



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *GIARDIA INTESTINALIS*  
MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN DE SEGMENTOS DE GENES  
DE TRES PROTEÍNAS VARIABLES DE SUPERFICIE

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
P R E S E N T A :  
MARTHA PONCE MACOTELA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PAZ MARÍA SALAZAR SCHETTINO



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## Doctorado en Ciencias Biomédicas

FACULTAD DE MEDICINA

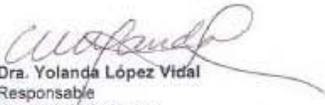
pdcb/grad/007Jur/2006.

**ING. LEOPOLDO SILVA**  
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION  
ESCOLAR DE LA UNAM.  
PRESENTE.

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevó a cabo el día 22 de febrero del 2006, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la alumna PONCE MACOTELA MARTHA, con número de cuenta 7422744-0 con la tesis titulada: "CARACTERIZACION DE AISLADOS DE *Giardia intestinalis* MEDIANTE LA AMPLIFICACION DE SEGMENTOS DE GENES DE TRES PROTEINAS VARIABLES DE SUPERFICIE", dirigida por la Dra. Paz María Salazar Schettino.

PRESIDENTE: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER  
SECRETARIO: DRA. PAZ MARIA SALAZAR SCHETTINO  
VOCAL: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE  
VOCAL: DRA. MARIA IMELDA LOPEZ VILLASEÑOR  
VOCAL: DRA. GUADALUPE ORTEGA PIERRES  
SUPLENTE: DR. RAFAEL LAMOTHE ARGUMEDO  
SUPLENTE: DRA. CONCEPCION TORIELLO NAJERA

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 27 de abril de 2006.

  
Dra. Yolanda López Vidal  
Responsable  
Facultad de Medicina

  
Dr. J. Javier Espinosa Aguirre  
Coordinador  
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

C.c.p. Biol. Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.  
Tutor(a) Dra. Paz María Salazar Schettino.  
Coordinación de Doctorado

**Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Parasitología Experimental del  
Instituto Nacional de Pediatría.**

**Con la asesoría de la  
Dra. Paz María Salazar Schettino.  
Jefe del Laboratorio de Biología de Parásitos, del Departamento de  
Microbiología y Parasitología de la UNAM.**

Gracias al Instituto Nacional de Pediatría, por el apoyo que recibí para llevar a cabo esta investigación.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por la gran oportunidad que me otorgó para acceder al Posgrado.

Con mi más sincero agradecimiento a la Dra. Alessandra Carnevale Cantoni, ex Directora del Instituto Nacional de Pediatría, por su gran apoyo, sabiduría y enseñanza; además, porque siempre nos impulsó para profundizar en el estudio de Giardia.

Gracias a mi Comité Tutorial: Dra. Paz María Salazar, Dra. Rosa María Bermúdez y Dr. Edgar Zenteno, por los valiosos conocimientos que obtuve de ellos.

Gracias al Jurado: Dra. Ingerborg Dorotea Becker Fauser, Dra. Paz María Salazar Schettino, Dra Edda Lydia Sciutto Conde, Dra. María Imelda López Villaseñor, Dra. Guadalupe Ortega Pierres, Dr. Rafael Lamothe Argumedo y Dra. Concepción Torriello Najera, por sus excelentes observaciones al manuscrito.

Gracias a mis Profesores de Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM: Drs. Jorge Tay, Rubén Álvarez Chacón†, Manuel Wong Chio, Paz María Salazar Schettino, Irene de Haro Arteaga, Manuel Gutiérrez Quiroz y Filiberto Malagón. Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) la beca que me otorgó, con número de registro 52271, durante el transcurso de mis estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Agradezco al Dr. Raúl Cos Lira, del Centro de Control Canino "Culhuacan" su apoyo para la obtención de material biológico para la búsqueda de Giardia.

Los experimentos sobre la genotipificación molecular de los aislados analizados en este trabajo se realizaron bajo la dirección de la Dra. Rosa Ma. Bermúdez del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, a quien agradezco su tiempo y gran disposición para realizar este estudio así como al acceso que tuve a las instalaciones de este centro durante mi estancia como alumno externo. Así mismo le hago patente mi agradecimiento por su interés, dedicación, y esfuerzo en la preparación y consecución de los manuscritos que incluyen los resultados obtenidos en este proyecto. También agradezco a las instalaciones de este centro

Agradezco a la Dra. Guadalupe Ortega Pierres, Jefa del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación de estudios Avanzados del IPN, su gran apoyo académico, tiempo y disponibilidad que tuvo conmigo, para que esta tesis se enriqueciera.

Agradezco al Dr. Peter L Ey., del Departamento de Biociencias Molecular de la Universidad de Adelaide, Australia, por su extraordinario apoyo académico, su entusiasmo y por la donación de los iniciadores.

Agradezco a la Dra. Paz María Salazar Schettino su gran apoyo académico y la confianza que depositó en mi para continuar con mi trayectoria en investigación

**Esta tesis la dedico a:**

*Mario, quien disfrutó conmigo los momentos más importantes de los frutos de esta tesis.*

*Mario gracias por tu apoyo incondicional.*

*Suri y Axa, porque son una chispita que me ilumina a cada momento.🌿*

*Mis padres: Marcos y Lolita porque siempre recibo fortaleza y cariño de ustedes.*

*Marcelino, Verónica, Domingo y Lolis por ser como son.*

*Mi excelente grupo de colaboradores del Laboratorio de Parasitología experimental del INP (Mario Martínez, Gustavo Peralta, Yadira Rufino, David Zaragoza, Silvia Caballero, Jorge Dávila), por su gran apoyo, dedicación, constancia y deseos de superación.*

*Dr. Rubén Álvarez-Chacón †, pionero de la Parasitología en México, de quien aprendí Parasitología Médica y que me permitió abrir la línea de Investigación en Giardiasis.*

*Mis grandes amigas: María Teresa Aguirre, Angélica González, Leticia Ruiz, Judith Vázquez, Bety Meraz, Pilar Soto, Maricela Hernández por los momentos en los que hemos convivido en esta gran trayectoria.*

*Dra. Dolores Correa porque me estimuló a buscar más de una forma para cumplir con mi objetivo, por sus observaciones y por su gran amistad.*

*Mis estudiantes de Ciencias y uno de la Facultad de Química, porque ellos han sido y serán extraordinarios generadores del conocimiento de la Parasitología en nuestro País.*

*Al grupo del Laboratorio de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina, UNAM, por su apoyo y amistad.*

*A quien trabaja para que se fortalezca la investigación en nuestro País.*

*A quien es capaz de decir “hagamos lo imposible”*

# Índice

<b>1.- Resumen</b> .....	
1.1 Abstract.....	
<b>2.- Publicaciones originales</b> .....	
<b>3.- Introducción</b> .....	
3.1 Características generales de <i>Giardia</i> .....	
3.1.1 Taxonomía .....	
3.1.2 Historia .....	
3.1.3 Especies .....	
3.1.4 Morfología .....	
3.1.4.1 Trofozoíto .....	
3.1.4.2 Quiste .....	
3.2 Ciclo biológico .....	
3.2.1 Desenquistamiento <i>in vitro</i> .....	
3.2.2 Cultivo <i>in vitro</i> .....	
3.2.3 Enquistamiento <i>in vitro</i> .....	
3.3 Mecanismos patogénicos .....	
3.4 Manifestaciones clínicas .....	
3.5 Estrategias del huésped para evadir el ataque del parásito .....	
3.6 Estrategias del parásito para evadir la respuesta del huésped .....	
3.7 Diagnóstico .....	
3.8 Tratamiento .....	
3.9 Epidemiología .....	
<b>4.- Planteamiento del problema</b> .....	
<b>5.- Justificación</b> .....	
<b>6.- Hipótesis</b> .....	
<b>7.- Objetivos</b> .....	
<b>8.- Material y métodos</b> .....	
8.1 Primera serie: Diagnóstico de giardiasis .....	
8.1.1 Concentración y purificación de quistes de <i>G. intestinalis</i> (Solución de Sheather) .....	
8.1.2 Desenquistamiento <i>in vitro</i> .....	
8.1.3 Cultivo en TYI-S-33 .....	
8.1.4 Clonación .....	
8.1.5 Aislados de <i>G intestinalis</i> .....	
8.1.5.1 Pacientes pediátricos .....	

8.1.5.2 Cánidos y un felino .....	
8.2 Segunda serie: aislados de <i>G intestinalis</i> .....	
8.2.1 Aislados obtenidos de ovinos .....	
8.2.2 Aislados procedentes de caprinos .....	
8.2.3 Muestras obtenidas de cánidos del centro de Control Canino "Culhuacan" .....	
8.2.4 Aislados obtenidos de humanos .....	
8.3 Obtención de los ácidos nucleicos .....	
8.4 Ensayos genéticos .....	
8.5 Primera serie: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
8.5.1 Ensayo 1 .....	
8.5.2 Ensayo 2 .....	
8.5.3 Ensayo 3 PCR-múltiplex (Mix-One).....	
8.6 Polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP's) .	
8.7 Segunda serie: PCR-múltiplex (GiP5) .....	
8.7.1 Ensayo 1 Cepas de referencia .....	
8.7.2 Ensayo 2 Artiodáctilos, cánidos y humanos.....	

## **9.- Resultados.....**

9.1 Primera serie. Obtención de los aislados de <i>G. intestinalis</i> ..	
9.2 Detección de los subtipos de <i>G. intestinalis</i> por PCR del DNA genómico. ....	
9.2.1 Ensayo 1.....	
9.2.2 Ensayo 2.....	
9.2.3 Ensayo 3 PCR-múltiplex (Mix-One) .....	
9.3 Segunda serie. Obtención de los aislados de <i>G. intestinalis</i> .	
9.4 Detección de los subtipos por PCR-múltiplex (Gi5P) del DNA genómico de <i>G. intestinalis</i> .....	
9.4.1 Ensayo 1 Amplificación de cepas de referencia...	
9.4.2 Ensayo 2 Amplificación de aislados que se obtuvieron de artiodáctilos, cánidos y humanos ..	

## **10.- Discusión.....**

## **11.- Conclusiones.....**

## **12.- Anexo.....**

## **13.- Referencias.....**

## **14.- Artículos.....**

## 1. Resumen.

*Giardia intestinalis* (*G. duodenalis*, *G. lamblia*), es un parásito cosmopolita que produce diarrea y malabsorción. La especie incluye organismos que están presentes en muchos mamíferos; sin embargo, la similitud morfológica enmascara diferencias biotípicas y genotípicas, lo bastante grandes para considerarla un complejo de especies. Basados en el análisis de segmentos de genes por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLPs) y secuenciación; se describieron siete ensamblajes (A - G). Desconocemos cuáles son los genotipos predominantes en aislados mexicanos de *G. intestinalis*. En este estudio, se analizaron muestras de DNA de *G. intestinalis* obtenidas en dos épocas: En la primera serie (resultados publicados) se incluyeron muestras provenientes de pacientes pediátricos, dos perros y un gato, analizadas por dos métodos: amplificación (PCR) de segmentos de genes de proteínas variables de superficie (VSP's) con análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) y por PCR-Múltiplex con un juego de iniciadores Mix-One, que detecta a tres ensamblajes (A, B y E) con iniciadores para SVP's y GDH. En la segunda serie (resultados no publicados) se incluyeron muestras de *Giardia* procedentes de animales de granja (ovinos y caprinos), cánidos y pacientes pediátricos, analizadas mediante un nuevo ensayo PCR-múltiplex, con los iniciadores GiP5 que detecta a los siete ensamblajes (A-G). En la primera serie se encontró predominio del grupo genético A-II, así se mostró que este grupo es potencialmente zoonótico como el grupo genético A-I. De forma consistente, con el ensayo múltiplex-GiP5 se confirmaron los resultados de la primera serie. Además, en la segunda serie, encontramos predominancia del subtipo A-I (zoonótico) en muestras procedentes de artiodáctilos, así como también el ensamblaje B (zoonótico) y E (artiodáctilos). De las muestras de DNA de *Giardia* obtenidas de los intestinos de perros, se encontró predominio de los ensamblajes C - D (específicos de perros) o mezclados con genotipos zoonóticos (A o B).

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que los animales de granja de una zona del Estado de Hidalgo y perros callejeros de una zona del Sur de la Ciudad

de México son reservorios y diseminadores de quistes de *G. intestinalis* con potencial zoonótico.

## 1.1 Abstract.

*Giardia intestinalis* (Syn. *G. duodenalis*, *G. lamblia*) is a cosmopolitan parasite which produces diarrhea and malabsorption. The species includes organisms that are ubiquitous in a variety of mammals. However, the morphological similarity masks genetic and biotypic differences that are sufficiently large for *G. intestinalis* now to be considered a species complex. Based on the analysis of DNA segments by the polymerase chain reaction (PCR), restriction fragments length polymorphisms (RFLP's) and sequence; seven assemblages have been described, from A to G. We do not know which are the *G. intestinalis* predominant genotypes in Mexico are. In present work we analyzed DNA samples from *Giardia intestinalis* retrieved in two times: First series (published), included samples from pediatric patients, dogs and cats, typed by: PCR-RFLP's of variable surface proteins (VSP's) and a PCR-multiplex (MixOne) capable to discriminate three assemblages (A, B, and E) with primers for VSP's and *GDH*. The second series (unpublished results), included DNA samples from hoofed farm animals (sheep and goat), new dog samples and pediatric patients, studied by PCR- multiplex (GiP5) with primers which are capable to discriminate between the seven assemblages (A-G). Surprisingly, in the first series, we found an unusual predominance of subtype A-II, thus *G. intestinalis* subtype A-II is potentially zoonotic, as A-I. In a consistent manner, we found with the PCR-multiplex with GiP5 primers the same results for the first series. Besides, we found a predominance of the subtype A-I in samples from rams, and *Giardia* belonging to assemblage B (zoonotic) and assemblage E (artiodactyls specific). In *Giardia* samples recovered from dog intestines, there were a predominance of assemblages C or D or mixed with *Giardia* belonging to assemblages A or B. The results from this work suggest that hoofed farm animals from the State of Hidalgo and dogs living in the southern part of the Mexico City, can be reservoirs and transmit *Giardia* cysts potentially zoonotic.

### 3. Introducción.

#### 3.1 Características generales de *Giardia*

Las características que definen al reino Protozoa están sujetas al Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. Los Archezoa comprenden dos Phyla que divergieron antes de la separación de todos los grupos que tienen mitocondrias. Estos son organismos que carecen de aparato de Golgi, mitocondrias, hidrogenosomas y peroxisomas; además, sus ribosomas y el rRNA son más semejantes a los de procariontes y la energía que producen es por glicólisis anaeróbica (Cavalier-Smith, 1998). Recientemente, se ha documentado la presencia de mitosomas (restos de organelos de mitocondrias) en *Giardia* (Silverman *et al.*, 2002; Tovar *et al.*, 2003).

##### 3.1.1. Taxonomía, (Cavalier-Smith, 1998).

Imperio: Eucariota.

Reino: Protozoa.

Subreino: Archezoa.

Phylum: Metamonada.

Subphylum: Eopharyngia.

Clase: Trepomonadea.

Orden: Diplomonadida.

Suborden: Diplomonadina.

Género: *Giardia*.

Especie: *Giardia intestinalis*

### 3.1.2. Historia.

Se atribuye al Holandés Antón van Leeuwenhoek (1632-1723) el descubrimiento de *Giardia*; pero, fue Clifford Dobell (1886-1949) quien tradujo, analizó e interpretó las cartas que Leeuwenhoek envió a la Royal Society. Dobell (1932) refiere que en una de esas cartas, Leeuwenhoek describió a los trofozoítos de *Giardia*. En la carta del 4 de noviembre de 1681 y dirigida a Robert Hooke, secretario de la Royal Society, dice que en una muestra de sus propias evacuaciones diarreas encontró unos “animalículos” del tamaño de los eritrocitos, más largos que anchos, aplanados y con “patitas”, que se movían vigorosamente de un lugar a otro (Boreham *et al.*, 1990).

En un estudio realizado doscientos años más tarde, el Checoslovaco Vilem Lambl (1859) observó y describió a los trofozoítos que encontró en las evacuaciones disentéricas de un niño y los nombró *Cercomonas intestinalis*. En 1882 Kunstler asignó el nuevo género *Giardia* a los trofozoítos que vió en muestras de renacuajos; el género *Giardia* fue en honor al Profesor Alfred Mathieu Giard (1846-1908). Por otro lado, Blanchard (1888) a los trofozoítos que encontró en mamíferos les denominó *Lamblia*.

Hegner (1922) comparó estos dos grupos y determinó que no había diferencias suficientes para mantener los dos géneros. Pero seguía la controversia con el nombre de la especie.

Por otro lado, Grassi (1879), describió la fase quística de este protozoario.

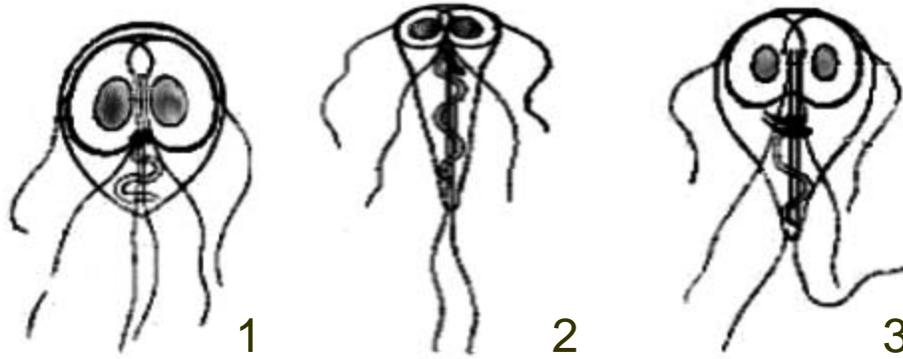
### 3.1.3. Especies.

Definitivamente el problema de la delimitación de las especies en el género *Giardia* tiene implicaciones epidemiológicas. Históricamente se describieron más de 40 especies, con base en la especificidad huésped-parásito, de hecho hubo tantas especies como hospederos se encuentran en la naturaleza (Kulda &

Nohýnková, 1995). Sin embargo, Filice (1952), mediante el análisis morfológico de los trofozoítos y la forma de los cuerpos medios redujo el número de especies y describió sólo tres: *G. muris* (roedores y aves), los trofozoítos son piriformes, con dos cuerpos medios pequeños y redondos, que se localizan en el centro del cuerpo. *G. agilis* (anfibios: ranas y renacuajos), los trofozoítos son alargados y delgados; los cuerpos medios tienen la forma de gota de lágrima y se encuentran a lo largo del eje del cuerpo. *G. duodenalis* (trofozoítos de conejo como referencia) que infecta a una amplia variedad de mamíferos, incluido el hombre, tiene el cuerpo medio con la forma de uña de martillo, se localiza transversalmente y cruza a la célula de un lado a otro (Filice, 1952) (Fig.1).

El nombre de la especie *lamblia* para designar a los aislados obtenidos de humanos actualmente es problemático, debido a que estos aislados también se pueden encontrar en otros mamíferos. Por prioridad taxonómica la Organización Mundial de la Salud acepta el nombre de *Giardia intestinalis*, sin. *G. lamblia* o *G. duodenalis* (Boreham *et al.*, 1990; Van Keulen, 2002).

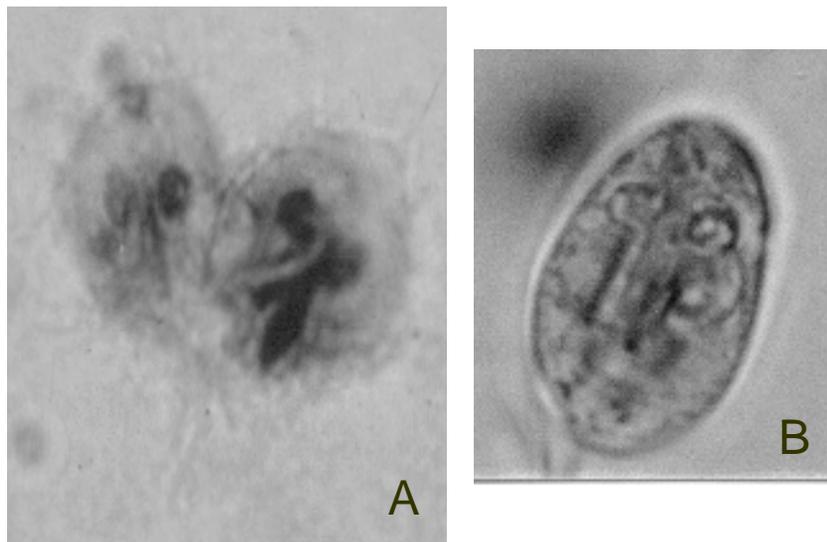
Recientemente, se han descrito dos nuevas especies en aves: *G. psittaci* cuyos cuerpos medios son semejantes al grupo morfológico *G. duodenalis* (uña de martillo); sin embargo, carecen del flanco ventrolateral (Erlandsen & Bemrick, 1987) y *G. ardeae* con cuerpos medios pleomórficos (redondos del tipo *G. muris* y en forma de uña de martillo del tipo *G. duodenalis*), pero, carecen de un flagelo caudal (Erlandsen *et al.*, 1990). Otra especie descrita en roedores es *G. microti*, que presenta dos trofozoítos en la fase quística y cuya secuencia del 16S rRNA es diferente a la de los trofozoítos de *Giardia* obtenidos de humanos (Van Keulen *et al.*, 1998).



**Figura 1.** Esquema de la morfología de los trofozoítos de tres especies de *Giardia* (Filice, 1952). (1) *Giardia muris*, que se encuentra en roedores y aves, (2) *G. agilis*, en anfibios, y (3) *G. duodenalis*, en mamíferos, incluido el hombre.

### 3.1.4. Morfología.

*Giardia intestinalis* tiene dos estadios: el trofozoíto que es la forma trófica o vegetativa, que produce las manifestaciones clínicas y el quiste es la estructura de resistencia y de transmisión (Fig. 2).



**Figura 2.** Fotomicrografía A. Trofozoítos en división (tinción de Giemsa). Fotomicrografía B. Quiste teñido con lugol, obtenido de un paciente con giardiasis.

#### **3.1.4.1. Trofozoíto.**

El trofozoíto es piriforme, mide de 12-15  $\mu\text{m}$  de longitud, 5-7  $\mu\text{m}$  de ancho y de 1-2  $\mu\text{m}$  de espesor. Este microorganismo es aplanado dorso-ventralmente, la superficie dorsal es convexa y puede ser lisa o rugosa, de acuerdo al momento metabólico del trofozoíto. La superficie ventral es cóncava y en ésta se localiza el disco suctor. Tiene ocho flagelos que emergen en pares: anteriores, laterales, ventrales y caudales (Owen, 1980).

El trofozoíto presenta en la parte anterior dos núcleos, que aparentemente tienen la misma cantidad de DNA, son transcripcionalmente activos, no se le han encontrado nucléolos; pero hay relictos genéticos (Xin *et al.*, 2005) y presentan grumos de heterocromatina en contacto con la membrana nuclear.

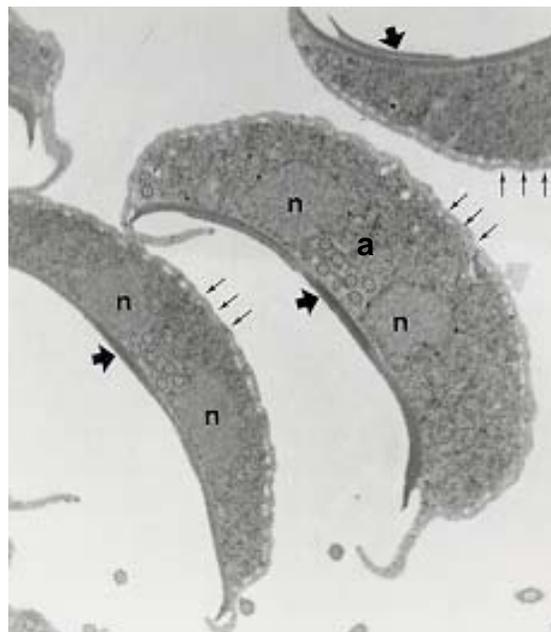
El disco suctor es la estructura más prominente en la región ventral, la superficie es lisa, pero puede presentar algunas depresiones en el centro, probablemente debidas a endocitosis. El disco está formado por microtúbulos que le dan rigidez y favorecen la adhesión del trofozoíto a las microvellosidades. El flanco ventrolateral rodea al disco suctor, tiene una subestructura filamentosa, probablemente su función sea contráctil (Fig.3).

Los flagelos se originan en el citoplasma como axonemas a partir de cuerpos basales, presentan el patrón característico de los eucariontes, de nueve dobletes de microtúbulos periféricos más dos centrales (9+2). Los flagelos ventrales ayudan a eliminar el fluido que se encuentra entre el disco suctor y las microvellosidades, e incrementan la succión del disco suctor. Los flagelos caudales se mueven vigorosamente de un lado a otro, comprimen el citoplasma del trofozoíto y proveen circulación interna de los fluidos; cuando los flagelos se elevan, la succión se libera y el trofozoíto se desplaza a otro lugar. En los axonemas caudales se

localiza una estructura denominada funis que consta de dos varillas longitudinales. Los flagelos anteriores y laterales favorecen el movimiento del trofozoíto cuando no está adherido a las microvellosidades.

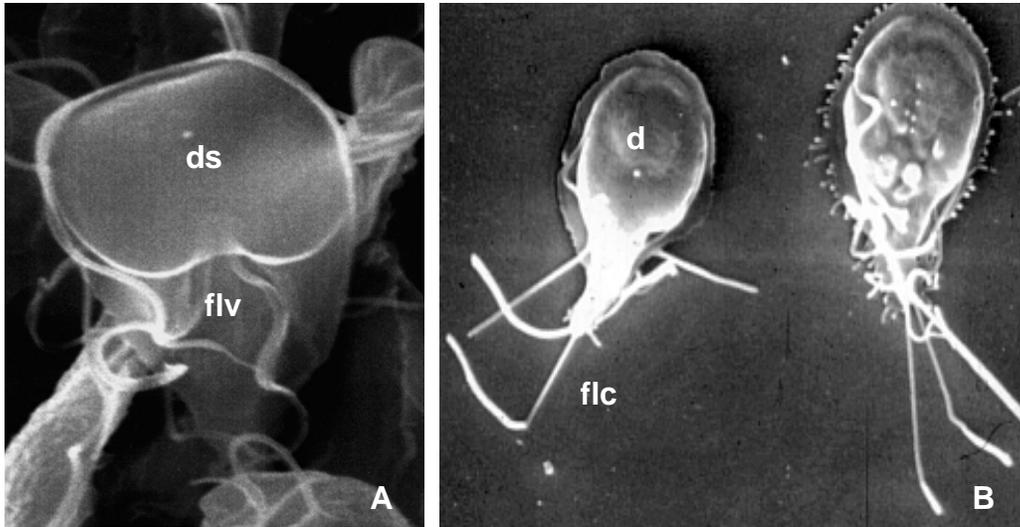
El cuerpo medio está formado de microtúbulos y tiene la función de soporte. El citoesqueleto presenta proteínas contráctiles del tipo de las giardinas, tubulina,  $\alpha$ -tubulina, miosina y tropomiosina (Feely *et al.*, 1982; Feely *et al.*, 1990; Narcisi *et al.*, 1994).

