

**DETECCIÓN DE QUISTES DE *Giardia lamblia* A PARTIR DE AGUAS RESIDUALES
USANDO SEPARACIÓN FLUORO-INMUNOMAGNÉTICA**

Michael Key González Ortiz

1.092.348.305

Universidad De Pamplona
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Biología
Pamplona Colombia

2017

**DETECCIÓN DE QUISTES DE *Giardia lamblia* A PARTIR DE AGUAS RESIDUALES
USANDO SEPARACIÓN FLUORO-INMUNOMAGNÉTICA**

Estudiante:

Michael Key González Ortiz

1.092.348.305

Directora:

PhD. Raquel Amanda Villamizar Gallardo

Universidad De Pamplona
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Biología
Pamplona Colombia
2017

TESIS PARA ASPIRAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mi padre Jaime Gonzalez Mendoza, quien luchó contra su enfermedad hasta lo último con el gran anhelo de verme como un profesional, y que aun estando en el cielo, sé que estará orgulloso de ver el primero de muchos logros que vendrán en mi vida profesional.

A mi madre Luber Ortiz Osorio que me inculco la gran importancia de salir adelante y de convertirme en un hombre de muchos valores.

A mi abuela Josefa Moreno De Zarta quien día tras día estuvo pendiente, me apoyaba con cada palabra de aliento para que siguiera adelante y que nunca me olvidara de luchar por lo que amaba.

Agradecimientos

Agradezco a Dios que siempre me cuidó en todo el camino quien no permitió que nada malo me pasara y que me ayudó a derribar cada obstáculo que se cruzaba en mi camino, así como llegar hasta el final de mi vida universitaria.

Agradezco a mis padres Jaime González Mendoza quien me apoyó hasta el último momento de su vida brindándome cada ayuda necesaria para que mi paso por la vida universitaria fuera el más exitoso, por sus consejos palabras de aliento y por enseñarme el valor de luchar hasta el último segundo por nuestras metas, Luber Ortiz Osorio quien después de la gran pérdida de mi padre se hizo al frente de todo que con esfuerzo, sacrificios, dedicación, entrega y lucha logro ayudarme a terminar esta etapa de mi vida.

A mis abuelos Josefa Moreno De Zarta quien nunca dejó de creer en mi dedicación y lucha en la universidad, y quien estuvo siempre presente ayudándome con mucho esfuerzo en lo que más podía para que lograra culminar mis estudios; por sus consejos, palabras de aliento y siempre inculcándome los mejores valores que me ayudaron no solo a ser un buen universitario si no un ser humano con gran ética, por siempre mostrarme el gran valor de la humildad, de la fe y espíritu de lucha contra cualquier obstáculo, porque en esa pequeña casa logro despertar desde una temprana edad el amor hacia la naturaleza, Gregorio Zarta quien se encuentra en el cielo y al que le debo muchos de sus consejos durante mi niñez los cuales nunca olvide y llevaré siempre conmigo.

A mis hermanos Brayan y Sharon González Ortiz que desde casa siempre estuvieron presentes en mis pensamientos por quienes me esforzaba por enriquecer mi parte intelectual y demostrarles que el verdadero camino hacia el éxito es el estudio, la dedicación, luchar por lo que se ama y salir adelante con esfuerzo y perseverancia, de no rendirse ante el primero de muchos obstáculos que se presentan en la vida estudiantil y personal.

A mi novia Natalia Cardona Marín a quien desde que conocí se convirtió en un apoyo incondicional en mi vida, quien lograba levantarme cada vez que me veía decaído que con su compañía no solo lograba animarme si no que siempre colocaba una sonrisa en mi rostro, por sus palabras, consejos ante tristezas y problemas que tuve que afrontar durante la culminación de mis estudios, quien con su amor y comprensión me ayudaba sacando lo mejor de mí.

A mis amigos Cesar Augusto Roa quien estaba presente en cada momento bueno o malo y con quien compartía muchos momentos duros de nuestras familias, estudios a Yermanth Roa Marín con quien compartí muchos momentos alegres, a Camilo Andrés Olarte Quiñonez quien siempre estuvo presente desde preescolar y quien me brindó muchos consejos como un profesional además de su apoyo incondicional en todo momento, Fernán Bonilla por su experiencia como profesional y su gran amistad.

A mi directora de tesis Raquel Amanda Villamizar quien estuvo al pendiente de cada paso que daba en el desarrollo del proyecto, por sus consejos y conocimiento, por la paciencia que tuvo durante la mejora de este proyecto y por su dedicación.

A los profesores Ulda Margarita Becerra, Diego Jaimes, Oscar Orlando Ortiz, Saury Thomas quien me colaboraba en todo lo que necesitaba durante el desarrollo de este trabajo

Al grupo de Investigación NANOSOST por abrirme las puertas y permitirme desarrollar este trabajo de grado.

Al compañero Edward Mayorga quien estuvo trabajando y colaborándome en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Hugo D. Lujan Director del Conicet en la Universidad de Córdoba Argentina, por su amabilidad gentileza y colaboración en el envío de los anticuerpos, por su disposición y colaboración en este proyecto

Contenido	
Agradecimientos	5
Lista de Figuras	9
Lista de Gráficos y tablas	10
RESUMEN	11
1. Introducción	12
2. Marco de Referencia	13
2.1 Definición de Agua	13
2.2 Contaminantes biológicos en aguas.	13
2.3. Parásitos	14
2.2.1 Giardia sp.	14
2.2.1.1 Ciclo Biológico de Giardia lamblia	15
2.3 Técnicas de detección de Giardia sp	16
2.4 Antecedentes.	17
2.5 Justificación	18
3. Objetivos	21
3.1 General	21
3.2 Específicos	21
4. Materiales y métodos	22
4.1 Área de estudio y recolección de muestras coprológicas.	22
4.2 Recolección de muestras.	22
4.2.1 Coprológicas	22
4.2.1.1 Purificación y concentración de quistes.	23
4.2.1.2 Conteo en Cámara de Neubauer	23
4.2.2 Aguas residuales	23
4.2.2.1 Funcionalización de Micropartículas Magnéticas	24
4.2.2.2 Pruebas de adsorción específicas	24
4.2.2.3 Pruebas de especificidad	24
4.2.2.4 Detección de Giardia sp. Mediante la técnica fluoro-inmunomagnética en muestras de agua destilada estéril (ADE) artificialmente contaminadas con quistes del parásito y aguas residuales.	24
4.2.2.5 Detección de Giardia sp. Mediante la técnica filtración por membrana en muestras de agua destilada estéril (ADE) artificialmente contaminadas con quistes del parásito y aguas residuales.	25

4.2.2.9 Modelo Estadístico	25
4.2.2.9.1.....	25
5.0 Resultados.....	27
5.1 Obtención de quistes	27
5.2 Purificación de quistes.....	27
5.3 Funcionalización de Micropartículas Magnéticas.....	28
5.4 Prueba de Adsorción Específica.....	28
5.6 Prueba de especificidad	29
5.7 Detección de <i>Giardia sp.</i> Mediante la técnica fluoro-inmunomagnética en muestras de agua destilada estéril (ADE) artificialmente contaminadas con quistes del parásito.	29
5.8 Detección de <i>Giardia sp.</i> Mediante la técnica filtración por membrana en muestras de agua destilada estéril (ADE) artificialmente contaminadas con quistes del parásito.	30
5.9 Detección de <i>Giardia sp.</i> Mediante la técnica fluoro-inmunomagnética en muestras de agua residual del río pamplonita Pamplona Norte de Santander	31
5.10 Detección de <i>Giardia sp.</i> Mediante la técnica filtración por membrana en muestras de agua residual del río Pamplonita en Pamplona Norte de Santander	33
6.0 DISCUSIÓN	34
7.0 Conclusiones.....	38
Referencias Bibliográficas.....	39
Anexos.....	45

Lista de Figuras

Figura 1. Morfología de Quiste de *Giardia sp.*

Figura 2. Ciclo Biológico de *Giardia sp*

Figura 3. Ubicación de las escuelas donde se recolectaron las muestras coprológicas. A) Escuela 1, B) escuela 2, C) escuela 3, D) escuela 4

Figura 4. Mapa sobre el sitio de toma de muestras de agua residual Río Pamplonita pasos abajo del puente Chichira; Coordenadas (Latitud 7°22'29.50"N y Longitud 72°38'22.61"O).

Figura 5. Microscopía Óptica de quistes de *Giardia sp.* antes y después de la purificación A) tinción con lugol de muestra directa, observación en 100X, B) Quistes purificados conservados en PBS Observación en 100X.

Figura 6. Microscopía A) Óptica de un quiste de *Giardia sp* unido a través de la interacción Ag-Ac, objetivo de 40X B) El mismo campo en modo fluorescencia donde pueden visualizarse las micropartículas magnéticas, objetivo de 40X

Figura 7. Microscopía óptica y de fluorescencia de A) quiste de *Giardia sp* observado en 40X sin colorante B) Micropartículas magnéticas en modo óptico objetivo 40X C) Micropartículas magnéticas en modo fluorescencia objetivo 40X.

Figura 8. Microscopía A) Óptica de un quiste de *Entamoeba coli* antes de realizar el magnetizado, teñido con lugol y observado en objetivo de 40X. B) Óptica de micropartículas funcionalizadas después de ser expuestas al parásito objetivo 20X. C) Fluorescencia del mismo campo donde se aprecian solo las partículas fluoro-magnéticas.

Figura 9. Microscopía A) Óptica de un quiste de *Giardia sp* después de magnetizar una muestra de agua contaminada con 10^2 Quiste/mL y observado en objetivo de 40X. B) Fluorescencia del mismo campo donde se aprecian solo las partículas fluoro-magnéticas

Figura 10. Microscopía Óptica de Quistes de *Giardia sp* obtenidos después de la filtración por membrana de muestras de agua destilada estéril contaminados artificialmente.

Figura 11. Microscopía A) Óptica de una quiste de *Giardia* detectados en aguas residuales del Río Pamplonita. El quiste se encuentra unido a una par de micropartículas a través de la interacción antígeno-anticuerpo. Objetivo de 40X. B) Fluorescencia del mismo campo donde sólo se aprecian las micropartículas fluoro-inmuno-magnéticas. Objetivo 40 X

Lista de Gráficos y tablas

Gráfica 1. Prevalencia de *Giardia sp* en escuelas de Pamplona Norte de Santander.

Gráfica 2. Porcentaje de Recuperación de quistes de *Giardia sp*. Ensayo de controles positivos para la técnica fluoro-inmunomagnética, filtración por membrana.

Gráfica 3. Diagrama de cajas sobre el número de quiste de *Giardia* detectados en los 3 volúmenes colectados en el muestreo.

Gráfica 4. Diagrama de dispersión sobre el número de quiste de *Giardia* detectados en los 3 volúmenes colectados en el muestreo.

Tabla 1. Enfermedades infecciosas y agente causal.

RESUMEN

El estudio de *Giardia sp*, en aguas es de vital importancia ya que este es un parásito intestinal que ataca principalmente la población infantil. El quiste llega a la cadena alimenticia a través de vehículos transmisores tales como el agua de donde son expulsados por medio de heces humanas o animales. Las técnicas convencionales de detección están basadas en el uso de microscopía óptica previo a su concentración a través de técnicas como la de Ritchie, Sheather, Faust, Telemann, MIF Mertiolato/Yodo/Formol. También se encuentran métodos más avanzados como: Método por precipitación, Determinación de antígenos por ‘ensayo por inmovinabsorción ligado a enzimas (ELISA), Inmunofluorescencia, Citometría de Flujo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), etc. Aunque estos métodos son efectivos, en el país no se han podido introducir masivamente posiblemente debido a que algunos se pueden ver afectados por las técnicas de concentración utilizadas, en el caso de las técnicas de fluorescencia hay sustratos del medio ambiente que pueden emitir fluorescencia, no siempre se trata de métodos flexibles, la falta de disponibilidad regular de los paquetes en el mercado y que algunos de estos métodos también detectan los microorganismos muertos. La metodología IMS trabajada en este proyecto a pesar de que sus materiales son costosos comparada con las técnicas convencionales, IMS proporciona suspensiones más limpias de quistes de *Giardia* de muestras de agua de turbidez baja y alta. También se ha demostrado que el procedimiento es adaptable a la recuperación de organismos individuales para posteriores procesamientos que incluyan determinar el tipo molecular y para la evaluación de la viabilidad.

Por tal motivo, en este estudio se reporta por primera vez el uso de una técnica de separación magnética modificada que emplea micropartículas magnéticas que permiten la concentración y separación de los quistes a partir de muestras de matrices complejas como lo es el agua residual y adicional a esta propiedad, posee integrada a su estructura un núcleo fluorescente que permite realizar de manera más sencilla la identificación del quiste del parásito. Las micropartículas fueron funcionalizadas con anticuerpo monoclonales anti-*Giardia*, lo que facilitó la detección del patógeno a través de la interacción antígeno-anticuerpo. Los quistes fueron concentrados y separados empleando un campo magnético externo, mientras que la visualización se hizo empleando microscopía de fluorescencia. La efectividad de esta técnica se contrastó con la filtración por membrana usando filtro millipore de 0.45 μm y los ensayos se hicieron tanto en muestras de agua destilada contaminadas artificialmente como en muestras reales de aguas residuales provenientes del río. Los resultados permitieron determinar que la técnica fluoro-inmunomagnética permite la concentración, separación y detección de quistes de *Giardia* en tan sólo 1 Lt de agua. Además, la técnica mostró ser selectiva ya que en presencia de otro tipo de parásito como *Entamoeba coli* no se presentaron reacciones cruzadas. En comparación con la filtración por membrana mostró mayor sensibilidad en la detección ya que en todos los análisis hechos en 1 lt de agua la técnica fluoro-inmunomagnética siempre permitió la recuperación de quistes del parásito. Por tanto, se pudo concluir a través de esta investigación que es posible detectar de forma rápida, sensible y selectiva quistes de *Giardia lamblia* a partir de aguas residuales.

1. Introducción

Giardia lamblia, un protista parasitario, que cambia su ciclo de vida entre dos formas distintas: un trofozoíto flagelado móvil, capaz de unirse a las células epiteliales intestinales, y un quiste inmóvil que es capaz de sobrevivir en el medio ambiente. Este parásito es el agente etiológico de la Giardiasis, la cual es una parasitosis de distribución cosmopolita. Este protozoo flagelado coloniza el intestino de seres humanos y animales, produciendo una enfermedad que puede ser asintomática, aguda o crónica, con cuadros diarreicos de intensidad variable que puede llegar a ocasionar síndrome de mala absorción (Rodríguez V. et al 2014).

Los quistes, son las formas resistentes del parásito que contaminan el agua o los alimentos. La transmisión se produce a través del contacto directo de persona a persona en entornos con niveles de higiene comprometidos, como centros de cuidado de niños. El agua cruda es un vehículo importante si se ingiere directamente o se utiliza en el riego y la preparación de alimentos consumidos crudos (Colli M. et al 2015).

