

# Medio de Keister modificado para el cultivo de *Giardia lamblia* in vitro

Disney Rosales-Borjas<sup>1,2</sup>, Juan Díaz-Rivadeneira<sup>2</sup>, Antonio Doña-Leyva<sup>3</sup>,  
Carmen Mascaró<sup>2</sup>, Antonio Osuna<sup>2</sup>, Librado Ortiz-Ortiz<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Hospital Universitario Dr. Miguel Oraá, Guanare, Estado Portuguesa, Venezuela;

<sup>2</sup>Grupo de Bioquímica y Parasitología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada y

<sup>3</sup>EMASAGRA, Granada, España;

<sup>4</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México  
y Universidad de Los Andes, Facultad de Medicina, Extensión Portuguesa, Guanare, Venezuela

Recibido Enero 15, 2009. Aceptado Febrero 2, 2009

## MODIFIED KEISTER MEDIUM FOR THE IN VITRO CULTURE OF GIARDIA LAMBLIA

### Resumen

Se informa sobre la modificación del medio tradicional de Keister usado para el crecimiento de *Giardia lamblia*. El medio propuesto permite elaborar volúmenes importantes que son esterilizados en autoclave y enriquecidos posteriormente con volúmenes pequeños de los componentes que son sensibles al calor. *G. lamblia* cultivado en el medio modificado creció al mismo nivel que en el medio tradicional.

**PALABRAS CLAVE:** *Giardia lamblia*, cultivo de *Giardia*, medio de Keister

### Abstract

*The elaboration of a modified Keister's culture medium for the growth of Giardia lamblia is reported. The modified medium allows the elaboration of important volumes that can be sterilized in the autoclave and later on enriched with small volumes of the components that are denatured by heat sterilization. G. lamblia cultured in the modified medium grows at the same level that in the traditional medium.*

**KEYWORDS:** *Giardia lamblia*, *Giardia culture*, *Keister medium*.

### Introducción

La aparición de los actuales medios de cultivo para protozoarios ha permitido investigar diversos aspectos parasitarios en áreas como el diagnóstico, bioquímica e inmunología, entre otros. El estudio de *Giardia lamblia*, protozoario flagelado reconocido como una importante causa de diarreas en el mundo (1-3), se ha facilitado gracias al reporte de varios medios para su crecimiento, entre ellos, la modificación al TYI-S-33 reportado por Keister (4), el cual permite un desarrollo apropiado en un cultivo axénico. Sin embargo, según el autor, es necesario que la preparación del medio de cultivo cumpla con ciertas condiciones para que se obtenga un crecimiento adecuado del parásito, en particular, que se clarifique y esterilice por

filtración desgerminizante y no por autoclave (5, 6). En este reporte, se informa sobre una modificación del medio de Keister que permite su esterilización por autoclave y posterior enriquecimiento con los componentes sensibles al calor previamente esterilizados por filtración.

### Material y métodos

*G. lamblia*. Se cultivaron trofozoitos de *G. lamblia* (ATCC No. 30957) en condiciones axénicas, en medio TYI-S-33 a 37°C enriquecido con suero bovino (10%) de acuerdo al método descrito por Keister (4). En todos los experimentos realizados, los trofozoitos se cosecharon después de 72 h de cultivo, enfriando los tubos de cultivo, con el parásito, en un baño de hielo a 4°C durante 10 min y

centrifugando a 250 g por 10 min a 4°C. La viabilidad del protozooario se determinó por medio de la exclusión del azul de tripan, la cual generalmente fue mayor del 90%.

Medio de Keister esterilizado por filtración desgerminizante. El medio se preparó de acuerdo a Keister (4), disolviendo en 600 ml de agua destilada los siguientes componentes:  $K_2HPO_4$ , 1.0 g;  $KH_2PO_4$ , 0.6 g; NaCl, 2.0 g; biosate peptona (BBL, Beckton Dickinson and Co., Cockeysville, MD), 30 g, bilis bovina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 500 g; glucosa, 10 g; clorhidrato de L-cisteína, 2 g; ácido ascórbico, 0.2 g, y citrato férrico amónico 22.8 mg. Se lleva el volumen a 900 ml con agua destilada y se ajusta el pH a 7,0-7,1 con NaOH 1N. El medio se clarifica y esteriliza por filtración (0.22  $\mu$ m de diámetro de poro). Finalmente, se complementa con 100 ml de suero fetal bovino inactivado previamente (56°C durante 30 min).

Medio esterilizado por autoclave. La modificación del medio de Keister (4) consiste en preparar el medio descrito anteriormente, omitiendo solamente la glucosa, el clorhidrato de L-cisteína y el ácido ascórbico y llevando el volumen a 875 ml con agua destilada. Esta solución se esteriliza en autoclave (121°C, 15 min) y posteriormente cuando se ha enfriado, se le adicionan 25 ml de una solución esterilizada por filtración desgerminizante (0.22  $\mu$ m de diámetro de poro) que contiene glucosa, 10 g; clorhidrato de L-cisteína, 2,0 g, y ácido ascórbico, 0.2g. Por último, se adicionan 100 ml de suero fetal bovino inactivado.

Inoculación de los medios en estudio con *G. lamblia*. Los medios así preparados se dispensan en tubos de vidrio de 13 X 100 mm, con tapa de rosca, llenándolos al 90% de su capacidad total. Los tubos se inoculan con 0,5 ml de una suspensión de trofozoitos de *G. lamblia* a una concentración final de 22.000 parásitos por ml.