Membrana plasmática. La membrana ventral recubre el citoesqueleto del disco suctor y generalmente es lisa, aunque se observa la forma espiral de los microtúbulos. En la membrana dorsal se observan pequeñas vesículas superficiales que probablemente correspondan a las vacuolas. Debido a que la membrana de las vacuolas es semejante al plasmalema, se sugiere que hay tráfico de sustancias entre las dos, para endocitosis o secreción (Fig. 3, 4). (Adam, 2001; Feely *et al.*, 1990).



**Figura 3.** Microscopía electrónica de transmisión (MET) de trofozoítos típicos. Disco suctor (flechas gruesas), núcleos (n), axonemas (a),

citoplasma electrodenso y membrana citoplasmática con vacuolas periféricas (flechas delgadas).



**Figura 4.** Microscopia electrónica de barrido (MEB). Fotomicrografía A. Región ventral, disco succionador (ds) y flagelos ventrales (flv). Fotomicrografía B. Región dorsal (d), flagelos caudales (flc), interdigitaciones y formación de protuberancias en el dorso.

La función de la mayoría de los organelos membranosos es para el metabolismo energético o para el transporte de macromoléculas. *Giardia* carece de mitocondrias (típicas) o peroxisomas y el metabolismo de todas las enzimas es citosólico (Gillin *et al.*, 1991).

*Giardia* no tiene lisosomas típicos; sin embargo, se sugiere que algunas vacuolas periféricas, tienen función lisosomal, debido a que poseen actividad de fosfatasa ácida (Feely & Dyer, 1987). También hay vesículas específicas de enquistamiento (ESV). Se ha demostrado que *Giardia* en proceso de enquistamiento, selecciona, empaqueta y transporta proteínas a su respectivo lugar mediante una estructura semejante a un aparato de Golgi (Gillin *et al.*, 1991; Lujan *et al.*, 1995).

#### 3.1.4.2. Quiste.

El quiste es de forma ovoide, mide de 8-12  $\mu\text{m}$  de longitud y de 7-10  $\mu\text{m}$  de ancho. La pared es de 0.3-0.5  $\mu\text{m}$  de espesor, compuesta de una capa filamentosa externa y una membranosa interna, la primera está cubierta de filamentos de 7-10 nm, compuestos de N-acetilgalactosamina y proteínas de 29, 75, 88 y 102 kDa. Entre la pared y la membrana plasmática hay un espacio lagunar, que está lleno de un material de baja electrodensidad. Internamente, en uno de los polos se localizan de dos a cuatro núcleos esféricos u ovoides, el nucleoplasma es moderadamente denso (Fig. 2B). Los axonemas de los flagelos con su estructura tradicional de microtúbulos (9+2). Hay fragmentos del disco suctor, que pueden servir como guías para la formación del nuevo disco o bien para reensamblarse en el proceso de desenquistamiento. También se observan segmentos del retículo endoplásmico rugoso, cuerpo medio y cuerpos basales.

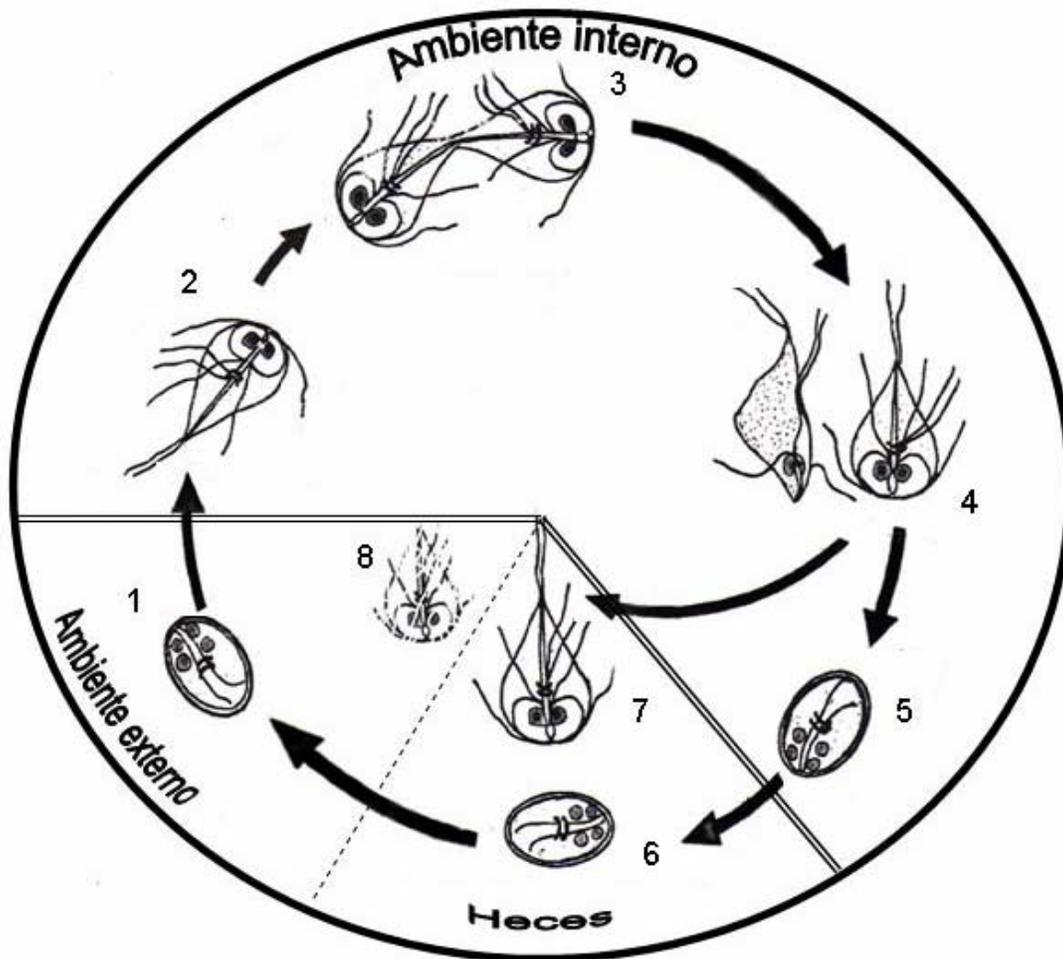
La periferia del quiste se ve rodeada por vacuolas, éstas pueden secretar los componentes de la pared y/o pueden participar en el proceso del desenquistamiento. Tanto en quistes como en trofozoítos se han encontrado endosimbiontes: bacterias, estructuras semejantes a *Mycoplasma* y virus. Se considera que puede haber transferencia de plásmidos al genoma de *Giardia* o que los endosimbiontes influyen en el proceso de infección (Sheffield & Bjorvatn, 1977; Owen, 1980; Feely *et al.*, 1988; Jung-Hsiang *et al.*, 1993; Adam, 2001; El-Shewy & Eid, 2005).

### **3.2. Ciclo biológico.**

El ciclo de vida de *G. intestinalis* es directo. El fecalismo es el mecanismo de infección, principalmente por contaminación fecal del agua, se puede adquirir por contacto directo de persona a persona, por la ingestión de alimentos contaminados con quistes presentes en la materia fecal, transmisores mecánicos (*Musca domestica*, *Periplaneta americana*) y fomites, entre otros. (Polis *et al.*, 1986; Wallis *et al.*, 1996).

La giardiasis se puede adquirir con la ingestión de al menos 10 quistes (Vesey & Peterson, 1999). El desenquistamiento se inicia después de que los quistes se degluten, pasan por el pH ácido del estómago y se activan con el pH alcalino del duodeno, en donde se emite la señal molecular de salida y división celular (Bingham & Meyer, 1979; Feely, 1986; Feely *et al.*, 1991). Los trofozoítos sintetizan una tiol-proteínasa, que probablemente contribuye para que el parásito se libere del quiste durante el desenquistamiento (Parenti, 1989). El proceso de desenquistamiento en un ambiente adecuado, es rápido, entre 5-10 minutos, el primer signo de actividad es el movimiento flagelar, los trofozoítos se dividen asexualmente por fisión binaria longitudinal después de salir del quiste y en ocasiones antes de hacerlo. Las sales biliares y el colesterol favorecen su crecimiento, lo que facilita que el parásito colonice el duodeno y yeyuno (Farthing *et al.*, 1983; Keister, 1983; Lujan *et al.*, 1996), aunque, también se han visto trofozoítos en el íleon.

En el proceso de enquistamiento los trofozoítos presentan cambios morfológicos y bioquímicos. a) reciben el estímulo de enquistamiento y se activan los genes específicos de proteínas de pared de quiste (CWP1, CWP2), b) se inicia la biogénesis de organelos secretores, síntesis, empaquetamiento, transporte y liberación de materiales de la pared de quiste y c) ensamble de la pared del quiste (Arguello-García *et al.*, 2002). Cuando los quistes salen con la materia fecal son potencialmente infectantes (Fig. 5). (Lujan *et al.*, 1997; Mowatt *et al.*, 1995; Lujan *et al.*, 1998).



**Figura 5.** Esquema del ciclo biológico de *Giardia*. 1.- Quiste (fase infectante), 2.- desenquistamiento en duodeno y liberación del trofozoíto (fase vegetativa), 3.- En duodeno y yeyuno, reproducción asexual por fisión binaria longitudinal, 4.- trofozoíto en proceso de enquistamiento, 5.- quiste, 6.- quiste en heces (fase de resistencia y diseminación) 7.- trofozoíto en heces (evacuaciones diarreicas), 8.- trofozoíto en lisis.

### 3.2.1. Desenquistamiento *in vitro*.

Hegner en 1927, realizó los primeros ensayos de desenquistamiento, al inocular quistes de *Giardia* en el estómago de ratas de laboratorio y después cosechó los trofozoítos del intestino. Wallis (1986), también desenquistó *in vivo*; inoculó quistes de *Giardia* (obtenidos de humanos, perros y castores) a gerbos y luego recuperó a los trofozoítos. Para el desenquistamiento *in vitro* se usaron soluciones ácidas (Bingham & Meyer, 1979). Posteriormente, se aumentó el porcentaje del desenquistamiento con solución salina balanceada de Hank (SSBH) ajustada con ácido clorhídrico a pH 2.0 y amortiguada con bicarbonato de sodio a pH 7.2 (Feely *et al.*, 1986).

### **3.2.2. Cultivo *in vitro*.**

El primero en cultivar *in vitro* trofozoítos de *Giardia* fue Karapetyan, quien usó un medio de cultivo monoxénico que contenía suero inactivado, digerido de carne, extracto de embrión de pollo y levaduras de *Sacharomyces cerevisiae* (Karapetyan, 1962).

Meyer, estabilizó el crecimiento de los trofozoítos en el medio de Karapetyan, después los creció en el medio M3 constituido con solución balanceada de Hank, extracto de levadura, cisteína, medio NCTC-109, suero inactivado y antibióticos (Meyer, 1970). Posteriormente, logró el cultivo axénico con el medio HSP-1, preparado con peptona, glucosa, cisteína y solución de Hank (Meyer, 1976).

El medio de cultivo TSP-1 para *Entamoeba histolytica* elaborado con triptona (Diamond, 1968), permitió el crecimiento de los trofozoítos de *Giardia* (Visvesvara, 1980; Gillin & Diamond, 1981, a, b; Bhatia & Warhust, 1981; Kasprzak & Majewska, 1983; Gordts *et al.*, 1984; Farthing *et al.*, 1982). Otro medio de cultivo para crecer trofozoítos de *Entamoeba* es el TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978), este medio complementado con bilis favoreció el crecimiento de la población de los trofozoítos de *Giardia* (Farthing *et al.*, 1983; Keister, 1983). En México, se cultivaron trofozoítos de *Giardia* de pacientes pediátricos, en el medio de cultivo TYI-S-33 complementado con bilis y suero humano (Ponce- Macotella *et al.*, 1990).

### 3.2.3. Enquistamiento *in vitro*.

Inductores del enquistamiento. Estudios *in vitro* demostraron que el exceso de bilis y la disminución de colesterol inducen el enquistamiento *in vitro* (Lujan *et al.*, 1997). *G. intestinalis* necesita colesterol para la biogénesis de sus membranas, pero es incapaz de sintetizar el colesterol *de novo* por lo que requiere tomarlo del medio (Jarroll *et al.*, 1981).

Los trofozoítos que se mantienen en medio de cultivo suplementado con suero deficiente en lípidos, forman estructuras quísticas que reaccionan con anticuerpos de pared de quiste (CWP) y cuando al medio se le complementa con lípidos, la adición de colesterol bloquea el enquistamiento. Este proceso no se presenta cuando se complementa con sales biliares. Se ha comprobado que la internalización de colesterol por los trofozoítos, depende de la concentración de sales biliares en el medio. Así una baja concentración de sales biliares en el medio de cultivo incrementa la captura de colesterol; sin embargo, concentraciones por arriba de la concentración crítica micelar bloquea la captación del colesterol y se correlaciona con el enquistamiento.

Se ha demostrado el estado físico de las sales biliares (monómeros o micelas) es importante para la captura de colesterol por los trofozoítos y que el exceso de sales biliares y la falta de colesterol inducen el enquistamiento. Probablemente, la falta de colesterol en los trofozoítos incrementa la fluidez de la membrana plasmática y se inicia una cascada de señales para la expresión de genes de enquistamiento (Lujan *et al.*, 1997).

Biogénesis de organelos. Cuando los trofozoítos se encuentran en medio de enquistamiento, sintetizan proteínas de pared de quiste (CWPs). Estas proteínas se secretan en el retículo endoplásmico, se unen a una chaperona BiP/GRP78 (familia de proteínas de shock por calor), quizá son glicosidadas en una estructura

semejante a un aparato de Golgi (encontrado en trofozoítos en proceso de enquistamiento) y se transportan en vesículas específicas de enquistamiento (ESV) hasta la superficie (Mowatt *et al.*, 1995; Benchimol M, 4004).

Ensamble de la pared del quiste. Después de unas horas de enquistamiento, los trofozoítos cambian de forma, se hacen esféricos y la superficie del cuerpo del trofozoíto, disco suctor y flagelos se cubren con componentes de pared de quiste (Lujan *et al.*, 1998; Arguello-García *et al.*, 2002; Benchimol M, 4004).

### **3.3 Mecanismos patogénicos.**

Los trofozoítos colonizan el intestino delgado y el mecanismo patogénico es multifactorial: traumático, enzimático, tóxico, barrera mecánica y competencia con el huésped, entre otros (Katelaris *et al.*, 1992; Farthing, 1997; Adam, 2001; Eckmann & Gillin, 2001).

-Traumático: Los trofozoítos se adhieren a los enterocitos y la adherencia está mediada por mecanismos físicos y bioquímicos. En el primer caso, la adhesión del trofozoíto al epitelio intestinal se produce por la presión negativa del disco suctor (como el de una ventosa), que se genera por la fuerza hidrodinámica, debida a la actividad constante de los flagelos ventrales; este mecanismo también explica la adherencia de los trofozoítos al plástico y al vidrio, cuando se cultivan *in vitro*.

En la adherencia mediada por componentes bioquímicos están involucradas las proteínas contráctiles del disco suctor, tales como: giardinas, actina,  $\alpha$ -actina, miosina, tropomiosina y vinculina (Feely *et al.*, 1982; Narcisi *et al.*, 1994). Se ha sugerido que las lectinas pueden estar relacionadas con la adherencia; algunos estudios *in vitro*, han demostrado que las lectinas se adhieren a las células por medio de receptores específicos, generalmente residuos de carbohidratos, que se localizan en las superficies celulares. La interacción de algunas lectinas con los

receptores celulares en el epitelio intestinal produce exfoliación, lisis celular, aumento del índice mitótico y aplanamiento de las microvellosidades. Los trofozoítos de *Giardia* poseen una lectina (taglina), de 28 a 30 kDa, que se une a un receptor de membrana que contiene residuos de manosa-6-fosfato, esta lectina puede provocar alteraciones del epitelio intestinal de forma similar a lo documentado en otras lectinas (Lev *et al.*, 1986; Farthing *et al.*, 1986).

-Enzimático: los trofozoítos sintetizan algunas enzimas (sulfatasas, fosfatasa ácida, hidrolasas, cisteinproteínas y tiolproteínas) que pueden favorecer su adherencia al epitelio intestinal, debido a que atacan a las glicoproteínas de los enterocitos y alteran la integridad de las microvellosidades (Feely & Dyer, 1987; Hare *et al.*, 1989; Parenti, 1989; Farthing, 1997).

-Otro mecanismo que puede provocar la atrofia parcial o total de las vellosidades, es el inducido por toxinas; aunque no se ha logrado identificar alguna, se ha observado que el medio de cultivo, en donde se han crecido trofozoítos de *Giardia*, daña el epitelio. Además, se ha registrado el gen de una proteína rica en cisterna (CRP136), que tiene secuencias repetidas que codifican para un péptido cuya homología con una sarafotoxina es del 57%, este péptido se encuentra en el veneno de la víbora *Ataraspis enggadensis*. El envenenamiento con esta sarafotoxina produce síntomas semejantes a los que se encuentran en la giardiasis, dolor abdominal, diarrea, etc. (Chen *et al.*, 1995; Upcroft *et al.*, 1997; Upcroft & Upcroft, 1998).

-Barrera mecánica: debido a la extensa superficie de absorción que proporcionan las microvellosidades, sería difícil que los trofozoítos pudieran formar una barrera mecánica total que impidiera la absorción de los nutrientes; sin embargo, algunas zonas del duodeno y yeyuno pueden estar cubiertas de trofozoítos, estos despolarizan la membrana celular, dañan las microvellosidades y provocan diferentes grados de malabsorción intestinal (Chávez *et al.*, 1995; Katelaris *et al.*, 1995; Deselliers *et al.*, 1997; Astiazarán-García *et al.*, 2000). Cuando las condiciones de crecimiento de los trofozoítos son óptimas se multiplican

vertiginosamente. Estudios *in vitro* mostraron que el crecimiento de los aislados INP150593-J10 y PI (Pórtland I) tuvieron una densidad celular de 2.5 y 2.8 millones de trofozoítos por ml, después de 85 h y 60 h, respectivamente (Ponce-Macotella *et al.*, datos no publicados).

-Competencia con el huésped: Los trofozoítos compiten con el huésped por sales biliares, colesterol, fosfolípidos, aminoácidos, hierro y zinc, entre otros. La disminución de sales biliares en el intestino, altera la formación de micelas y se produce mala absorción de las grasas, con la consecuente esteatorrea (eliminación de grasas en la materia fecal). Así mismo los trofozoítos compiten por colesterol y fosfolípidos, ya que no los puede sintetizar *de novo*. Tampoco sintetiza aminoácidos y cuando los necesita, los adquiere del medio. Para la producción de energía utiliza aminoácidos como el aspartato, alanina y arginina. La cisteína la aprovecha para proteger a su membrana de los radicales libres. Además, compite por los micro-nutrientes como son el zinc y el hierro (Nash & Mowatt, 1993; Eckmann *et al.*, 2000; Eckmann & Gillin, 2001).

Los mecanismos antes descritos contribuyen al daño de los enterocitos y a la malabsorción. Esta se correlaciona con atrofia de las vellosidades, aumento del índice mitótico y recambio acelerado de enterocitos. Cuando los enterocitos llegan inmaduros a la superficie del epitelio, tienen producción enzimática defectuosa o disminuida. Estudios en animales infectados con *G. intestinalis* mostraron disminución de la actividad de las disacaridasas: maltasa, isomaltasa, sacarasa, trehalosa, lactasa, isomaltasa y glucoamilasa. Además, se encuentran disminuidas las enzimas que se producen en las microvellosidades, tales como: glucoamilasa, isomaltasa y ATPasa basolateral de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . También están disminuidas las enzimas celulares isocitrato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; la disminución de la primera provoca reducción de la producción de ATP y la falta de energía en las células causa una disminución de la absorción intestinal de carbohidratos y aminoácidos. Cuando disminuye la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, se altera la biosíntesis de lípidos y otras macromoléculas

necesarias para la síntesis de las membranas celulares (Belosevic *et al.*, 1989; Nain *et al.*, 1991; Farthing, 1997).

### **3.4 Manifestaciones clínicas.**

El período prepatente es de nueve días, el de incubación de una a dos semanas y la infección puede mantenerse desde algunas semanas hasta varios años (Chester *et al.*, 1985; Hill, 1993; Thompson, 1994; Lengerich *et al.*, 1994).

La giardiasis puede ser asintomática, aguda o crónica. Se registra el 50 % ó más de portadores asintomáticos; el problema en estos casos, es que los pacientes pueden cursar algún grado de malabsorción intestinal, pocas veces detectada (Astiazarán-García *et al.*, 2000) y son diseminadores de quistes.

En la giardiasis aguda se puede observar una gran diversidad de signos y síntomas. En una serie de 400 pacientes del Instituto Nacional de Pediatría (INP) con giardiosis, el Dr. Álvarez-Chacón, encontró: dolor abdominal 69.3%, diarrea 48.38%, hiporexia 45.89%, meteorismo 32.67%, náuseas 21.45%, flatulencia 11.97%, constipación 11.47%, vómito 9.98%, peso bajo 9.48%, palidez de tegumentos 8.48, borborigmos 4.49% y talla baja 3.24% (datos no publicados).

El dolor abdominal es epigástrico y posprandial inmediato, las evacuaciones son explosivas, profusas, sin sangre, inicialmente acuosas, después esteatorréicas, fétidas y flotan por el exceso de grasas. Debido a que algunas manifestaciones clínicas en esta fase son semejantes a las provocadas por virus (rotavirus), bacterias (*Campylobacter*, *Escherichia coli* toxigénica) y otros parásitos (*Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* sp), es necesario realizar el diagnóstico diferencial. En la giardiasis el período de incubación es largo, los síntomas son por tiempo prolongado y no hay fiebre ni sangre en heces (Hill, 1993).

La giardiasis crónica puede durar varios meses y es devastadora en la población infantil; el dolor abdominal se exagera durante la ingestión de los alimentos y los niños dejan de comer, presentan meteorismo, distensión abdominal, flatulencia

fétida, malestar general, astenia, adinamia, pérdida de peso y talla baja. Las evacuaciones son blandas, esteatorréicas y fétidas, que pueden alternar con períodos de estreñimiento o con evacuaciones de consistencia normal. En esta fase, los pacientes desarrollan malabsorción de vitaminas A y B<sub>12</sub>, proteínas, lípidos y carbohidratos, principalmente lactosa, sacarosa, maltosa e isomaltosa y micro-nutrientes como el hierro y zinc. Los pacientes que cursaron con malabsorción de lactosa, pueden presentar intolerancia a ésta, manifestada con evacuaciones diarreicas; por tal motivo, se recomienda que no ingieran leche durante los primeros 30 días después del tratamiento. El diagnóstico diferencial se hace con enfermedad celiaca, sprue, enteritis tropical, úlcera duodenal, hernia hiatal, infecciones con *Cryptosporidium*, *Isospora* y *Strongyloides stercoralis*. Hay algunos registros de giardiasis relacionados con: urticaria, artritis, arteritis retinal, iridociclitis, colecistitis y pancreatitis (Hill, 1993; Thompson, 1994).

### **3.5 Estrategias del huésped para evadir el ataque del parásito.**

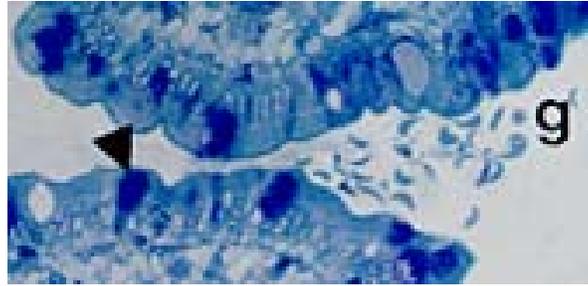
El huésped utiliza estrategias inespecíficas y específicas para eliminar al parásito. En la región superior del intestino delgado hay grandes cantidades de sales biliares que actúan como detergentes e inhiben el crecimiento de los microorganismos. Además, los ácidos grasos libres (productos de la lipólisis) y las proteasas contribuyen al daño de las membranas citoplasmáticas de los microorganismos (Gillin *et al.*, 1988; Seow *et al.*, 1993). El huésped cuenta con células caliciformes productoras de moco que protegen la mucosa intestinal de alimentos, virus, bacterias y parásitos (Miller, 1987; Ishikawa 1993; Chadee, 1990). Por otro lado, los enterocitos producen óxido nitroso (ON) a partir de arginina en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintetasa (ONS) y lo liberan al lumen. El ON y sus derivados nitratos y nitritos son potentes antiparasitarios (Eckmann *et al.*, 2000).

Debido a que *Giardia* estimula la vía alterna del complemento, las IgG3 e IgM en presencia de complemento lisan a los trofozoítos. La eliminación del parásito se ha correlacionado con IgA secretora. Por otro lado, los macrófagos de las placas de

Peyer en presencia de anticuerpos anti *Giardia* ingieren grandes cantidades de trofozoítos que mueren por mecanismos oxidativos. Los macrófagos activados por IFN- $\gamma$  fagocitan a los trofozoítos, aunque en este proceso también se dañan los enterocitos, por tal motivo se propone que los macrófagos funcionan como presentadores de antígenos (Farthing, 1997; Faubert, 2000; Eckmann & Gillin, 2001).

### **3.6 Estrategias del parásito para evadir la respuesta del huésped.**

*Giardia* es de los pocos microorganismos que coloniza el ambiente proteolítico y lipolítico del intestino delgado (Eckmann & Gillin, 2001). Estudios *in vitro* demostraron que las sales biliares favorecen su crecimiento (Farthing *et al.*, 1983; Keister, 1983). Debido a que el parásito requiere de colesterol para la biogénesis de sus membranas y como no lo sintetiza de *novo*, utiliza a las sales biliares como acarreadoras del colesterol y fosfolípidos (Jarroll *et al.*, 1981; Lujan *et al.*, 1996). Por otro lado, estudios *in vitro* mostraron que los trofozoítos inhiben la lipólisis (Katelaris *et al.*, 1991; Farthing, 1997), asimismo, el parásito se protege de los ácidos grasos libres, porque provoca un incremento de células caliciformes (Miller, 1987), En un estudio, realizado en perros infectados con *Giardia*, se encontró aumento de células caliciformes cuando se comparó con los controles (Ponce-Macotella *et al.*, datos no publicados) (Fig. 6). Por otro lado, algunos componentes del moco también pueden dañarlo como se ha visto en *Nippostrongylus brasiliensis* y *Entamoeba histolytica* (Ishikawa, 1993; Chadee, 1990; Eckmann, 2003).



**Figura 6.** Fotomicrografía de un corte histológico del intestino delgado de un perro infectado con *Giardia*. Célula caliciforme (cabeza de flecha), Trofozoítos (g).