Para el análisis y la evaluación de la calidad del agua residual en Colombia se cuenta con la resolución 1594/84. La determinación de la fuente de la contaminación en ambientes acuáticos es importante para la estimación de los riesgos de salud asociados con las contaminación, facilitando medidas para remediar los cursos de agua contaminados y la determinación de responsabilidades legales a futuro (Venegas C. 2015). Los riesgos ambientales y de salud pública asociados con la eliminación de aguas residuales han enfocado la atención en la importancia de un tratamiento eficiente de las aguas residuales. Además, la reutilización de aguas residuales recuperadas ha surgido como una opción prominente en la búsqueda de fuentes alternativas de agua (Ramo A. et al 2017)

La mayoría de los parásitos intestinales se transmiten por contaminación del ambiente y en este aspecto, el agua y los alimentos juegan un papel importante si las heces llegan directamente a las fuentes hídricas (Pérez C. et al 2008). Que es lo que convencionalmente pasa con el Río Pamplonita, los quistes, ooquistes y huevos de los parásitos intestinales permanecen allí y se distribuyen de forma sencilla a cultivos y fuentes hídricas empleadas para recreación y/o consumo.

En Colombia según la Resolución Número 2115 de 2007 del Ministerio de la protección social y de ambiente, vivienda y desarrollo territorial el valor aceptable para *Giardia* es de cero (0) Quistes por volumen fijado según la metodología aplicada en aguas potables. Se emplean Técnicas implementadas y validadas según la Environmental Protection Agency (EPA), método 1623 de diciembre de 2005, que consta de tres pasos fundamentales: filtración, purificación y detección. El método 1623 de la EPA requiere filtración, separación inmunomagnética de los quistes del material capturado y enumeración de los organismos basándose en los resultados de microscopía de ensayo de inmunofluorescencia (FA).

2. Marco de Referencia

2.1 Definición de Agua

Líquido transparente, incoloro, inodoro e insípido en estado puro, cuyas moléculas están formadas por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno, y que constituye el componente más abundante de la superficie terrestre y el mayoritario de todos los organismos vivos (RAE, 2017).

El agua, es un recurso natural escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente, que como consecuencia del rápido desarrollo humano y económico y del uso inadecuado que se ha hecho de ella como medio de eliminación, ha sufrido un alarmante deterioro (Zúñiga C, 2014). El agua, un compuesto extraordinariamente simple, es sin embargo una sustancia de características tan excepcionales y únicas que sin ella sería imposible la vida, es una sustancia de capital importancia para la vida con excepcionales propiedades consecuencia de su composición y estructura. Es una molécula sencilla formada por tres pequeños átomos, uno de oxígeno y dos de hidrógeno, con enlaces polares que permiten establecer puentes de hidrógeno entre moléculas adyacentes. Este enlace tiene una gran importancia porque confiere al agua propiedades que se corresponden con mayor masa molecular. El agua es en el hombre, el líquido en el que se produce el proceso de la vida y, de hecho, la supervivencia de las células depende de su capacidad para mantener el volumen celular y la homeostasia (Carbajal A *et al*, 2012).

2.2 Contaminantes biológicos en aguas.

El deterioro de la calidad del agua es un gran problema que va en aumento, y es considerado uno de los principales problemas ambientales. Las principales causas, tanto para el agua dulce como la salada, son los vertidos incontrolados de las aguas residuales urbanas e industriales, muchas veces sin tratamiento. Los principales efectos que produce el agua contaminada en el medio ambiente son: contaminación microbiológica del agua, con la transmisión hídrica de enfermedades (Fernández C. 2012)

Estas enfermedades se pueden clasificar en tres grupos: microbios patógenos, virus, y parásitos y protistas. Los microbios patógenos han sido la principal causa de muerte en los países en desarrollo del mundo. Este grupo de microbios se infecta directamente a través del agua potable, Algunos virus pueden crecer en el canal alimentario humano o en la boca y la laringe, para luego ser expulsados a través de heces que pueden verse en aguas residuales y aguas contaminadas. Los parásitos también pueden ser transferidos al cuerpo humano a través del consumo directo de agua contaminada, causando enfermedades. Las enfermedades más importantes, transmitidas por parásitos se describen en la Tabla 1. La contaminación del agua por estos organismos puede estar relacionada con la contaminación del agua misma durante la fase de la tubería. Esta contaminación puede entrar en la línea a través de la red de distribución (Behnam H *et al* 2013).

No	Enfermedad	Agente Causal
1	Disentería amebiana	<i>Entamoeba histolytica</i>
2	Giardiasis	<i>Giardia lamblia</i>
3	Balantidiasis	<i>Balantidium coli</i>
4	Dracunculiasis	<i>Dracunculus</i>
5	Distomatosis	<i>Fasciola hepatica</i>

Tabla 1. Enfermedades infecciosas y agente causal. Tomado y adaptado de Behnam H et al 2013.

2.3. Parásitos

Cualquier organismo que disminuye la aptitud de su huésped infectándolo. Esta definición ecológica incluye microparásitos (por ejemplo, virus y bacterias) y macroparásitos (por ejemplo, Gusanos) (Pierre O & Samuel A 2014). La característica que comparten todos ellos es que necesitan de otros organismos vivos para completar su ciclo vital, de esta manera, se establecen una serie de relaciones entre ellos y el hospedador como lo es el parasitismo, asociación en la cual uno solo de los socios, que denominaremos parásito, obtiene los beneficios y el otro, el hospedador, puede sufrir daño. Como en todo fenómeno biológico, no es posible establecer barreras rígidas que permitan separar estrictamente los distintos tipos de asociación. Existe la posibilidad en algunos casos de pasar de una relación de comensalismo a una de parasitismo. La Organización Mundial de la Salud (OMS), define el parasitismo como un estado de asociación biológica entre dos especies diferentes y al parásito como el ser vivo que de manera temporal o permanente, vive a expensas de otro organismo de distinta especie obteniendo de éste su nutrición y morada y, al cual, puede ocasionar daño estructural o funcional. Como consecuencia de esta asociación durante la evolución de las especies los parásitos han sufrido transformaciones morfológicas y fisiológicas, para poder adaptarse a su vida parasitaria. Cabe mencionar por ejemplo: la atrofia o desaparición del aparato locomotor, la adquisición de estructuras que permiten su fijación al hospedador, la reducción o desaparición del aparato digestivo. En general, los aparatos circulatorio, respiratorio y de excreción son simples. El sistema nervioso y los órganos de los sentidos son muy desarrollados en artrópodos y rudimentarios en helmintos. Con el fin de asegurar la sobrevivencia de la especie han desarrollado una extraordinaria capacidad de reproducción. Entre los helmintos existen machos y hembras, aunque algunos son hermafroditas. En todos ellos la mayor parte del cuerpo está ocupada por el aparato reproductor que en algunos casos incluso es doble. Los protozoos también tienen una gran capacidad de multiplicación, ya sea a través de procesos sexuales o asexuados (Valdebenito M *et al* 2012)

2.2.1 *Giardia sp.*

Los organismos del género *Giardia* se clasifican en el phylum Metamonada, subphylum Trichozoa, superclase Eopharyngia, clase Trepomonadea, subclase Diplozoa y orden Giardiida. La taxonomía de las especies de *Giardia* ha sido controvertido, resultando en una nomenclatura confusa con nombres diferentes que se utilizan para la misma especie. Hasta la fecha se han reconocido seis especies en el género, una en anfibios (*G. agilis*), dos en aves (*G. ardeae* y *G. psittaci*), dos en roedores (*G. muris* y *G. microti*) y una en mamíferos (*G. duodenalis*). En el caso de *G. duodenalis*, dos sinónimos también están en uso por razones históricas, *Giardia intestinalis* y *Giardia lamblia*. Además de la variación morfológica de quistes y trofozoítos, que está en la base de la taxonomía, existe una amplia variación genética entre y dentro de cada especie, como lo demuestran los estudios de polimorfismos de proteínas y ADN (Certad G. *et al* 2017).

La forma de movilidad del trofozoíto de *Giardia* es mediante sus ocho flagelos que conservan en la estructura canónica "9 + 2" de un flagelo móvil. Los ocho flagelos están organizados en cuatro pares bilateralmente simétricos: el anterior, el caudal, el posteriolateral y el ventral. Los cuerpos basales de todos los flagelos se localizan en la parte anterior de la célula entre los dos núcleos.

Cada par flagelar difiere en su posición citológica dentro del trofozoíto y en su asociación con estructuras auxiliares. El golpe coordinado de los ocho flagelos móviles de *Giardia* da como resultado movimientos complejos esenciales para la motilidad y la división celular, y puede ayudar en la fijación del parásito al epitelio intestinal del huésped (Shane G. *et al* 2016).

Se transmite principalmente a través de agua y alimentos y estas rutas de transmisión resultan en brotes. *Giardia* se ha asociado con numerosos brotes de agua durante las últimas décadas. Más del 30% de los brotes notificados se asociaron con sistemas de agua potable contaminados, o presumiblemente contaminados, con *Giardia*. Para los brotes de agua potable, las deficiencias en los procesos de tratamiento de agua son la razón más citada (Einarsson E. *et al.*2015). La infección con *G. lamblia* es una de las enfermedades parasitarias más comunes en todo el mundo y se inicia por la ingestión de los quistes del parásito, los cuales se desenquistan debido a las enzimas digestivas del estómago, liberando los trofozoítos. Estos colonizan el intestino delgado superior y se adhieren a la superficie del epitelio intestinal mediante un organelo característico llamado “disco ventral o de adhesión”. El mecanismo de adaptación de *Giardia* conocido como enquistamiento, es esencial para que el parásito pueda sobrevivir fuera del intestino del hospedador, ya que los trofozoítos son sensibles a los cambios de temperatura, humedad y a la presencia de agentes químicos. En este proceso, los trofozoítos descienden por el intestino del hospedador, y al encontrar un ambiente pobre en colesterol, se induce su diferenciación a quiste, los cuales son eliminados con las heces. La principal característica de la forma quística es la presencia de una rígida pared glicoprotéica externa que protege al parásito en condiciones ambientales muy hostiles, inclusive a la acción de desinfectantes (Lujan D, 2006).

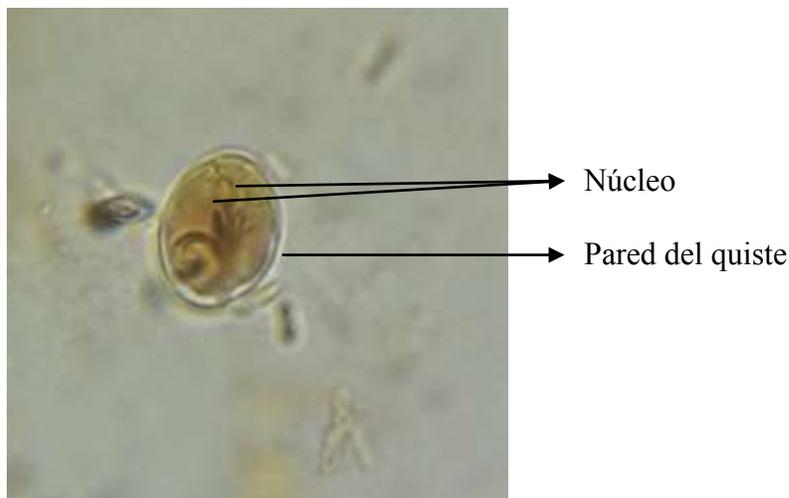


Figura 1. Morfología de Quiste de *Giardia sp.* (Fuente Propia. 2017)

2.2.1.1 Ciclo Biológico de *Giardia lamblia*

El ciclo biológico de *G. lamblia* presenta dos fases distintas: trofozoíto y quiste. La forma del trofozoíto es piramidal, con ocho flagelos dispuestos dos en dos. Reside normalmente en las dos primeras partes del intestino delgado; duodeno y yeyuno, donde absorbe alimentos. Su movimiento se produce alrededor de una capa mucosa inmóvil situada en la base de las microvellosidades con un movimiento en saca corcho. Las heces pueden ser una

vía de movilización hasta el intestino grueso para los parásitos no adheridos. Si el microorganismo está el tiempo suficiente en el colon se produce la retracción de los flagelos en vainas citoplasmáticas y se excreta en forma de quiste más pequeño y ovalado que el trofozoíto. Estos quistes son la forma infectiva del parásito. Cuando maduran son capaces de sobrevivir durante más de dos meses en agua fresca y resisten a la cloración durante la potabilización del agua. La nueva infección se produce por ingestión de agua, verduras frescas etc., contaminadas por quistes. Una vez en el duodeno el quiste se divide para dar lugar a dos trofozoítos binucleados (Garrido A. 2015).