Evaluación del crecimiento por medio de la determinación del número de parásitos. Se tomaron al azar tubos de los medios en estudio a diferentes tiempos y se introdujeron en un baño de hielo a 4°C durante 10 min. Los tubos se rodaron vigorosamente entre las manos y se tomó una alícuota que se fijó con formalina a una concentración final del 0.1% y se determinó el número de parásitos en una cámara

hemocitométrica. El conteo se realizó durante 4 días.

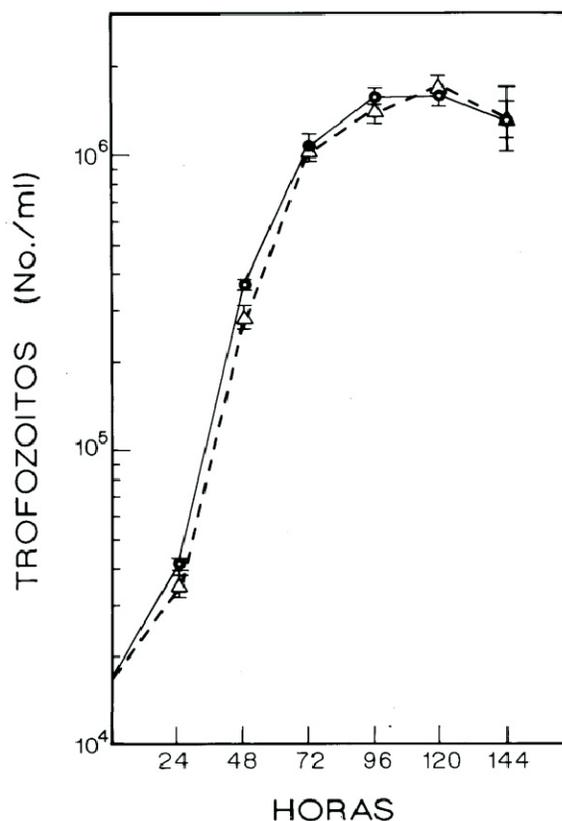
Análisis estadístico. Se usó la prueba de Fisher para determinar la homogeneidad de la varianza entre grupos. Cuando la varianza fue homogénea, se aplicó la prueba *t* de Student (7) para estimar si la diferencia entre promedios era significativa. Por otra parte, cuando la varianza fue heterogénea, se utilizó la *U* de Mann-Whitney (8).

## Resultados

Comparación del crecimiento de *Giardia* en el medio esterilizado en autoclave y el método tradicional filtrado.

### Determinación del número de parásitos

El crecimiento de *Giardia* es similar tanto en el medio esterilizado en autoclave como en el tradicional filtrado. Como se observa en la figura 1, el número de parásitos a lo largo de 5 días de cultivo no mostró diferencias significativas (*P* 0,05) en los medio estudiados.



## Discusión

Los resultados que se presentan, indican que la modificación al medio de Keister (4) no altera el crecimiento del protozooario. En una revisión en este tema, Diamond (5), reportó que el medio TYI-S-33 apoya el crecimiento de *G. lamblia* siempre y cuando se esterilice por filtración y no por autoclave. A la fecha, este protozooario ha sido pasado al menos 60 veces en el medio esterilizado por autoclave, sin diferencias cualitativas en morfología celular o en movilidad cuando se compara con aquellos crecidos en el medio de Keister (4). Además, el tiempo de generación fue similar en los dos medios estudiados (datos no reportados) y se encuentra en el rango previamente informado por otros investigadores con este flagelado (9). La modificación que aquí se propone permite esterilizar por autoclave, sin detrimento en el crecimiento del parásito, siempre y cuando se omitan durante el proceso de esterilización del resto de los componentes, la glucosa, L-cisteína y ácido ascórbico, los cuales se adicionan posteriormente una vez que se han esterilizado previamente por filtración en un volumen pequeño, que es fácil y rápidamente realizada. Esta modificación simplifica la preparación del medio,

particularmente cuando no se cuenta con equipo para la filtración de grandes volúmenes del medio de Keister (4).

## Referencias

1. Wolfe, M.S. 1978. Current concepts in parasitology. Giardiasis. N. Engl. J. Med. 298:319-321.
2. Thompson, R. C. 2000. Giardiasis a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. Int. J. Parasitol. 30:1259-1267.
3. Katz, D.E. Heisey-Grove, D., Beach. M. J., et al. 2006. Prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission. Epidemiol. Infect. 134:935-941.
4. Keister, D.B. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TWI-S-33 medium supplemented with bile. Trans. R. Soc., Trop. Med. Hyg. 77:487-488.
5. Diamond, L.S, 1987. *Entamoeba, Giardia y Trichomona. En, In Vitro Methods for Parasite Cultivation.* A.E.R. Taylor, J.R. Baker, eds. Academic Press, London. pp. 1-28.
6. Gillin, F.D., Diamond, L.S. 1981. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* growth response to reducing agents. Exp. Parasitol. 51:382-391.
7. Fisher, R.A. 1934. Statistical Method for Research Workers. Oliver & Boyd, Edinburgh.
8. Mann, H.B., Whitney, D.R. 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. Ann. Math. Statist. 18:50-54.
9. Bifulco, J.M., Schaefer, F.III. 1992. Serial subcultivation of *Giardia lamblia* in Keister's modified TYI-S-33 medium containing Ultrosor G. J. Protozool. 39:211-213.