Los trofozoítos evitan el ataque proteolítico con diferentes mecanismos: a) inhiben a la tripsina (Seow *et al.*, 1993), b) se protegen con sus proteínas variantes de superficie (VSP) que son ricas en cisteína; este aminoácido confiere gran estabilidad estructural a las proteínas por la formación de puentes disulfuro, c) se propone que el recambio constante de sus VSP's les ayuda a evadir la respuesta inmune del huésped, y d) las VSP's se pueden unir a metales como el zinc, lo que acarrea la inhibición de la síntesis de peptidasas intestinales (carboxipeptidasas) que necesitan de este metal (Luján *et al.*, 1995; Upcroft J & Upcroft P, 1998; Singer *et al.*, 2001).

Los trofozoítos evitan la agresión del ON debido a que compiten con el huésped por la arginina que es el precursor para la síntesis del ON ((Eckmann *et al.*, 2000; Kasper & Buzoni-Gatel, 2001). La tiolproteínasa de *Giardia* hidroliza las proteínas que ingiere y cuando esta enzima sale del trofozoíto, rompe a la inmunoglobulina IgA a nivel de la bisagra, entre CH2 y CH3 y de esta forma facilita la evasión de la respuesta inmune del huésped (Parenti, 1989; Eckmann & Gillin, 2001).

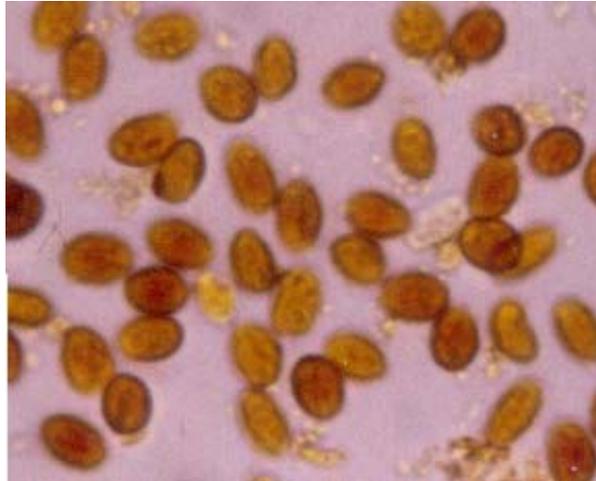
Por otro lado, *Giardia* induce apoptosis en las células del epitelio intestinal; rompe las uniones de la zónula ocludentes (ZO-1) e incrementa la permeabilidad epitelial, este tipo de daño es dependiente de caspasa 3. El efecto pro-apoptótico, quizá explique la carencia de infiltrado inflamatorio en el tejido colonizado por este

parásito, ya que se sabe que la muerte celular por apoptosis contribuye a la resolución de la inflamación (Chin *et al.*, 2002; Buret *et al.*, 2002).

### **3.7 Diagnóstico.**

Después del examen clínico-epidemiológico minucioso, en el que se considera la diarrea de larga evolución, pérdida de peso, malabsorción, hábitos higiénicos deficientes y fuentes de agua no potable para beber; el desafío en el laboratorio es demostrar la giardiasis. Para ello se debe detectar de manera directa los quistes y/o trofozoítos de *Giardia* en las heces, en sondeo duodenal o en las biopsias del intestino delgado. Indirectamente por la captura de anticuerpos en suero, coproantígenos y secuencias de DNA específicas de *Giardia* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Kamath & Murugasu, 1974; Pickering, 1985; Hill, 1993; Faubert, 1996; Thompson, 2004).

**Coproparasitoscópicos (CPS).** Esta técnica está catalogada como el estándar de oro. La sensibilidad puede ser baja debido a la excreción intermitente de los quistes o la poca cantidad de éstos. Cuando las heces son blandas o diarreicas se encuentran más trofozoítos que quistes y se realiza el examen directo en fresco, si las heces son de consistencia formada o semiformada se encuentran más quistes que trofozoítos y se efectúan los CPS cualitativos de concentración: flotación (sulfato de zinc) o sedimentación (formol-éter) (Fig. 7). Debido a que la sensibilidad se incrementa con el número de muestras que se analicen (con una muestra la sensibilidad es del 76 al 86%, con dos es del 90% y con tres alcanza el 97.6%), el número mínimo de CPS necesarios para descartar la giardiasis es de tres, si son negativos y el cuadro clínico es compatible con giardiasis se debe realizar una serie de cinco (Hill, 1993).



**Figura 7.** Fotomicrografía de quistes de *Giardia* teñidos con lugol, obtenidos de un paciente con giardiasis.

**Sondeo duodenal.** Cuando los CPS son negativos se puede realizar el sondeo o el aspirado duodenal con biopsia. En el primer caso se utiliza una cápsula de gelatina (cápsula de Beal), que contiene 90 cm de hilo de nylon y un contrapeso metálico al final. El paciente en ayunas, deglute la cápsula con alguna bebida (té) y el extremo del hilo se sujeta en la mejilla con cinta adhesiva. Durante el tiempo (4 horas) que el paciente camina la cápsula se desintegra en el estómago y el hilo llega hasta duodeno. Utilizando guantes, se saca el hilo impregnado con fluido duodenal (color amarillo) y moco, se exprime en una caja de Petri, se coloca una gota del material en un portaobjetos y los trofozoítos se observan en contraste de fases. El contrapeso (metálico y recubierto de plástico) se elimina con las heces.

El aspirado duodenal es un método invasivo, debido a que se requiere de anestesia para la endoscopia, pero se obtiene más fluido y al mismo tiempo se puede obtener muestras de tejido de varios sitios incluyendo la unión duodeno-yeyunal. El aspirado es un método diagnóstico muy sensible y útil en pacientes

con giardiasis crónica (Kamath & Murugasu, 1974). Sin embargo, puede tener una falla hasta del 20 % (Ponce-Macotela *et al*, datos no publicados).

**Inmunológico.** La sensibilidad de las pruebas inmunológicas para la detección de anticuerpos en suero depende de: a) antígeno utilizado, b) tipo de anticuerpo (IgG, IgM o IgA) y c) técnica (IFI, ELISA, Western blot) (Faubert, 2000). Se puede detectar IgG en suero de pacientes giardiásicos, después de dos semanas de la infección y hasta 15 meses después del tratamiento (Smith *et al.*, 1981). Los coproantígenos tienen la ventaja de que se pueden detectar pequeñas concentraciones de antígenos en heces. La técnica de ELISA, que reconoce el antígeno GSA-65 tiene una sensibilidad del 98% y especificidad del 100% (Faubert., 1996).

**Molecular.** El diagnóstico que se basa en la detección del DNA de *Giardia* en materia fecal por PCR se utiliza frecuentemente para estudios epidemiológicos y se reporta que es más sensible y específico que los métodos convencionales. Además, el análisis de los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP's) proporciona información acerca de los genotipos predominantes en *Giardia* (Thompson, 2004).

### **3.8 Tratamiento.**

El tratamiento se prescribe en pacientes con giardiasis aguda o crónica; sin embargo, hay controversia en relación al tratamiento de portadores asintomáticos y en pacientes giardiásicos de zonas endémicas. Algunos sugieren no dar tratamiento, porque la parasitosis se auto limita, hay posibilidades de reinfectarse, los fármacos producen efectos adversos y el gasto se incrementa con cada tratamiento (Gilman *et al.*, 1988; Thompson, 1994). Sin embargo, otros proponen que los portadores asintomáticos deben de recibir tratamiento, debido a que independientemente del curso clínico de la parasitosis, los pacientes presentan diferentes grados de daño en las microvellosidades (Astiazarán *et al.*, 2000), y fundamentalmente porque son reservorios y diseminadores de quistes.

Entre los fármacos de elección están: los derivados de la naranja de acridina, nitroimidazoles, nitrofuranos y benzimidazoles (Gardner & Hill, 2001; Harris *et al.*, 2001; Mineno & Avery, 2003).

La quinacrina se ha utilizado como anti-giardiasis desde los años 1940 y se le proponen dos mecanismos de acción: 1) el fármaco se intercala en el DNA de los trofozoítos y se inhibe la síntesis de los ácidos nucleicos. 2) interactúa con los lípidos de las membranas aumentando su permeabilidad. La dosis en adultos es de 100 mg/tres veces al día/siete días, en niños es de 6 mg/Kg./día, tres veces al día, durante 10 días. La eficacia es del 64-95%. Este tratamiento puede producir náuseas, vómito y dolor abdominal; ocasionalmente pigmentación amarilla de la piel, esclerótica y orina. La dermatitis exfoliativa y psicosis tóxica son poco frecuentes. Se contraindica en niños menores de cinco años (Mendelson, 1980; Craft *et al.*, 1981; Upcroft *et al.*, 1996).

El metronidazol se utiliza para el tratamiento de la giardiasis desde los años 1960. Su mecanismo de acción involucra tres fases: (a) Entrada del metronidazol al trofozoíto por difusión pasiva. (b) Reducción del grupo nitro. El transporte de electrones depende de la piruvato ferredoxin óxido reductasa (PFOR) y de la ferredoxina (Fd). La PFOR cataliza la descarboxilación del piruvato a acetil Co A y CO<sub>2</sub>; paralelamente, reduce a la Fd. En la vía normal, la Fd es la aceptadora de electrones. El metronidazol reemplaza a los protones como aceptadores de electrones y reduce el grupo 5-nitro a su radical nitro-tóxico. (c) Efecto citotóxico del producto reducido. El radical nitro-tóxico interactúa con la doble hélice del DNA, provocando pérdida de la estructura y ruptura de las cadenas helicoidales (Freeman *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 2001; Mineno *et al.*, 2003).

La dosis en adultos es de 250 mg tres veces al día por siete días, en niños es de 7.5 mg/Kg./día, tres veces al día por cinco o siete días. La eficacia es del 90-97%. Produce efectos secundarios no deseables: náuseas, sabor metálico, dolor abdominal, mareos, cefalea y puede ser genotóxico. Se contraindica en pacientes

que beben alcohol, porque les produce el síndrome del acetaldehído (antabus). La resistencia se debe a la disminución de la PFOR y Fd, aunque, también pueden estar involucrados los genes *mdr* (resistencia múltiple a drogas) (Johnson, 1993; Upcroft J & Upcroft P, 1994; Liu *et al.*, 2000; Upcroft P & Upcroft J, 2001; Ponce-Macotella *et al.*, 2001).

El tinidazol es mejor tolerado que el metronidazol. La dosis en adultos es de 2.0 g y en niños es de 50 mg/Kg. (sin pasar de 2.0g), en ambos casos, se administra en una sola dosis y el tratamiento es por dos días. La eficacia es del 95-100% (Jokipii & Jokipii, 1982). El mecanismo de acción y la resistencia son semejantes al metronidazol (Harris *et al.*, 2001).

La furazolidona se utiliza como anti-giardiasis desde los años 1950. La dosis en adultos es de 400 mg/día (cuatro veces al día) por siete o diez días, en niños es de 8 mg/Kg./día (tres veces al día) durante 10 días. Su eficiencia es del 72 al 92%. Los efectos colaterales son: náuseas, vómito, diarrea y malestar general. Puede provocar urticaria y coloración oscura de la orina; en pacientes con disminución de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa puede causar hemólisis intravascular (Levi *et al.*, 1977; Craft *et al.*, 1981; Murphy & Nelson, 1983). El fármaco inhibe a la monoamino oxidasa (MAO) y no se debe administrar cuando se toman inhibidores de la MAO. Cuando se ingieren bebidas alcohólicas puede causar el efecto antabus. Dosis altas y prolongadas pueden ser mutagénicas en bacterias y carcinogénicas en roedores. El mecanismo de acción aun no está determinado; sin embargo, los productos reducidos pueden dañar al DNA. La resistencia se puede deber a que los trofozoítos no la absorben o al incremento de las enzimas del ciclo tiol que lo detoxifican (Harris *et al.*, 2001).

El albendazol se utiliza contra la giardiasis desde 1986. La absorción por vía oral es pobre, pero se incrementa con la ingestión de comidas ricas en grasas. La dosis en niños y adultos es de 400 mg/día (una sola toma), durante 7 días y su eficacia es del 97-100%. Los efectos adversos son: trastornos gastrointestinales,

vértigo, urticaria, alopecia y elevación transitoria de transaminasas. El fármaco actúa sobre las proteínas del citoesqueleto. Cuando el albendazol se une a la  $\beta$ -tubulina, inhibe la polimerización de la proteína y altera la formación de los microtúbulos, lo que provoca que el disco suctor se fragmente. Además, los benzimidazoles se unen al DNA de *Giardia* e inhiben la actividad de la topoisomerasa II (Meloni et al., 1990; Chavez et al., 1992; Bell et al., 1993; Pungpak et al., 1996; Venkatesan, 1998; Oxberry et al., 2000).

El mebendazol se utilizó en la giardiasis a finales de los años 1980. La dosis en adultos y niños es de 200 mg, tres veces al día, durante 5 días y la eficacia es del 95-100%. Los efectos adversos son mínimos: náuseas y vómito. Este fármaco inhibe la polimerización de la tubulina y su mecanismo de daño es muy específico contra los parásitos debido a que tiene más afinidad a la tubulina de éstos que a la del huésped (Al-Waili et al., 1998).

La nitazoxanida es un antiparasitario de amplio espectro. En México, el primer registro de su uso se documenta en 1997. La dosis en niños es de 200 mg/dos veces al día/tres días y en adultos es de 500 mg/dos veces al día/tres días. La eficacia es del 65-72% y con pocos efectos adversos. Algunos estudios *in vitro* muestran su eficacia y el mecanismo de acción no está bien definido, aunque se sugiere que es similar al del metronidazol (Romero-Cabello et al., 1997; Rossignol et al., 2001, Ponce-Macotela et al., 2001; Cedillo-Rivera et al., 2002; Díaz et al., 2003).

La paramomicina es un aminoglucósido de amplio espectro. Tiene una eficacia entre el 60 al 70%. Los efectos adversos son: náuseas, cólico abdominal y diarrea. Este antibiótico se absorbe poco y se usa en mujeres embarazadas. El mecanismo de acción es por inhibición de la síntesis de proteínas mediante la adhesión al rRNA (Mineno & Avery, 2003).

Debido a los efectos adversos que producen los fármacos y a la selección de cepas resistentes, se están buscando otras alternativas. Las plantas son una fuente importante para la búsqueda de principios activos, ya que aproximadamente el 25% de los medicamentos utilizados a nivel mundial proviene de éstas. En México, en 1994, se publicó el primer estudio de plantas que se usan en la medicina tradicional como antidiarreicos y/o antiparasitarios y que poseen actividad anti-giardiasis *in vitro* (Ponce-Macotela *et al.*, 1994). Algunos compuestos del ajo (*Allium sativum*) y extractos de otras plantas tienen efecto anti-giardiasis (Calzada *et al.*, 1998; Harris *et al.*, 2000; Ponce-Macotela *et al.*, 2001; Ankli *et al.*, 2002; Calzada *et al.*, 2005; Ponce-Macotela *et al.*, 2006). Actualmente, la giardiasis se trata con los fármacos que se describieron arriba; sin embargo, algunos principios activos de los extractos de plantas están demostrando que son buenos candidatos para la obtención de nuevos fármacos para su futura prescripción en el tratamiento de la giardiasis.

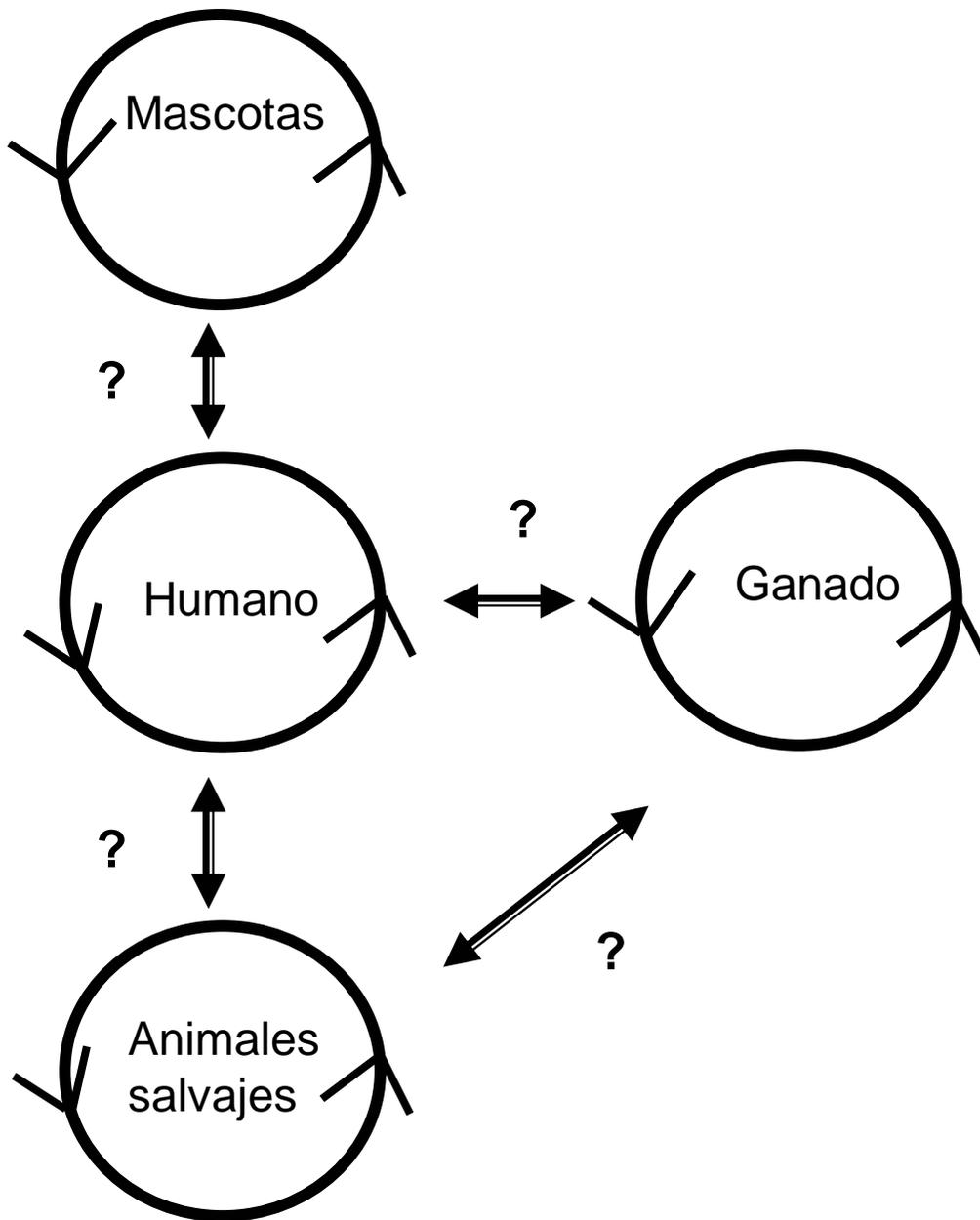
### **3.9 Epidemiología.**

Se considera que la giardiasis es una parasitosis re-emergente (Thompson, 2000). Su distribución es mundial y se estima que hay más de 280 millones de infecciones por año (Lane & Lloyd, 2002). La OMS publicó que sólo en Asia, África y América Latina hay 200 millones de pacientes con giardiasis sintomática y medio millón de casos nuevos al año (WHO, 1996). Esta parasitosis es epidémica en países desarrollados y tiene una frecuencia del 2-5% (Issac-Renton *et al.*, 1993; Ortega & Adam, 1997). En países en desarrollo es endémica y su frecuencia oscila entre el 20-30%. (Gilman *et al.*, 1988). En México, se le encuentra entre el 7.4 al 68.5% (Tay *et al.*, 1994; Cifuentes *et al.*, 2000).

La infección se transmite por fecalismo: directo (ano-mano-boca) o indirecto (agua de beber y alimentos contaminados con quistes, transmisores mecánicos y fómites, entre otros). Se sugiere que la transmisión hídrica es la más frecuente, porque los cuerpos de agua pueden contaminarse fácilmente con heces de

humanos o animales (Marshall *et al.*, 1997). El parásito afecta preferentemente a la población infantil, es común en pacientes hipoagmaglobulinémicos y en turistas cuando viajan a países en donde la giardiasis es endémica (Lo Galbo *et al.*, 1982; Taylor *et al.*, 1988; Hill, 1993; Marshall *et al.*, 1997). En estancias infantiles la infección es frecuente (Polis *et al.*, 1986); por otro lado, los niños infectados que todavía no controlan esfínteres y que meten a piscinas pueden ser diseminadores de quistes (Hoque *et al.*, 2001; Linane *et al.*, 2001).

Además de infectar a los humanos *G. intestinalis*, se encuentra como parásito de animales domesticados y silvestres (Meloni *et al.*, 1993; Xiao & Herd, 1994; Van Keulen *et al.*, 2002; Appelbee *et al.*, 2003; Thompson, 2004). En perros callejeros y/o no deseados que sacrifican en el antirrábico de “Culhuacan” en el sur de la Ciudad de México se reportó una incidencia de trofozoítos de *Giardia* en el 51% de los casos (Ponce-Macotela *et al.*, 2005). Para la diseminación de la giardiasis se proponen cuatro rutas que involucran a diferentes mamíferos, incluido el hombre (Fig. 8). Pero, aún se sabe poco de la interacción entre estas vías, existe la necesidad dilucidar qué huéspedes son reservorios y potenciales transmisores de quistes de *G. intestinalis* al hombre.



**Figura 8.** Representación esquemática de los ciclos de transmisión de la giardiosis, entre las diferentes especies de huéspedes.

Debido a la imposibilidad de discriminar morfológicamente a los trofozoítos de *G. intestinalis* y a la posible transmisión zoonótica, se han utilizado herramientas bioquímicas, isoenzimáticas y de biología molecular para biotipificarlos. Estas estrategias incluyen el análisis de antígenos de secreción y excreción de aislados de *Giardia* (Nash *et al.*, 1985a), isoenzimas (Meloni *et al.*, 1988; Cedillo *et al.*,

1989; Andrews *et al.*, 1989; Homan *et al.*, 1992; Moss *et al.*, 1992; Mayrhofer *et al.*, 1995), enzimas de restricción, hibridación (Nash *et al.*, 1985b; Homan *et al.*, 1992), cariotipos (Korman *et al.*, 1992), huella génica (Carnaby *et al.*, 1994; Hopkins *et al.*, 1999), PCR-RFLP's (Ey *et al.*, 1992; Ey, *et al.*, 1993a; Ey *et al.*, 1993b; Ponce-Macotela *et al.*, 2002; Cedillo-Rivera, 2003; Read *et al.*, 2004) hasta la secuenciación (Monis *et al.*, 1999) y han mostrado una gran diversidad en el grupo morfológico *G. intestinalis*. No obstante, los aislados de *Giardia* de diferentes partes del mundo se han podido agrupar en diferentes grupos genéticos: grupo 1,2 y 3 (Nash *et al.*, 1985a; Baruch *et al.*, 1996), grupos "Polish" y "Belgian" (Homan *et al.*, 1992; van Keulen *et al.*, 1995), grupos I-IV (Andrews *et al.*, 1989; Ey *et al.*, 1992, 1993a,b) y ensamblajes A y B (Mayrhofer *et al.*, 1995) que se correlacionan.

Además, mediante la amplificación de genes que codifican para proteínas variables de superficie (VSP), el gen de la glutamato deshidrogenasa (gdh) y los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP's), se han descrito varios grupos genéticos: ensamble A con los subtipos A-I y A-II (encontrados en el humano), ensamble B (humanos) y ensamble Livestock (en borregos, vacas y caballos entre otros), (Monis *et al.*, 1996; Ey *et al.*, 1996; Ey *et al.*, 1997; Adam, 2001).

El análisis filogenético, de aislados de *G. intestinalis* de los principales grupos genéticos, mediante la secuenciación de segmentos de genes que codifican a la glutamato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, factor de elongación 1 $\alpha$  y el RNA ribosomal 18S corroboró la existencia de siete ensamblajes A, B, C, D, E, F y G (Monis *et al.*, 1999). Los ensamblajes A y B son potencialmente zoonóticos (van Keulen *et al.*, 2002), los ensamblajes C y D predominan en las muestras de *G. intestinalis* obtenidas de perros (Monis *et al.*, 1998), en tanto que el ensamble E se encuentra en aislados de *Giardia* procedentes de artiodáctilos (animales de pezuña hendida), (Ey *et al.*, 1997) y los ensamblajes F y G en muestras obtenidas de gatos y ratas respectivamente (Monis *et al.*, 1999). Estos hallazgos apoyan la

hipótesis de que *Giardia intestinalis* es un complejo de especies (Andrews *et al.*, 1989; Monis *et al.*, 1999) (Tabla 1).

**Tabla 1. Genotipos de *G. intestinalis*.**

Mayrhofer	Nash	Homan	Huéspedes
A (A-I)	1	Polaco	Humanos, castores, gatos, lemures, ovejas, perros, chinchilla, alpaca, caballos, cerdos, bovinos
A (A-II)	2		Humanos, castores, perros, gatos
B (III y IV)	3 y 4	Belga	Humanos, castores, perros, monos
C y D			Perros
E			Ovinos, caprinos, porcinos, bovinos
F			Gato
G			Rata

A pesar de que en México, la frecuencia de la giardiasis en el humano y en perros es alta, hay escasos registros de genotipificación de *Giardia* (Ponce-Macotela *et al.*, 2002; Cedillo-Rivera *et al.*, 2003; Lalle *et al.*, 2005) y desconocemos la frecuencia de genotipos zoonóticos.

#### **4.- Planteamiento del problema.**

La giardiasis constituye un verdadero problema de salud, porque produce diferentes grados de malabsorción intestinal y afecta especialmente a los niños. Estudios en el modelo murino, infectados con diferentes cepas, han mostrado déficit en la absorción intestinal. El ciclo biológico de este parásito, favorece la distribución y diseminación de los quistes; sin embargo, la alta frecuencia de esta parasitosis en el humano, no se explica solo por el fecalismo de humanos; quizá, la explicación más verosímil y parsimoniosa es la que introduce la variable: contaminación de alimentos y agua con quistes de *Giardia* procedentes de mascotas y/o animales de granja. Debido a que *G. intestinalis* obtenida de diferentes hospederos, no se puede diferenciar por criterios morfológicos, se han utilizado herramientas moleculares que discriminan a siete ensamblajes (A-G), algunos de estos con potencial zoonótico. El conocer los ensamblajes predominantes en México, permitirá reinterpretar la epidemiología de la giardiasis y de esta manera, diseñar nuevas estrategias para su control.