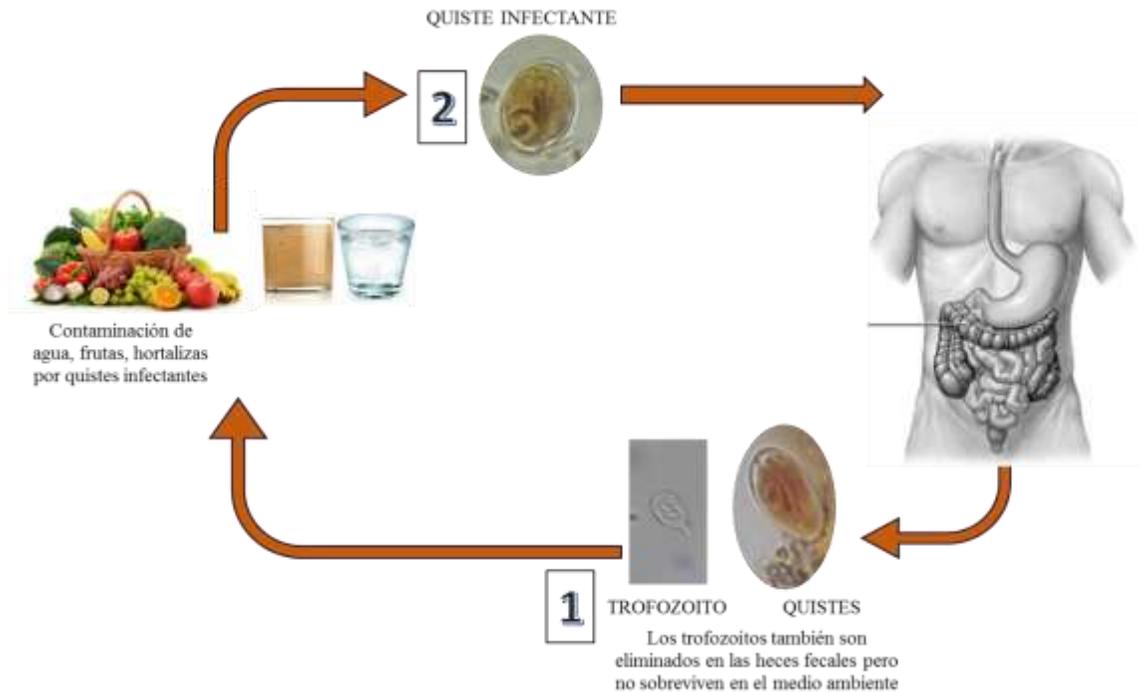


Figura 2. Ciclo Biológico de *Giardia sp* (Fuente Propia. 2017)

2.3 Técnicas de detección de *Giardia sp*

Las técnicas que se usan en la detección de quistes de *Giardia sp* en agua se acompaña de unos pasos que se basan en: Fase de Concentración que incluye técnicas como filtración (ha sido el método más popular en el intento de aislar con éxito parásitos protozoarios en agua) empleando membranas, Cartuchos, o ultra-filtración, y recuperación de partículas del filtro, precipitación química seguida por disolución del precipitante, centrifugación continua y centrifugación-decantación. La segunda fase del procedimiento de monitoreo tiene como objetivo la concentración selectiva de organismos diana a partir del conjunto de partículas. Esto se ha logrado a través de las dos técnicas de separación por gradiente de densidad: flotación y centrifugación en gradiente discontinuo. Sin embargo, después de la aprobación de la USEPA en 1999, las metodologías con IMS fueron desplazando las metodologías de separación de gradientes. El paso final del procedimiento de monitoreo en agua es la detección e identificación. Métodos utilizados a lo largo de los años para el control de *Giardia* en el agua son de gran variedad, siendo los más notables microscópicas y moleculares. La detección también es posible

mediante citometría de flujo, óptica, Ensayo de Inmunofluorescencia (Directa, indirecta) y nuevas técnicas basadas en biosensores (Efstratiou A. *et al* 2017)

Como ejemplo tenemos el método empleado por los autores Hans A. *et al* 2011, fue la filtración por cartuchos, seguido de una separación inmunomagnética usando columnas MS MACS y detección mediante citometría de flujo con un citómetro de flujo espacial CyClow Partec equipado con un láser de estado sólido azul de 200mW que emitía luz a 488nm dicho método consiste en un conteo volumétrico del citómetro de flujo donde midieron los eventos en 200µl de volumen de muestra y extrapolaron el resultado a 1ml del volumen de muestra. Los filtros ópticos se ajustaron para medir la fluorescencia verde a 520nm, la fluorescencia roja a 630nm y la dispersión lateral (SSC) a 488nm. El gatillo se fijó en fluorescencia verde. Los eventos fueron definidos basados en fluorescencia SSC, 520nm y 630nm. Los resultados se presentaron trazando fluorescencia verde (520nm) frente a fluorescencia roja (630nm), así como frente a SSC y aplicando regiones de bloqueo definidas (Hans A. *et al* 2011).

2.4 Antecedentes.

A nivel internacional, investigadores brasileiros reportaron en 2012 un estudio sobre la ocurrencia de oocistos de *Cryptosporidium sp* y quistes de *Giardia sp*. en los principales manantiales de dicha ciudad, encontrando que *Cryptosporidium* fue la especie más prevalente (8,1%), seguida por *Giardia duodenalis* (5,9%), *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (2,7%) y *Blastocystis hominis* (2,2%). El método empleado por los autores fue la filtración por membrana seguido de inmuno-fluorescencia/DAPI y microscopía de contraste de fase. Los resultados mostraron una alta contaminación de diferentes manantiales de una importante ciudad turística de Brasil, destacando la necesidad de monitorear las fuentes de agua naturales (Branco *et al* 2012). Así mismo en Sao Paulo, otro grupo de investigadores realizaron estudios sobre la calidad del agua potable examinando la prevalencia de *Giardia sp*. En este caso los investigadores emplearon la técnica de filtración usando filtros de policarbonato de 1µm (Whatman Inc.) acoplada a separación inmunomagnética usando anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína para *Giardia* y *Cryptosporidium* (Waterborne) y DAPI (4', 6-diamidino-2-fenil-indol, Sigma). Los investigadores lograron determinar que la infección por *Giardia* osciló entre 0,29% a 2,47% en niños y adultos, respectivamente. De esta forma, los autores concluyen que las aguas superficiales evaluados están fuertemente contaminados por los quistes de *Giardia* lo cual es ocasionado por deficientes sistemas de potabilización o la falta de acceso de agua potable a la población analizada (Sato Z *et al*, 2013). Recientemente en España un grupo de investigadores realizaron estudios sobre la incidencia de *Giardia* en agua destinada para el consumo. Los autores de la investigación encontraron *G. duodenalis* en 58 muestras (45,6%) agua potable y un (59,8%) 76 muestras en aguas no tratadas, empleando filtración por membrana acoplado a separación inmunomagnética. La identificación de los parásitos la llevaron a cabo usando métodos moleculares basados en PCR (Castro H *et al*, 2015).

Estudios recientes con la finalidad de establecer la prevalencia, el nivel de contaminación y la importancia para la salud pública de *Giardia duodenalis* un grupo de Investigadores realizaron un estudio en Ríos primario de Rumania Occidental, encontrando que 22 muestras (41,5%) eran positivas para los quistes de *Giardia* (de 0,05 a 300 quistes por litro), de las cuales *G. duodenalis*

se identificó molecularmente en 13 muestras de agua (24,5%), destacando una considerable contaminación de las aguas de los ríos con *Giardia spp.* Empleando filtración de microfibras; Se aislaron los quistes de *Giardia* mediante separación inmunomagnética (IMS) de acuerdo con el método USEPA 1623 y, después de la tinción con anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia (FITC), se identificaron y contaron bajo un microscopio. Se identificaron las especies a través del procedimiento anidado PCR-RFLP dirigido a los genes 18S ribosomal RNA y *gdh*, respectivamente (Imre K *et al* 2017).

En Sarawak, Malaysia, Reena L. *et al* 2016 estudiaron la presencia de parásitos transmitidos por el agua en varios sitios de procesamiento de dos plantas de tratamiento de agua potable (A y B) y siete sistemas de distribución (DS) en Dicha isla, donde encontraron muestras para *Giardia* (32,9%, 28/85) empleando técnicas como filtración por membrana seguido de separación inmunomagnética (IMS) aplicada de acuerdo con el Método USEPA 1623.1 con modificaciones menores. Las perlas de hierro recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos de *Giardia* se usaron para separar los quistes del sedimento de agua y de los desechos utilizando el concentrador de partículas magnéticas. El sobrenadante restante se utilizó entonces para detectar otros parásitos. La muestra se tiñó con isotiocianato de fluorescencia comercial (FITC) marcado (*Giardia* Cel IF Kit, Cellabs Pty Ltd., Brookvale, Australia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La observación se realizó microscopio de epifluorescencia, para confirmar la presencia de quistes (Reena L. *et al* 2016).

A nivel nacional en el departamento de Quindío se han estudiado casos sobre presencia de parásitos intestinales asociados a sistemas de agua potable y no potable determinando la presencia de quistes de *Giardia sp*, *Blastocystis sp*, y ooquistes de *Cryptosporidium sp*. para la viabilidad de las formas parasitarias usaron Inmufluorescencia con anticuerpos específicos para *Giardia* y *Cryptosporidium*. (GEMAPOL, 2012).

Investigaciones realizadas por (Huang W. *et al* 2017), diseñaron un sistema de dispersión laser de múltiples ángulos basados en microfluidos (MALS), capaz de adquirir patrones de dispersión de una sola partícula. El sistema incluye un chip de vidrio microfluídico de boquilla sin revestimiento, y una unidad MALS en el chip que está en alineación con la salida de la boquilla en el chip, dicho sistema proporciona una herramienta prometedora para la detección libre de parásitos transmitidos por el agua y otros contaminantes biológicos. En otras investigaciones realizadas por (Sabi A *et al* 2015), diseñaron una unidad que utiliza un filtro metálico y un transductor de ultrasonidos para eluir quistes, con un volumen de retrolavado retenido Aproximado de 400 µl, encontrando altas tasas de recuperación de quistes de *Giardia sp*, son técnicas que arrojan buenos resultados pero que tienen un nivel de complejidad elevado a la hora de utilizarlas en un laboratorio convencional.

2.5 Justificación

Los sistemas de salud, el saneamiento y el acceso al agua tienen ciertas limitaciones en los países de América Latina (AL): asuntos típicos de los países en desarrollo. Por países, Brasil lidera los reportes de protozoarios parasitarios en América del Sur con 30,3% (20/66), seguido por Argentina con 15,1% (10/66), Colombia 10,6% (7/66). El agua es a menudo contaminada y por lo tanto poco saludable para los consumidores y usuarios. La información sobre la prevalencia y

la detección de protozoos parasitarios transmitidos por el agua es limitada o no está disponible en LA. Colombia, desde 2007, decretó la vigilancia obligatoria de los protozoarios (Resolución 2115, 2007). Este reglamento se encuentra todavía en fase de ejecución por parte de las empresas de servicios que suministran agua para consumo humano. Estos esfuerzos pueden tener una importancia notable en los últimos años, mejorando los informes sobre brotes y la vigilancia, por lo que estas medidas podrían ser un modelo para otros países de la región para el control y monitoreo de protozoarios de importancia médica (Rosado M. *et al* 2017)

Protozoos intestinales patógenos identificados según regiones. Encuesta Nacional de Morbilidad (Peralta L *et al* 2008).

Protozoos patógenos	*Región del Atlántico	*Región Central	*Región Pacífico	*Región Oriental	Santa fe de Bogotá
<i>Entamoeba histolytica</i>	16,4%	10,4%	14,3%	10%	10%
<i>Giardia lamblia</i>	15,7%	13,3%	13,3%	15%	10,8%
<i>Balantidium coli</i>	0,2%	-	0,2%	-	-
<i>Tricomonas ntestinalis</i>	0,2-1%	0,2-1%	-	-	0,2-1%

* Departamentos en: Región del Atlántico (Atlántico, Bolívar, Cesar, Córdoba, Guajira, Magdalena, Sucre). Región Central (Antioquia, Caldas, Huila, Tolima, Armenia, Quindío, Risaralda). Región Pacífica (Chocó, Cauca, Valle del Cauca, Nariño). Región Oriental (Boyacá, Norte de Santander, Santander, Casanare, Cundinamarca y Meta) (Peralta L *et al* 2008).

- No se mostró la prevalencia de estos parásitos en estas regiones, pues donde se obtuvo no fue significativa (Peralta L *et al* 2008)

Aunque la giardiosis es más común en niños en los primeros 10 años de edad, se ha observado un aumento de ésta en los últimos años. No obstante existen reportes de prevalencia en niños de diferentes regiones, no se pueden generalizar para todo el país, por los factores que inciden en la transmisión. En un estudio realizado en preescolares y escolares rurales del departamento de Córdoba, la prevalencia para este parásito fue de 48%. Es importante destacar que en Colombia se han realizado estudios para su detección, empleando anticuerpos anti-*G. duodenalis* y antígenos de *Giardia* de cepas colombianas, los cuales han permitido el desarrollo y perfeccionamiento de Ensayos Inmunoenzimáticos Ligados a Enzimas (ELISA), que se pueden utilizar en futuros estudios epidemiológicos (Peralta L *et al* 2008).

A pesar del desarrollo económico y social en las últimas décadas, y de los avances en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas con técnicas de biología molecular, en Colombia las enfermedades parasitarias siguen siendo causa de alta morbilidad; particularmente en las poblaciones pobres (Peralta L *et al* 2008).

Por esta razón a través del desarrollo de este proyecto se empleó la técnica de separación inmunomagnética como método de atrapamiento de quistes de *Giardia lamblia* empleando como elementos de reconocimiento, anticuerpos monoclonales específicos para el parásito. Como novedad, las partículas magnéticas además presentan la característica que son fluorescentes. Por tanto, la parte magnética se emplea para realizar la concentración de los parásitos, mientras que

la parte fluorescente es útil para hacer el seguimiento a través de técnicas de microscopía de fluorescencia, comparando esta técnica con el uso de membranas para determinando cuál de estos dos métodos resulta más eficaz a la hora de detectar quistes de *Giardia* en agua residual del río Pamplonita Pamplona Norte de Santander.

La importancia de este estudio es colocar a prueba dos técnicas de suma importancia en el análisis de aguas, usado en investigaciones de bacterias y virus, el llevarlas a prueba en la detección de quistes de *Giardia sp* se convierte en una herramienta útil debido a la baja probabilidad de encontrar dicho parásito en agua con las técnicas convencionales de sedimentación y flotación a causa de la dilución que presenta cuando se encuentra en fuentes hídricas, este trabajo amplía conocimientos en parasitología y nanotecnología. De la misma manera genera información sobre futuros trabajos en los que se desee emplear estas técnicas en el tratamiento de aguas no tratadas y potables, así como estudios moleculares para determinar las especies de *Giardia* presentes en fuentes hídricas.

3. Objetivos

3.1 General

- ✓ Detectar quistes de *Giardia lamblia* a partir de aguas residuales usando separación fluoro-inmunomagnética

3.2 Específicos

- ✓ Obtener quistes de *Giardia sp* a partir de muestras coprológicas aplicando el método directo en microscopía óptica.
- ✓ Funcionalizar micropartículas fluoro-inmunomagnéticas con anticuerpos monoclonales anti-*Giardia* que faciliten el proceso de concentración, separación y detección de *Giardia lamblia*
- ✓ Detectar quistes de *Giardia lamblia* en muestras de aguas contaminadas artificialmente y en matrices complejas (i.e. aguas residuales) empleando micropartículas funcionalizadas.
- ✓ Caracterizar microscópicamente los complejos micropartícula-quiste para la identificación de quistes de *Giardia lamblia* infecciosos en las muestras problema.

4. Materiales y métodos

4.1 Área de estudio y recolección de muestras coprológicas.

El estudio se realizó en 4 escuelas de la ciudad de Pamplona Norte de Santander ubicadas en las siguientes coordenadas Escuela 1 (latitud: 7°22'56.40"N y longitud: 72°38'37.54"O), Escuela 2 (latitud: 7°22'49.45"N y longitud: 72°38'43.40"O), Escuela 3 (latitud: 7°22'51.88"N y longitud: 72°39'8.26"O), Escuela 4 (latitud: 7°20'58.43"N y longitud: 72°39'45.05"O) (ver Figura 1). La Giardiasis ocurre en todo el mundo y especialmente entre los niños y en sitios en que las condiciones sanitarias son deficientes (Alvarenga 2012). Por tal motivo, se tomaron muestras coprológicas de Escuelas de sectores de bajos recursos (estrato 1) de la ciudad de Pamplona, Norte de Santander.

