Desenquistamiento y cultivo de *Giardia muris*

GONZALEZ-CASTRO, J.; BERMEJO-VICEDO, M.T.; PALACIOS-GONZALEZ, F.

Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada. 18001 Granada

Summary

The treatment of *Giardia muris* cysts with 3,3% hipoclorite removes the joined bacteria to them. With cysts prepared in this manner, washed afterwards and finally subjected to the action of artificial gastric juice (HCL - pepsin solution pH 1,2), we initiated monoaxenic and axenic cultures in Karapetyan, HLELSB with yeast, TC-199 with yeast, M-3 by Meyer, and TC-199 without yeast. These didn't carry antibiotics except M-3 by Meyer medium. Our technic allowed to obtain axenic cultures of *Giardia muris* without necessity of previous monoaxenic cultures.

Key Words: Unencystment; culture; *Giardia muris*.

Resumen

El tratamiento de los quistes de *Giardia muris* con sol. de hipoclorito al 3,3% permite liberarlos de las bacterias acompañantes. Partiendo de quistes así tratados, lavados y finalmente sometidos a la acción de un jugo gástrico artificial (solución clorhídrica de pepsina pH 1,2), pudimos iniciar cultivos monoaxénicos y axénicos en los medios de Karapetyan, HLELSB con levaduras, TC-199 con levaduras, M-3 de Meyer y TC-199 sin levaduras, que, salvo en uno, medio M-3 de Meyer, no llevaban antibióticos. Nuestra técnica permitió pues, obtener, de primera intención, cultivos axénicos de *Giardia muris*, sin necesidad, como es habitual, de previos cultivos monoaxénicos.

Palabras Clave: Desenquistamiento; cultivo; *Giardia muris*.

Introducción

A excepción de Bingham y Meyer[1], que cultivaron trofozoitos de *Giardia sp.*, obtenidos tras un tratamiento desenquistante practicado sobre los quistes, el resto de los autores que han conseguido el cultivo de *Giardia sp.*, lo realizaron partiendo de sus trofozoitos.

En este trabajo presentamos unos estudios de desenquistamiento, para comprobar la viabilidad de los quistes de *Giardia sp.* una vez sometidos a distintas sustancias desinfectantes, con el fin de conocer qué concentraciones y sustancias tienen acción bactericida para la flora bacteriana acompañante de los quistes, sin que mermara la viabilidad de los mismos, y que permitiesen así iniciar un cultivo con los trofozoitos obtenidos de dichos quistes. De entre los agentes utilizados, el hipoclorito sódico al 3,3% nos permitió iniciar cultivos axénicos de *Giardia muris*.

Material y Métodos

Se emplearon en los experimentos quistes de *Giardia muris* procedentes de ratón blanco de laboratorio.

Comprobada la infestación con *Giardia*, se procedía al aislamiento, concentración y purificación de los quistes según la técnica siguiente: la emulsión fecal, una vez filtrada a través de gasa entrecruzada, se repartió en tubos de centrífuga, centrifugándose a 500 g durante dos o tres minutos. Retirado el sobrenadante, el sedimento se sometió a centrifugación en el gradiente discontinuo de sacarosa de Sheffield y Bjorvatn[7] modificada, a fin de concentrar y purificar los quistes de *Giardia*. La técnica original fue modificada por nosotros, preparándose tres soluciones de sacarosa a las concentraciones de 1,5 M, 0,75 M y 0,5 M. El sedimento procedente de la primera centrifugación se colocó en la parte superior del

gradiente centrifugándose a 1.480 g durante treinta minutos. Transcurrido ese tiempo, se recogía el líquido de las interfases, sacarosa 0,5 M/agua y 0,5 M/0,75 M, en donde se encontraban los quistes, pasándose a tubos de centrífuga siliconados, donde se sometieron a tres lavados con PBS (pH 7,0) por centrifugación a 1.480 g/ 30 minutos. El sedimento así obtenido se lavaba dos veces con buffer fosfato. Los quistes, ya concentrados y purificados, se conservaban a 4° C. en los anteriores tubos de centrífuga.