## 5.- Justificación.

Se enumeran algunos de los argumentos que evidencian la necesidad de estudiar a este parásito: a) *G. intestinalis* es un parásito intestinal de amplia distribución mundial. b) Afecta principalmente a la población infantil. c) Se le encuentra parasitando a una gran variedad de animales domésticos y silvestres. d) Los trofozoítos obtenidos de los diferentes hospederos son morfológicamente indistinguibles. e) Para caracterizarlos es necesario utilizar herramientas bioquímicas y de biología molecular. f) El análisis molecular de aislados de *Giardia*, obtenidos de diferentes partes del mundo, muestran la distribución y prevalencia de los diferentes genotipos. g) En México, la giardiasis en el hombre tiene una frecuencia hasta del 68%. h) En perros la frecuencia es hasta del 50%. i) Desconocemos la frecuencia de este parásito en animales de granja (borregos y chivos) y j) Además, hay pocos registros de genotipificación de *G. intestinalis* con marcadores moleculares. En este contexto resulta muy útil el uso de herramientas tales como la PCR-RFLP's y la PCR-múltiplex, las cuales permitirían conocer los genotipos predominantes de *Giardia* y así discriminar las infecciones mixtas (con más de un genotipo) y los genotipos con potencial zoonótico.

## **6.- Hipótesis.**

**H<sub>0</sub>** Si la población mundial de *G. intestinalis*, está constituida por siete ensamblajes genéticos, definidos mediante el empleo de estrategias moleculares, entonces, si se analizan los aislados mexicanos de *G. intestinalis* con herramientas similares se encontrará que estos aislados se agruparán de forma semejante.

**H<sub>1</sub>** Si la población mundial de *G. intestinalis*, está constituida por siete ensamblajes genéticos, definidos mediante el empleo de estrategias moleculares, entonces, si se analizan los aislados mexicanos de *G. intestinalis* con herramientas similares se encontrará que estos aislados se agruparán de forma diferente.

## **7- Objetivos.**

### **General.**

Caracterizar con marcadores moleculares específicos a los aislados de *Giardia intestinalis* procedentes de humanos, perros, gatos, ganado ovino y caprino, discriminar aquellos que tengan potencial zoonótico e introducir en un contexto internacional los genotipos predominantes en México.

### **Particulares.**

Para alcanzar el objetivo general, es necesario cumplir una serie de metas:

- 1) Diagnóstico de giardiasis en diferentes hospederos.
- 2) Aislamiento y concentración de quistes.
- 3) Desenquistamiento *in vitro* e *in vivo*.

- 4) Cultivo axénico de los trofozoítos.
- 5) Obtención de DNA de trofozoítos en cultivo axénico, de trofozoítos aislados directamente del intestino delgado (de perros) y de quistes obtenidos directamente de las heces.
- 6) Amplificación de secuencias de segmentos de genes de proteínas variables de superficie.
- 7) Restricción del DNA para la obtención de los polimorfismos de los fragmentos de restricción
- 8.- Amplificación mediante PCR-múltiplex (Mix-one PCR-múltiplex y GiP5 PCR-múltiplex).
- 9) Determinación de los genotipos.

## **8.- Material y métodos.**

### **8.1. Primera serie: Diagnóstico de giardiasis.**

Las muestras de materia fecal de los pacientes se analizaron por el examen coproparasitológico de concentración flotación (Faust). Para ello se realizó una suspensión homogénea con 1 - 2 g de materia fecal y 10 ml de agua destilada. La suspensión se pasó a través de un cedazo y se colocó en un tubo de 13X100. Se centrifugó a 2000 x g por minuto, el sobrenadante se decantó y el sedimento se resuspendió con solución de sulfato de zinc (densidad 1:180°Baumer), se homogeneizó y se centrifugó a 2000 x g por minuto. Con un asa se obtuvo la película superficial, se colocó en un portaobjetos con lugol y se le puso un cubreobjetos (De Haro *et al.*, 1995). Las preparaciones se observaron con un microscopio Carl Zeiss, con una magnificación de 160x y las muestras con quistes de *Giardia* se almacenaron a 4 °C, para posteriormente, concentrarlos y purificarlos para el desenquistamiento.

#### **8.1.1 Concentración y purificación de los quistes de *G. intestinalis* (Solución de Sheather).**

Los quistes de *G. intestinalis* se concentraron mediante la técnica de Sheather (Arrowood & Sterling, 1987), con algunas modificaciones. La muestra con quistes se homogeneizó con agua destilada, se pasó a través de un cedazo y se centrifugó a 2000 x g por minuto. El sobrenadante se eliminó, el precipitado se lavó tres veces, se resuspendió y se utilizó para el gradiente.

Se prepararon tubos cónicos de 15 ml con la solución de Sheather (gradiente de sacarosa-fenol). A cada tubo se le puso 3.0 ml de la solución con una densidad de 1.103 grados Baumer y se adicionó 1.0 ml de la solución con una densidad de 1.06. A los tubos con el gradiente se les agregó 0.2 ml de la muestra con quistes y se centrifugaron a 5000 x g por 20 minutos. Posteriormente, se obtuvo la banda que contenía los quistes, éstos se lavaron tres veces con agua destilada para

eliminar la sacarosa y el fenol. Los quistes se emplearon en el proceso de desenquistamiento *in vitro*.

### **8.1.2 Desenquistamiento *in vitro*.**

El desenquistamiento se indujo con solución salina balanceada de Hank (SSBH) ácida y básica (Feely, 1986; Ponce-Macotela *et al.*, 1990). Las soluciones se hicieron en el momento de iniciar el desenquistamiento. A 50 ml de SSBH se le adicionó bicarbonato de sodio hasta obtener un pH 7.5, posteriormente, 25 ml de esta solución se acidificó con ácido clorhídrico 1M hasta un pH 2.0 y ambas soluciones se mantuvieron a 37°C.

A la suspensión de quistes (1.0 ml) contenida en tubos cónicos, se le adicionaron 2.0 ml de la SSBH (pH 2.0) y se incubó a 37°C/30 minutos; posteriormente, se le agregaron 4.0 ml de SSBH (pH 7.5) y se centrifugó a 6000 x g por tres minutos. El sobrenadante se decantó, el precipitado se sembró en el medio de cultivo TYI-S-33 suplementado con 10% de suero y se incubó a 37°C. La salida de los trofozoítos se registró con un foto-microscopio Carl Zeiss con iluminación de contraste de fases (Ponce-Macotela *et al.*, 1990). Fig. 9. Con el objetivo de corroborar la axenización de los cultivos, se sembraron 100.0 µl del cultivo que contenía a los trofozoítos, en agar sangre (bacterias) y en Sabouraud con y sin antibióticos (hongos)

### **8.1.3. Cultivo en TYI-S-33.**

Los trofozoítos de *G. intestinalis* se crecieron en el medio de cultivo TYI-S-33 complementado con 10% de suero, contenidos en tubos de borosilicato de 13 X 100 con tapón de rosca, a 37°C, con una inclinación de 10° (anexo).

### **8.1.4 Clonación.**

Del aislado INP051187-MG se estableció la clona INP100588-CMG-1, mediante el crecimiento en medio semisólido con agarosa al 0.22%, (Gillin & Diamond, 1980).

### **8.1.5 Aislados de *Giardia intestinalis*.**

De esta primera serie se obtuvieron en total 23 muestras. 19 cultivos axénicos procedentes de pacientes pediátricos, una clona, dos aislados de perros y un aislado de gato.

#### **8.1.5.1 Pacientes pediátricos.**

Se obtuvieron 19 aislados de *Giardia intestinalis* de pacientes que acudieron al Instituto Nacional de Pediatría (INP). Los pacientes provenían de cuatro Estados: Estado de México, Michoacán, Guanajuato, Morelos y el Distrito Federal. Once de los 19 aislados se obtuvieron de pacientes sintomáticos. La mayoría de estos tuvieron giardiasis crónica, asociada a una patología de base (Tabla 2). Del aislado # 2 (INP051187-MG) se obtuvo una clona que dio origen al aislado #3 ((INP100588-CMG); el aislado #9 (INP031091-NIT5) se obtuvo por sondeo duodenal de una paciente de 18 años de edad, con artritis reumatoide juvenil y con giardiasis crónica que recurrió durante ocho años; el aislados #17 (INP040393-J8) se aisló de un paciente de ocho años de edad, con síndrome nefrítico y giardiasis crónica (CPS con *Giardia*, en noviembre/diciembre de 1992 y marzo/abril de 1993), y el aislado #18 (INP150593-J10) se obtuvo de un niño de 7 años de edad, que presentó diarrea crónica intermitente, dolor abdominal, flatulencia y en sus CPS se encontró *Giardia intestinalis* y *Ascaris lumbricoides* (Tabla 2).

#### **8.1.5.2 Aislados obtenidos de dos cánidos y un felino.**

Los dos perros tuvieron giardiasis adquirida de forma natural. De uno de estos animales, los quistes se aislaron de las heces por el método Sheather, se desenquistaron *in vitro*, se cultivaron en el medio TYI-S-33, como se refirió anteriormente y se obtuvo el aislado INP110997-PAM. Al otro perro se le realizó una resección intestinal. Brevemente, el perro se anestesió con ketamina, bajo condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar), se hizo una incisión abdominal, se obtuvo el intestino delgado, se disecó longitudinalmente y se obtuvieron muestras para la búsqueda de trofozoítos de *G. intestinalis*. Posteriormente, se obtuvo el contenido intestinal, se colocó en un matraz de 100 ml, se lavó con PBS y los trofozoítos se sembraron en el medio de cultivo TYI-S-33 a 37°C. Se comprobó la axenización y se obtuvo el aislado INP300693-CP5.

Al gato se le realizaron CPS de concentración durante seis días, se corroboró que no se encontraba infectado y se le inocularon 200,000 quistes/ml. El lote de quistes procedía de un paciente pediátrico originario y residente del Estado de México, de donde también se obtuvo un aislado (INP150593-J10). Después de la inoculación se realizaron CPS de concentración, se encontraron quistes de *Giardia*, estos se concentraron, desenquistaron *in vitro*, se sembraron en el medio TYI-S-33 y se obtuvo el aislado INP180693-HG8 (Tabla 2).

## **8.2 Segunda serie: Aislados de *G. intestinalis***

De la segunda serie se consiguieron en total 73 muestras. Catorce provenientes de ganado ovino, 4 de caprino, 31 de perros y 24 de humanos (Tabla 5).

### **8.2.1 Aislados obtenidos de ovinos.**

Las muestras de heces se obtuvieron de pequeños rebaños de *Ovis aries* procedentes del Estado de Hidalgo (México, región central). La infección se comprobó por el método de concentración flotación (Faust). Los quistes de *Giardia* se concentraron mediante un gradiente de sacarosa, se desenquistaron *in vitro* (Ponce-Macotela *et al.*, 1990) o *in vivo* en *Meriones unguiculatus* (gerbos) y se crecieron en el medio TYI-S-33 (Keister, 1983).

Se obtuvieron 14 aislados. Ocho por desenquistamiento *in vivo* y seis por desenquistamiento *in vitro*. Tabla 5. De los trofozoítos del aislado INP-B2 se obtuvieron quistes *in vitro*, se inocularon a un gerbo, se recuperaron los trofozoítos y se obtuvo el aislado INP-B2Q1G3. Los trofozoítos obtenidos del aislado INP-B4G1 se enquistaron y desenquistaron *in vitro* y se obtuvo el aislado INP-B4G1Q1; este aislado se volvió a enquistar y desenquistar *in vitro* y se obtuvo el INP-B4G1Q1Q2.

### **8.2.2 Aislados procedentes de caprinos.**

De los cuatro aislados de caprinos (*Capra hircus*), tres se obtuvieron por desenquistamiento *in vitro*. Los quistes de *Giardia* de una cabra, se dividieron en dos lotes, uno se desenquistó *in vitro* (INP-CH69) y el otro se desenquistó *in vivo* INP-CH69G12 (Tabla 5).

### **8.2.3 Muestras que se obtuvieron de cánidos del Centro de Control Canino “Culhuacan”**

Los trofozoítos de *G. intestinalis* se obtuvieron del intestino delgado de perros sacrificados en el de Control Canino “Culhuacan”. Los segmentos con abundantes trofozoítos de *Giardia* se incubaron con agitación durante 30 minutos, en PBS a 37 °C, esta maniobra permitió que los trofozoítos se adhirieran a las paredes de los tubos. Posteriormente y para eliminar los detritus celulares, los tubos se lavaron dos veces con PBS pH 7.2 a 37 °C. Finalmente para colectar los trofozoítos, los tubos se colocaron en un baño de hielo durante 20 minutos, se centrifugaron a 1000 x g y se cosecharon con pipeta Pasteur. El DNA se obtuvo con el método de Fenol-cloroformo y precipitación con etanol a -20 °C.

Por otro lado, de un perro se obtuvieron quistes de *Giardia*, se concentraron y se dividieron en dos lotes; uno fue para desenquistamiento *in vitro* y se obtuvo el aislado INP-CP6. El otro lote de quistes se procesó para la extracción del DNA (Tabla 5).

#### **8.2.4 Aislados obtenidos de humanos.**

De las 22 muestras procedentes de pacientes pediátricos y que se analizaron en esta serie, siete se desenquistaron *in vitro*, 12 en gerbos y en tres casos el DNA se aisló directamente de los quistes (Tabla 5).

#### **8.3 Obtención de los ácidos nucleicos.**

Los trofozoítos de los cultivos axénicos se lavaron con PBS (pH 7.2), se concentraron y se incubaron toda la noche a 42°C en solución de lisis (10 mM, Tris-HCl [pH 7.4]; 10 mM, EDTA; 150 mM, NaCl; 0.4% de duodecil-sulfato de sodio y 0.2 mg/ml proteinasa K). Al lisado se le adicionó fenol/cloroformo (1:1), se agitó manualmente durante 5 minutos y se centrifugó a 20000 x g por 10 minutos; se obtuvo la fase acuosa y se repitió la extracción fenólica. Se efectuó una extracción con cloroformo y los ácidos nucleicos se precipitaron con acetato de sodio 0.3 M (pH 7.0) y etanol a -20°C y los tubos se dejaron toda la noche a -20°C. Posteriormente, se centrifugaron a 20000 x g por 10 minutos, el sobrenadante se eliminó y el precipitado se disolvió con TE [10 mM, Tris-HCl y 1 mM, EDTA (pH 7.4)]. Para eliminar el RNA, las muestras se incubaron con 20 µg/ml de RNasa a 37°C durante 30 minutos y el DNA se re-extrajo con fenol/cloroformo. El DNA se precipitó con acetato de sodio-etanol y finalmente se disolvió en TE.

#### **8.4 Ensayos genéticos.**

Los aislados se tipificaron con base en la amplificación de segmentos de genes ortólogos cuya secuencia de nucleótidos son genotipo específico y por los polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP).

Inicialmente, se analizó el DNA genómico de cada aislado, mediante ensayos de PCR 1 y 2, se amplificaron segmentos de genes que codifican a proteínas

variables de superficie (*vsp*) y que son específicas del Ensamble A (Ey *et al.*, 1993a; Ey *et al.*, 1996). La identificación del grupo I (tipo A-I) y del grupo II (tipo A-II) u otros subtipos del Ensamble A se llevaron a cabo mediante los RFLP's de los *productos amplificados* (Ey *et al.*, 1993a; Monis *et al.*, 1996; Ey *et al.*, 1997; Monis *et al.*, 1998; Ey *et al.*, 1996; Karanis & Ey., 1998).

Los aislados también se analizaron mediante el ensayo 3, el cual es un nuevo método diagnóstico (PCR-múltiplex, con los iniciadores Mix-One), que detecta en un solo paso a tres ensamblajes de *Giardia*.

### **8.5 Primera serie: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Excepto en donde se indique otra cosa, la PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer, modelo 2400. La mezcla de reacción fue de 50  $\mu$ l y contenía 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dATP, dGTP, dCTP y dTTP, 5' y 3' oligonucleótidos (cada uno 0.25  $\mu$ M) [Lakeside<sup>TM</sup> y GIBCO-BRL], 100 ng del DNA de *Giardia* y 1.5 U de *Taq* DNA polimerasa (TaqGold, Perkin Elmer Corp.).

En todos los experimentos se incluyeron controles positivos con DNA genómico de cepas de referencia: WB y P1 (ATCC 30957 y 30888 respectivamente) Ad-1 del ensamblaje A (grupo genético A-I), Bris-136/C2 (ensamblaje A, grupo genético A-II), Ad-28 (ensamblaje B) y CZ-P15 (ensamblaje E; genotipo de animales de granja). El control negativo fue la mezcla de reacción sin DNA de *Giardia*.

Los productos amplificados se identificaron por electroforesis (submarino) en geles de agarosa al 1% en amortiguador de TBE (Tris-boratos-EDTA), teñidos con bromuro de etidio (0.5 $\mu$ g/ml). Los marcadores de tamaño molecular fueron: el fago  $\lambda$  *Hind III* y el fago  $\Phi$ X 174 *Hae III* (Boehringer Mannheim). La electroforesis se desarrolló a 60 V, 30mA y 5 W, durante 90 minutos.

**8.5.1 Ensayo 1:** Amplificación de un segmento de 0.52-kb del gen *vsp* específico del ensamblaje A.

Se utilizaron los oligos 432 y 433 (Ey *et al.*, 1993 a, b) que amplifican segmentos homólogos de tres genes *vsp*: *vsp417-1* (syn. *tsa417*), *vsp417-2* (*tsp11*) y *vsp417-3*, de la subfamilia de los genes *vsp417* (Ey *et al.*, 1998; Ey *et al.*, 1999). La reacción involucró un tiempo inicial de desnaturalización de 10-min a 95°C, seguido de cinco ciclos de 15 seg a 95°C, 45 seg a 62°C, y 2 min a 72°C, más 30 ciclos de 15 seg a 95°C, 45 seg a 66°C, y 3 min a 72 °C. Un periodo final de extensión de 7 min a 72°C.

El producto de 0.52-kb que se amplificó en este ensayo corresponde a una mezcla de dos loci (*vsp417-1* y *vsp417-2*) para el caso de aislados del grupo genético A-I y de tres loci (*vsp417-1*, -2 y -3) para aislados del grupo A-II (Ey *et al.*, 1993a; Ey *et al.*, 1998; Ey *et al.*, 1999).

El segmento derivado del locus *vsp-1* restringe con *Pst I* y *Kpn I*, pero no con *Hind III*, en tanto que el derivado de *vsp-2*, restringe con *Hind III*, pero no con *Pst I* o *Kpn I*. Aislados de *Giardia* de los grupos A-I y A-II se pueden discriminar con la restricción con *Pst I*, ya que se detecta un nuevo RFLP que es específico del locus *vsp417-3* (detectado únicamente en aislados del grupo A-II) (Ey *et al.*, 1993a,b ; Ey *et al.*, 1998).

El amplificado de 0.52-kb susceptible a *Hind III* puede discriminar aislados del grupo A-I y A-II. Cuando el producto de 0.52-kb no restringe con *Hind III*, entonces, los aislados pueden ser del tipo “hoofed livestock” (animales de granja de pezuña hendida) (Ey *et al.*, 1996; Ey *et al.*, 1997).

Con los oligonucleótidos 432 y 433, los aislados del ensamble B generan un producto de 0.37-kb (Ey *et al.*, 1993; Ey *et al.*, 1998).

**8.5.2 Ensayo 2:** Amplificación de segmentos homogéneos subtipo-específico de un locus único del gen *vsp*.

Para la identificación de los grupos A-I y A-II, se usaron por separado pares de oligonucleótidos específicos de los tres genes *vsp* (Ey *et al.*, 1996; Ey *et al.*, 1997; Karanis & Ey, 1998).

*Ensayo 2A, par de iniciadores A.* Con los oligos 726 + 433 se amplifica un segmento de 1.9-kb del gen *vsp-417-1* e identifica a los aislados del ensamble A (A-I, A-II y like A-I/A-II).

*Ensayo 2B, par de iniciadores B.* Con los oligos 727 + 433 se amplifica un segmento de 1.8-kb del gen *vsp 417-2* (para aislados del grupo A-I) o *vsp 417-3* (para aislados del grupo A-II y like A-I/A-II) Estos grupos se pueden distinguir por el análisis de los RFLP's (Ey *et al.*, 1996; Ey *et al.*, 1998; Ey *et al.*, 1999).

*Ensayo 2C, par de iniciadores C.* Con los oligos 733 + 731 se amplifican segmentos del gen *vsp1267* (Mowatt *et al.*, 1991), Si el producto es de 1.8-kb los aislados son del grupo A-I y si el producto es de 1.6-kb entonces los aislados serán del grupo A-II. El DNA de aislados del grupo like A-I/A-II no generan ningún producto (Ey *et al.*, 1996). Para la PCR, las muestras se desnaturalizaron a 95°C (10 min), y se sometieron a cinco ciclos de amplificación (30 s a 95°C, 1 min a 55°C, 2 min a 72°C), seguido de 30 ciclos de 15 s a 95°C, 45 s a 60°C; 4 min a 72°C, con un tiempo final de elongación de 7 min a 72°C.

### **8.5.3 Ensayo 3.** *Determinación de los genotipos más frecuentes por PCR-múltiple, Mix-One.*

Este método permite, en un solo paso, identificar a tres ensambles de *G. intestinalis* [Ensamble A, (grupos A-I y A-II), Ensamble B y Ensamble E], mediante el uso de una mezcla de diferentes oligonucleótidos. Tres oligos (727, 27 y 33) son específicos de los genes *vsp* e identifican únicamente a los grupos A-I y A-II; los otros seis oligos (211, 214-217, 579) son específicos del gen de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*) (Ey *et al.*, 1996; Ey *et al.*, 1997; Ey *et al.*, 1998; Monis *et al.*,

1999). Todos los oligos, excepto el 579 (Ey *et al.*, 1996), amplifican productos de diferente tamaño de cada genotipo. Esto facilita la identificación precisa de diferentes grupos genéticos, además, detecta infección mixta, en donde se involucra a más de un aislado.

La mezcla de la reacción (25 $\mu$ l) contenía los reactivos anteriormente mencionados más 5% de dimetilsulfóxido. Fueron sujetos a desnaturalización a 95°C (10 min), seguido de 30 ciclos, 30 s a 95°C, 30 s a 56°C; 3 min a 72°C, con un tiempo final de elongación de 7 min a 72°C.

#### **8.6 Polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP).**

El producto de 0.52-kb amplificado con los oligos 432 + 433 (*ensayo 1*) se restringió con *Cla I*, *Pst I*, *Kpn I* y *Hind III*. Del ensayo 2A, el producto amplificado (1.9-kb) con los oligos 726 + 433 se restringió con *Pst I*, *Sma I* y *Kpn I*. El producto del ensayo 2 B (1.8-kb) se restringió con *Kpn I*, *Hind III*, *Xba I* y *Cla I*. Ensayo 2C, los productos amplificados con los oligos 733 + 731 (1.6-kb o 1.8-kb) se restringieron con *Pst I*, *Cla I* y *Eco R I*. Las enzimas fueron de la marca GIBCO BRL. En todos los casos, la incubación con las enzimas fue de  $\geq 2$  horas, siguiendo las instrucciones adecuadas para cada enzima. Los productos que se obtuvieron se identificaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, con 0.5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio en amortiguador de TBE. Las condiciones de corrido fueron a 60 V, 30 mA y 5 W, durante 90 minutos.

#### **8.7 Segunda serie: PCR-múltiplex (GiP5)**

Para la PCR múltiplex se utilizaron los iniciadores GiP5 [que detecta a los siete ensamblados (A-G)] en un solo paso (iniciadores en proceso de patente, Dr. Peter Ey), sin necesidad de utilizar enzimas de restricción y adicionalmente se puede detectar infección con más de un genotipo.

### **8.7.1 Ensayo 1. Estandarización de la PCR-múltiplex (GiP5) con cepas de referencia.**

La PCR-múltiplex se estandarizó con el DNA genómico de cepas de referencia de los siete ensambles (proporcionadas por el Dr. P Ey): Ad 1, A1 (humano); B136, A2 (humano); Ad 28, B (humano); Ad 137, C (perro); Ad 148, D (perro); Ad 134, E (artiodáctilo); P15, E (artiodáctilo); Ad 23, F (gato) y Rat, G (rata) (Ey *et al.*, 1997; Monis *et al.*, 1999).

La amplificación de la PCR-Múltiplex se realizó en un volumen de 25 µl que contenía 1X PCR amortiguador, 1X DMSO; dNTPs 200µM; Oligos 10(5x); Taq Gold, 0.625U; Mg Cl<sub>2</sub>, 2.5 mM y DNA, 50 ng. El control negativo fue la mezcla de la reacción sin DNA de *Giardia*.

Las muestras se desnaturalizaron durante 10 min a 95<sup>o</sup>, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95<sup>o</sup>C, 30 s a 50<sup>o</sup>C y 3 min a 72<sup>o</sup>C, con un tiempo de extensión de 7min a 72<sup>o</sup>C. Los productos amplificados se identificaron por electroforesis horizontal (submarino) en geles de agarosa al 1% en amortiguador de TBE (Tris-boratos-EDTA) y teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). El marcador de tamaño molecular fue una escalera de 100-pb. La electroforesis fue a 60V, 30 mA y 5 W durante 90 minutos. Los resultados se analizaron en un sistema de registro UVP BioImaging Systems Epi Chemi<sup>3</sup>.

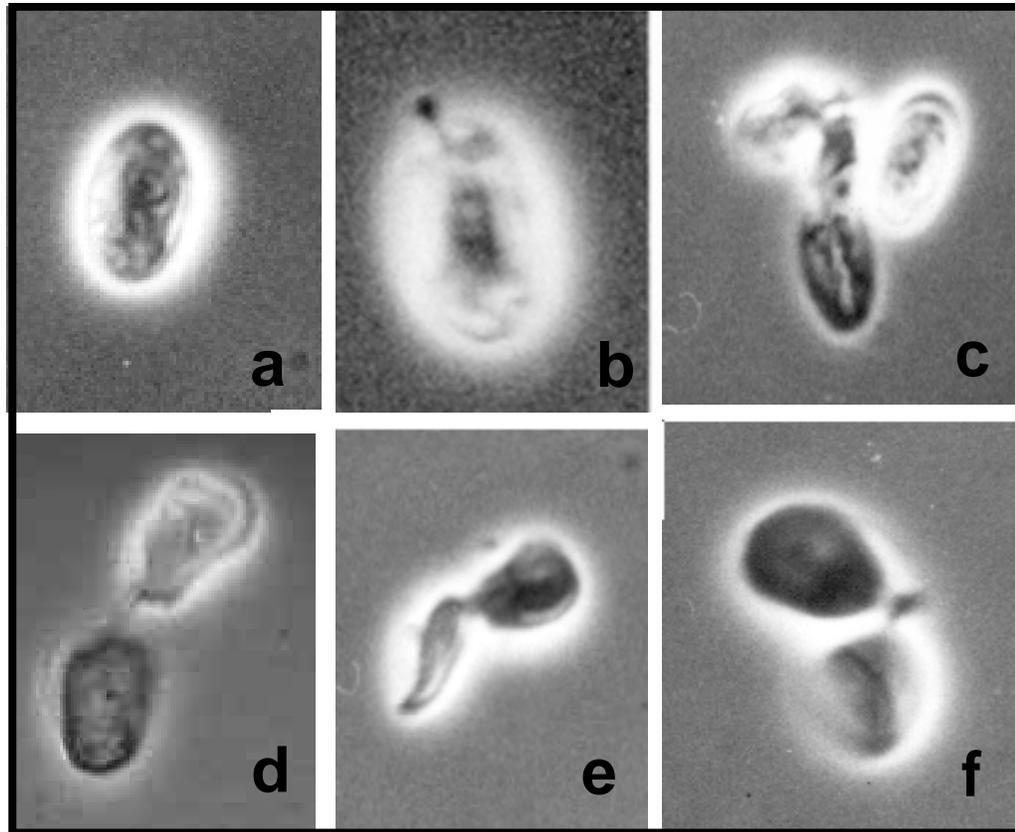
### **8.7.2 Ensayo 2. PCR-múltiplex (GiP5) con DNA genómico de *G. intestinalis*.**

El DNA genómico de las muestras de la segunda serie (ovinos, caprinos, cánidos y humanos) y adicionalmente de la primera serie (humanos, perros y un gato) se amplificaron por PCR-múltiplex con la mezcla de iniciadores GiP5, siguiendo el procedimiento descrito para las cepas de referencia.