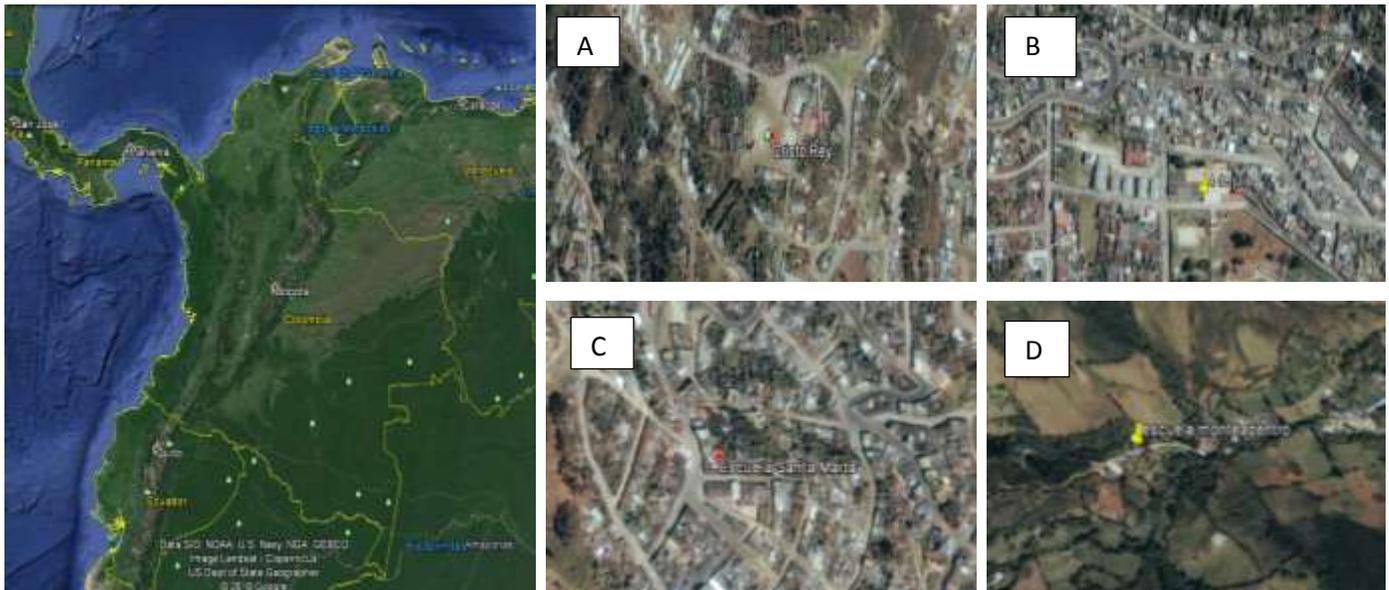


Figura 3. Ubicación de las escuelas donde se recolectaron las muestras coprológicas. A) Escuela 1, B) escuela 2, C) escuela 3, D) escuela 4

4.2 Recolección de muestras.

4.2.1 Coprológicas

Se tomaron muestras en niños que comprendían una edad entre los 4-12 años de edad, que cursaban un grado escolar entre preescolar y tercero primaria. Se solicitó un permiso escrito al rector de las instituciones y padres de familia de los niños que se analizaron con el compromiso de entregar resultados sobre el análisis hecho (anexo 8 y 9 firmas de rector y coordinador y anexo 10 notificaciones a los padres). Se recolectó un total de 118 muestras coprológicas en cajas estériles y transportadas en cavas provistas con hielo hacia el laboratorio de Nanotecnología y Gestión Sostenible de la Universidad de Pamplona donde se procesaron en un tiempo inferior a 2h. La determinación se realizó en fresco usando microscopía óptica (Arias A. *et al* 2010).

4.2.1.1 Purificación y concentración de quistes.

Los quistes se purificaron a partir de materia fecal, utilizando un doble gradiente de Sacarosa (Sacarosa 1M y 0,5M respectivamente). Para ello, las muestras de materia fecal se diluyeron y filtraron en gasa. 5mL del filtrado se colocaron sobre 10mL de una solución de Sacarosa 1 M y fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min. Recuperando el sobrenadante, se llevó a un volumen final de 50mL con H₂O destilada, los cuales fueron nuevamente centrifugados a 2000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante; el sedimento fue resuspendido y se le adicionó 10mL de una solución de Sacarosa 0,5M, centrifugándose a 2000 rpm por 5 min adicionales. El sobrenadante fue descartado y el pellet conteniendo los quistes fueron lavados con agua destilada estéril y filtrados por membrana 0.45 µm. Las membranas conteniendo los quistes fueron almacenadas en solución de PBS (Adaptado de Saura A. 2012).

4.2.1.2 Conteo en Cámara de Neubauer

Los quistes purificados fueron contados empleando la cámara de Neubauer empleando un volumen de muestra de 10µL. Se realizó el recuento de los 16 cuadros en forma organizada y se hizo lo mismo con todos los cuatro cuadrantes, calculándose el número de quistes de la muestra original (Bernal M, 2014) los cuales fueron reportados aplicando la siguiente fórmula:

$$1mm * 1mm * 0.1mm = 0.1mm^3$$

El resultado se reportó de la siguiente manera: **Numero de quistes/ 0.1mm³**

Los quistes de *Giardia sp* concentrados y purificados fueron diluidos en base 10 hasta 10³ Quistes/mL en solución de PBS y almacenados a 4°C hasta su uso (Adaptado de Alviarez Y *et al* 2014).

4.2.2 Aguas residuales

Las muestras de agua residuales fueron recolectadas en envases plásticos, de cierre hermético, previamente esterilizados (Jaramillo G. *et al* 2014) y fueron transportados al laboratorio en Nanotecnología y Gestión Sostenible de la Universidad de Pamplona. El punto de muestreo fue el tramo donde ya vienen mezcladas los vertimientos de los colectores en el río Pamplonita, pasos abajo del puente Chichira Coordenadas (Latitud 7°22'29.50"N y Longitud 72°38'22.61"O) (GEMAPOL 2012).



Figura 4. Ubicación geográfica del sitio de toma de muestras

4.2.2.1 Funcionalización de Micropartículas Magnéticas

Las micropartículas fluoro-magnéticas fueron funcionalizadas con anticuerpos monoclonales anti-*Giardia lamblia* IgG (anticuerpos monoclonales anti-quistes y contra CWPs Cyst Wall Protein 1 and 2), provisto por el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación y Desarrollo en Inmunología y Enfermedades infecciosas (CIDIE-CONICET), de la Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina por el Dr. Hugo D. Lujan. Las condiciones de funcionalización se reservan ya que son objeto de patente. **Adaptado de: NC20160005568-Patente de Invención Nacional - TÉCNICA DE DETECCIÓN FLUORO-INMUNOMAGNÉTICA DE VIRUS ENTÉRICOS EN AGUAS.**

4.2.2.2 Pruebas de adsorción específicas

Se mezcló v:v micropartículas fluoro-magnéticas (10 ppm) y quistes de *Giardia* (100 quistes/mL). La mezcla se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se magnetizó durante 15 minutos. Seguidamente, se realizaron dos lavados con PBS al 10% y un lavado con Agua Destilada Estéril (ADE). Por último, al concentrado magnético se le adicionó ADE y se llevó a observación en microscopía de fluorescencia. El objetivo de la prueba era comprobar que en ausencia del anticuerpo los parásitos no se unían de forma inespecífica a las micropartículas. El proceso se llevó a cabo por triplicado. **Adaptado de: NC20160005568-Patente de Invención Nacional - TÉCNICA DE DETECCIÓN FLUORO-INMUNOMAGNÉTICA DE VIRUS ENTÉRICOS EN AGUAS.**

4.2.2.3 Pruebas de especificidad

A un (1) Lt de agua destilada estéril contaminada artificialmente con 10^3 quistes de *Entamoeba coli*, se le adicionó 500µL de una dilución de (10 ppm) de micropartículas fluoro-magnéticas previamente funcionalizadas con el anticuerpo anti-*Giardia* tal como se describió en el numeral 4. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación constante y posteriormente se magnetizó durante 15 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 50µL de PBS al 10% y un lavado con 50µL de Agua Destilada Estéril (ADE). Por último, al concentrado magnético se le adicionaron 15µL de ADE y se llevó a observación en microscopía de fluorescencia, donde se trató de observar la ausencia de parásitos acoplados a las micropartículas. El objetivo de la prueba era comprobar que en presencia de otro tipo de parásito frecuente en aguas de la misma naturaleza, el anticuerpo no presente reacciones cruzadas. El proceso se llevó a cabo por triplicado. **Adaptado de: NC20160005568-Patente de Invención Nacional - TÉCNICA DE DETECCIÓN FLUORO-INMUNOMAGNÉTICA DE VIRUS ENTÉRICOS EN AGUAS.**

4.2.2.4 Detección de *Giardia sp.* Mediante la técnica fluoro-inmunomagnética en muestras de agua destilada estéril (ADE) artificialmente contaminadas con quistes del parásito y aguas residuales.

Una solución de micropartículas magnéticas funcionalizadas con los anticuerpos monoclonales anti-*Giardia* fueron adicionadas a 1Lt de agua ADE previamente contaminada con 100 quistes. La interacción antígeno-anticuerpo se llevó a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, las partículas magnéticas fueron magnetizadas y el

sobrenadante fue removido. El magnetizado fue lavado tres veces con solución Buffer fosfato y Tween 0.05 % y agua destilada estéril. Seguidamente se llevó a caracterización por microscopía de fluorescencia y óptica. El mismo procedimiento se llevó a cabo con 1 Lt de las aguas residuales. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. **Adaptado de: NC20160005568-Patente de Invención Nacional-TÉCNICA DE DETECCIÓN FLUORO-INMUNOMAGNÉTICA DE VIRUS ENTÉRICOS EN AGUAS.**

4.2.2.5 Detección de *Giardia sp.* Mediante la técnica filtración por membrana en muestras de agua destilada estéril (ADE) artificialmente contaminadas con quistes del parásito y aguas residuales.

Se filtró 1Lt de agua destilada la cual había sido previamente contaminada artificialmente con 100 quistes. Se retiró el filtro de membrana de 0.45 μm usando una pinza metálica estéril y seguidamente se colocó en una caja de Petri a la cual se le adicionó solución salina 0.85 %. Posteriormente, con ayuda de una pipeta Pasteur se aspiró el líquido y se depositó una gota en un portaobjetos. El montaje fue teñido con lugol y posteriormente observado con microscopía óptica en objetivos 10X y 40 X (Chávez M & Ramírez S. 2014). Todas las pruebas se realizaron por triplicado. El mismo procedimiento se llevó a cabo con 1 Lt de las aguas residuales con la diferencia de que para evitar que los filtros se obturaran, se realizó una centrifugación preliminar a 2500 rpm/15min con el fin de remover material particulado (Chávez M & Ramírez S. 2014).

4.2.2.9 Modelo Estadístico

Se realizó un modelo de tipo cuantitativo para detectar la presencia de Quistes de *Giardia lamblia*. en el análisis de aguas residuales.

Pregunta de Investigación: ¿La técnica fluoro-inmunomagnética permitirá la detección de quistes de *Giardia lamblia* en agua residual?

Tratamiento: Aplicación de la técnica fluoro-inmunomagnética en la detección de *Giardia sp* en aguas residuales.

Variable: Número de quistes de *Giardia lamblia*. detectados por la técnica fluoro-inmunomagnético en un volumen de 1 Lt.

(H0): La técnica fluoro-inmuno-magnética permite la detección de quistes de *Giardia lamblia* en muestras de agua residual.

(H1): La técnica fluoro-inmuno-magnética no permite la detección de quistes de *Giardia lamblia* en muestras de agua residual.

4.2.2.9.1.

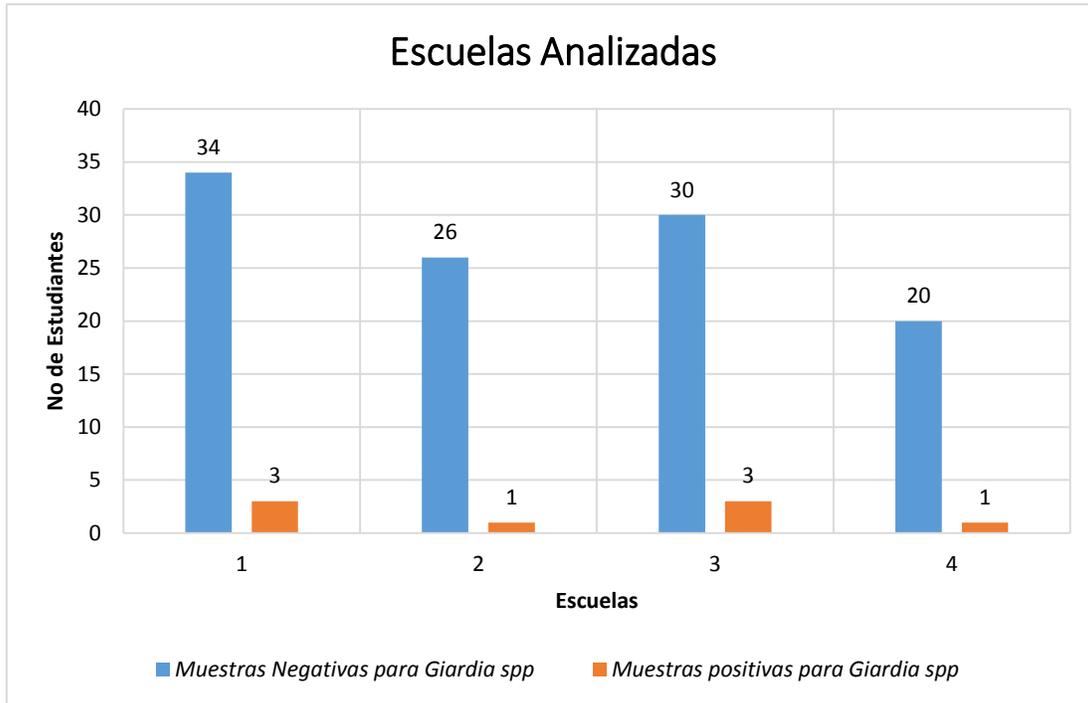
Análisis de Datos: Se realizó análisis descriptivo con la finalidad de describir cómo se distribuye los quistes de *Giardia lamblia* a lo largo de los 10 muestreos realizados en un mismo punto; cuál es su frecuencia y cuáles son los determinantes o factores con ella asociados. ANOVA de un factor y comparación de medias para determinar si se muestran diferencias significativas o por el contrario puede suponerse que sus medias poblacionales no difieren. Análisis de regresión para estimar las relaciones entre las variables, graficas de barras para representar los valores obtenidos en la prevalencia de *Giardia* en las escuelas analizadas y

controles positivos en la contaminación artificial de dichos quistes en agua destilada estéril. Diagrama de cajas (SPSS) para visualizar la dispersión de los datos obtenidos en las muestras de agua residual, valores atípicos y simetría entre los mismos. Diagrama de barras y de dispersión si existe aumento o disminución en el transcurso de los muestreos en cuanto al número de quistes de *Giardia sp.* en aguas residuales (EXCEL).