a) *Lavado y esterilización de la superficie de los quistes.*

La suspensión de los quistes así conservados se filtró bajo presión negativa de 1,2 Kg. por cm^2, a través de filtro de 8 µm (Sartorius), colocado en un dispositivo de filtración Sartorius (SM 16510), previamente esterilizado. La filtración se realizó en una cámara de flujo laminar vertical, trabajándose en estas condiciones el resto de los experimentos. Los quistes contenidos en el filtro fueron lavados, haciéndoles pasar a su través 500 ml. de lejía comercial al 3,3% en agua, lavado que tardaba en realizarse aproximadamente treinta minutos. La técnica es similar a la descrita para el lavado de metacercarias de *Fasciola hepatica* por Osuna y Guevara[6].

Una vez finalizado el lavado se recogió el filtro conteniendo los quistes, colocándose en un tubo de centrífuga estéril con tapón, lavándose con 10 ml. de solución de Hank estéril a 4°C. El lavado se realizó por centrifugación a 1.480 g, durante treinta minutos, retirando el filtro tras un segundo lavado y centrifugado de nuevo para obtener así un sedimento de quistes estériles.

b) *Técnica de desenquistamiento.*

El sedimento conteniendo los quistes fue tratado durante cincuenta minutos con una solución de pepsina (1: 10.000 Merck) al 1% ajustada a pH 1,2 con CLH 1N y previamente calentada a 37° C., en agitación constante de 70 impulsos/minuto.

Transcurrido este tiempo, el tubo conteniendo la suspensión de quistes se centrifugó a 1.480 g, durante diez minutos. El botón de quistes obtenido se lavó con solución de Hank estéril a pH 7,2, tres veces, al objeto de eliminar el exceso de ácido de la anterior solución. Tras el último centrifugado, el sedimento de quistes se suspendió en 5 ml. de medio TC-199 estéril, previamente calentado a 37° C. De esta suspensión bien homogenizada se hizo inmediatamente recuento de quistes y, eventualmente, si las había de fomas trofozoicas desenquistadas (generalmente no había trofozoitos), utilizando una cámara de Neubauer. Seguidamente, se incubó la suspensión a 37° C., durante 15 minutos.

c) *Recuento de trofozoitos y quistes.*

Conseguido el desenquistamiento, se tomó una gota con pipeta Pasteur siliconada, contando el número de trofozoitos y quistes en cámara de Neubauer, para, de acuerdo con el recuento previo, establecer el porcentaje de desenquistamiento.

Medios de Cultivo

Utilizamos cuatro medios de cultivo, en los que se mantuvieron los trofozoitos de *Giardia muris.* Estos medios fueron monoaxénicos y axénicos.

Los medios monoaxénicos que empleamos fueron: el medio de Karapetyan[3], el medio TC-199 más 10% de SBF (inactivado a 56° C., 30') y un medio original nuestro que denominamos HLELSB.

H = Hank
EL = Extracto de levadura
SB = Suero bovino.

Este medio de HLELSB se compone de:

—Bacto casiotona (Difco) . . . . . 0,5 g
—Extracto de levadura (Difco) . . . . . 0,01 g
—Suero bovino (inactivado) . . . . . 10 ml
—Solución de Hank . . . . . 90 ml

A estos medios monoaxénicos se les añadía una suspensión de *Saccharomyces cerevisiae* a una concentración inicial en los medios de 1 x 10^6 levaduras por ml., introducidas las levaduras en un tubo de diálisis.

Los medios axénicos empleados fueron el medio M-3 de Meyer[5] y el medio TC-199, más un 20% de SBF, previamente inactivado a 56° C., 30 minutos.

Se utilizaron frascos de cultivo Leighton de 22 mm^2. Una vez inoculados los frascos se incubaban en estufa de cultivo a 37° C.

Con los trofozoitos desenquistados se inoculó cada medio, utilizándose 6 frascos Leighton para cada experimento.