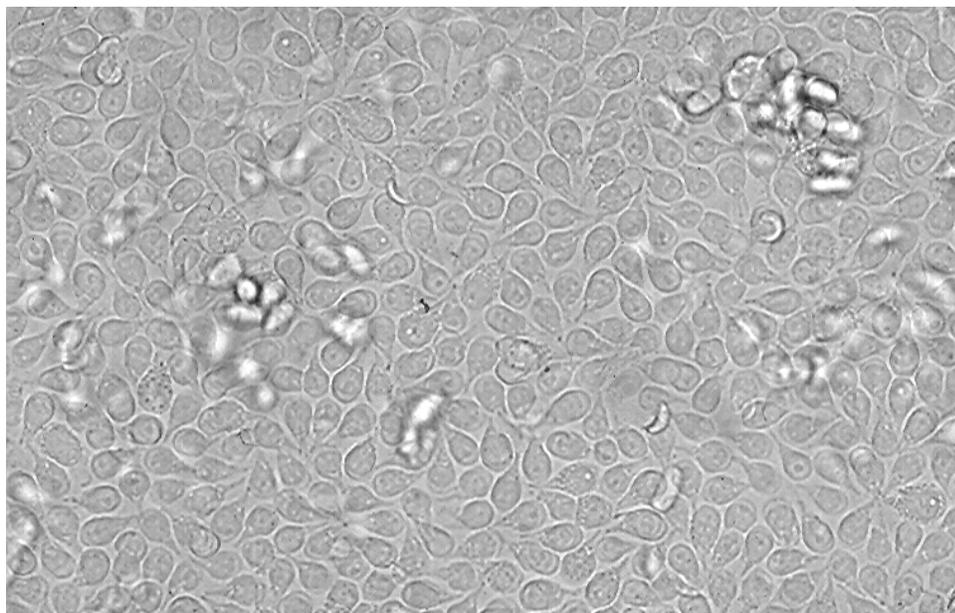
## **9.- Resultados.**

### **9.1 Primera serie. Obtención de los aislados de *G. intestinalis*.**

El huésped de origen, el lugar de residencia de los pacientes, los antecedentes clínicos y el método de obtención de los trofozoítos se muestran en la Tabla 2. La mayoría de los pacientes presentaron un cuadro de base y 11 tuvieron giardiasis sintomática en el momento en que se obtuvo la muestra para los CPS. Dos aislados se establecieron a partir de trofozoítos obtenidos por sondeo duodenal INP031091-NIT5 (paciente) y por resección intestinal INP300693-CP5 (perro). Del aislado INP051187MG se obtuvo la clona INP051187-CMG. Los otros aislados se lograron por desenquistamiento *in vitro*. Fig. 9. En todos los casos los aislados se mantuvieron en el medio de cultivo TYI-S-33 y en este medio se multiplicaron por fisión binaria longitudinal, formando mono-capa en la superficie de los tubos (Fig. 10).



**Figura 9.** Fotomicrografías en donde se observa el desenquistamiento *in vitro*, a) quiste, b) quiste activado, c) dos trofozoítos saliendo del quiste y un quiste integro, d) trofozoíto en la última fase de salida, e y f) trofozoítos en división.



**Figura 10.** Fotomicrografía de trofozoítos en mono-capa en el medio de cultivo TYI-S-33.

**Tabla 2. Aislados de *Giardia intestinalis* [Primera serie].**

Denominación	Huésped	Residencia de los pacientes.	Antecedentes de los pacientes.	Giardiosis	Obtención de trofozoítos.
1 INP271087-MM	Humano	Netza. Edo de Méx.	Retraso en el crecimiento.	+	Desenquistamiento
2 INP051187-MG	Humano	Jilotepec. Edo de Méx.	Púrpura trombocitopénica.	+	Desenquistamiento
3 INP051187-CMG	Clona				
4 INP040288-PM	Humano	Rancho la Trampa. Mich	Lesión del nervio ciático.		Desenquistamiento
5 INP170588- Z	Humano	N.D.			Desenquistamiento
6 INP040889-NIT1	Humano	Naucalpan. Edo de Méx.	Epilepsia, ERGE, gastrostomía	+	Desenquistamiento
7 INP220290-NIT2	Humano	D.F.	Policlínica.		Desenquistamiento
8 INP240490-NIT3	Humano	Coyoacán.D.F.	Hiperreactor bronquial.		Desenquistamiento
9 INP031091-NIT5	Humano	Coyoacán.D.F.	Artritis.R.J. Gastroduodenitis.	+	Sondeo duodenal.
10 INP250991-NIT6	Humano	Tlahuac. D.F.	Leucemia, anemia megaloblástica	+	Desenquistamiento
11 INP121191-NIT7	Humano	Tlalpan. D.F.	Duodenitis crónica. ERGE.	+	Desenquistamiento
12 INP250292-NIT9	Humano	A. Obregón.D.F.	Ausencias, blefaroconjuntivitis.	+	Desenquistamiento
13 INP210897- AXA1	Humano	D.F.	Diarrea crónica.	+	Desenquistamiento
14 INP030299-VGA	Humano	Guanajuato	Neuropatía. Prob. ERGE.		Desenquistamiento
15 INP130199- MAG	Humano	Tlalpan. D.F.			Desenquistamiento.
16 INP 041192-J5	Humano	N.D.			Desenquistamiento.
17 INP040393-J8	Humano	Miacatlán. Morelos.	Síndr. nefrótico, diarrea intermi	+	Desenquistamiento
18 INP150593-J10	Humano	Naucalpan. Edo de Méx.	Diarrea crónica intermitente agu	+	Desenquistamiento
19 INP180693-HG8	Gato	D.F.	Infección inducida.		Desenquistamiento
20 INP300693-CP5	Perro	D.F.	Infección natural.		Resección intestinal
21 INP110997-PAM	Perro	D.F.	Infección natural.		Desenquistamiento
22 INP130294- H12	Humano	Iztapalapa. D.F.	Divertículo vesical. Giardiosis.	+	Desenquistamiento
23 INP080196- AXA 0	Humano	N.D.			Desenquistamiento

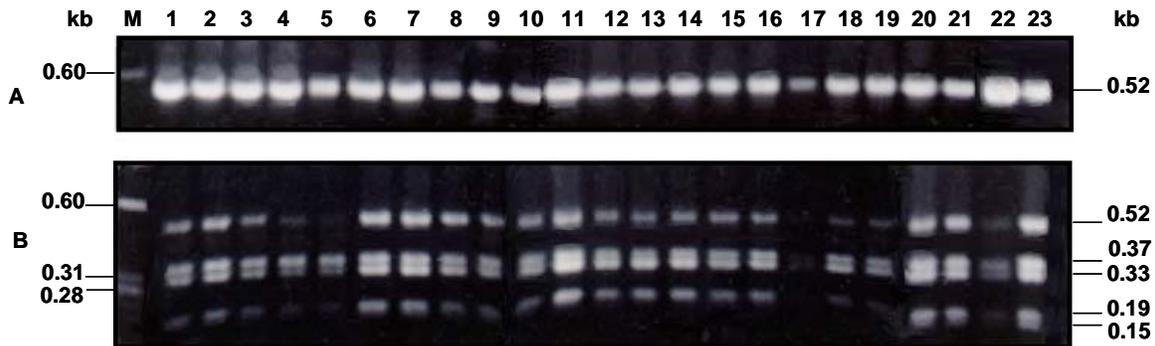
ND: no determinado, ERGE: enfermedad de reflujo gastroesofágico. +: giardiasis sintomática. La numeración corresponde a la que se muestra en los carriles de cada ensayo electroforético.

## 9.2 Detección de los subtipos de *G. intestinalis* por PCR del DNA genómico.

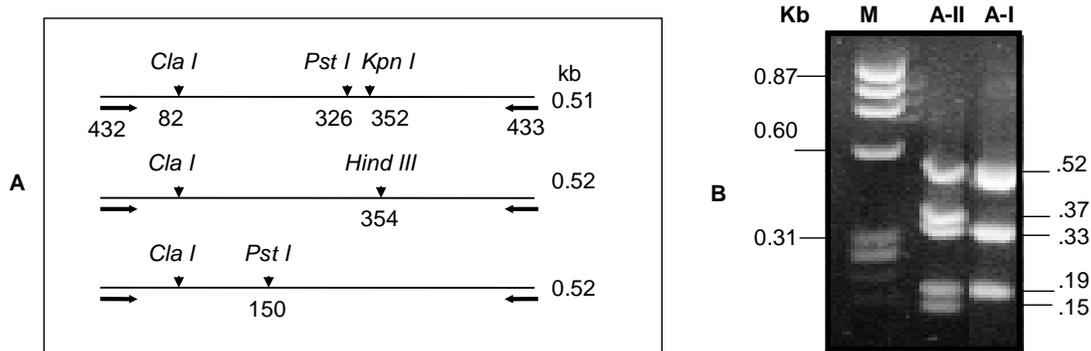
### 9.2.1 **Ensayo 1:** Amplificación de un segmento de 0.52-kb del gen *vsp* específico del ensamble A.

Cuando se amplificó el DNA de los 22 aislados y la clona, con los oligos 432 + 433 se obtuvo un producto de 0.52-kb (Fig. 11, panel A). Cada aislado contiene un subtipo del ensamble A, ya sea solo o como parte de una mezcla de poblaciones, por ejemplo, derivada de infecciones múltiples que involucran a más de un subtipo.

El análisis de los productos que se obtuvieron de la restricción con *Pst* I generó un patrón típico del subtipo A-II de *G. intestinalis* (Fig.11B). Este patrón comprende una banda residual de 0.52-kb (que corresponde al locus *Vsp417-2* resistente a la digestión con *Pst* I), las bandas de 0.33 y 0.19-kb corresponden al locus *vsp417-1* y las bandas de 0.37 y 0.15-kb son del locus *vsp417-3*. El doble patrón de bandeo es característico de aislados del subtipo A-II. En tanto que el patrón de bandeo de los aislados del subtipo A-I solamente generan las bandas de 0.33 y 0.19-kb (Ey *et al.*, 1993b) (Fig. 12). Todos los aislados restringieron con *Kpn* I y *Hind* III (datos no mostrados).



**Figura 11. Ensayo 1.** Análisis electroforético de un segmento de 0.52-kb del gen *Vsp417* y RFLP de aislados de *G. intestinalis*. La numeración en los carriles corresponde al número de aislado de la Tabla 2. Panel A: coamplificación (0.520-kb) de los tres alelos del gen *vsp417*, con los oligos 432 + 433. Panel B polimorfismos de los fragmentos de restricción con *Pst I*. El patrón de bandeo fue similar en todos los aislados. Marcador de DNA,  $\phi$ X174 *Hae III* (M).

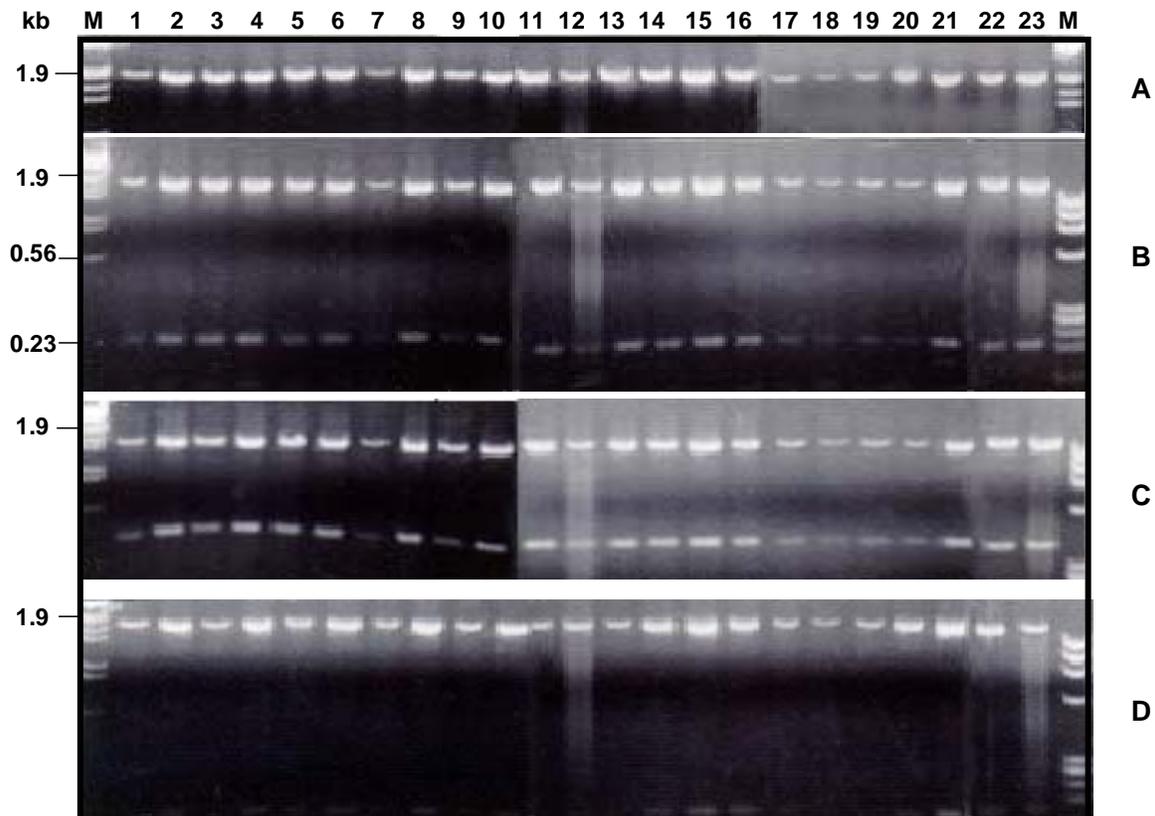


**Figura 12. Panel A.** Representación esquemática de un segmento de los tres alelos *vsp-417* (*vsp-417-1,-2,3*), flanqueados por los oligos 432 + 433 y sus sitios de restricción. Panel B. Análisis electroforético de cepas de referencia de *G. intestinalis* del ensamble A y restringidos con *Pst I*. Bris-136 (grupo A-II), restricción de los alelos *vsp417-1* y 3 (bandas de 0.33 y 0.19-kb y 0.37 y 0.159-kb respectivamente). Portland (grupo A-I) restricción del alelo *vsp417-1* (bandas de 0.33 y 0.19-kb). Marcador de DNA,  $\phi$ X174 *Hae III* (M)

**9.2.2 Ensayo 2:** Amplificación de segmentos homogéneos subtipo-específico de un locus único del gen *Vsp*.

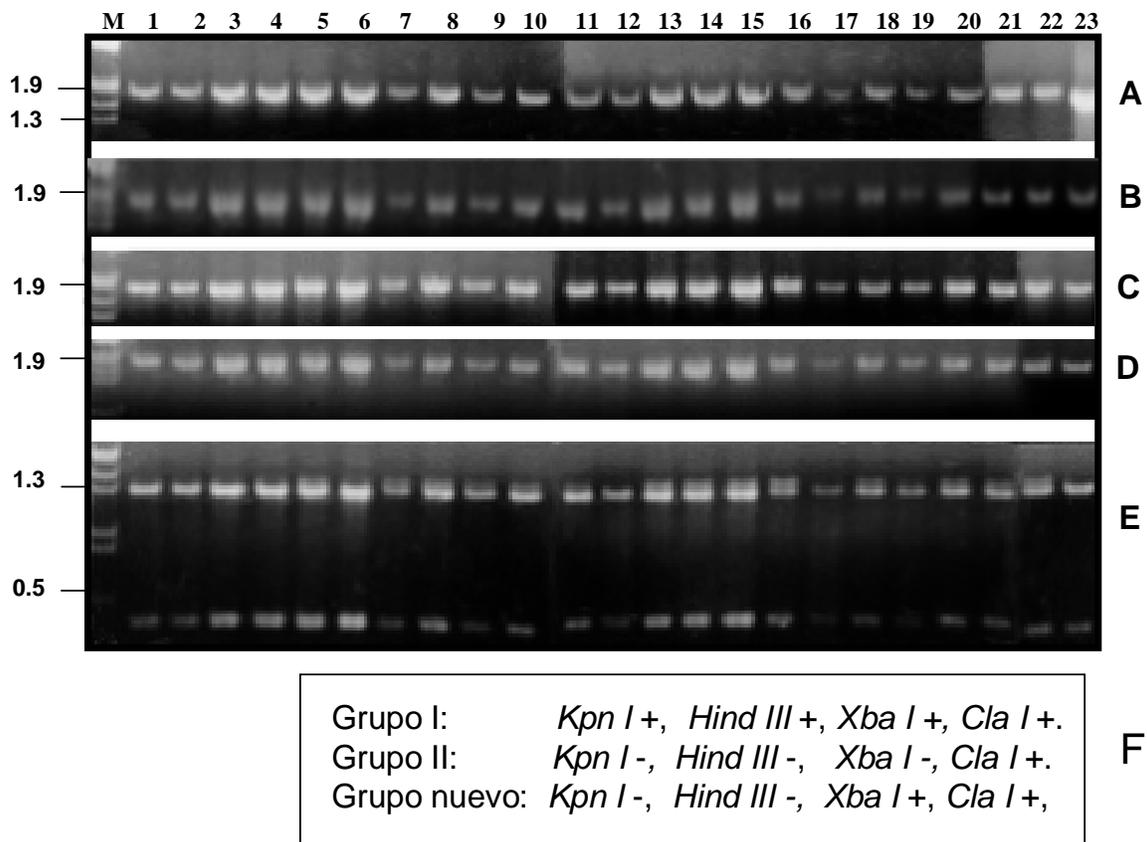
Para verificar que todos los aislados correspondieran al ensamble A, subtipo A-II, el DNA genómico de cada aislado se sujetó a otras amplificaciones con segmentos más grandes de los genes *vsp*.

En el ensayo 2A (Iniciadores 726 +433), en todos los aislados, se amplificó un segmento de 1.9-kb del gen *vsp-417-1*, que fue sensible a la restricción con las enzimas *Pst I*, *Sma I* y *Kpn I* (Fig.13).



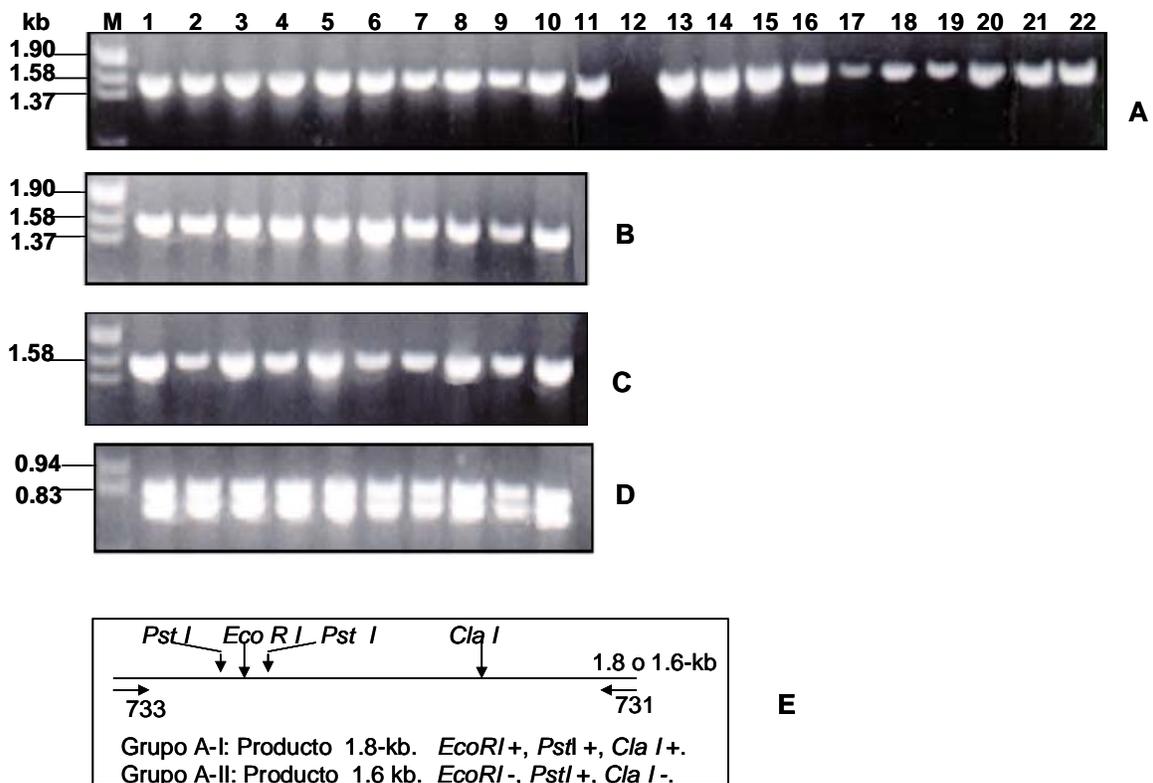
**Figura. 13.** *Ensayo 2A.* Análisis electroforético del producto amplificado del gen *vsp-1*, y RFLP de los aislados de *G. intestinalis* empleando los iniciadores 726+433. Producto de 1.9-kb (A), resticción con las enzimas *Pst I* (B), *Sma I* (C) y *Kpn I* (D).

De manera similar, en el ensayo 2B, con el par de iniciadores B, todas las muestras generaron un producto de 1.8-kb, que corresponde al segmento esperado de la *vsp417-2* (para el subtipo A-I) o *vsp417-3* (subtipo A-II). El análisis de restricción, del producto amplificado de cada aislado, mostró un perfil de RFLP [*Cla I* + (1309 +0.446-kb), *Kpn I* -, *Hind III* - y *Xba I* -]; este patrón es característico del gen *vsp417-3* del subtipo A-II (Fig. 14). El segmento de 1.8-kb del gen *vsp417-2* correspondiente al subtipo A-I es sensible a las cuatro endonucleasas (Ey *et al.*, 1996).



**Figura 14.** *Ensayo 2B.* Análisis electroforético de la amplificación de los alelos *vsp417-2* o *vsp417-3* y RFLP de los aislados de *G. intestinalis*. Los productos de la PCR tienen el mismo número que en la Tabla 2. (A) Se muestra un amplificado de 1.8-kb con los oligos 727 + 433. (B) Restricción con *Kpn I* (C) *Hind III*, (D) *Xba I* y (E) *Cla I*. (F) Cuadro con los RFLP de los grupos genéticos.

En el *ensayo 2 C* con el par de iniciadores C, en 21 aislados y la clona CMG-1, se generó un producto de 1.6-kb (distintivo del tipo A-II de *G. intestinalis*); la excepción fue el aislado INP250292-NIT9 (#12, Tabla 2), que no amplificó en este ensayo. El análisis de restricción fue característico del subtipo A-II de *G. intestinalis* (restringido con *Pst I*, pero no con *Eco RI* ni con *Cla I*). En la Fig. 15 se muestran los RFLP de las primeras 10 muestras. En este mismo ensayo (2C) un producto de 1.8-kb y el reconocimiento de las tres enzimas (*Pst I*, *Eco RI* y *Cla I*) son específicos del subtipo A-I de *G. intestinalis* (Ey *et al*, 1996).



**Figura 15.** *Ensayo 2C.* Análisis electroforético de la amplificación del gen *vsp1267* (iniciadores 733-731) y RFLP de aislados de *G.intestinalis*. (A) se muestra en todos los aislados un producto de 1.6-kb, excepto en el carril 12. No se generaron fragmentos de restricción con *Eco RI* (B) y *Cla I* (C). Restricción con *Pst I* (D). M, marcador de DNA, bacteriophago  $\lambda$  *Eco R I Hind III*. (E) Diagrama de los sitios de corte de las enzimas y RFLP de los grupos genéticos I y II.

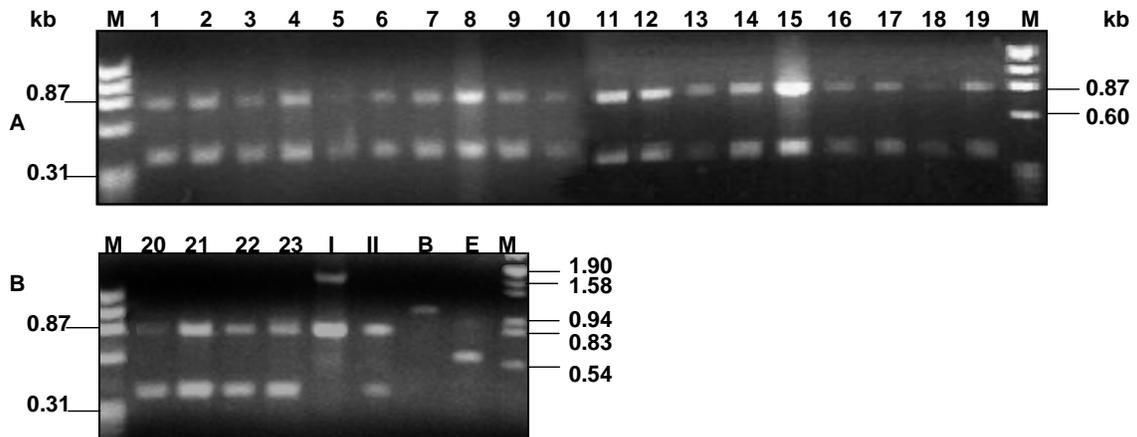
Aunque estos ensayos distinguen los subtipos del ensamble A de *G. intestinalis*, no detectan otros subtipos – en particular los ensamblajes C y D (específicos de perros), E (animales de granja de pezuña hendida). Como solamente se analizó una clona de un aislado y porque algunos cultivos pudieran ser heterogéneos, derivados de infecciones que involucren más de un subtipo (Andrews et al., 1992; Upcroft JA & Upcroft P, 1994), se consideró necesario determinar la presencia de genotipos adicionales. Por tal motivo se llevó al cabo el *ensayo 3*.