5.0 Resultados

5.1 Obtención de quistes

La gráfica 1 muestra la prevalencia de *Giardia sp* en 118 estudiantes examinados de cuatro escuelas de Pamplona Norte de Santander. Se puede observar que un número total de 8 estudiantes resultó positivo para dicho parásito; lo cual representa un 6,8% de la población estudiada, siendo la escuela 1 y 3 donde se presentó mayor incidencia.



Gráfica 1. Prevalencia de *Giardia sp* en escuelas de Pamplona Norte de Santander.

5.2 Purificación de quistes.

Las muestras positivas fueron concentradas y purificadas aplicando el principio de un doble gradiente de sacarosa, reportado por Saura A. (2012). Se puede observar en la figura A el quiste de *Giardia sp* rodeado de un alto contenido de residuos coprológicos y en la figura B los quistes puros donde se logra apreciar un montaje libre de residuos coprológicos.

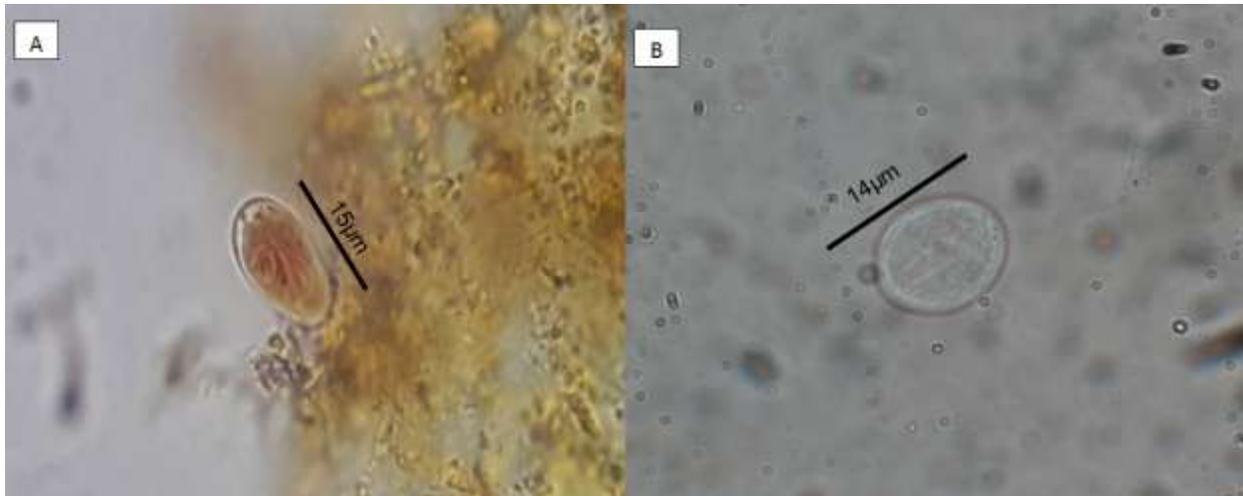


Figura 5. Microscopía Óptica de quistes de *Giardia sp.* antes y después de la purificación A) tinción con lugol de muestra directa, observación en 100X, B) Quistes purificados conservados en PBS Observación en 100X.

5.3 Funcionalización de Micropartículas Magnéticas

Las micropartículas fluoro-magnéticas funcionalizadas con anticuerpos monoclonales anti-*Giardia* fueron expuestas a una solución de agua destilada estéril conteniendo 10^2 Q/mL. La figura 6 muestra como el quiste del parásito se une a través de la interacción antígeno-anticuerpo a tres micropartículas funcionalizadas. En la figura 6B se aprecia la fluorescencia de las mismas.

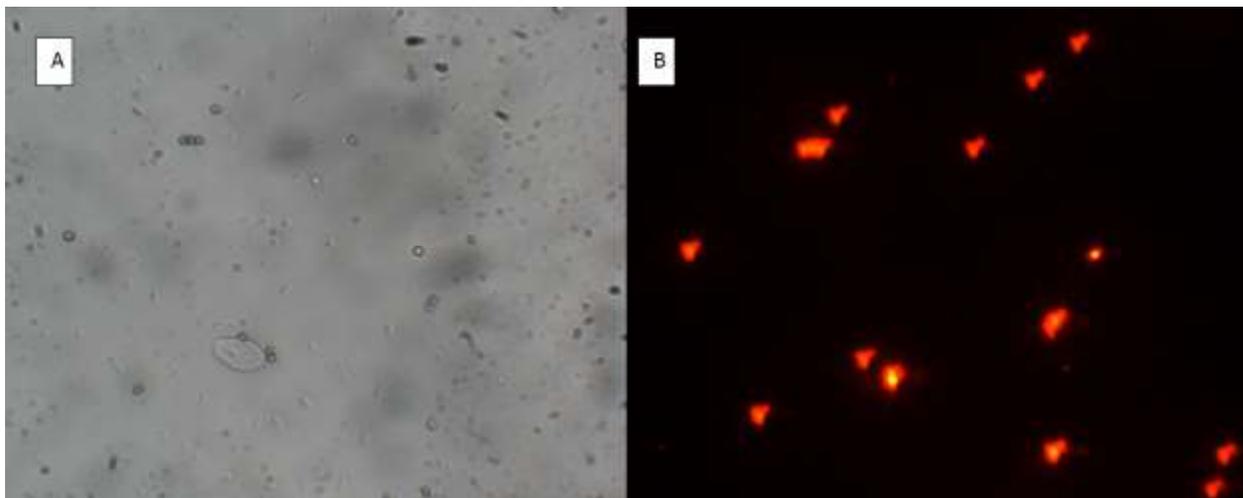


Figura 6. Microscopía A) Óptica de un quiste de *Giardia lamblia* unido a través de la interacción Ag-Ac, objetivo de 40X B) El mismo campo en modo fluorescencia donde pueden visualizarse las micropartículas magnéticas, objetivo de 40X

5.4 Prueba de Adsorción Específica

No se logró detectar la presencia de quistes de *Giardia sp.*, pero si la presencia de micropartículas magnéticas (figura 7). Lo que demostró que en ausencia del anticuerpo anti-*Giardia*

los quistes de los parásitos no se absorben de forma inespecífica. Lo que confirma la afirmación de Condori L (2011) “un antígeno se une con el anticuerpo específico y forma el complejo antígeno-anticuerpo”.



Figura 7. Microscopía óptica y de fluorescencia de A) quiste de *Giardia sp* observado en 40X sin colorante B) Micropartículas magnéticas en modo óptico objetivo 40X C) Micropartículas magnéticas en modo fluorescencia objetivo 40X.

5.6 Prueba de especificidad

A través de esta prueba se logró comprobar que el anticuerpo provisto por el laboratorio CONICET de la Universidad de Córdoba en Argentina, no presentó reacciones cruzadas, lo que se evidenció por la ausencia de quistes de *Entamoeba coli* después de haber sido expuestas a las micropartículas funcionalizadas con anticuerpos monoclonales *anti-Giardia* (Figura 8).



Figura 8. Microscopía A) Óptica de un quiste de *Entamoeba coli* antes de realizar el magnetizado, teñido con lugol y observado en objetivo de 40X. B) Óptica de micropartículas funcionalizadas después de ser expuestas al parásito. Objetivo 20X. C) Fluorescencia del mismo campo donde se aprecian solo las partículas fluoro-magnéticas.

5.7 Detección de *Giardia sp.* Mediante la técnica fluoro-inmunomagnética en muestras de agua destilada estéril (ADE) artificialmente contaminadas con quistes del parásito.

Con el fin de determinar si las micropartículas magnéticas tenían la capacidad de concentrar y separar los quistes de *Giardia lamblia* diluidos en agua, se contaminó artificialmente 1Lt de Agua Destilada Estéril con 10^2 Q/mL. Después de magnetizar la muestra, se pudo visualizar que se había formado el complejo micropartícula-anticuerpo-quiste que puede evidenciarse en la

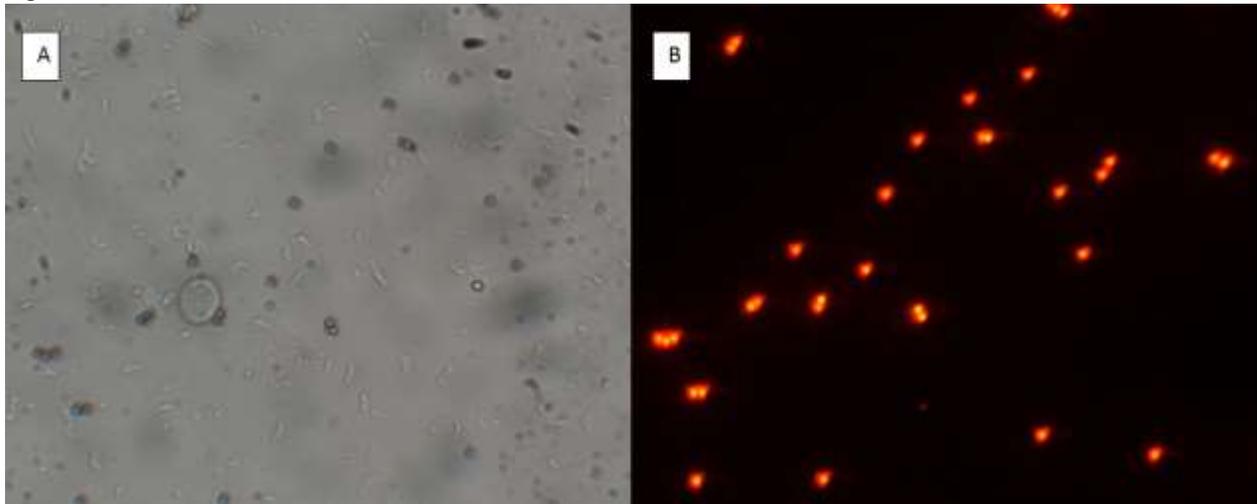


Figura 9. Microscopía A) Óptica de un quiste de *Giardia lamblia* después de magnetizar una muestra de agua contaminada con 10^2 Quiste/mL y observado en objetivo de 40X. B) Fluorescencia del mismo campo donde se aprecian solo las partículas fluoro-magnéticas

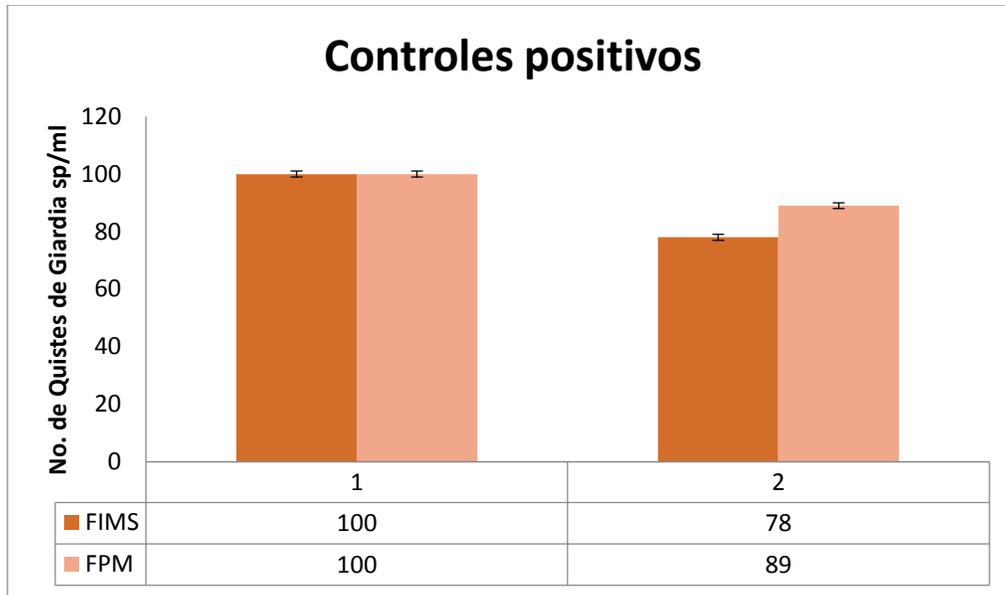
5.8 Detección de *Giardia sp.* Mediante la técnica filtración por membrana en muestras de agua destilada estéril (ADE) artificialmente contaminadas con quistes del parásito.

Se realizó una contaminación artificial en 100 mL de agua destilada estéril con la finalidad de tener un control positivo sobre la retención de quistes en la membrana.



Figura 10. Microscopía Óptica de Quistes de *Giardia sp* obtenidos después de la filtración por membrana de muestras de agua destilada estéril contaminados artificialmente.

En la siguiente grafica se observa la recuperación a partir de 100 quistes de *Giardia sp* en contaminación artificial de ADE mediante la técnica fluoro-inmunomagnética (FIMS) y de filtración por membrana (FPM), donde se logra concentrar *Giardia* con las dos técnicas empleadas.



Gráfica 2. Recuperación de quistes de *Giardia sp.* Ensayo de controles positivos para la técnica fluoro-inmunomagnética, filtración por membrana.