Diariamente se observaba el desarrollo de los cultivos bajo microscopio invertido.

Los medios de cultivo se cambiaron diariamente, en condiciones estériles.

Resultados

En el cuadro n.º 1 se recogen los datos obtenidos en cada medio de cultivo, expresando el número de trofozoitos de *Giardia* por ml. correspondiente a cada experiencia y, junto a él, el logaritmo decimal de dicho número.

Las cifras obtenidas en forma de logaritmo decimal del número de giardias por ml., nos permiten expresar gráficamente las curvas de crecimiento de la *Giardia muris.* (Ver gráficas I, II, III, IV y V).

Cuadro n.º 1

Crecimiento de Giardia muris en diversos medios de cultivo

N) Número de trofozoitos por ml. de medio.
L) Logaritmo decimal del n.º de trofozoitos por ml.

	KARAPETYAN		HLELSB + lev.		TC-199 + lev.		M-3 de MEYER		TC-199 sin lev.	
DIAS	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L
0	160.000	5,2	72.000	4,86	300.000	5,48	22.000	4,34	12.000	4,08
1	350.000	5,54	135.000	5,13	600.000	5,78	40.000	4,6	20.000	4,3
2	480.000	5,68	250.000	5,39	730.000	5,86	60.000	4,78	50.000	4,7
3	590.000	5,77	310.000	5,49	820.000	5,91	70.000	4,85	60.000	4,78
4	630.000	5,8	420.000	5,62	890.000	5,95	77.000	4,89	80.000	4,9
5	670.000	5,83	500.000	5,7	920.000	5,96	81.000	4,91	86.000	4,93
6	630.000	5,8	520.000	5,72	870.000	5,94	83.000	4,92	82.000	4,91
7	580.000	5,76	490.000	5,69	830.000	5,92	78.000	4,89	78.000	4,89
8	510.000	5,71	470.000	5,67	800.000	5,9	74.000	4,87	77.000	4,885
9	460.000	5,66	450.000	5,65	780.000	5,89	71.000	4,85	75.000	4,88
10	430.000	5,63	440.000	5,64	760.000	5,88	69.000	4,84	74.000	4,87

Discusión

Bingham y Meyer[1] en 1979 consiguieron el desenquistamiento in vitro de *Giardia sp.*, estableciendo cultivos de trofozoitos desenquistados, partiendo de quistes de *Giardia* del hombre y del mono. Mantuvieron este cultivo durante siete meses en medio HSP-3. Los autores no especificaron en su trabajo la técnica seguida para aseptizar los quistes y conseguir trofozoitos libres de contaminación bacteriana. Suponemos que los antibióticos que forman parte del medio HSP-3 permitieron conseguir un cultivo libre de bacterias.

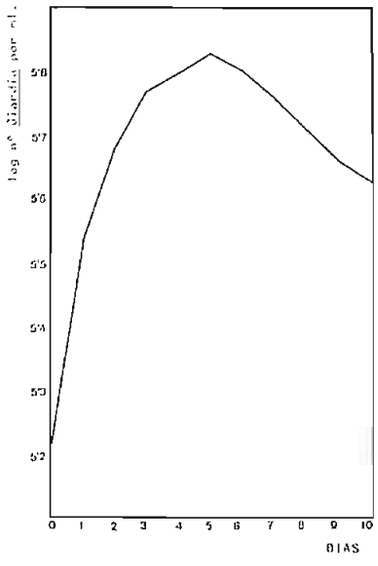
Nosotros conseguimos iniciar cultivo de trofozoitos de *Giardia muris* en medios axénicos y monoaxénicos partiendo de un concentrado de quistes, aseptizados con hipoclorito sódico al 3,3% y desenquistados posteriormente.

Excepto en el medio M-3 de Meyer, que lleva en su composición antibióticos, nunca incorporamos antibióticos al cultivo, consiguiendo cultivos libres de contaminación bacteriana.