### **9.2.3 Ensayo 3: Determinación de los genotipos más frecuentes por PCR-múltiple, MixOne.**

Este novedoso ensayo PCR-múltiple (Mix-One) se utilizó para verificar la presencia de genotipos no identificados en los ensayos anteriores. Los resultados fueron categóricos (Fig. 16). Las 23 muestras generaron dos productos, uno de 0.805 -kb (específico del ensamble A) y que corresponde a un segmento del gen de la *gdh* y otro de 0.366-kb que es un segmento del gen *vsp417-3* (específico del tipo A-II de *G. intestinalis*). Se demostró que el genotipo A-II se distinguió fácilmente de los otros genotipos, ya que se amplificó el DNA genómico de aislados de referencia (ensamble A, subtipos A-I, A-II, ensamble B y E). Para el subtipo A-I, se generaron dos productos, uno de 805-kb y que corresponde a un segmento del gen *gdh* (específico del ensamble A), más un producto de 1.6-kb del gen *vsp417-2* (específico del tipo A-I). Para el ensamble B, se produjo un amplificado de 1.04-kb, correspondiente al gen de la *gdh*. Finalmente, para el genotipo de artiodáctilos (ensamble E), se generaron dos productos de 0.60-kb y 0.89-kb, ambos son del gen de la *gdh*.

Los aislados analizados en este ensayo no generaron productos adicionales de DNA (diferentes al subtipo A-II o + otro genotipo), esto nos indica que si alguno de ellos contenía otro genotipo, probablemente, la sub-población estaba presente pero en muy poca cantidad.

Un análisis de los tres ensayos se presenta en las Tablas 3 y 4.



**Figura 16.** *Ensayo 3.* Análisis electroforético mediante la PCR-múltiplex, Mix-One de los aislados de *G. intestinalis*. La numeración es la misma que se muestra en la Tabla 2. (A) aislados del 1-19. (B) Aislados del 20-23, también se muestra la amplificación del DNA de aislados de referencia. I, II = ensamble A, subtipos A-I y A-II, respectivamente; B = ensamble B; E = ensamble E y M = marcador de tamaño molecular. Todos los aislados generaron los productos de 0.805-kb y 0.366-kb, patrón característico del genotipo A-II.

**Tabla 3. Resumen de los productos amplificados de los genes *vsp417* (*tsa417*, *tsp11* y *vsp1267*) y RFLP's [primera serie].**

		<u><i>tsa417</i>-1,2,3,</u>				
		<u>Polimorfismos (RFLP's)</u>				
Aislados	Huésped	Producto	Cla I	Hind III	Kpn I	Pst I
Gpo I		0.52-kb	+	+	+	+
Gpo II		"	+	+	+	++
1-18, 22, 23	Humano	"	+	+	+	++
19	Gato	"	+	+	+	++
20, 21	Perros	"	+	+	+	++
		<u><i>tsp11</i> (727+433)</u>				
		<u>Polimorfismos (RFLP's)</u>				
		Producto	KpnI	Hind III	Xba I	Cla I
Gpo I		1.8-kb	+	+	+	+
Gpo II		"	-	-	-	+
1-18, 22, 23	Humano	"	-	-	-	+
19	Gato	"	-	-	-	+
20, 21	Perros	"	-	-	-	+
		<u><i>tsa417</i> (726+433)</u>				
		<u>Polimorfismos (RFLP's)</u>				
		Producto	Pst I	SmaI	KpnI	
Gpo I		1.9-kb	+	+	+	
Gpo II		"	+	+	+	
1-18, 22, 23	Humano	"	+	+	+	
19	Gato	"	+	+	+	
20, 21	Perros	"	+	+	+	
		<u>VSP1267 (733-731)</u>				
		<u>Polimorfismos (RFLP's)</u>				
		Producto	Eco RI	Cla I	Pst I	
Gpo I		1.8-kb	+	+	+	
Gpo II		1.6-kb	-	-	+	
1-18, 22, 23	Humano	1.6-kb	-	-	+	
19	Gato	"	-	-	+	
20, 21	Perros	"	-	-	+	

El número de los aislados corresponde al que se muestra en la Tabla 2 y en cada uno de los geles de los ensayos 1 y 2. (Fig. 11,14 y 15).

**Tabla 4. Productos amplificados con la PCR-múltiple, Mix One. (Primera serie).**

Aislados	Genotipo	Huésped	Producto
Referencia	Ens A-I	Humano, zoonótico	1.6 + 0.805-kb 0.805 + 0.266-kb
"	Ens A-II	Humano, zoonótico	1.04-kb
"	Ens-B	Humano, zoonótico	0.60 + 0.89-kb
"	Ens-E	Artiodáctilos	0.805 + 0.366-kb
1-18, 22,23	A-II	Humano	kb
19	"	Gato	"
20, 21	"	Perros	"

El número de los aislados corresponde al que se muestra en la Tabla 2 y Figura 16.

### 9.3 Segunda serie. Obtención de los aislados de *G. intestinalis*.

Los hospederos de origen y el método de obtención de los aislados de esta serie se presentan en la Tabla 5. Además, se agregan a la lista los aislados de la primera serie, que también se analizaron mediante la PCR-múltiple con los iniciadores GiP5.

**Tabla 5. Aislados de *Giardia* de las dos series analizados con la PCR-múltiple con los oligos GiP5.**

No	Aislado	Huésped	Origen	PCR-Múltiple Ensamble	
1	1	INP-B2	Ovino	in vitro	AI + All (mix, AI>All)
2	2	INP-B2Q1G3	Ovino	Enquist/ Gerbil	AI
3	3	INP-B3	Ovino	in vitro	AI
4	4	INP-B3G1	Ovino	Gerbo	AI
5	5	INP-B4 G1	Ovino	Gerbo	AI
6	6	INP-B4G1Q1	Ovino	Gerbo/Enquist	AI + B (mix, AI > B)
7	7	INP-B4G1Q1Q2	Ovino	Gerbo/Enquist	AI
8	8	INP-B24	Ovino	in vitro	E
9	9	INP-B24G3	Ovino	Gerbo	E + AI (mix, E >> AI)
10	10	INP-B31 G1	Ovino	Gerbo	All
11	11	INP-B31G3	Ovino	Gerbo	E + AI(mix, E >>> AI)
12	12	INP-B51 G3	Ovino	Gerbo	AI
13	13	INP-B57	Ovino	in vitro	E+AI (mix, E>>>AI)
14	14	INP-B83	Ovino	in vitro	E + AI (mix, E >> AI)

15	15	INP-CH61	Caprino	in vitro	AI
16	16	INP-CH62	Caprino	in vitro	E
17	17	INP-CH69	Caprino	in vitro	AI
18	18	INP-CH69G12	Caprino	Gerbo	AI
19	1	INP-P1	Perro	Intestino	C+B (mix, C>B)
20	2	INP-P2	Perro	Intestino	C+B (mix, C>>B)
21	3	INP-P3	Perro	Intestino	D+B (mix, D>>>B)
22	4	INP-P4	Perro	Intestino	C+B (mix, C≈B)
23	5	INP-P5	Perro	Intestino	B
24	6	INP-P6	Perro	Intestino	B
25	7	INP-P7	Perro	Intestino	D+E+B (mix, D>>B>E)
26	8	INP-P8	Perro	Intestino	B
27	9	INP-P10	Perro	Intestino	D+B (mix, D>>>B)
28	10	INP-P11	Perro	Intestino	D+B (mix, D≈B)
29	11	INP-P12	Perro	Intestino	B
30	12	INP-P13	Perro	Intestino	B
31	13	INP-P16	Perro	Intestino	C+B (mix, C>>>B)
32	14	INP-P17	Perro	Intestino	D+B (mix, D>>B)
33	15	INP-P18	Perro	Intestino	C+B (mix, B>>C)
34	16	INP-P19	Perro	Intestino	B
35	17	INP-P20	Perro	Intestino	B
36	18	INP-P21	Perro	Intestino	D
37	19	INP-P24	Perro	Intestino	B
38	20	INP-P27	Perro	Intestino	B
39	21	INP-P28	Perro	Intestino	C
40	22	INP-P29	Perro	Intestino	C
41	23	INP-P30	Perro	Intestino	D
42	24	INP-P32	Perro	Intestino	D
43	25	INP-P34	Perro	Intestino	D
44	26	INP-P36	Perro	Intestino	C
45	27	INP-P38	Perro	Intestino	D+B (mix, D≈B)
46	28	INP-PT1	Perro	Intestino	D+B (mix, D>>B)
47	29	INP-P3JCH	Perro	Intestino	All
48	30	INP-CP5*	Perro	Intestino	All
49	31	INP-CP6	Perro	in vitro	?
50	32	INP-QCP6	Perro	Quistes	C
51	33	INP-PAM*	Perro	in vitro	All
52	1	INP-H12*	Humano	In vitro	All
53	2	INP-H13	Humano	In vitro	All
54	3	INP-H14	Humano	In vitro	All
55	4	INP-H14G2	Humano/gerbo	Gerbo	All
56	5	INP-H14G3	Humano/gerbo	Gerbo	All
57	6	INP-QGRI	Quiste/humano	Quistes	B
58	7	INP-GRI	Humano	In vitro	All + B (mix, All> > B)
59	8	INP-GRIG1	Humano/gerbo	Gerbo	B3
60	9	INP-AFPG2	Humano/gerbo	Gerbo	B3
61	10	INP-AFPG1G2	Humano/gerbo	Gerbo	B3
62	11	INP-QJAR	Humano/quistes	Quistes	A2
63	12	INP-JAR	Humano	In vitro	All
64	13	INP-YPRG1	Humano/gerbo	Gerbo	B + All (mix, B >> All)
65	14	INP-YPRG2	Humano/gerbo	Gerbo	B3

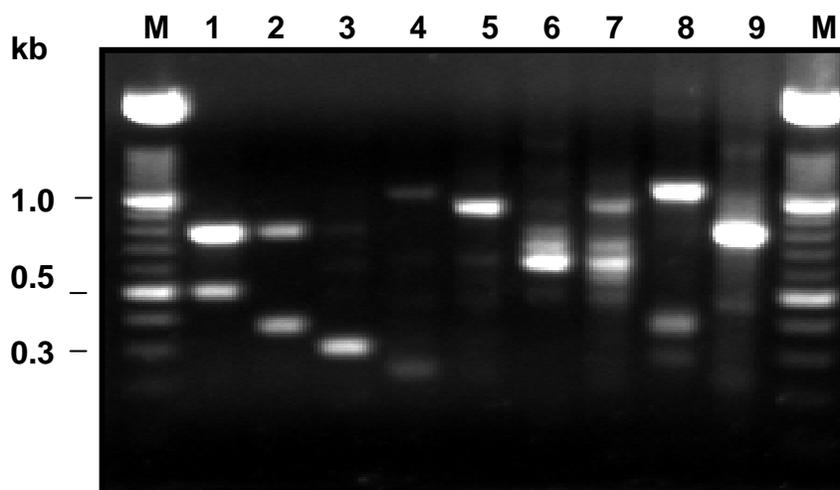
66	15	INP-HSP	Humano	In vitro	All
67	16	INP-HSP-G1	Humano/gerbo	Gerbo	All
68	17	INP-HSPG2	Humano/gerbo	Gerbo	All
69	18	INP-SPZ	Humano	In vitro	All
70	19	INP-SPZG1	Humano/gerbo	Gerbo	All
71	20	INP-SPZG2	Humano/gerbo	Gerbo	All
72	21	INP-SPZG3	Humano/gerbo	Gerbo	AI + All (mix, AI≠All)
73	22	INP-QSPZ	Quiste/humano	Quistes	?
74	23	INP-NIT1*	Humano	In vitro	All
75	24	INP-NIT2*	Humano	In vitro	All + AI (mix, All >> AI)
76	25	INP-NIT3*	Humano	In vitro	All
77	26	INP-NIT5*	Humano	Sondeo duoden	All
78	27	INP-NIT6*	Humano	In vitro	All
79	28	INP-NIT7*	Humano	In vitro	All
80	29	INP-NIT9*	Humano	In vitro	All
81	30	INP-J5*	Humano	In vitro	All
82	31	INP-J8*	Humano	In vitro	B
83	32	INP-J10*	Humano	In vitro	AI +All (AI>>All)
84	33	INP-J10G15	Humano	Gerbo	All
85	34	INP-J10AC	Humano	In vitro	AI
86	35	INP-MM*	Humano	In vitro	All
87	36	INP-PM*	Humano	In vitro	All
88	37	INP-MG*	Humano	In vitro	All
89	38	INP-CMG*	Humano	clona	All
90	39	INP-Z*	Humano	In vitro	All
91	40	INP-AXA0*	Humano	In vitro	All
92	41	INP-AXA1*	Humano	In vitro	All
93	42	INP-VGA*	Humano	In vitro	All
94	43	INP-QMAG	Humano		All
95	44	INP-MAG*	Humano	In vitro	All
96	45	INP-HG8*	Gato	in vitro	All

\* Aislados de la primera serie. 73.- No se pudo determinar el genotipo.

#### 9.4 Detección de los subtipos de *G. intestinalis* por PCR-múltiplex (GiP5) del DNA genómico de *G. intestinalis*. Segunda serie.

##### 9.4.1. Ensayo 1. Estandarización de la PCR-múltiplex (GiP5) con cepas de referencia.

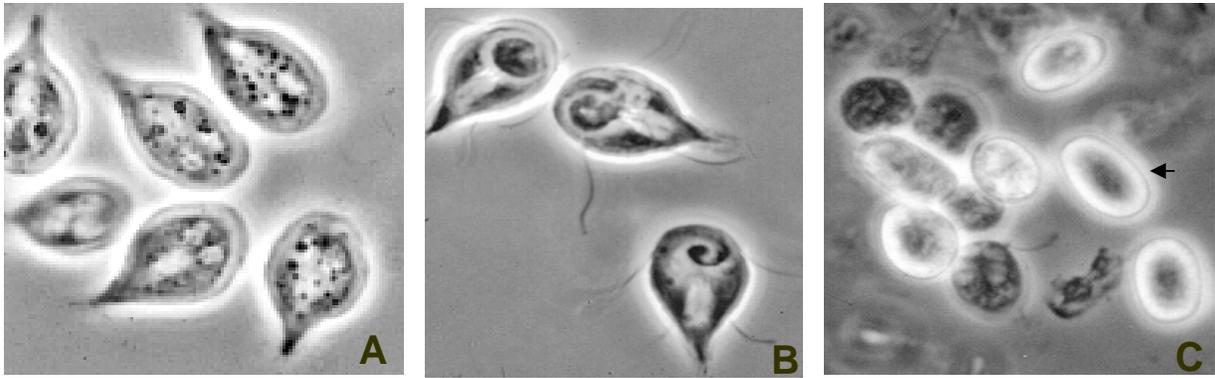
La PCR-múltiplex con el DNA genómico de las cepas de referencia de *Giardia* generó un patrón característico para cada ensamble: Ad 1, "A1" (499, 765 pb), B136, "A2" (366, 765 pb), Ad 28, "B" (295 pb); Ad 137, "C" (232, 1004 pb); Ad 148 "D" (895); Ad 134, "E" (606 pb); P15, "E" (606); Ad 23, "F" (266, 1038 pb) y Rat, "G" (687, 765 pb) (Fig.17).



**Figura 17.** PCR-múltiplex con los iniciadores GiP5 (DNA genómico de las cepas de referencia). (M) escalera de 100 pb, (1) Ensamble A, subtipo “A1” (humanos y zoonótico); (2) Ensamble A, subtipo “A2” (humanos y zoonótico); (3) Ensamble “B” (humanos y zoonótico); (4 y 5) Ensambls “C” y “D” (perros); (6 y 7) Ensamble “E”(artiodáctilos); (8) Ensamble “F” (gato) y (9) Ensamble “G” (rata).

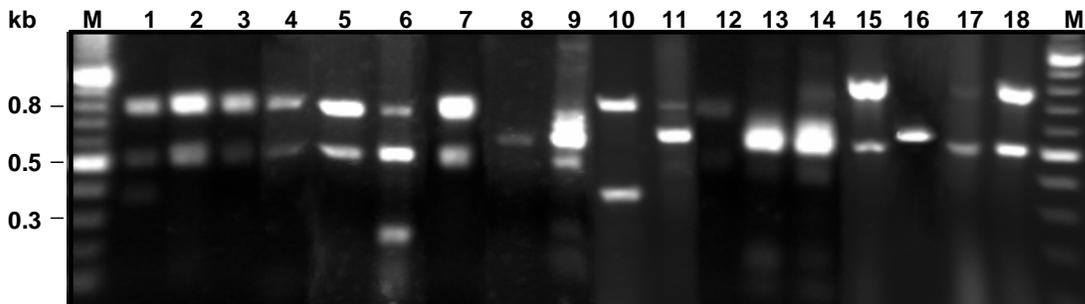
**9.4.2. Ensayo 2.** PCR-múltiplex con los iniciadores GiP5 de aislados de *G. intestinalis* obtenidos de animales de: a) granja (artiodáctilos), b) cánidos y c) pacientes.

**a) Artiodáctilos.** Catorce aislados se obtuvieron de ovinos y cuatro de caprinos. De los aislados procedentes de borregos, ocho se desenquistaron *in vivo* en gerbos y seis por desenquistamiento *in vitro*. Trofozoítos del aislado INP-B2 se enquistaron *in vitro* (Gillin *et al*, 1988), se desenquistaron *in vivo*, se establecieron en el medio TYI-S-33 y se obtuvo el aislado INP-B2Q1G3. Los trofozoítos obtenidos del aislado INP-B4G1 se enquistaron y desenquistaron *in vitro* y se obtuvo el aislado INP-B4G1Q1. Este aislado se volvió a enquistar y desenquistar *in vitro* y se obtuvo el INP-B4G1Q1Q2. Tres aislados de chivos se obtuvieron por desenquistamiento *in vitro* y uno en gerbo (Fig. 18) (Tabla 5).



**Figura 18.** Fotomicrografías del enquistamiento *in vitro*. (A) Los trofozoítos estimulados para el enquistamiento *in vitro*, presentan una gran cantidad de vesículas, (B) reacomodo del disco suctor y (C) formación de quistes viables (flecha).

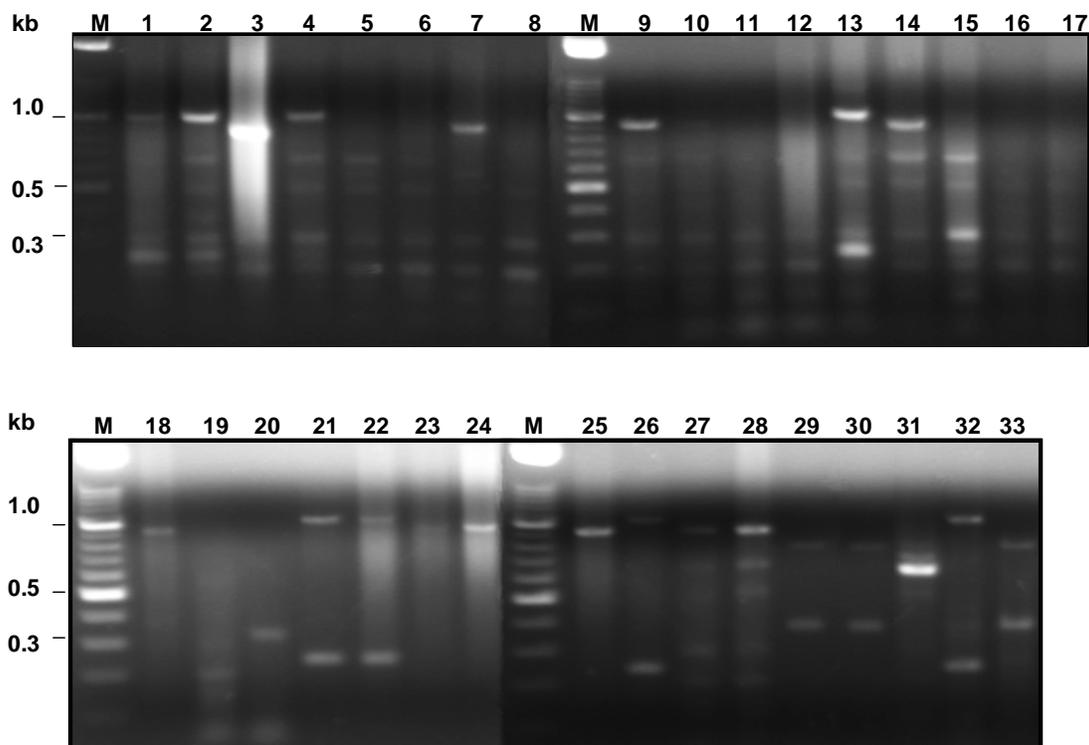
El análisis de los productos de la PCR múltiplex, con los iniciadores GiP5, de las muestras de *G. intestinalis* procedentes de artiodáctilos mostró un predominio del ensamble A-I (seis de borrego y tres de chivo) (Fig. 19). Dos aislados obtenidos por desenquistamiento *in vitro* (borrego y chivo) mostraron un perfil que correspondió al ensamble E y en seis aislados se encontró un perfil complejo que sugiere una mezcla de los genotipos (E + AI, AI + B, y AI + AII) (Tabla 5).



**Figura 19.** Análisis electroforético de los productos amplificados con la PCR-múltiplex, con los iniciadores GiP5, de aislados de *G.intestinalis* obtenidos de artiodáctilos. Ovinos (carriles 1-14) y caprinos (carriles 15-18). Escalera de 100-pb (M). Se observa mezcla de genotipos en los carriles: (1) AI+AII, (6) AI + B, (9) E +AI, (11) E+AI, (13 y 14) E + AI.

**b) Cánidos.** De mayo a octubre del 2002, se realizó otro muestreo en perros. Se analizó el intestino de 164 perros, 55 de estos (33.50%) presentaron trofozoítos de *Giardia* y de 30 de ellos se obtuvo el DNA. Dos aislados se obtuvieron por desenquistamiento *in vitro* y se analizó el DNA de los quistes obtenidos de las heces del perro (INP-CP6) (Tabla 5).

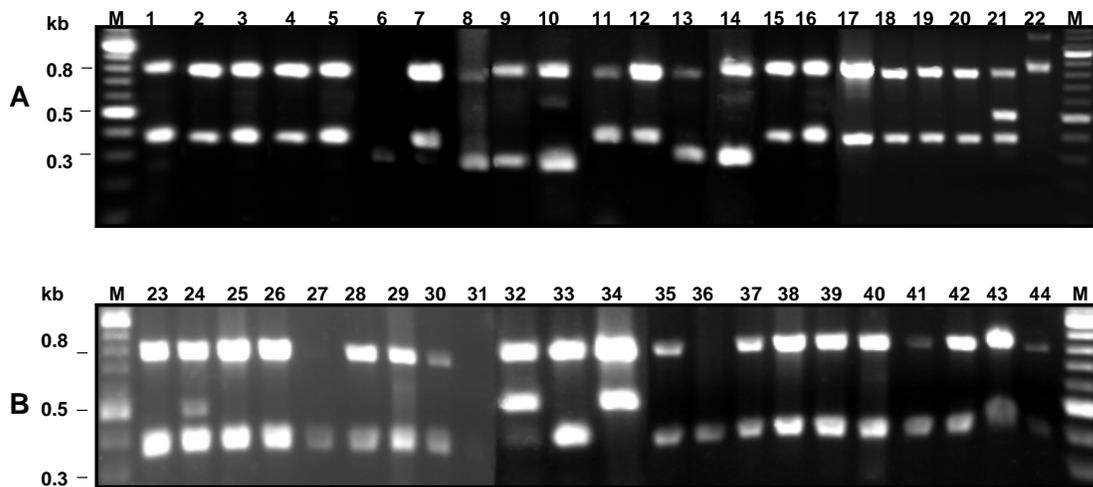
De las 30 muestras que se obtuvieron del intestino de los perros, 11 amplificaron productos correspondientes al ensamble B (295 pb), cuatro fueron del ensamble C (232+1004 pb), tres presentaron un perfil del ensamble D (895 pb) y tres del grupo All (366+ 765 pb). El patrón de bandeo de seis muestras mostró una mezcla de los genotipos D+B. Cuatro con los genotipos C+B, uno que no se pudo determinar (carril 31) y solamente una muestra sugiere infección con tres genotipos (D+B+ E) (Fig. 20).



**Figura 20.** Análisis electroforético de los productos amplificados con la PCR-múltiplex de muestras obtenidas de cánidos. (M) escalera de 100-pb. Carriles 1 al 29, DNA de trofozoítos obtenidos directamente del intestino delgado. Carriles 30 y 33 aislados (INP-CP5 e INP-PAM) previamente analizados con PCR-RFLP's y Mix-one, (genotipo All). Carril 31, DNA de trofozoítos obtenidos por desenquistamiento *in vitro* (INP-CP6) y el carril 32 DNA obtenido directamente de los quistes (INP-QCP6).

**c) Muestras de *Giardia* obtenidas de humanos.** De las 22 muestras que se obtuvieron de pacientes pediátricos y que se analizaron en este estudio, siete fueron por desenquistamiento *in vitro*, 12 por desenquistamiento *in vivo* (gerbos) y en tres casos el DNA se aisló directamente de los quistes obtenidos de las heces. Tabla 5. De estas muestras, 13 correspondieron con el grupo genético A-II (366 + 765-pb), cuatro al ensamble B3 (295+765-pb), uno fue del B (295-pb), y en uno no se pudo determinar (carril 22). Además, en tres aislados se encontró mezcla de los ensamblajes A-II+B y A-I+All (Fig. 21A) (Tabla 5).

En la Fig. 21B se muestra el patrón de bandeo de aislados obtenidos de pacientes pediátricos, que previamente se analizaron con los genes *vsp* y primers Mix-one (Ponce-Macotela *et al.*, 2002) los que mostraron predominio del ensamble A-II.



**Figura 21.** Análisis electroforético de los productos amplificados mediante PCR-múltiplex de muestras de *Giardia* obtenidas de humanos. (A) Carriles 1-3, 7, 12, 15 y 18, aislados obtenidos por desenquistamiento *in vitro*. Carriles 4, 5, 8-10, 13,14, 16,17 y 19-21, aislados obtenidos en gerbo. Carriles 6, 11 y 22 DNA obtenidos directamente de los quistes. (B) Aislados previamente analizados con PCR-RFLP's y Mix-One, excepto las muestras de los carriles 33 (obtenido de un gerbo), 34 (enquistamiento y desenquistamiento *in vitro*) y 43 (DNA de quistes). (M) escalera de 100-pb.