5.9 Detección de *Giardia sp.* Mediante la técnica fluoro-inmunomagnética en muestras de agua residual del río pamplonita Pamplona Norte de Santander

Las micropartículas fluoro-inmunomagnéticas permitieron la concentración, separación y posterior detección de quistes de *Giardia sp* en las muestras de agua residual analizadas. la respuesta a la interacción del anticuerpo al antígeno en la CWP (Cyst Wall Protein) se debe a su afinidad posiblemente con las proteínas de la pared del quiste únicas de *Giardia* las cuales son lectinas que unen fibrillas del homopolímero GalNAc

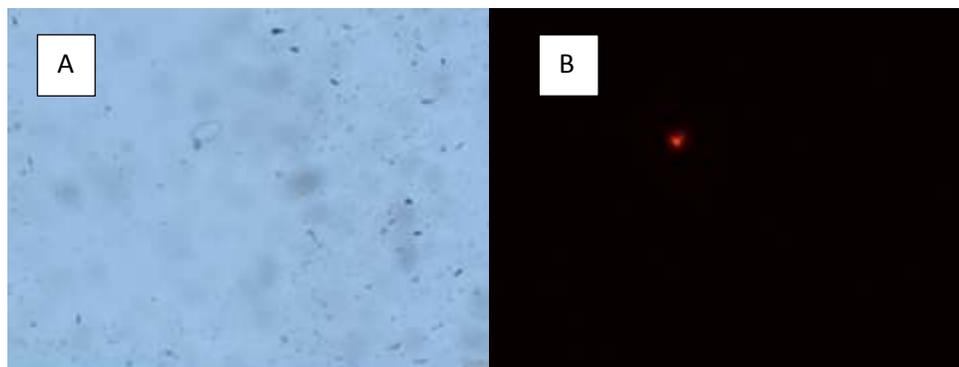
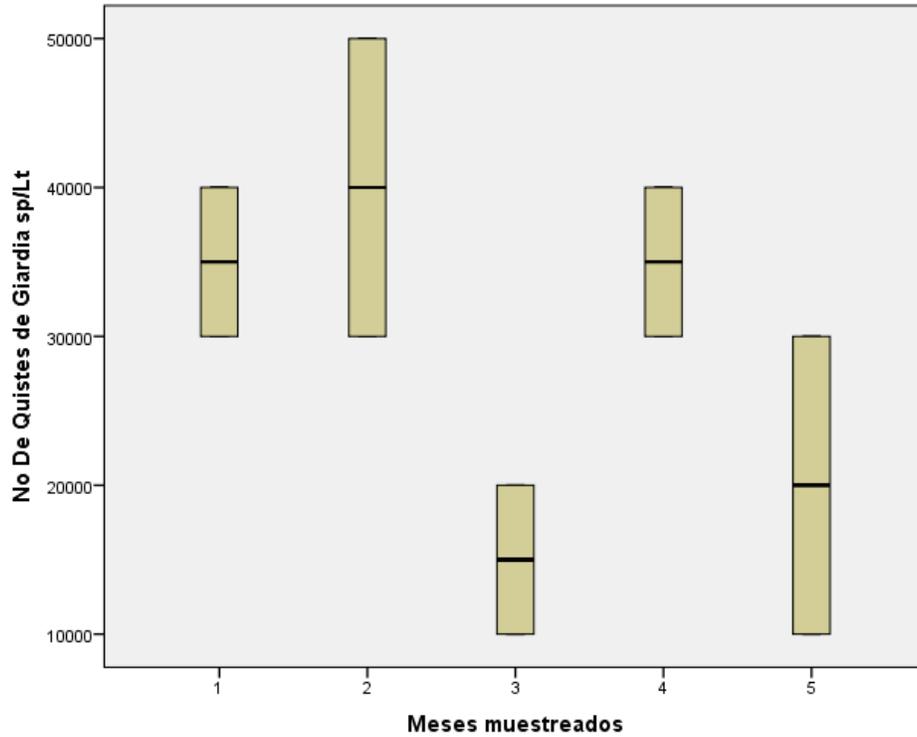


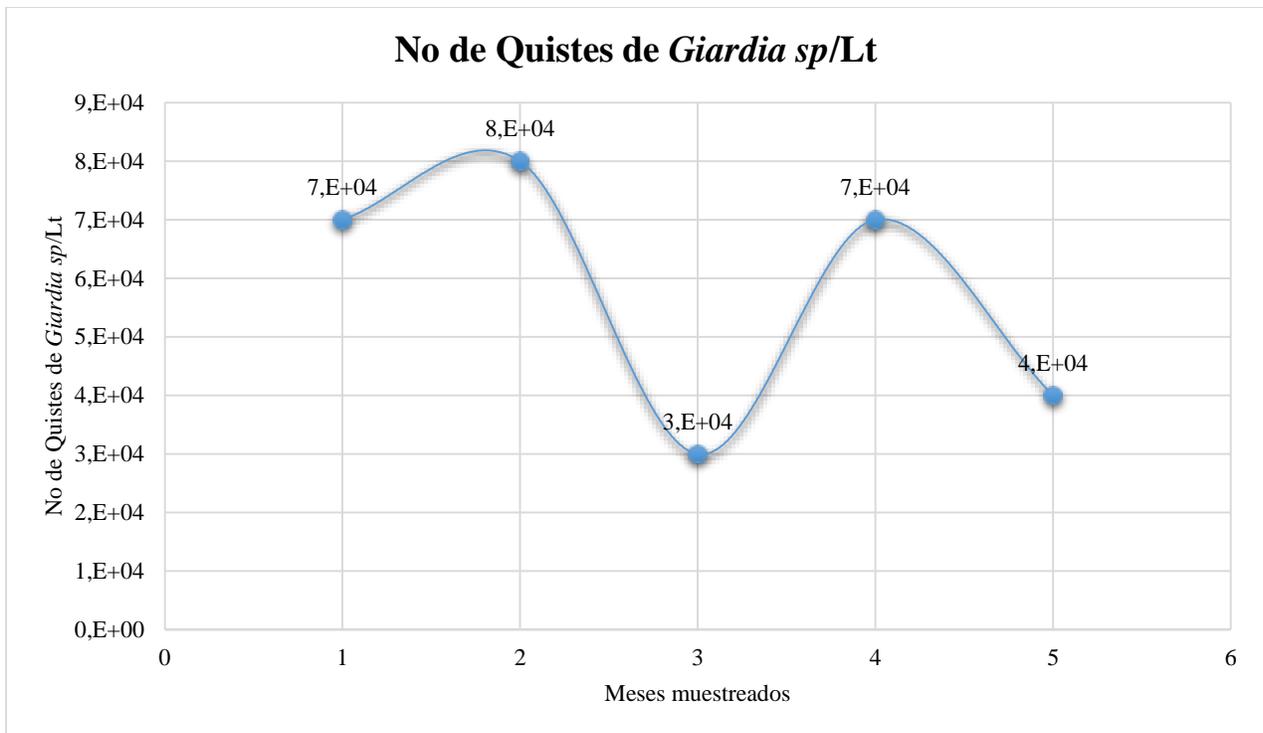
Figura 11. Microscopía A) Óptica de una quiste de *Giardia lamblia* detectados en aguas residuales del Río Pamplonita. El quiste se encuentra unido a una par de micropartículas a través de la interacción antígeno-anticuerpo. Objetivo de 40X. B) Fluorescencia del mismo campo donde sólo se aprecian las micropartículas fluoro-inmuno-magnéticas. Objetivo 40 X

Diagrama de cajas con donde se observa la detección de *Giardia lamblia* en muestras de agua residual en los 10 muestreos realizados durante los 5 meses, comprobando la eficiencia de la técnica fluoro-inmunomagnética en matrices (Agua residual)



Gráfica 3. Diagrama de cajas sobre el número de quiste de *Giardia lamblia* detectados en los 5 meses muestreados.

Diagrama de dispersión con el número de quistes detectados por el método fluoro-inmunomagnético, donde se logra observar el número de quistes concentrados en un periodo de 5 meses.



Gráfica 4. Diagrama de dispersión sobre el número de quiste de *Giardia lamblia* detectados en los 3 volúmenes colectados en el muestreo.

5.10 Detección de *Giardia sp.* Mediante la técnica filtración por membrana en muestras de agua residual del río Pamplonita en Pamplona Norte de Santander

No fue posible detectar la presencia de quistes de *Giardia*, empleando la técnica de filtración por membrana.

6.0 DISCUSIÓN

La Giardiasis se considera un problema de salud pública a nivel mundial, presentándose principalmente en estratos socioeconómicos bajos asociados normalmente a malas prácticas higiénico-sanitarias, así como a deficientes prácticas en la preparación de alimentos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de 200 millones de personas de Asia, África y América Latina presentan Giardiasis sintomática y cada año se diagnostican alrededor de 500.000 nuevos casos. En Colombia, se estima que la frecuencia de Giardiasis es aproximadamente del 28% en la población infantil. En el presente estudio se pudo determinar que sólo un 7% de los estudiantes analizados resultó positivo para el quiste del parásito, lo cual indica que las prácticas higiénico-sanitarias de los estudiantes y familias analizadas no es tan deficiente toda vez que el porcentaje de prevalencia fue de una cuarta parte la registrada a nivel nacional y menor a la reportada en otras ciudades de Colombia Ibagué Tolima (Gutiérrez R *et al* 2014), Cúcuta Norte de Santander (Sánchez M *et al* 2013), Soracá Boyacá (Sáenz R 2015), donde se han documentado prevalencias de 58,97%,11,7% y 11%, respectivamente.

Debido a que los procesos de concentración se basan casi exclusivamente en el tamaño de las formas parasitarias, una gran cantidad de material extraño también puede quedar concentrado, y este material puede interferir con la detección exitosa de los parásitos, ya sea incrementando el volumen total de material que necesita ser examinado, u obstaculizando la observación de los parásitos durante el análisis de la muestra. Por lo anterior, se han implementado procesos de separación que mejoran la detección de estos microorganismos, incluyendo la centrifugación con gradientes de sacarosa (Díaz G. 2014), lo que permitió una mayor concentración del quiste y muestras más limpias. Esto se debe a la densidad del azúcar con las diferentes concentraciones trabajadas con el fin de concentrar quistes y eliminar partículas no quísticas en los lavados.

Se observó que al someter los quistes de *Giardia sp* con las micropartículas magnéticas no funcionalizadas con el anticuerpo anti-*Giardia* no presentaron afinidad por el parásito por ende no se presente interacción y ausencia del quiste después de los lavados. Dicho resultado era el esperado y confirma que en ausencia de los elementos receptores ningún patógeno puede absorberse de manera inespecífica a la micropartícula. “Esto se debe a la afinidad que debe exhibir el anticuerpo monoclonal por cualquiera de las proteínas antigénicas en la pared quística (Cyst Wall Protein CWPs) de *G. lamblia*, Varias de estas moléculas son reconocidas por las respuestas de anticuerpos” (Quintero J. *et al* 2013).

Al realizar la contaminación artificial con quistes de *Entamoeba coli* se buscaba comprobar el grado de especificidad del anticuerpo monoclonal anti-*Giardia* frente a otros patógenos. Se pudo observar en la Figura 4 que no hubo unión de las micropartículas funcionalizadas con los quistes del parásito lo que corrobora la teoría de Condori L (2011) sobre especificidad “capacidad de los anticuerpos para diferenciar entre antígeno (epítomos) estructuralmente muy próximos o parecidos. Los anticuerpos reaccionan de forma más eficaz con los antígenos que desencadenaron su producción (antígenos homólogos), que con antígenos similares u otros antígenos (antígenos heterólogos). Los elementos estructurales del epitopo que destacan de la masa central del inmunógeno se comportan como inmunodominantes, y son particularmente significativos en la determinación de la especificidad. Estos anticuerpos son muy

discriminadores y distinguen fácilmente entre dos moléculas que difieren en un carbono, o incluso entre isómeros de la misma molécula”. Las proteínas de la pared del quiste de *Entamoeba* incluyen lectinas de Jacob (proteínas que se unen a carbohidratos) que reticulan la quitina, las quitinasas que degradan la quitina y las lectinas de Jessie que hacen que las paredes sean impermeables (Samuelson J. & Robbins P. 2011). La especificidad podría estar dada a que la pared del quiste de *Giardia* contiene homopolímeros de N-acetilgalactosamina (GalNAc) que es único en *Giardia* como lo afirman Samuelson J. & Robbins P. 2011.

Empleando la técnica de separación fluoro-inmunomagnética en agua destilada contaminada artificialmente, se pudo observar la habilidad de las micropartículas magnéticas funcionalizadas para reconocer el quiste del parásito, concentrarlo y separarlo en 1 Lt de agua. La respuesta que exhibe el antígeno al anticuerpo se debe principalmente a la afinidad que se presenta en la interacción tal y como lo corrobora Quintero J. *et al* (2013) cuando habla de afinidad entre Ac-Ant “Esto se debe a la afinidad que exhibe el anticuerpo monoclonal por cualquiera de las proteínas antigénicas en la pared quística (Cyst Wall Protein CWPs) de *G. lamblia*, Varias de estas moléculas son reconocidas por las respuestas de anticuerpos” (Quintero J. *et al* 2013). Generando consigo la interacción antígeno-anticuerpo observada en la figura 9.

En la figura 9 se puede observar la interacción antígeno-anticuerpo gracias a la funcionalización del anticuerpo con las micropartículas magnéticas. Se puede apreciar la unión de una sola micropartícula a un costado del quiste y no el quiste cubierto de varias micropartículas esto posiblemente pasa por la afirmación de Condori L (2011) “cuando cualquiera de los reaccionantes están en exceso no se pueden formar grandes agregados antígeno-anticuerpo”, por factores como lo indica Flores V. *et al* (2014), “Fuerza iónica: Donde la asociación antígeno-anticuerpo se ve impedida por la neutralización parcial de cargas opuestas, producto de la concentración de iones de Na y Cl alrededor de los antígenos y anticuerpos”, Juárez B (2004) “El acoplamiento estructural entre las macromoléculas está dado por varias fuerzas débiles que disminuyen con la distancia, como son los puentes de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals, las interacciones electrostáticas débiles y las hidrofóbicas”.

El uso de la técnica fluoro-inmunomagnética permitió la detección de quistes de *Giardia* en comparación con la técnica de filtración por membrana en todos los muestreos realizados en el río Pamplonita de Pamplona Norte de Santander gracias al uso de anticuerpos monoclonales específicos anti-*Giardia* con micropartículas fluoro-magnéticas, tal y como lo corrobora Barbosa J. *et al* 2013 “la utilización de anticuerpos específicos asociados con fluorocromos ha sido usada en microscopia de inmunofluorescencia (IMF) con mejores resultados de sensibilidad y especificidad, y es la técnica aplicada en la rutina clínica”, y Hernández F. *et al* 2013 “La presencia del Ac conjugado con el fluorocromo no necesita de ninguna reacción química para hacerse evidente. Los fluorocromos emiten luz de una determinada longitud de onda luego de ser excitados por un haz de luz de longitud de onda menor. Cada fluorocromo es capaz de emitir luz dentro de un determinado espectro de longitud de onda.”

En comparación con la técnica de filtración por membrana se presentó ausencia en la detección de quistes de *Giardia sp* debido a que el rendimiento de cada técnica depende de la misma cuando se emplean con matrices de aguas turbias como las residuales como lo habla Mahmoudi

R & Mirzaei A (2015) “El rendimiento de recuperación de los quistes de *Giardia sp* en el agua depende de los métodos de purificación e identificación utilizados”. ó Correa R. & Luiz A. (2015), con los resultados de sus estudios notaron que “la separación inmunomagnética ayudó a capturar quistes principalmente en muestras con turbidez media y baja. Para los efluentes tratados con turbidez baja, la filtración por membrana alcanzó un 67,5% de recuperación para los quistes de *Giardia*. Según el Comité Federal-Provincial-Territorial de Salud y Medio Ambiente (2012) “Aunque la filtración por membrana es altamente efectiva para la eliminación de quistes protozoarios, la integridad del sistema (roturas, conectores, pegamento), el ensuciamiento de la membrana y la degradación deben ser considerados. El ensuciamiento de la membrana suele ser causado por la acumulación de partículas, productos químicos y crecimiento biológico en las superficies de la membrana”, lo que puede ocasionar impedimentos a la hora de detectar los quistes de *Giardia sp*.