Karapetyan[3] en 1962 cultivó *Giardia duodenalis* procedente de intestino de ratones, naturalmente infestados con este protozoo, en un medio de cultivo compuesto de suero humano, tripticasa, extracto de embrión de pollo y solución de Hank. También hemos ensayado este medio, añadiendo, al igual que Karapetyan[4], *Saccharomyces cerevisae,* indispensable para que las giardias crezcan y se desa-

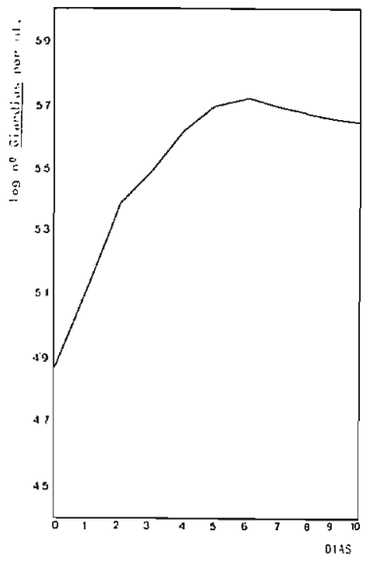
GRAFICA I

Curva de crecimiento de *Giardia muris* en el medio de Karapetyan.



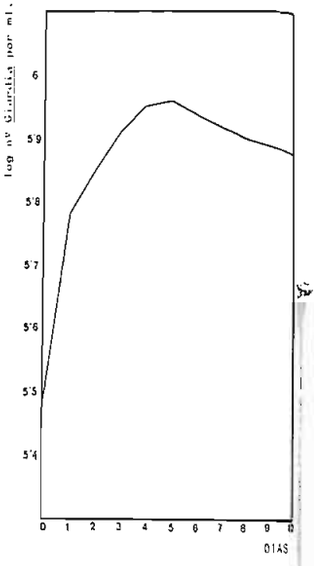
GRAFICA II

Curva de crecimiento de *Giardia muris* en el medio de HLELSB con levaduras.



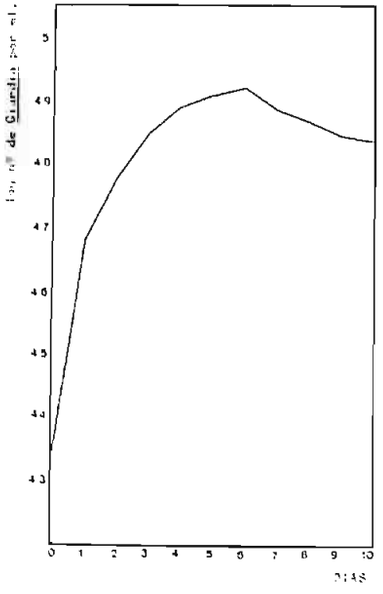
GRAFICA III

Curva de crecimiento de *Giardia muris* en el medio de TC-199 con levaduras.



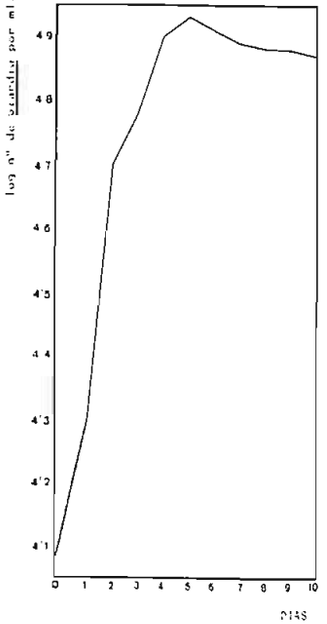
GRAFICA IV

Curva de crecimiento de *Giardia muris* en el medio M-3 de Moyer.



