucosa intestinal en el hospedero y que *G. duodenalis* está en contacto con la mucosa

del intestino delgado. Estos parásitos intestinales pueden inducir respuesta humoral en el hospedero. En cambio *E. coli*, *E. nana*, *I. butschlii*, *T. hominis*, uncinarias y *B. hominis*, puesto que viven en la luz intestinal y nunca invaden la mucosa, posiblemente no inducen respuesta inmune y, por ende, ninguna producción de anticuerpos. Por tanto, los antígenos reconocidos por las muestras de suero de pacientes con presencia de los parásitos intestinales anteriormente mencionados corresponderían a los reconocidos por IgA anti-*G. duodenalis* confirmada mediante ELISA.

La aparente paradoja de detectar anticuerpos IgA anti-*G. duodenalis* sin observar el parásito en materia fecal podría también explicarse por la excreción intermitente de quistes del parásito en las heces, fenómeno biológico inherente del parásito (24). Por tanto, no es posible afirmar que los antígenos reconocidos por las muestras de pacientes con otras parasitosis e IgA anti-*G. duodenalis* sean inespecíficos de los aislamientos colombianos.

El reconocimiento por IgA de antígenos de quistes y trofozoítos en los aislamientos estudiados permite inferir que éstos pueden inducir una respuesta inmune humoral específica en el hospedero. El desarrollo de anticuerpos IgA anti-*G. duodenalis* en el hospedero permite que se reduzca la habilidad de los trofozoítos de adherirse a la superficie de las células epiteliales del intestino (35). Char *et al.* (12,13) y Soliman *et al.* (14) han observado anticuerpos IgA anti-*G. duodenalis* aproximadamente una semana después de la aparición de la IgM anti-*G. duodenalis*, lo cual indica que existe infección en el hospedero. Por ende, se puede sugerir que el antígeno de 65 kDa, que es reconocido por IgA anti-*G. duodenalis* en 85%, tanto en quiste como en trofozoíto, podría ser el más indicativo de infección con *G. duodenalis*. Adicionalmente, el reconocimiento de más de dos de los siguientes antígenos con pesos moleculares de 57, 65, 145 y 170 kDa podrían ser también indicadores de infección parasitaria ya que el 100% de los casos reconocen, por lo menos, dos de ellos.

Al desconocer si un hospedero ha estado en contacto con *G. duodenalis* en algún momento de su vida, sería importante introducir en estudios

posteriores sueros de pacientes en todo el espectro de la infección para realizar diagnóstico parasitológico en heces y detección de coproantígeno de *G. duodenalis* en eluidos con el fin de corroborar la presencia o ausencia del parásito y detectar anticuerpos IgA anti-*G. duodenalis* en suero de estos pacientes para garantizar que no tienen infección y en los infectados determinar la duración de la persistencia de IgA anti-*G. duodenalis* post-tratamiento.

Se deberán realizar estudios para conocer el papel de los antígenos propuestos como indicadores de infección con *G. duodenalis* en la patogenicidad y respuesta inmune humana y la posible aplicación en pruebas inmunodiagnósticas e inmunizaciones pasivas.

### Agradecimientos

Financiado por el Instituto Nacional de Salud-Colciencias, Código No. 2104-04-10151 del 2000.