El análisis descriptivo de las medidas de posición (media, mediana y moda) (ver tabla en anexo 1) indican el valor central de la distribución, y para el caso del número de quistes de *Giardia sp*/Lt aproximadamente coinciden los tres estadísticos en el valor $3 \cdot 10^4$. Esto significa que la distribución es bastante simétrica y que el número de quistes capturado en los 10 muestreos por la técnica fluoro-inmunomagnética se mantiene sin presentar ausencia de captura. La detección mínima en comparación con la máxima de quistes detectados oscila entre $1 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^4$, confirmando que en los diez muestreos realizados se logró detectar quistes de *Giardia sp*.

El estadístico F (Fisher) con su nivel de significancia (sig) cuyo valor fue de 0,213 al ser mayor que 0,05 se acepta la igualdad de medidas; es decir no existen diferencias significativas entre los grupos (Número de quistes de *Giardia sp*/Lt en el tiempo de muestreo expresado en meses). Lo que indica que la detección de quistes de *Giardia sp* por medio de la técnica fluoro-inmunomagnética no se ve afectado por los diferentes meses en lo que se realizó la recolecta de las muestras. Por consiguiente hay detección de quistes de *Giardia sp* en un número que oscila entre $1 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^4$ en los 5 meses muestreados. Con respecto al valor P (significancia) se puede establecer que si dicho valor es $\geq 0,05$ se manifiesta que no hay diferencia significativa en el experimento ya que dicho valor fue de 0,213 afirmando la aprobación de la hipótesis nula y por consiguiente se rechaza la hipótesis alterna.

En el gráfico 3, se observa que no existen valores atípicos, es decir no se presenta detección de quistes destacados por abajo ni por encima de los datos obtenidos; que serían efecto de cálculos extremos o en el caso de una mala tabulación manual, errores de medición o registro. Para el mes 2 y 5 se observa una mayor dispersión en la distribución de los datos a diferencia del mes 1,3 y 4, por otra parte la línea que representa la mediana indica que los valores calculados se encuentran de forma simétrica (Distribución simétrica), debido a que se puede observar que están relativamente en el centro de la caja.

En el Gráfico 4 se observa un diagrama de dispersión trabajado con base a los cinco meses muestreados donde los resultados nos permite determinar que en el mes 1, 2 y 4 se presentaba una mayor detección de quistes de *Giardia sp*, a diferencia del mes 3 y 5. Dicha variación de número de quistes de *Giardia* mediante la técnica fluoro-inmunomagnética en los meses muestreados, se debe principalmente a la discontinuidad del quiste cuando se encuentra en

medios acuáticos tal y como lo menciona Branco N. et al (2012) “la ausencia de protozoos en algunos de los manantiales estudiados no implica ninguna deficiencia en la metodología; se debe señalar la intermitencia de los quistes en el medio ambiente.” Esto en comparación con los resultados obtenidos sobre el número de quistes detectados ($1 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^4$, $3 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$) en los 5 meses cuyos valores no eran constantes en cada muestreo.

Para Bencardino Martínez Ciro (2012), el coeficiente de correlación R^2 se define como un “indicador estadístico que nos permite conocer el grado de relación, asociación o dependencia que pueda existir entre dos o más variables”. Donde el coeficiente de correlación al cuadrado disminuye, se aleja de uno; se dice también que la recta representa cada vez menos a ese conjunto de observaciones. Cuando se presenta los siguientes intervalos: $R^2=1$ =correlación perfecta, $0,9 \leq R^2 < 1$ correlación excelente, $0,8 \leq R^2 < 0,9$ correlación aceptable, $0,6 \leq R^2 < 0,8$ correlación regular, $0,3 \leq R^2 < 0,6$ correlación mínima, y un $R^2 < 0,30$ estará indicando que no hay correlación entre las variables. En la gráfica se observa que el R^2 su máximo valor lo representa la regresión cubico con un valor de 0,170, con lo cual se concluye que con respecto a esta regresión no existe una correlación entre las variables y con respecto a las otras regresiones como su guarismo o valor de la correlación continúan estando por debajo 0,3 sigue sin existir correlación entre las variables.

7.0 Conclusiones.

Se obtuvieron quistes de *Giardia sp*, en muestras coprológicas de niños logrando identificar su estructura morfológica mediante tinción de lugol y observación en microscopia óptica logrando purificarlos para poder emplearlos en la fase experimental de contaminación artificial de muestras de agua destilada estéril

Se logró comprobar la funcionalización de micropartículas con el anticuerpo anti-*Giardia* mediante la interacción de las micropartículas con el quiste de *Giardia sp* observadas en microscopia óptica y de fluorescencia en matrices de agua residual y agua destilada estéril contaminada artificialmente.

Se detectó la presencia de quistes de *Giardia sp* empleando la técnica fluoro-inmunomagnética en aguas residuales del río Pamplonita Pamplona Norte de Santander.

Referencias Bibliográficas

- Alvarenga Góchez Delfy Marianella, (2012), Determinación De *Giardia lamblia* En Humanos Relacionada Con *Giardia lamblia* en *Canis lupus familiaris* En La Jurisdicción De La Unidad De Salud De San Miguelito, San Salvador, Universidad De El Salvador Facultad De Ciencias Agronómicas.
- Alviarez Yenny, Lares María, Viettri Mercedes, Aguilar Cruz M., Herrera Leidi, Ferrer Elizabeth. (2014), Estandarización de la técnica de aglutinación directa para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas, *Biomédica*; 34:308-17 doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.2078>
- Arias Andrés Jonathan, Guzmán Gloria Elcy, Lora-Suárez Fabiana María, Torres Elizabeth, Gómez Jorge Enrique, (2010), Prevalencia de protozoos intestinales en 79 niños de 2 a 5 años de edad de un hogar infantil estatal en Circasia, Quindío, *infectio* 14(1), 31-38
- Barbosa Joana, Maria José Espinar, Acácio Gonçalves Rodrigues, Cidália Pina-Vaz, (2013), *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia* y *Encephalitozoon intestinalis*, oportunistas emergentes, *Boletín De Malariología Y Salud Ambiental*. 3 (2): 117-124. Recuperado de: <http://www.scielo.org.ve/pdf/bmsa/v53n2/art01.pdf>
- Bencardino Martínez Ciro, (2012), *Estadística y Muestreo*, Bogotá, Colombia, ECOE ediciones Ltda.
- Bernal Consuelo María, (2014), protocolo de prácticas para la escuela, universidad nacional abierta y a distancia escuela de ciencias agrícolas, pecuarias y del medio ambiente ECAPMA, Universidad Nacional Abierta y a Distancia–UNAD.
- Behnam Hiro, Soheil Saeedfar, Farzaneh Sabbagh Mojaveryazdi, (2013), Biological Contamination of the Water and Its Effects, *PPI-UTM TESIC*, https://www.researchgate.net/publication/258329025_Biological_Contamination_of_the_Water_and_Its_Effects
- Branco N., D.A.G. Leal, R.M.B. Franco A. (2012), parasitological survey of natural water springs and inhabitants of a tourist city in southeastern Brazil, *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, 12(5) 410–417 <https://doi.org.ezproxy.unal.edu.co/10.1089/vbz.2011.0679>
- Carbajal Azcona Angeles, González Fernández María, (2012), Propiedades y funciones biológicas del agua Departamento de Nutrición, *CSIC*: 33-45.
- Castro Hermida José Antonio, González Warleta Marta, (2015), *Cryptosporidium spp.* and *Giardia duodenalis* as pathogenic contaminants of water in Galicia, Spain: The need for safe drinking water, *Elsevier* 218, 132-138.
- Certad Gabriela, Viscogliosi Eric, Chabé Magali, M. Cacciò Simone, (2017), Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*, *Trends in Parasitology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.006>

- Colli Cristiane Maria, Renata Coltro Bezagio, Letícia Nishi, Thaís Souto Bignotto, Érika Cristina Ferreira, Ana Lúcia Falavigna-Guilherme, Mônica Lúcia Gomes (2015), Identical Assemblage of *Giardia duodenalis* in Humans, Animals and Vegetables in an Urban Area in Southern Brazil Indicates a Relationship among Them, *PLOS ONE*, DOI:10.1371/journal.pone.0118065
- Condori López Paola E. (2011), Reacción antígeno anticuerpo, *Revista de Actualización Clínica* (13), ISSN 2304-3768
- Corrêa Medeiros Raphael and Luiz Antonio Daniel, (2015), Comparison of selected methods for recovery of *Giardia spp.* cysts and *Cryptosporidium spp.* oocysts in wastewater, *Journal of Water and Health* 13.3, doi: 10.2166/wh.2015.228
- Chávez Martínez Rene Wilmar, Ramírez Salazar Mauricio Milton. (2014). *Determinación De Bacterias Y Parásitos En Cinco Hortalizas Frescas, Comercializadas En Los Principales Supermercados De La Ciudad De Santa Ana*, (Tesis de pregrado), Universidad de el Salvador, el Salvador, Centro América.
- Díaz Galván Ana Luz, (2014), *Detección y caracterización molecular de microsporidios, Cryptosporidium spp. y Cyclospora spp. en aguas potables, residuales y recreacionales de la zona centro de España*, (tesis doctoral), Universidad Complutense, Madrid, España. Tomado de <http://eprints.ucm.es/24582/1/T35161.pdf>.
- Einarsson Elin, Svärd G. Staffan, Troell Karin, (2015), UV irradiation responses in *Giardia intestinalis*, *Experimental Parasitology*, 154, 25–32
- Efstratiou Artemis, Jerry Ongerth, Panagiotis Karanis, (2017), Evolution of monitoring for *Giardia* and *Cryptosporidium* in wáter, *Water Research* 123, 96-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.042>
- Fernández Cirelli, Alicia, (2012), El agua: un recurso esencial, *Química Viva* 11(3); 147-170. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/863/86325090002.pdf>
- Flores Vargas Tatiana Colaboración: Ticona Flores Jhenny (2014), Reacciones Antígeno Anticuerpo, *Revista de Actualización Clínica*; 44.
- Franco Posada Anne Giselle, (2013) *Descripción de los parásitos intestinales más comunes en caninos llevados a consulta a la Clínica Veterinaria Lasallista Hermano Octavio Martínez López*, (Tesis de pregrado), Corporación Universitaria lasallista, Caldas, Antioquia.
- García Ramos SE, García Poza P, Ramos Díaz S. (2011), Utilización Terapéutica de los anticuerpos monoclonales, *Ars Pharm* 52(3), 46-57
- Garrido Abril Paola, (2015). “*Giardia sp y Su Participación En Las Alteraciones Nutricionales*” (tesis de pregrado), Universidad de Valladolid, Valladolid, España.
- Ganz Kyle R., Liviu Clime, Jeffrey M. Farber, Nathalie Corneau, Teodor Veres, Brent R. Dixon (2015), Enhancing the Detection of *Giardia duodenalis* Cysts in Foods by Inertial

- Microfluidic Separation, *Environmental Microbiology* 81(12), doi:10.1128/AEM.03868-14
- GEPAMOL, (2012), *Detección y Viabilidad de quistes de Giardia sp, Blastocystis sp y ooquistes de Cryptosporidium sp en el sistema de agua potable y no potable del municipio de Armenia, Quindío*, Grupo de Investigación del programa de medicina, universidad del Quindío sistema integrado de Gestión.
- Gutiérrez Rodríguez Victoria E., Oneida Espinosa Álvarez, Julio C. Carranza Martínez, Sofía Duque, Adriana Arévalo, Gustavo A. Vallejo. (2014), Detección de parásitos intestinales en niños preescolares y animales domésticos del municipio de Ibagué (Tolima), *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 7(1).
- Hans-Anton Keserue, Hans Peter Füchslin, Thomas Egli, (2011), Rapid Detection and Enumeration of *Giardia lamblia* Cysts in Water Samples by Immunomagnetic Separation and Flow Cytometric Analysis, *Appl Environ Microbiol.* 77(15):5420–5427. doi: 10.1128/AEM.00416-11
- Heredia Menocal Lenina Tamara, Sánchez Caraballo Yuria Isabel, (2014), Importancia de la vigilancia sanitaria de los parásitos en la calidad del agua, según su uso, *Rev Cubana de Higiene y Epidemiología*;52(2), recuperado de: http://www.bvs.sld.cu/revistas/hie/vol52_2_14/hie06214.htm
- Hernández Fundora Hermes, Yamila Puig Peña, Sergio Chiroles Rubalcaba, I MSc. Andrea María Rodríguez Bertheau, Juan Gallardo Díaz, Yoslane Milián Samper, (2013), Métodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en aguas, *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*;51 (1):84-96.
- Huang Wei, Yang Limei, Lei Lei, Feng Li, (2017), Label-free detection and identification of waterborne parasites using a microfluidic multi-angle laser scattering system, *optics communications*; 400, 25-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.optcom.2017.04.053>
- Imre Kálmán, Claudia Sala, Adriana Morar, Marius S. Ilie, Judit Plutzer, Mirela Imre, Florin S. Hora, Corina Badea, Mihai V. Herbei, Gheorghe Dărăbu, (2017), *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. as contaminant protozoa of the main rivers of western Romania: genetic characterization and public health potential of the isolates, *Springers Environ Sci Pollut Res*, DOI 10.1007/s11356-017-9543-y
- Jaramillo Gallego Liliana María, Martínez Heredia Henny Luz, Hernández Salazar Juancarlos José, Muñoz Hernández Tulia María, García Naranjo María Margarita, Hurtado Suárez Benny Leonardo. (2014), Identificación de parásitos intestinales en agua de pozos profundos de cuatro municipios. Estado Aragua, Venezuela. 2011-2012, *Revista Cubana de medicina tropical* 66(2), 164-173
- Juárez-Bautista Javier (2004), Factores que intervienen en la reacción antígeno-anticuerpo, *Gac Méd Méx*; 140(3).
- Lujan D. Hugo, (2006) *Giardia* y Giardiasis, *MEDICINA*; 66: 70-74