GRAFICA V

Curva de crecimiento de *Giardia muris* en el medio TC-199 sin levaduras.



rrollen. Pero mientras Karapetyan incorporaba a dicho medio de cultivo penicilina (500 U.I. por ml.) y estreptomicina (250 U.I. por ml.), nosotros, aunque no incorporamos al cultivo ningún antibiótico, conseguimos que el cultivo de *Giardia muris* prosperase, lo cual es indicativo de que los lavados previos al desenquistamiento permitieron la aseptización del medio y la obtención de trofozoitos viables con los cuales poder iniciar perfectamente un cultivo.

Karapetyan[4] en 1963, cultivando *Giardia intestinalis* en su medio al que añadió *Candida guillermondii* señaló que el máximo de crecimiento se conseguía en los días 5, 6 y 7, bajando el crecimiento en los días sucesivos. Nuestros hallazgos fueron semejantes a los de este autor, pues en su medio original conseguimos el máximo de crecimiento en los días 4, 5 y 6, y, a partir de este día, la cifra de *Giardia muris* fue decreciendo hasta el décimo día, en el que interrumpimos la experiencia.

En nuestro medio original HLELSB con *Saccharomyces cerevisae*, el máximo de crecimiento se obtuvo en los días 5, 6 y 7. Algo similar ocurrió en el cultivo en medio TC-199 con levaduras, donde el crecimiento máximo se obtuvo en los días 4, 5 y 6.

Meyer[5] en 1970, obtuvo por primera vez cultivos axénicos de especies de *Giardia*. Indicó que antes de iniciar un cultivo axénico de cepas de *Giardia*, debe establecerse monoaxénicamente con *Saccharomyces cerevisae*, pero separados ambos por una membrana de diálisis de modo que los requerimientos de metabolitos de levaduras vivas por parte de las giardias fuesen satisfechos.

Transcurrido un mes de mantener el cultivo en estas condiciones, *Giardia* es capaz de crecer axénicamente en el medio M-3. El crecimiento máximo ocurre entre el quinto y el séptimo día de la inoculación (Dancinger y Meyer[2]).

Conseguimos iniciar un cultivo axénico en el medio M-3 de Meyer con trofozoitos de *Giardia muris* procedentes de quistes que habían sido aseptizados según nuestra metodología y sometidos a la técnica de desenquistamiento in vitro, ya expuesta anteriormente. La curva logarítmica de crecimiento de *Giardia muris* indica que el crecimiento máximo lo obtuvimos 5-6 días después de la inoculación, resultados que coinciden con los indicados anteriormente por Dancinger y Meyer[2].

De igual modo, en el medio TC-199 sin adición de levaduras (medio que no había sido ensayado por ningún autor anteriormente para cultivos de *Giardia sp.),* el crecimiento máximo se consiguió transcurridos 4-5 días de la inoculación de los trofozoitos desenquistados de quistes de *Giardia muris.*

Referencias

1. **Bingham, A. K.; Meyer, E. A.**— *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. *Nature, 277,* 1979, 301-302.
2. **Dancinger, M.; Meyer, E. A.**— The in vitro growth response of *Giardia* trophozoites from the rabbit. *J. Protozool., 18,* 1971, 311-313.
3. **Karapetyan, A. E.**— In vitro cultivation of *Giardia duodenalis. J. Parasitol., 48,* 1962, 337-340.
4. **Karapetyan, A. E.**— Determination of growth rate of *Lamblia intestinalis* cultivated in vitro. *Acta Protozool., 1,* 1963, 321-326.
5. **Meyer, E. A.**— Isolation and axenic cultivation of *Giardia* trophozoites from the rabbit, chinchilla and cat. *Exp. Parasitol., 27,* 1970, 179-183.
6. **Osuna, A.; Guevara, D.**— Cultivo de helmintos parásitos, I: Primeros resultados con un medio básico para el cultivo in vitro de *Fasciola hepatica* L. *Rev. Ibér. Parasitol., 34,* 1974, 137-140.
7. **Sheffield, H. G.; Bjorvatn, B.**— Ultrastructure of the cysts of *Giardia lamblia. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 26,* 1977, 23-30.

(Recibido el 19 de diciembre de 1984; aceptado el 18 de marzo de 1985).