### Referencias

1. Meyer EA. Giardiasis. En: Meyer EA, editor. Human parasitic diseases. Amsterdam: Elsevier Science Publishers Biomedical Division; 1990. p.v.
2. Adam RD. The biology of *Giardia* spp. Microbiol Rev 1991;55:706-32.
3. Faubert GM. Immune response to *Giardia duodenalis*. Clin Microbiol Rev 2000;13:35-54.
4. Roberts-Thomson IC, Stevens DP, Mahmoud AAF, Warren KS. Giardiasis in the mouse: an animal model. Gastroenterology 1976;71:57-61.
5. Langford TD, Housley MP, Boes M, Chen J, Kagnoff MF, Gillin FD, *et al*. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. Infect Immun 2002;70:11-8.
6. Nash TE, Aggarwal A, Adam DR, Conrad JT, Merritt JW. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. J Immunol 1988; 141:636-41.
7. Aggarwal A, Nash TE. Antigenic variation of *Giardia lamblia* *in vivo*. Infect Immun 1988;56:1420-3.
8. Bienz MP, Siles-Lucas P, Wittwer P, Muller N. *Vsp* gene expression by *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7 during antigenic variation *in vivo* and *in vitro*. Infect Immun 2001;69:5278-85.
9. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev 2001;14:447-75.
10. Heyworth MF, Pappo J. Use of two-colour flow cytometry to assess killing of *Giardia muris* trophozoites by antibody and complement. Parasitology 1989;99:199-203.
11. O'Shea-Alvarez MS, Gonzalez-Robles A, Chaves B, Cedillo-Rivera R. Ultrastructural localization of *Giardia lamblia* antigens by human IgA and IgG. Arch Med Res 1994;25:407-12.
12. Char S, Shetty N, Narasimba M, Elliot E, Macaden R, Farthing MJG. Serum antibody response in children with *Giardia lamblia* infection and identification of an immunodominant 57-kilodalton antigen. Parasite Immunol 1991;13:329-37.
13. Char S, Shetty N, Cevallos AM, Yamson P, Sulliva PB, Neale G, Farthing MJG. Impaired IgA response to *Giardia* heat shock antigen in children persistent diarrhoea and giardiasis. Gut 1993;34:38-40.
14. Soliman MM, Taghi-Kilani R, Ahmed FA, Abou-Shady AFA, El-Mageid SAA, Handousa AA, *et al*. Comparison of serum antibody responses to *Giardia lamblia* of symptomatic and asymptomatic patients. Am J Trop Med Hyg 1998;58:232-9.
15. Bingham AK, Meyer EA. *Giardia* excystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. Nature 1979;277: 301-2.
16. Duque S, Nicholls RS, Arévalo A, Guerrero R. Serodiagnóstico de giardiasis: identificación de inmunoglobulina G anti-*Giardia duodenalis* en suero mediante ELISA. Biomédica 2001;21:228-33.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72:248-54.
18. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
19. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:4350-4.
20. Smith PD, Gillin FD, Kaushal NA, Nash TE. Antigenic analysis of *Giardia lamblia* from Afghanistan, Puerto Rico, Ecuador, and Oregon. Infect Immun 1982;36:714-9.
21. Taylor GD, Wenman WM. Human immune response to *Giardia lamblia*. J Infect Dis 1987;155:137-40.
22. Janoff EN, Craft JC, Pickering LK, Novotny T, Blaser MJ, Kinsley CV, *et al*. Diagnosis of *Giardia lamblia* infections by detection of parasite-specific antigens. J Clin Microbiol 1989;27:431-5.
23. Forrest M, Isaac-Renton J, Bowie W. Immunoblot patterns of *Giardia duodenalis* isolates from different hosts and geographical locations. Can J Microbiol 1990; 36:42-6.
24. Faubert GM, Belosevic M. Animal models for *Giardia duodenalis* type organisms. En: Meyer EA, editor. Human

- parasitic diseases. Amsterdam: Elsevier Science Publishers Biomedical Division; 1990. p.77-90.
25. **Nash TE, Banks SM, Alling DW, Merritt JW Jr., Conrad JT.** Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol* 1990;71:415-21.
  26. **Clark JT, Holberton DV.** Plasma membrane isolated from *Giardia lamblia*: identification of membrane proteins. *Eur Cell Biol* 1986;42:200-6.
  27. **Einfeld DA, Stibbs HH.** Identification and characterization of a major surface antigen of *Giardia lamblia*. *Infect Immun* 1984;46:377-83.
  28. **Gillin FD, Reiner DS, Boucher SE.** Small intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia in vitro*. *Infect Immun* 1990;56:705-7.
  29. **Das S, Traynor-Kaplan A, Reiner DS, Meng TC, Gillin FD.** A surface antigen of *Giardia lamblia* with a glycosylphosphatidylinositol anchor. *J Biol Chem* 1991; 266:21318-23.
  30. **Rosales-Borjas DM, Díaz-Rivadeneira J, Doña-Leyva A, Zambrano-Villa SA, Mascaró C, Osuna A, et al.** Secretory immune response to membrane antigens during *Giardia lamblia* infection in humans. *Infect Immun* 1998;66:756-9.
  31. **Crossley R, Holberton DV.** Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *J Cell Sci* 1983; 59:81-103.
  32. **Torian BE, Barnes RC, Stephens RS, Stibbs HH.** Tubulin and high-molecular-weight polypeptides as *Giardia lamblia* antigens. *Infect Immun* 1984;46:152-8.
  33. **Reiner DS, Gillin FD.** Human secretory and serum antibodies recognize environmentally induced antigens of *Giardia lamblia*. *Infect Immun* 1992;60:637-43.
  34. **Rosoff JD, Stibbs HH.** Isolation and purification of a *Giardia lamblia*-specific stool antigen (GSA 65) useful in coprodiagnosis of giardiasis. *J Clin Microbiol* 1986;23: 905-10.
  35. **Kaplan BS, Uni S, Aikawa M, Mahmoud AAF.** Effector mechanism of host resistance in murine giardiasis: specific IgG and IgA cell-mediated toxicity. *J Immunol* 1985;134:1975-81.