- Mahmoudi Reza Mohammad, Mirzaei Asad, (2015) Evaluation of immunomagnetic separation and the sucrose flotation methods coupled with immunofluorescence or PCR for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* (oo) cysts in water samples, *Res Med Sci* 2(4):41-44
- Ministerio de la protección social y de ambiente, vivienda y desarrollo territorial, Resolución 2115 de 2007, Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano, Fecha de consulta: 27 de junio de 2017, Disponible en: http://www.minambiente.gov.co/images/GestionIntegraldelRecursoHidrico/pdf/Legislacion%20del_agua/Resoluci%C3%B3n_2115.pdf
- Ministerio de salud y protección social, resolución número 005975 de 2016, "Por la cual se modifica la Resolución 4678 de 2015, que adopta la Clasificación Única de Procedimientos en Salud —CUPS- en su Anexo Técnico No. 1 y se sustituye el Anexo Técnico No. 2", Fecha de consulta: 27 de junio de 2017, Disponible en: <http://www.sispro.gov.co/recursosapp/SiteAssets/Resolucion-5975-de-2016-CUPS.pdf>
- Pérez-Cordón Gregorio, María J. Rosales, Renzo A. Valdez, Franklin Vargas-Vásquez, Ofelia Cordova, (2008), Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú, *Perú Med Exp Salud Publica*; 25 (1): 144-48, recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v25n1/a18v25n1.pdf>.
- Peralta L. Mónica, Jaime Ayala, (2008), Algunas consideraciones sobre la prevalencia actual de *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, coccidios, microsporidios y mixosporidios en Colombia, *Salud Uninorte*; 24 (2): 294-302, tomado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v24n2/v24n2a13.pdf>
- Pierre-Oliver Methot & Samuel Alizon (2014), What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions, *Virulence* 5:8, 775—785. www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/21505594.2014.960726
- Polverino D., Molina N.B., Minvielle M.C., Lozano M.E., Basualdo J.A., (2004), Técnicas de purificación y ruptura de quistes de *Giardia spp.*, *Revista Argentina de Microbiología*, 36: 97-100
- Quintero Jael, Diana Carolina Figueroa, Rafael Barcelo, Linda Breci, Humberto Astiazaran-García, Lucila Rascon, Ramon Robles-Zepeda, Adriana Garibay-Escobar, Enrique Velazquez-Contreras, Gloria Leon Avila, Jose Manuel Hernandez-Hernandez, Carlos Velazquez, (2013), Identification of an immunogenic protein of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies generated from infected mice, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 108 (5): 616-622
- RAE, Real Academia Española, Agua, (S.F), Consultado el Junio 10 de 2017, de <http://dle.rae.es/?id=1BKpQj3>

- Ramo Ana, Emilio Del Cacho, Caridad Sánchez-Acedo, Joaquín Quílez, (2017), Occurrence and genetic diversity of *Cryptosporidium* and *Giardia* in urban wastewater treatment plants in north-eastern Spain, *Elseiver* 598, 628-638.
- Reena Leeba Richard, Init Ithoi, Mohamad Azlan Abd Majid, Wan Yusoff Wan Sulaiman, Tian Chye Tan, Veeranoot Nissapatorn and Yvonne Ai Lian Lim, (2016), Monitoring of Waterborne Parasites in Two Drinking Water Treatment Plants: A Study in Sarawak, Malaysia, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13, 641; doi:10.3390/ijerph13070641, tomado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4962182/pdf/ijerph-13-00641.pdf>
- Rodríguez Victoria, Oneida Espinosa, Julio César Carranza, Sofía Duque, Adriana Arévalo, Jairo Alfonso Clavijo, Daniel Alfonso Urrea, Gustavo Adolfo Vallejo, (2014), Genotipos de *Giardia duodenalis* en muestras de niños de las guarderías del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar y de perros en Ibagué, Colombia, *Biomédica* 34, 271-81
- Rosado Manuel Félix -García, Milena Guerrero-Flores, Gabriele Karanis, Mar Del Carmen Hinojosa, Panagiotis Karanis, (2017), Water-borne protozoa parasites: The Latin American perspective, S1438-4639(17)30016-0, DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijheh.2017.03.008>
- Sáenz-Rodríguez Ana Yervid, (2015), Factores de riesgo para parasitismo intestinal en niños escolarizados de una institución educativa del municipio de Soracá – Boyacá, *Rev Univ. salud*.17(1):112-120.
- Sabi-Al M.N.S., J.A. Gad, U. Riber, J.A.L. Kurtzhals and H.L. Enemark, (2015), New filtration system for efficient recovery of waterborne *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts, *Journal of Applied Microbiology* 119, 894-903; Doi:10.1111/jam.12898
- Salgado-Arroyo Bárbara, Yaleyvis Buelvas-Montes, Vivian Villalba-Vizcaíno, Octavio Salomón-Arzuza, (2014), Caracterización genética por reacción en cadena de la polimerasa de *Giardia intestinalis* en muestras de humanos y perros del Caribe colombiano, *Enferm Infecc Microbiol Clin.*; 32(7):424–427
- Samuelson John & Robbins Phillips, (2011), A simple fibril and lectin model for cyst walls of *Entamoeba* and perhaps *Giardia*, *Trends Parasitol* 27(1): 17–22. doi:10.1016/j.pt.2010.09.002. tomado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3014499/pdf/nihms245181.pdf>
- Sánchez Milena Diana, Gutiérrez Katherine Leidy, Pérez Geovanny Omar, (2013), Estudio De Parasitosis Intestinal En Población Escolar De 1° A 5° Grado De Tres Instituciones Educativas De Diferente Nivel Socioeconómico En La Ciudad De San José De Cúcuta, Norte De Santander, *Revista IMBION*, 1: 2322-6471
- Sato Z. Maria Ines, Galvani Ana Tereza, Padula Jose Antonio, Nardocci Adelaide Cassia, Lauretto Marcelo de Souza, Pepe Razzolini Maria Tereza, Hachich Elayse Maria, (2013),

- Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil, *Elsevier* 443, 389-396.
- Saura Alicia, (2012), *Nuevos métodos para el diagnóstico Microbiológico de la amebiasis y de otros Protozoarios intestinales*, (Tesis de Doctorado), Universidad católica de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Shane G. McNally, Scott C. Dawson, (2016), Eight unique basal bodies in the multi-flagellated diplomonad *Giardia lamblia*, *Cilia* 5-21. DOI 10.1186/s13630-016-0042-4
- Tabares Fernando Luis, Gonzalez Lina, (2008), Prevalencia de parasitosis intestinales en niños menores de 12 años, hábitos higiénicos, características de las viviendas y presencia de bacterias en el agua en una vereda de Sabaneta, Antioquia, Colombia, *IATREIA* 21(3).
- US Environmental Protection Agency. Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in water by filtration/Ins/FA. Diciembre 2005. Office of Water (4607). Fecha de consulta: 27 junio del 2017. Disponible en: <http://www.epa.gov/microbes/1623de05.pdf>.
- Valdebenito Madrid Verónica, Fonseca Fernández Ítalo, Godoy Torrejón Eduardo, (2012), *Manual de parasitología humana*, Concepción, Chile, Larenas.
- Venegas Camilo (2015), *Diferenciación de la fuente de contaminación como herramienta para el mejoramiento de la calidad del agua* (tesis de especialización), Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá Colombia.
- Xu Sen, Mutharasan Raj, (2010), Rapid and Sensitive Detection of *Giardia lamblia* Using a Piezoelectric Cantilever Biosensor in Finished and Source Waters, *Environ. Sci. Technol.* 44, 1736–1741
- Zuñiga Chaidés Ivonne, (2014), *Obtención y purificación de anticuerpos policlonales específicos contra el contaminante emergente estreptomycin*, (Tesis de Maestría), Universidad autónoma de aguas calientes, Aguascalientes, Mexico.

Anexos.

Anexo 1, ANALISIS DESCRIPTIVO

Frecuencias.

Estadísticos

		No De Quistes de <i>Giardia sp/Lt</i>	Meses muestreados
N	Válido	10	10
	Perdidos	0	0
Media		29000,00	3,00
Error estándar de la media		4068,852	,471
Mediana		30000,00	3,00
Moda		30000	1 ^a
Desviación estándar		12866,839	1,491
Varianza		165555555,556	2,222
Mínimo		10000	1
Máximo		50000	5

a. Existen múltiples modos. Se muestra el valor más pequeño.

Anexo 2, Tabla de Frecuencias.

No De Quistes de *Giardia sp/Lt*

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	10000	2	20,0	20,0	20,0
	20000	1	10,0	10,0	30,0
	30000	4	40,0	40,0	70,0
	40000	2	20,0	20,0	90,0
	50000	1	10,0	10,0	100,0
Total		10	100,0	100,0	

Anexo 3, ANOVA DE UN FACTOR

Descriptivos

No De Quistes de *Giardia sp/Lt*

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	2	35000,00	7071,068	5000,000	-28531,02	98531,02	30000	40000
2	2	40000,00	14142,136	10000,000	-87062,05	167062,05	30000	50000
3	2	15000,00	7071,068	5000,000	-48531,02	78531,02	10000	20000
4	2	35000,00	7071,068	5000,000	-28531,02	98531,02	30000	40000
5	2	20000,00	14142,136	10000,000	-107062,05	147062,05	10000	30000
Total	10	29000,00	12866,839	4068,852	19795,62	38204,38	10000	50000

ANOVA

No De Quistes de *Giardia sp/Lt*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	940000000,000	4	235000000,000	2,136	,213
Dentro de grupos	550000000,000	5	110000000,000		
Total	1490000000,000	9			

Resumen de modelo y estimaciones de parámetro

Variable dependiente: No De Quistes de *Giardia sp/Lt*

Ecuación	Resumen del modelo					Estimaciones de parámetro			
	R cuadrado	F	df1	df2	Sig.	Constante	b1	b2	b3
Lineal	,164	1,574	1	8	,245	39500,000	-3500,000		
Logarítmico	,161	1,536	1	8	,250	37252,221	-8618,522		
Inverso	,136	1,261	1	8	,294	21911,299	15522,703		
Cuadrático	,167	,701	2	7	,528	42000,000	-5642,857	357,143	
Cúbico	,170	,410	3	6	,752	49000,000	-15476,190	4107,143	-416,667
Compuesto	,162	1,543	1	8	,249	40403,129	,861		
Potencia	,165	1,579	1	8	,244	36958,396	-,376		
S	,147	1,381	1	8	,274	9,839	,697		
Crecimiento	,162	1,543	1	8	,249	10,607	-,150		
Exponencial	,162	1,543	1	8	,249	40403,129	-,150		
Logística	,162	1,543	1	8	,249	2,475E-5	1,162		

La variable independiente es Meses muestreados.



Anexo 4, Charlas en colegios sobre recomendaciones para prevenir casos de parasitosis



Anexo 5, Charlas a padres de familia y niños de cada escuela donde se recolecto las muestras coprológicas



Anexo 6, Agitación y magnetizado de micropartículas Ac



Anexo 7, Filtración por membrana.

Pamplona, 20 de septiembre de 2016

Pr. Bernardo Wilches
Rector
Instituto San Francisco de Asís Sede Galán



Asunto: Solicitud de permiso para guardar y entregar muestras coprológicas

Muy atentamente me permito solicitar permiso y colaboración para que le puedan guardar muestras coprológicas de los estudiantes de Jardín al estudiante Michael Key Gonzalez Ortiz C.C. 309234805, estudiante de X semestre del programa de Biología quien se encuentra realizando su tesis de grado bajo mi dirección en la cual pretendemos determinar la cantidad de parásitos presentes en heces de los niños entre 5-7 años de edad en las sedes de Cristo Rey, 4 de Julio y Santa Marta.

Por nuestra parte, nos comprometemos a que una vez se procesen las muestras, se entregara un reporte con los resultados para que se tenga en cuenta en posibles jornadas de desparasitación.

Agradezco su atención y colaboración.

Raquel Aminda Valenzuela Gallardo, Ph.D
Docente tiempo completo
Facultad de Ciencias Básicas
Universidad de Pamplona

Prof.
Alfonso Castellanos,
Olga Borrero
Joaquín Linares
Viabilizar pronto autorización padres
a familia
Pedi copia Investigación

Anexo 8, Carta autorización del rector para trabajar en los colegios.

Pamplona, 00 de Febrero de 2017

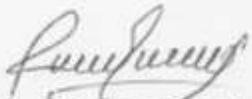
Pr. José Joaquín Rincón
Coordinador sede Cristo Rey
Instituto San Francisco de Asís

Asunto: Solicitud de permiso para guardar y entregar muestras coprológicas

Muy atentamente me permito solicitar permiso y colaboración para que le puedan guardar muestras coprológicas de los estudiantes de Jardín a segundo primaria al estudiante Michael Key Gonzalez Ortiz C.C. 1092348305, estudiante de X semestre del programa de Biología quien se encuentra realizando su tesis de grado bajo mi dirección en la cual pretendemos determinar la cantidad de parásitos presentes en heces de los niños entre 5-7 años de edad en las sedes de 4 de Julio y Santa Marta.

Por nuestra parte, nos comprometemos a que una vez se procesen las muestras, se entregara un reporte con los resultados para que se tenga en cuenta en posibles jornadas de desparasitación.

Agradezco su atención y colaboración.


Raquel Amanda Villanar Gallardo, Ph.D
Docente tiempo completo
Facultad de ciencias Básicas
Universidad de Pamplona


Recibido
3/11/2017

Anexo 9, Carta autorización del coordinador de uno de los colegios.

Estimados padres de familia reciban un cordial saludo, la presente es para indicarles que el grupo de investigación NANOSOST de la universidad de Pamplona se encuentra realizando una investigación sobre Parásitos Intestinales en niños, por tal motivo necesitamos su aprobación para poder enviarles el frasco donde ustedes se deberán comprometer en depositar la muestra de materia fecal del menor, en tal caso favor marcar con una X si desean colaborar con el estudio, por parte nuestra nos comprometemos a entregarles resultados del niño. Muchas Gracias

Yeime Katherine Canajal SI NO

Estimados padres de familia reciban un cordial saludo, la presente es para indicarles que el grupo de investigación NANOSOST de la universidad de Pamplona se encuentra realizando una investigación sobre Parásitos Intestinales en niños, por tal motivo necesitamos su aprobación para poder enviarles el frasco donde ustedes se deberán comprometer en depositar la muestra de materia fecal del menor, en tal caso favor marcar con una X si desean colaborar con el estudio, por parte nuestra nos comprometemos a entregarles resultados del niño. Muchas Gracias

Andrés Santiago Sánchez SI NO

Estimados padres de familia reciban un cordial saludo, la presente es para indicarles que el grupo de investigación NANOSOST de la universidad de Pamplona se encuentra realizando una investigación sobre Parásitos Intestinales en niños, por tal motivo necesitamos su aprobación para poder enviarles el frasco donde ustedes se deberán comprometer en depositar la muestra de materia fecal del menor, en tal caso favor marcar con una X si desean colaborar con el estudio, por parte nuestra nos comprometemos a entregarles resultados del niño. Muchas Gracias

SI NO

Anexo 10, Autorización por escrito que se les daba a los padres de familia para poder colectar las muestras coprológicas.



Anexo 11, Participación en II encuentro de Investigación en Medicina y Salud, Ciencia e Innovación

Anexo 12, Tabla de Siglas.

Siglas	Significado
ADE	Agua destilada estéril
IgG	Inmunoglobulina G
FIMS	Fluoro Inmunomagnético
FPM	Filtración por membrana
CWPs	Cyst Wall Protein (Proteínas de la pared quística)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
FA	Microscopia de ensayo de Inmunofluorescencia
OMS	Organización mundial de la salud
AL	América latina
MALS	Sistema de dispersión laser de múltiples ángulos