**Tabla 6. Frecuencia global de los ensamblados (A-G) de *G. intestinalis* a nivel mundial.**

Referencia	Huésped	Origen geográfico	<i>G. intestinalis</i>	No.	G e n o t i p o s									
					A	AI	AII	AIII	B	CyD	E	F	G	Mez
Nash <i>et al.</i> , 1985a	Humanos animales	EU	Axénico	15	13	4	9	0	2		0	0	0	0
Andrews <i>et al.</i> , 1989	Humanos	Australasia	Axénico	29	27	20	7	0	2	0	0	0	0	0
Homan <i>et al.</i> , 1992	Humanos gato	Europa, África, Asia	Axénico	43	20	19	0	0	24	0	0	0	0	0
Nahs & Mowat, 1992	Humanos animales	América, Asia	Axénico	29	29	22	7	0	0	0	0	0	0	0
Weiss <i>et al.</i> , 1992	Humanos animales	América, Asia	Axénico	35	10	4	6	0	25	0	0	0	0	0
Mayrhofer <i>et al.</i> , 1995	Humanos	Australia	Ratón lact	28	7	0	7	0	21	0	0	0	0	0
Baruch <i>et al.</i> , 1996	Humanos animales	América	Axénico	16	11	8	3	0	5	0	0	0	0	0
Ey <i>et al.</i> , 1996	Humanos animales	Suiza	Axénico	9	6	5	1	0	0	0	3	0	0	0
Monis <i>et al.</i> , 1996*	Humanos animales	Europa, África, Asia	Axénico	40	21	15	6	0	6	0	0	0	0	2
Ey <i>et al.</i> , 1997**	Artiodáctilos	Australia, Europa, Canadá	Axénico, ratón	32	15	10	?	0	0	0	17	0	0	0
Karanis & Ey, 1998	Humanos animales	Alemania	Axénico	15	13	7	6	0	2	0	0	0	0	0
Monis <i>et al.</i> , 1999	Perros	Australia, Europa, Canadá	Ratón lactante axénico	11	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0
Hopkins <i>et al.</i> , 1999***	Humanos animales	Australia, Europa, Canadá	Axénico	52	34	17	17	0	16	0	2	0	0	0
Paintlia <i>et al.</i> , 1999	Humanos	India	Axénicos	10	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Homan <i>et al.</i> , 2001	Humanos	Netherlands	Quistes	18	9	0	0	0	9	0	0	0	0	0
Read <i>et al.</i> , 2002	Humanos	Australia	Quistes	23	7	0	0	0	16	0	0	0	0	0
Van Keulen <i>et al.</i> , 2002	Humanos perros	Canadá, USA,	Quistes, axénico	32	21	0	0	0	11	0	0	0	0	0
	gatos			16	8	0	0	0	8	0	0	0	0	0
	artiodáctilos			9	6	0	0	0	3	0	0	0	0	0
	otros			6	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Ponce <i>et al.</i> , 2002	Humanos animales	México	Axénico	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cacció <i>et al.</i> , 2002****	Humanos	Italia	Quistes	22	22	0	22	0	0	0	0	0	0	0
Graczyk <i>et al.</i> , 2002	Humanos gorilas	Uganda	Quistes	30	24	0	10	2	6	0	0	0	0	1
	bovinos			3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cedillo <i>et al.</i> , 2003	Humanos	México	Axénico	26	26	26	0	0	0	0	0	0	0	0
Sulaiman <i>et al.</i> , 2003	Humanos perros	América, India	Quistes	37	6	0	0	0	31	0	0	0	0	0
****	muskkrat			15	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0
	vacunos			8	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
	castores			7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0
	rata			7	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
	conejo			1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Abe <i>et al.</i> , 2003	Perros	Japón	Quistes	4	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Apelbee <i>et al.</i> , 2003	Artiodáctilos	Canadá	Quistes	42	1	0	0	0	0	0	41	0	0	0
Traub <i>et al.</i> , 2004*****	Humanos perros	India	Quistes	29	5	3	2	0	8	0	0	0	0	4
				20	5	2	3	0	2	0	0	0	0	0
Read <i>et al.</i> , 2004	Humanos artiodáctilos	Australia	Axénicos	23	9	4	5	0	14	0	0	0	0	0
	gatos		Quistes	16	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0
	Perros			21	9	9	0	0	2	9	0	0	0	0
				9	1	1	0	0	2	6	0	0	0	0
Lalle <i>et al.</i> , 2004 *****	Humanos perros	Italia	Quistes	37	11	1	7	3	15	0	0	0	0	6
	gatos			21	6	5	0	0	0	14	0	0	0	1
	becerros			1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
				24	12	8	1	2	5	0	3	0	0	4
Traub <i>et al.</i> , 2005	Artiodáctilos	USA	Quistes	10	4	3	1	0	6	0	0	0	0	0
Lalle <i>et al.</i> , 2005	Humanos perros	México	Quistes	9	9	7	0	2	0	0	0	0	0	0
				5	5	3	0	1	0	0	0	0	0	1
Giangaspero <i>et al.</i> , 2005	Ovinos	Italia	Quistes	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Ponce <i>et al.</i> , Segunda serie	Humanos	México	Axénico, gerbo,	7	6	0	6	0	0	0	0	0	0	1
			quiste,	12	6	0	6	0	4	0	0	0	0	2
			Intestino,	2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	perros	México	Axénico, quistes	29	1	0	1	0	9	7	0	0	0	12
				3	2	0	2	0	0	0	0	0	0	1
				1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	artiodáctilos	México	Axénico, gerbo	8	3	3	0	0	0	2	0	0	0	3
				10	7	6	1	0	0	0	0	0	0	3
			Total	990	471	219	139	10	275	66	91	1	0	41

- \* 11 aislados sin genotipo.
- \*\* Cinco aislados pueden ser AI/All.
- \*\*\* Dos aislados pueden ser del ensamble E
- \*\*\*\* 10 aislados pueden ser All o Alll.
- \*\*\*\*\* Tres muestras de rata corresponden a *Giardia microti*.
- \*\*\*\*\* 11 muestras de humanos y 13 de perros sin genotipo
- \*\*\*\*\* Grupos genéticos A3, A4,A5, A6, A7, A8.

## 10.- Discusión.

Los resultados de este estudio son importantes porque se incluyen datos del primer análisis riguroso de los genotipos de aislados mexicanos de *Giardia intestinalis* publicados (Ponce-Macotela *et al.*, 2002) (Tabla 6). Son notables por dos razones. Primero, por la dominancia del subtipo A-II y la ausencia de otro genotipo. En el año 2002, de 499 aislados tipificados, solamente 59 (11.8%) se habían identificado como A-II en comparación con 100 del subtipo A-I y 115 del ensamble B. Segundo, por la identificación de tres aislados del grupo genético A-II, obtenidos de animales. Antes de esta publicación el subtipo A-II solamente se había encontrado en humanos. Con esta aportación se plantea el carácter zoonótico del grupo genético A-II y por ende la definición del ensamble A como ensamble zoonótico. En este mismo contexto Traub en el 2004, reportó al igual que nosotros que el grupo genético A-II es zoonótico; así mismo, establece la relación dueño/mascota y plantea que hay infecciones cruzadas debidas a transmisión zoonótica (Traub *et al.*, 2004) de forma similar al subtipo A-I (Tabla 6). (Nash & Mowatt, 1992; Monis *et al.*, 1996; Ey *et al.*, 1996; Ey *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 2000a).

En este estudio es importante señalar la dominancia del genotipo A-II, porque los pacientes procedían de diferentes zonas geográficas de nuestro País (D. F., Estado de México, Morelos, Michoacán y Guanajuato). Estos solamente compartían las variables: giardiasis crónica y una enfermedad de base (Tabla 2), razón por la que acudieron a un centro de atención de tercer nivel (Instituto Nacional de Pediatría). Es importante notar que los pacientes con giardiasis sintomática (11), como los pacientes con giardiasis asintomática (9) estuvieron infectados con *G. intestinalis* del grupo genético A-II. Estos resultados contrastan con los publicados por Cedillo-Rivera *et al.*, (2003) quienes también genotipificaron aislados de *Giardia* procedentes de pacientes con giardiasis sintomática (6) y

asintomática (20); en este reporte todos estuvieron infectados con *G. intestinalis* del grupo genético A-I.

Los datos de esta tesis permiten suponer que: a) el subtipo A-II está asociado a infecciones crónicas, o que b) los cuadros de base favorecen la selección del genotipo AII. Estos trabajos, el de Cedillo-Rivera y de Ponce-Macotela, al igual que otras publicaciones en donde se busca correlacionar sintomatología/grupo genético son contradictorios. Un caso similar se encuentra en los trabajos reportados por Homan y Read. En el 2001 Homan & Mank, analizaron nueve pacientes con diarrea intermitente (ensamble A) y nueve con diarrea aguda y persistente (ensamble B). En este estudio se plantea que los aislados del ensamble A y B pueden causar manifestaciones clínicas; sin embargo, consideran que los aislados del ensamble A son frecuentes en individuos asintomáticos (Homan & Mank, 2001). Estos datos concuerdan con los señalados por Paintlia *et al.*, (1999). Sin embargo, los resultados de Read *et al.*, (2002), sugieren que los aislados del ensamble A ocasionan diarrea en contraposición a lo propuesto por Homan.

Con estos resultados, se deduce, que los marcadores que se utilizaron en estos estudios (genotipos) no son los adecuados para discriminar aislados patogénicos de los no patogénicos; como se ha documentado para *Entamoeba histolytica* (patógena) y *Entamoeba dispar* (no patógena) (Diamond & Clark, 1993).

Un hecho de importancia en este trabajo, fue el que se pudo infectar a un gato a partir de un lote de quistes de *G. intestinalis* obtenidos de un paciente pediátrico. De ambos se obtuvo el cultivo axénico, INP-J10 de quistes aislados de las heces del paciente e INP-HG8 a partir de quistes aislados del gato. Así resultó interesante genotipificarlos y descubrir que ambos fueron del subtipo A-II (Tablas 2 y 3). Esto sugiere que *G. intestinalis* es un organismo eurixénico, con gran capacidad de adaptación fisiológica.

Los productos que se obtuvieron en cada ensayo son contundentes, porque se basan en la amplificación de segmentos de varios loci; la identificación de los RFLP's, que se han definido y confirmado por secuenciación y que corresponden a genotipos representativos de las sublíneas genéticas de este complejo de especies (Ey *et al.*, 1993a; Ey *et al.*, 1993b; Monis *et al.*, 1996; Monis *et al.*, 1999; Ey *et al.*, 1997). La identificación del genotipo A-II se fundamenta en la amplificación del ensayo 1, en donde el amplicón de 0.52-kb se restringió con *Pst I* y generó un doble patrón de bandeo; del ensayo 2B, el producto de 1.8-kb restringe con *Cla I*, pero no con *Kpn I*, *Hind III* o *Xba I*, y el del ensayo 2C que produce un único amplicón de 1.6-kb. La Tabla 3 resume los resultados de amplificación de los genes de las *VSP*'s, de los 22 aislados, que corresponden a la primera serie, ya registrados en el 2002.

Por otro lado, con el ensayo 3, los productos que se obtuvieron de la PCR-múltiplex, con la mezcla de oligonucleótidos MixOne [0.805-kb (*gdh*) + 0.366-kb (*VSP*)], confirmaron los resultados de los dos primeros ensayos. Hasta donde sabemos, es la primera vez que se utiliza un ensayo de PCR-múltiplex para genotipificar aislados de *Giardia* (Ponce-Macotella *et al.*, 2002) (Tabla 4).

La implementación de una nueva PCR-múltiplex, con la mezcla de iniciadores GiP5 (diseñados por el Dr. Peter L. Ey, en proceso de patente), fue extraordinariamente significativa porque permitió la identificación, en un solo paso, del genotipo de 93 de las 95 muestras analizadas (artiodáctilos, cánidos y humanos), sin necesidad de utilizar enzimas de restricción, hibridación o secuenciación; adicionalmente, se pudo detectar mezcla de genotipos. Esta es la primera vez que se realiza la genotipificación, con una mezcla de iniciadores que permite discriminar los siete genotipos predominantes (A-G) del grupo morfológico *G. intestinalis*. Otros trabajos han utilizado la PCR-múltiplex, pero, para detectar, al mismo tiempo, *Cryptosporidium* y *Giardia*, en muestras de agua y en moluscos (Kaucner & Stinear, 1998; Gómez-Couso *et al.*, 2004).

¿Por qué es necesario genotipificar a *G. intestinalis*? Este protozoario intestinal es el más reportado a nivel mundial y se le encuentra tanto en humanos como en otros mamíferos. Probablemente existen varias rutas de propagación. Para poder implementar medidas de control de la giardiasis: es necesario establecer si el hombre se puede infectar a través de rutas zoonóticas (Fig. 8). Si es así, es forzoso determinar qué animales son portadores y diseminadores potenciales de esta parasitosis. En la Tabla 6, se resume la frecuencia de los ensamblajes encontrados y registrados en la literatura internacional, a ésta se añade los resultados de los aislados analizados que corresponden a la segunda serie de esta tesis. De un total de 990 muestras, el 47.5% corresponde al ensamblaje A; existe predominio del grupo genético A-I con un 22.15%, sobre el grupo genético A-II que tiene una frecuencia del 14%.

Con la PCR-múltiple, se identificaron los siete ensamblajes (A-G) de las muestras de referencia (obsequiadas por el Dr. P. Ey) (Fig. 17). Los iniciadores GiP5 son específicos para *Giardia*, ya que no amplificaron muestras de DNA obtenidos de *Trichomonas muris*, *Cryptosporidium* spp, *Cyclospora cayetanensis* y microsporidios spp.

Se obtuvieron, por primera vez en México, aislados de *Giardia* procedentes de artiodáctilos (ovinos y caprinos), en éstos la PCR-múltiple mostró predominio del ensamblaje A (genotipo A-I), mundialmente reconocido como zoonótico (Andrews, *et al.*, 1989; Monis, *et al.*, 1996; Thompson, 2004); también se encontró el ensamblaje E, que es más específico de animales de pezuña hendida (Ey *et al.*, 1997; Monis *et al.*, 1999) y mezcla de genotipos, fundamentalmente de A-I + E. El predominio del ensamblaje A y específicamente del genotipo A-I, sugiere que estos animales (rebaños pequeños, pastoreados por campesinos de una zona del Estado de Hidalgo, México) pueden ser una fuente de infección para el hombre y/o viceversa. Este grupo genético (A-I), también se ha identificado en ovinos de Suiza, Canadá e Italia (Ey *et al.*, 1996; Ey *et al.*, 1997; Giangaspero *et al.*, 2005).

En la literatura solamente se ha reportado un aislado de *G. intestinalis* procedente de caprinos y que corresponde al ensamble E (Ey *et al.*, 1997). En este trabajo se obtuvieron cuatro aislados axénicos, tres pertenecientes al genotipo A-I y solo uno del ensamble E (Fig. 19), (Tablas 5 y 6).

Por otro lado, en muestras de bovinos de Italia, (Lalle *et al.*, 2004), reportó alta frecuencia de los Ensamblados A y B; pero, existen otros estudios en donde el ensamble E es frecuente (Appelbee *et al.*, 2003; Sulaiman *et al.*, 2003; Read *et al.*, 2004). (Tabla 6).

Es importante destacar que el método de desenquistamiento (*in vitro* o *in vivo*), en dos aislados (borrego y chivo) no afectó al genotipo. Los aislados INP-B3 (*in vitro*) e INP-B3G1 (gerbo), INP-CH69 (*in vitro*) e INP-CH69G12 (gerbo)] conservaron el mismo genotipo (A-I) (Fig. 19) (Tabla 5).

Por otro lado, con la PCR-múltiple, con los iniciadores GiP5, se detectaron mezclas de genotipos. La mezcla E+A-I se encontró en cinco muestras, en tanto que la mezcla A-I+A-II se encontró en una muestra (Tabla 5). Lalle *et al.*, (2004) también registran dos muestras obtenidas de bovinos y que presentaron mezcla de un genotipo zoonótico y un genotipo específico de artiodáctilos A-I+B (Tabla 6).

El aislado INP-B24 que se obtuvo por desenquistamiento *in vitro* y establecido en el medio TYI-S-33 presentó un patrón compatible con el ensamble E; sin embargo, el aislado INP-B24G3 que se desenquistó en un gerbo (*in vivo*) presentó un patrón que sugiere la mezcla de los genotipos E+A-I, con predominio del ensamble E (E>>A-I). Este resultado sugiere que en el proceso de desenquistamiento *in vitro*, los trofozoítos del aislado INP-B24 estuvieron sujetos a presiones de selección que eliminaron a los trofozoítos del grupo A-I (Tabla 5). Un proceso similar se observó con dos aislados desenquistados en gerbo y que procedían de una muestra de un borrego: el aislado INP-B31G1 se ubicó en el grupo genético A-II y el aislado INP-B31G3 tuvo mezcla del ensamble E y grupo genético A-I (E>>>A-I).

Los resultados sugieren que este borrego estuvo infectado con *G. intestinalis* de dos ensambles: a) del ensamble A, grupo genético A-I (zoonótico), grupo genético AI, que se ha reportado como específico de humanos, ahora también zoonótico a partir de perros (Ponce-Macotela *et al.*, 2002; Traub *et al.*, 2004) y en este trabajo identificado en borregos. b) del ensamble E, que preferentemente infecta artiodáctilos. A partir de estos datos se puede afirmar que es imposible predecir cuál es el grupo genético más susceptible a la selección negativa en el medio de cultivo TYI-S-33. Estos datos sugieren que es necesario profundizar la investigación para deducir cuáles son las variables que permiten la selección y por ende la sobre vivencia de un ensamble en particular.

Ignoramos si el proceso de manipulación enquistamiento/ desenquistamiento juega algún papel; pero, el aislado INP-B4G1 desenquistado *in vivo* pertenece al subgrupo A-I; sin embargo, cuando se sometió a un proceso de enquistamiento y desenquistamiento *in vitro* dio lugar al aislado INP-B4G1Q1, en el que se encontró una mezcla de genotipos AI+B ( $A1 > B$ ). Luego, este mismo aislado, después de un segundo enquistamiento/ desenquistamiento *in vitro* generó el aislado B4G1Q1Q1 cuyo genotipo fue A-I. Se podría sugerir que el aislado INP-B4G1 estaba constituido por una mezcla de ensambles, estando los trofozoítos del ensamble B por debajo de los límites de detección de la PCR-múltiplex, pero, más susceptibles de enquistar que la población dominante. Por esta razón estaban representados en el aislado B4G1Q1; pero, seleccionados negativamente en la segunda ronda de enquistamiento, en donde prevaleció el ensamble A (grupo genético A-I) aparentemente el mejor adaptado al medio de cultivo.

Aunque en este trabajo se analizaron pocas muestras de artiodáctilos, es importante destacar que estos animales pueden ser reservorios y diseminadores de genotipos zoonóticos. Además, estos resultados coinciden con los registros de Upcroft, J & Upcroft, P (1994) and Butcher *et al* (1994), quienes indican que la mezcla de genotipos puede ser frecuente y que el genotipo predominante puede ser resultado de presiones de selección inducidas por el hospedero y/o por el medio de cultivo TYI-S-33.

En la literatura mundial, están registrados pocos aislados axénicos de *Giardia* obtenidos de perros y mantenidos en cultivo *in vitro*: CH-C1 (Zürich, Switzerland) y FD:84-16 (Calgary, BC, Canadá) del Ensamble A, grupo AI. D-47 (Praga, Rep.Checa) y vanc/89/UBC/59 (Vancouver, BC, Canadá) del Ensamble B (Strandén *et al.*, 1990; Ey *et al.*, 1996; Monis *et al.*, 1998), los aislados mexicanos INP-CP5 e INP-PAM (Ciudad de México) del ensamble A, grupo A-II (Ponce-Macotela *et al.*, 2001).

En este estudio, de las 29 muestras de *Giardia* que se obtuvieron directamente del intestino delgado de los perros, se encontró que el ensamble D predominó en 11 muestras sobre ocho muestras del ensamble C, ambos genotipos hasta ahora, específicos de perros (Monis *et al.*, 1998). También se encontró el ensamble B (considerado zoonótico) en nueve muestras. El hallazgo de genotipos zoonóticos (A y B) en muestras de perros es consistente con otros reportes (Van Keulen *et al.*, 2002; Lalle *et al.*, 2004) (Tabla 6).

Se encontró que un perro estaba infectado con *G. intestinalis* que se identificó en el grupo genético A-II (Fig. 20) (Tabla 5). Este resultado reafirma el carácter zoonótico de subtipo A-II, también identificado en las muestras de los cultivos INP-CP5 (obtenido por resección intestinal y establecido en cultivo) e INP-PAM (logrado por desenquistamiento *in vitro*) (Ponce-Macotela *et al.* 2002). Se encontraron resultados similares en muestras de *Giardia* obtenidas de perros, de la India y analizadas mediante la secuenciación de los genes del factor de elongación 1-alfa, (*ef-1 $\alpha$* ) y triosa fosfato isomerasa. (Traub *et al.*, 2004).

Llama la atención la alta frecuencia de mezclas de los genotipos específicos de perros (C y D) con el genotipo zoonótico (B); C+B (5) y D+B (7). En la mayoría de los casos con predominio de C y D sobre B (D ó C >>>B). Fig 20., Tabla 5. Esta diferencia de predominio de un genotipo sobre otro, es reflejo de la diferencia de concentraciones de DNA y puede explicar los hallazgos de Read (2004), quien encuentra inconsistencia en la tipificación de muestras de perros, cuando usa el

gen *18S rDNA* y el gen de la *gdh*. Con el primer gen encuentran el ensamble C ó D y con el segundo gen el subtipo BIV, por tal motivo los autores sugieren que para la genotipificación de *Giardia* se utilicen varios genes (Read *et al.*, 2004). Nuestros resultados muestran que los iniciadores GiP5 son capaces de detectar estas pequeñas diferencias.

En otros trabajos, también se señalan genotipos zoonóticos, genotipos específicos de perros o infección mixta (Van Keulen *et al.*, 2002; Abe *et al.*, 2002; Sulaiman *et al.*, 2003; Lalle *et al.*, 2004). En quistes de *Giardia* obtenidos de perros de Italia, Lalle *et al.*, (2004) encontraron genotipos específicos de perros D1 (7), D2 (4), D1+D2 (2) y C (1); genotipo zoonótico, A1 (5) A8 (1) y mezcla de zoonótico y específico de perros A+D. Cuando analizó muestras de cinco perros de México, también encontró genotipos zoonóticos A1 (3), A3 (1) y mezcla de A1+B (Lalle *et al.*, 2005).

Considerando estos resultados en los cuales no se cuenta con la presión de selección del medio de cultivo, por la cual se pueden seleccionar preferentemente los genotipos del ensamble A (Andrews *et al.*, 1992; Mayrhofer *et al.*, 1995), se puede establecer que los perros son susceptibles de ser infectados por lo menos con cuatro ensambles: ensamble A con sus dos subtipos A1 (altamente zoonótico) y A11 (más específico de humanos), ensamble B (con el subtipo B IV, zoonótico) y los ensambles C y D (específicos de perros). Esto sugiere que los perros tienen dos ciclos de infección: a) transmisión de *Giardia* con genotipos específicos de perros y b) transmisión zoonótica de genotipos de los ensambles A, B (Ponce-Macotela *et al.*, 2005). El resultado es interesante, debido a que en el sur de la Ciudad de México la frecuencia de la giardiasis en perros es muy alta, hasta del 51% (Ponce-Macotela *et al.*, 2005). Por esta razón, es necesario promover campañas encaminadas a evitar el fecalismo de los perros en los parques, jardines o camellones y de esta forma prevenir la contaminación de alimentos y agua con heces de perros.

En un estudio anterior señalamos el predominio del genotipo A-II en aislados axénicos de *Giardia* obtenidos de pacientes pediátricos (Ponce-Macotela *et al.*, 2002). Ahora, en este segundo estudio, también dominó el genotipo A-II, en seis aislados que se obtuvieron por desenquistamiento *in vitro* y en seis de 12 que se obtuvieron por inoculación en gerbos (*in vivo*). Adicionalmente, se encontró cuatro aislados con genotipo B3; dos aislados con la mezcla de los genotipos A-II+B, y un aislado con la mezcla A-I+A-II. Hasta donde sabemos, es la primera vez que en México se encuentra el ensamble B en aislados de *G. intestinalis* de origen humano. Otros autores que han analizado muestras de pacientes mexicanos solo encuentran el genotipo A-I y/o A3 (Cedillo-Rivera *et al.*, 2003; Lalle *et al.*, 2005). La frecuencia del ensamble B en la literatura mundial es del 27.7% (Tabla 6).

Durante mucho tiempo se ha planteado que el medio de cultivo favorece la selección de trofozoítos con genotipos del ensamble A; sin embargo, en muestras de DNA de quistes y de sus cultivos establecidos a partir de trofozoítos desenquistados *in vitro* o *in vivo* se conservó el subtipo A-II [(INP-QJAR e INP-JAR); (INP-QMAG e INP-MAG); (INP-HSP, INP-HSPG1 e INP-HSPG2) y (INP-H14, INP-H14G2, INP-H14G3)] (Tabla 5).

Por otro lado, en aislados obtenidos de pacientes se encontró mezcla de los genotipos AI+AII y AII+B. En otros trabajos también se han reportado infecciones mixtas: AI+AII y A+B3 (Lalle *et al.*, 2004).

Al momento, ignoramos cuáles son las variables que favorecen el predominio del genotipo A-II sobre el genotipo AI, como en el caso del aislado INP-N2 o del genotipo A-I sobre el genotipo A-II como fue el caso del aislado INP-J10 (Tabla 5). Sin embargo, en el último caso, el proceso de enquistamiento y desenquistamiento *in vitro* favoreció el dominio del genotipo A-I. Puede especularse que este tipo de intervención favorece re-arreglos genómicos (Le Blanq., 1992; Carnaby *et al.*, 1994) que potencian alguna ventaja selectiva en trofozoítos que de otra manera se mantendrían sub-representados en la población. Estos resultados evidencian la

necesidad de profundizar la investigación en el apasionante tema de *Giardia* y giardiasis.

## 11.- Conclusiones.

1.- Se contribuyó en el contexto internacional al conocimiento de los genotipos de *Giardia intestinalis*, al describir por primera vez al grupo genético A-II como un subtipo potencialmente zoonótico, cambiando el concepto de grupo genético A-II como específico de humanos.

2.- El resultado que se obtuvo mediante la PCR-RFLP de los genes de proteínas variables de superficie fue claro; sin embargo, no permite la caracterización de todos los ensamblajes (A-G). Por otro lado, la PCR-múltiple, con los iniciadores GiP5 si detecta a los siete ensamblajes (A-G) y este permitió en un solo paso, caracterizar al 97.91 % de las muestras analizadas en este trabajo, y además se pudieron detectar mezclas de genotipos.

3.- En muestras obtenidas de humanos (desenquistadas *in vitro* o *in vivo*) se encontró predominio del ensamblaje A (grupo genético AII). También se detectó el ensamblaje B (grupo genético B3), y se encontró mezcla de genotipos (AI+AII y AII+B).

4.- Un gato fue susceptible a la infección con quistes de *Giardia* obtenidos de un paciente pediátrico y conservó el mismo genotipo [INP-HG8 (grupo AII), INP-J10 (grupo AII)], Por otro lado, los dos perros de la primera serie (resección intestinal y desenquistamiento *in vitro*), también fueron del grupo AII. Estos resultados sugieren que el grupo AII es potencialmente zoonótico.

5.- Las muestras de *G. intestinalis* obtenidas directamente del intestino de los perros del antirrábico, mostraron ensamblajes específicos de perro (C y D). Además, es muy importante resaltar que también presentaron el ensamblaje B, (zoonótico).

6.- En animales de granja, fue significativo encontrar predominio del genotipo AI (zoonótico), por lo que, es necesario considerar que estos animales son diseminadores de quistes de *G. intestinalis* a los seres humanos, modificándose la concepción epidemiológica de la giardiasis.

7.- Los resultados evidencian la necesidad de buscar nuevos marcadores para discriminar y caracterizar a los aislados potencialmente patógenos para los seres humanos.

## 12.- Anexo.

### Solución salina fosfatos (SSF) pH 7.2-7.4.

NaCl	6.5 g.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.8 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4 g.

Se aforó a 1000 mL, se midió el pH y se esterilizó por autoclave.

### Solución salina balanceada de Hank (SSBH). 10X 1000 ml.

CaCl anhidro	140 .0 mg.
KCl	400.0 mg.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60.0 mg.
MgSO <sub>4</sub>	97.70 mg.
NaCl	8000.0 mg.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	48.0 mg
NaHCO <sub>3</sub>	350 mg.

Todos los reactivos, excepto el bicarbonato de sodio se disolvieron en 800 mL de agua desionizada con la ayuda de un agitador magnético, se aforó a 1000 mL y se esterilizó por filtración.

La SSBH se utilizó para el desenquistamiento: el pH se llevó a 7.4 con bicarbonato de sodio y después el pH se bajó a 2.0 con ácido clorhídrico.

### Medio de cultivo TYI-S-33 complementado con suero. (500 ml).

Trypticase.	10.0 g.
Extracto de levaduras.	5.0 g.
Glucosa.	5.0 g.
Bilis bovina.	500.0 mg.
NaCl.	1.0 g.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .	500.0 mg.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .	300.0 mg.
Cisteína.	1.0 g.
Acido ascórbico.	100 .0 mg.
Citrato férrico de amonio.	15.0 mg.

La mezcla de reactivo se disolvió en 400 mL de agua desionizada, el pH se ajustó a 7.0 con hidróxido de sodio 1.0 N y se aforó en un matraz de 500 ml. Se prefiltró con una membrana de 0.4 µM, en ambiente no estéril, después se filtró (membrana de 0.22 µM), bajo condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar. El medio se complementó con 10 % de suero humano o fetal de ternera.

### **Mezcla de ficoll (Stop Mix) 35 ml.**

Ficoll.	12.25 g. 35 %
SDS.	0.175.g. 0.5%.
Azul de bromofenol.	0.035 g. 0.1%. 50 pares de bases (pb)
Xilencianol.	0.035 g. 0.1% . 400 pb.

La mezcla se calentó a 45°C hasta disolver el ficoll y se almacenó a temperatura ambiente. Esta mezcla sirvió para cargar las muestras con DNA en el gel submarino.

### **Solución de Bromuro de Etidio (BrE) 10 mg/ml.**

Este reactivo se usó para visualizar ácidos nucleicos (DNA, RNA) ya que emite fluorescencia cuando se excita con una longitud de onda de 250 a 310 nm.

Bromuro de Etidio.	50.0 mg.
Agua desionizada esterilizada.	5.0 ml.

Se manejó con guantes y se evitó la inhalación, ya que este reactivo es altamente mutagénico y produce daño irreversible. Se colocó en un frasco de color ambar, se mezcló y se almacenó a 4°C hasta su uso.

### **Tris 2.0 M, 1000 mL a pH 7.4.**

H <sub>2</sub> O.	850.0 ml.
Tris base.	242.2 g.
HCl (concentrado).	5.0 ml.

El tris se vació en un vaso de 1000 ml, se agregó el agua, se fue adicionando el ácido clorhídrico, lenta y cuidadosamente, se mezcló con la ayuda de un agitador magnético, se ajustó el pH y se aforó a 1000 ml.

### **EDTA. 0.5 M.( Sal disódica del ácido etilendiamina tetraacético).**

EDTA-Na <sub>2</sub> :2 H <sub>2</sub> O.	93.05 g.
H <sub>2</sub> O desionizada.	Aforar a 500 ml.

El EDTA se vació en un vaso de 600 mL, se agregó 300 ml de agua, se ajustó el pH a 8.0 con NaOH 10 M, se aforó y se esterilizó por autoclave.

### **Amortiguador TE (Tris/EDTA) 100 ml.**

Tris 10.0 mM pH 7.4.	500.0 ml del concentrado de 2.0 M.
EDTA 0.1 mM pH 8.0.	20.0 ml del concentrado de 0.5 M.
H <sub>2</sub> O	99.48 ml.

Se esterilizó por autoclave y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

### **Cloruro de sodio (NaCl) 5.0 M.**

NaCl. 292.2 g.

H<sub>2</sub>O desionizada. 1000.0 ml

Se disolvió la sal en 700 ml de agua, posteriormente se aforó a 1000 ml y se esterilizó por autoclave.

### **Hidróxido de sodio (NaOH) 10.0 M.**

NaOH. 200 g.

H<sub>2</sub>O desionizada. 500.0 ml

Se disolvió la sal con la ayuda de un agitador magnético en 450 ml de agua, se aforó a 500 ml y se esterilizó con autoclave.

### **Duodecil sulfato de sodio (SDS) 10%.**

SDS. 100.0 g.

H<sub>2</sub>O desionizada. 100.0 ml.

El SDS se disolvió con agua desionizada previamente esterilizada, evitando la inhalación del reactivo.

### **Acetato de sodio 3.0 M.**

Acetato de sodio 3H<sub>2</sub>O. 40.8 g.

Agua desionizada. 100 ml

El acetato de sodio se colocó en un vaso de 250 ml, se agregó 80 ml de agua, se ajustó el pH a 7.0 con ácido acético, se aforó a 100 ml y se esterilizó por filtración.

### **Amortiguador de tris Boratos con sal Disódica del Ácido Etilendiamina Tetraacético. (TBE 20X) 1000 ml.**

Tris base (1.0M). 121.0 g.

Acido Bórico (1.0M). 61.7 g.

EDTA-Na<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O (20.0 mM) 7.44 g.

H<sub>2</sub>O desionizada. 1000.0 ml.

Los reactivos se disolvieron en 800 ml de agua previamente esterilizada con autoclave, se aforó a 1000.0 ml y se almacenó a temperatura ambiente.

### **Fenol saturado.**

Fenol. 500.0 ml a 68°C.

H<sub>2</sub>O 330.0 ml.

Tris HCl. 1.0 M, pH 8.0 5.6 ml.

NaOH 10.0 M. 488 .0 ml

8-hidroxiquinoína 500.0 mg.

El agua, tris e hidróxido se vaciaron al frasco de fenol, se dejó que se disolviera, después se agregó la hidroquinoleína, se mezcló y se almacenó a temperatura ambiente.

### **Proteínasa K.**

Proteínasa K. 10.0 mg.  
TE. 1.0 ml.

La proteínasa K se disolvió en 1.0 ml de TE, se dividió en 10 partes (100.0 ml) y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Solución de lisis. 5.0 ml.**

Reactivo.	Concentrada.	Necesaria.	Tomar.
Tris pH7.4	2.0 M.	10.0 mM	25.0 $\mu\text{l}$
EDTA.	0.5 M.	10.0 mM	100.0 $\mu\text{l}$ .
NaCl.	5.0 M.	50.0 mM.	150.0 $\mu\text{l}$ .
SDS.	10.0 %.	0.4 %	200.0 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O			4525.0 $\mu\text{l}$ .
Proteínasa K.	10.0 mg/ml	200.0 $\mu\text{g/ml}$ .	20.0 $\mu\text{l}$ .

En este orden se disolvieron los primeros cuatro reactivos, se aforó a 5.0 ml con agua desionizada y esterilizada.

La proteínasa K se agregó al tubo que tiene las células con la solución de lisis.

### **RNAsa A.**

RNAsa A. 10.0 mg.  
TE. 1.0 ml.

La RNAsa A se disolvió en 1.0 ml de TE, se dividió en 10 partes iguales (100.0  $\mu\text{l}$ ) y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Minigel de Agarosa al 0.8% en 30 ml de amortiguador TBE (Tris Boratos EDTA).**

Agarosa. 240.0 mg.  
TBE. 30.0 ml.  
BrE. 0.5 ml.

La agarosa se fundió en amortiguador TBE, se dejó a que enfriara a  $60^{\circ}\text{C}$ , se agregó el BrE, se mezcló evitando la formación de burbujas, se vació al molde del minigel y se dejó a  $4^{\circ}\text{C}$  para que gelificara.

## 13.- Referencias.

- Abe N, Kimata I, Iseki M. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolated from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. J Vet Med Sci. 2003;65:29-33..
- Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev. 2001; 14:447-75.
- Al-Waili NS, Al-Waili BH, Saloom KY. Therapeutic use of mebendazole in giardial infections. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1988;82:438.
- Andrews RH, Adams M, Boreham PFL, Mayrhofer G, Meloni BP. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. Int J Parasitol. 1989;19:183-90.
- Andrews RH, Chilton NB, Mayrhofer G. Selection of specific genotypes of *Giardia intestinalis* by growth in vitro and in vivo. Parasitol. 1992;105:375-86.
- Ankli A, Heinrich M, Bork P, Wolfram L, Bauerfeind P, Brun R, Schmid C, Weiss C, Bruggisser R, Gertsch J, Wasescha M, Sticher O. Yucatec mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. J Ethnopharmacol. 2002;79:43-52.
- Appelbee AJ, Frederick LM, Heitman TL, Olson ME. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. Vet Parasitol. 2003;112:289-94.
- Arguello-Garcia R, Arguello-López C, González-Robles A, Castillo-Figueroa AM, Ortega-Pierres MG. Sequential exposure and assembly of cyst wall filaments on the surface of encysting *Giardia duodenalis*. Parasitology. 2002, 123; 209-219.
- Arrowood MJ, Sterling CR. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using sucrose and isopycnic percoll gradients. J Parasitol. 1987;73:314-9.
- Astiazarán-García H, Espinosa-Castellano M, Castañón G, Chávez-Munguía B, Martínez-Palomo A. *Giardia lamblia*: effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the growth of gerbils (*Meriones unguiculatus*). Exp Parasitol. 2000;95:128-35.
- Baruch AC, Isaac-Renton J, Adam RD. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. J Infect Dis. 1996;174:233-6.

- Bhatia VN & Warhurst DC. Hatching and subsequent cultivation of cyst of *Giardia intestinalis* in Diamond's medium. J Trop Med Hyg. 1981;84:45-6.
- Bell CA, Dykstra CH C, Naiman NA, Cory M, Fairley TA, Tidwell RR. Structure-activity studies of dicationically substituted Bis-Benzimidazoles against *Giardia lamblia*: Correlation of anti-giardial activity with DNA binding affinity and giardial topoisomerase II inhibition. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37:2668-73.
- Belosevic M, Faubert GM, Maclean JD. Disaccharidase activity in the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*. Gut. 1989;30:1213-9.
- Benchimol M. The release of secretory vesicle in encysting *Giardia lamblia*. FEMS Microbiol Letters. 2004;235:81-7.
- Bingham AK, Meyer EA. *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. Nature. 1979;277:301-2.
- Boreham PFL, Upcroft JA, Upcroft P. Changing approaches to the study of *Giardia* epidemiology:1681-2000. Int J Parasitol. 1990;20:479-90.
- Buret AG, Mitchell K, Muench DG, Scott KGE. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. Parasitol. 2002;125:11-9.
- Butcher PD, Cevallos AM, Carnaby S, Alstead EM, Swarbrick ET, Farthing MJG. Phenotypic and genotypic variation in *Giardia lamblia* isolates during chronic infection. Gut. 1994;35:51-4.
- Cacció SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the b-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int J Parasitol. 2002;32:1023-30.
- Calzada F, Cervantes-Martínez JA, Yépez-Mulia L. In vitro antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. J Ethnopharmacol. 2005;98:191-3.
- Calzada F, Meckers M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Contreras A, Mata R. Screening of mexican medicinal plants for antiprotozoal activity. Pharmaceutical Biol. 1998;36:305-9.
- Carnaby S, Katelaris PH, Naeem A, Farthing MJG. Genotypic heterogeneity within *Giardia lamblia* isolates demonstrated by M13 fingerprinting. Infect Immun. 1994;62:1875-80.

- Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev.* 1998;73: 203-66.
- Cedillo-Rivera R, Chávez B, González-Robles A, Tapia A, Yépez-Mulia L. In vitro effect of nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J Eukaryot Microbiol.* 2002;49:201-8.
- Cedillo-Rivera R, Darvy JM, Enciso-Moreno JA, Ortega-Pierres, Ey PL. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. *Parsitol Res.* 2003; 99:119-23.
- Cedillo-Rivera R, Enciso-Moreno JA, Martínez-Palomo A, Ortega-Pierres G, *Giardia lamblia*: isoenzyme analysis of 19 axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989; 83:644-6.
- Cifuentes E, Gomez M, Blumenthal U, Tellez-Rojo MM, Romieu I, Ruiz-Palacios G, Ruiz-Velazco S. Risk factors for *Giardia intestinalis* infection in agricultural villages practicing wastewater irrigation in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62:388-92.
- Craft JC, Murphy T, Nelson JD. Furazolidone and quinacrine. *Am J Dis Child.* 1981;135:164-6.
- Chadee K, Ndarathi C, Keller K. Binding of proteolytically-degraded human colonic mucin glycoproteins to the Gal/GalNAc adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Gut.* 1990;31:890-5.
- Chávez V, Cedillo-Rivera R, Martínez-Palomo A. *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the in vitro effect of benzimidazoles. *J Protozool.* 1992;39:510-515.
- Chávez V, González-Mariscal L, Cedillo-Rivera R, Martínez-Palomo A. *Giardia lamblia*: In vitro cytopathic effect of human isolates. *Exp Parasitol.* 1995;80:133-8.
- Chen N, Upcroft JA, Upcroft P. *Giardia duodenalis* gene encoding multiple repeats of a toxin homologue. *Parasitol.* 1995;111:423-31.
- Chester AC, Macmurray FG, Restifo MD, Mann O. Giardiasis as a chronic disease. *Dig Dis Sci.* 1985;30:215-8.
- Chin AC, Teoh DA, Scott KGE, Meddings JB, Macnaughton WK, Buret AG. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun.* 2002;70:3673-80.

- De Haro-Arteaga I, Salazar-Schettino PA, Cabrera-Bravo M. Diagnóstico morfológico de las parasitosis. Méndez Editores. Segunda Edición. ISBN 968-6596-51-8. 1995.
- Deselliers LP, Tan DTM, Scott RB, Olson ME. Effects of *Giardia lamblia* infection on gastrointestinal transit and contractility in Mongolian gerbils. Dig Dis Sci. 1997;42:2411-9.
- Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica* – like amebae. J Parasitol. 1968;54:1047-56.
- Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Euk Microbiol. 1993;40:340-4.
- Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1978;72:431-2.
- Díaz E, Mondragón J, Ramírez E, Bernal RM. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. Am J Trop Med Hyg. 2003;68:384-5.
- Eckmann, L. Mucosal defences against *Giardia*. Parasite Immunol. 2003;25: 259-270.
- Eckmann L, Gillin FD. Microbes and microbial toxins: Paradigms for microbial mucosal interactions. I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001;280:G1-G6.
- Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, Gillin FD. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. J Immunol. 2000;164:1478-87.
- El-Shewy KA, Eid RA. In vivo killing of *Giardia* trophozoites harbouring bacterial endosymbionts by intestinal paneth cell: an ultrastructural study. Parasitol. 2005;130:269-74.
- Erlandsen SL, Bemrick WL. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. J Parasitol. 1987;73:623-9.
- Erlandsen SL, Bemrick WL, Wells CL, Feely DE, Knudson LI, Campbell SR, Van Keulen H, Jarroll EL. Axenic culture and characterization of *Giardia*

- ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). J Parasitol. 1990;76:717-24.
- Ey PL, Andrews RH, Mayrhofer G. Differentiation of major genotypes of *Giardia intestinalis* by polymerase chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoite surface antigen. Parasitol. 1993a;106:347-56.
- Ey PL, Bruderer T, Wehrli C, Köhler P. Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analyses of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia. Parasitol Res. 1996;82:52-60.
- Ey PL, Darby JM, Andrews RH, Mayrhofer G. *Giardia intestinalis*: detection of major genotypes by restriction analysis of gene amplification products. Int. J. Parasitol. 1993b;23: 591-600.
- Ey PL, Darby JM, Mayrhofer G. Comparison of *tsa417*-like variant-specific surface protein (VSP) genes in *Giardia intestinalis* and identification of a novel locus in genetic Group II isolates. Parasitology. 1998;117:445-55.
- Ey PL, Darby JM, Mayrhofer G. A new locus (*vsp417-4*) belonging to the *tsa417*-like subfamily of variant-specific surface protein genes in *Giardia intestinalis*. Mol Biochem Parasitol. 1999;99:55-68.
- Ey PL, Khanna K, Andrews RH, Manning PA, Mayrhofer G. Distinct genetic groups of *Giardia intestinalis* distinguished by restriction fragment length polymorphisms. J Gen Microbiol. 1992;138: 2629-37.
- Ey PL, Mansouri M, Kulda J, Nohýnková E, Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. J. Eukar. Microbiol. 1997;44:626-35.
- Farthing MJG. The molecular pathogenesis of giardiasis. J Pediatric gastroenterol Nutr. 1997;24:79-88.
- Farthing MJG, Pereira MEA, Keusch GT. *Giardia lamblia*: evaluation of roller bottle cultivation. Exp Parasitol. 1982;54:410-5.
- Farthing MJG, Pereira MEA, Keusch GT. Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*. Infect Immun. 1986;51:661-7.
- Farthing MJG, Varon SR, Keusch GT. Mammalian bile promotes growth of *Giardia lamblia* in axenic culture. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1983;77:467-9.
- Faubert GM. The immune response to *Giardia*. Parasitology Today. 1996;12:140-5.

- Faubert GM. Immune response to *Giardia duodenalis*. Clin Microbiol Rev. 2000;13:35-54.
- Feely DE. A simplified method for in vitro excystation of *Giardia muris*. J Parasitol. 1986;72: 474-5.
- Feely DE, Chase DG, Hardin EL, Erlandsen SL. Ultrastructural evidence for the presence of Bacteria, viral-like particles, and Mycoplasma-like organisms associated with *Giardia* spp. J Protozool. 1988;35:151-8.
- Feely DE, Dyer JK. Localization of acid phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. J Protozool. 1987;34:80-83.
- Feely DE, Gardner MD, Hardin EL. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. J Parasitol. 1991;77:441-8.
- Feely DE, Holberton DV, Erlandsen SL. The biology of *Giardia*. In Meyer EA. Giardiasis. Elsevier Science Publishers B.V 1990: 11-49.
- Feely DE, Schollmeyer JV, Erlandsen SL. *Giardia* spp. Distribution of contractile proteins in the attachment organelle. Exp Parasitol. 1982;56:145-54.
- Filice FP. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. Univ Cal Publ Zool. 1952;57:53-146.
- Freeman CD, Klutman NE, Lamp KC. Metronidazole. A therapeutic review and update. Drugs. 1997; 54:679-708.
- Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis. Clin Microbiol Rev. 2001;14:114-28.
- Giangaspero A, Paoletti B, Iorio R, Traversa D. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from sheep in central Italy. Parasitol Res. 2005;96:32-37.
- Gillin FD, Diamond LS. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. Exp Parasitol. 1981a;52:9-17.
- Gillin FD, Diamond LS. Clonal growth of *Giardia lamblia* trophozoites in semisolid agarose medium. J Parasitol. 1980;66:350-2.
- Gillin FD, Diamond LS. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: growth responses to reducing agents. Exp Parasitol. 1981b;51:382-91.

- Gillin FD, Reiner DS, Boucher SE. Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Infection Immunity*. 1988;56:705-7.
- Gillin FD, Reiner DS, Mc Caffery M. Organelles of protein transport in *Giardia lamblia*. *Parasitology Today*. 1991;7: 113-6.
- Gilman RH, Marquis GS, Miranda E, Vestegui M, Martínez H. Rapid reinfection by *Giardia lamblia* after treatment in a hyperendemic third world community. *Lancet*. 1988;13:343-5.
- Gómez-Couso H, Freire-Santos F, Amar CFL, Grant KA, Williamson K, Ares-Mazás ME, Mc Lauchlin J. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplex nested-PCR. *Int J Food Microbiol*. 2004:
- Gordts B, Retoré P, Cadranel S, Hemelhof W, Rahman M, Butzler. Routine culture of *Giardia lamblia* trophozoites from human duodenal aspirates. *Lancet*. 1984;21:137-8.
- Graczyk TK, Bosco-Nizeyi J, Ssebide B, Thompson RCA, Read C, Cranfield MR. Anthropozoonotic *Giardia duodenalis* genotype (assemblage) A infections in habitats of free-ranging human-habituated gorillas, Uganda. *J Parasitol*. 2002;88:905-9.
- Hare DF, Jarroll EL, Lindmark DG. *Giardia lamblia*: Characterization of proteinase activity in trophozoites. *Exp Parasitol*. 1989;68:168-75.
- Harris JC, Plummer S, Lloyd D. Antigiardial drugs. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001;57:614-9.
- Harris JC, Plummer S, Turner MP, Lloyd D. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: *Allium sativum* (garlic) is an effective anti-giardial. *Microbiology*. 2000;146:3119-27.
- Hill DR. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infect Dis Clin North Am*. 1993;7:503-25.
- Hoque ME, Hope VT, Scragg R, Kjellström T, Lay-Yee R. Nappy handling and risk of giardiasis. *Lancet*. 2001;357:1017-8.
- Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. 2001;31:822-6.
- Homan WL, van Enckevort FHJ, Limper L, van Eys GJJM, Schoone GJ, Kasprzak W, Majewska AC, van Knapen F, Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and DNA probes. *Parasitol. Res*. 1992;78: 316-23.

- Hopkins RM, Constantine CC, Groth DA, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RCA, PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. Parasitol. 1999;118:531-39.
- Ishikawa N, Horri Y, Nawa Y. Immune-mediated alteration of the terminal sugars of globet cell mucins in the small intestine of *Nippostrongylus brasiliensis*-infected rats. Immunology. 1993;78:303-7.
- Issac-Renton JL, Cordeiro C, Sarafis K, Shahriari H. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. J Infect Dis. 1993;167:431-40,
- Jarroll EL, Muller PJ, Meyer EA, Morse SA. Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. Mol Biochem Parasitol. 1981; 2:187-96.
- Jokipii L, Jokipii AMM. Treatment of giardiasis: comparative evaluation of ornidazole and tinidazole as a single oral dose. Gastroenterol. 1982;83: 399-404.
- Johnson PJ. Metronidazole and drugs resistance. Parasitol Today. 1993;9: 183-86.
- Jung-Hsiang T, Shiou-Jeng O, Shu-Chen Ch, Huei-Min S. Giardivirus enters *Giardia lamblia* WB trophozoites via endocytosis. Exp Parasitol. 1993;76:165-74.
- Kamath KR, Murugasu R. A comparative study of four methods for detecting *Giardia lamblia* in children with diarrheal disease and malabsorption. Gastroenterol. 1974;66:16-21.
- Karanis P, Ey PL. Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. Parasitol Res. 1998;84:442-9.
- Karapetyan A. In vitro cultivation of *Giardia duodenalis*. J Parasitol. 1962;48:337-40.
- Kasper LI H, Buzoni-Gatel D. Ups and Downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. Infect Immun. 2001;69: 1-8.
- Kasprzak W, Majewska AC. Isolation and axenic growth of fresh *Giardia intestinalis* strains in TPS-1 medium. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1983;77:223-4.
- Katellaris PH, Farthing MJG. Diarrhoea and malabsorption in giardiasis: A multifactorial process?. Gut .1992; 33:295-7,

- Katellaris PH, Naeem A, Farthing MJG. Attachment of *Giardia lamblia* trophozoites to a cultured human intestinal cell line. *Gut*. 1995;37:512-8.
- Katellaris PH, Seow F, Ngu MC. The effect of *Giardia lamblia* trophozoites on lipolysis in vitro. *Parasitol*. 1991; 103:35-9.
- Kaucner Ch, Stinear T. Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large-volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription –PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:1743-9.
- Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 1983;77:487-8.
- Korman SH, Le Blancq SM, Deckelbaum RJ, Van der Ploeg LH. Investigation of human giardiasis by karyotype analysis. *J Clin Invest*. 1992;89:1725-33.
- Kulda J, Nohýnková E. *Giardia* in humans and animals, In P- P- Kreier, ed. *Parasitic protozoa*. Academic Press, San Diego. 1995; pp 225-42.
- Lalle M, Jiménez CE, Cacció SM, Pozio E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a b-giardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol*. 2005;91: 203-5.
- Lalle M, Pozio E, Cappelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacció SM. Genetic heterogeneity at the b-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol*. 2004;35:207-13.
- Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol*. 2002;28:123-47.
- Le Blancq SM, Korman SH, Van der Ploeg LHT. Spontaneous chromosome rearrangements in the protozoan *Giardia lamblia*: estimation of mutation rates. *Nucleic Acids Res*. 1992;20:4539-45.
- Lengerich EJ, Addiss DG, Juranek DD. Severe giardiasis in the United States. *Clin Infect Dis*. 1994;18:760-3.
- Lev B, Ward H, Keusch GT, Pereira MEA. Lectin activation in *Giardia lamblia* by host protease: A novel host-parasite interaction. *Science*. 1986;232:71-3
- Levi GC, de Ávila CA, Neto VA. Efficacy of various drugs for treatment of giardiasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1977;26:564-5.
- Linnane E, Roberts R, Looker N. Nappies and transmission of *Giardia lamblia* between children. *Lancet*. 2001;358:507.

- Liu SM, Brown DM, O'Donoghue P, Upcroft P, Upcroft JA. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. Mol Biochem Parasitol. 2000;108:137-40.
- Lo Galbo PR, Sampson HA, Buckley RH, Durham NC. Symptomatic giardiasis in three patients with X-linked agammaglobulinemia. J Pediatr. 1982;101:78-80.
- Lujan HD, Mowatt MR, Nash TE. Lipid requirements and lipid uptake by *Giardia lamblia* trophozoites in culture. J Euk Microbiol. 1996;43:237-42.
- Luján HD, Mowatt MR, Nash TE. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. Microbiol Mol Biol Rev. 1997; 61:294-304
- Luján HD, Mowatt MR, Nash TE. The molecular mechanisms of *Giardia* encystation. Parasitology Today. 1998; 14:446-50.
- Luján HD, Mowatt MR, Wu JJ, Lu Y, Lees A, Chance MR, Nash TE. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its methal-binding properties. J Biol Chem. 1995; 270:13807-13.
- Marshall MM, Naumovits D, Ortega Y, Sterling Ch R. Waterborne protozoan pathogens. Clin Microbiol Rev. 1997;10:67-85.
- Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. Division of *Giardia* isolates from human into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. Parasitol. 1995;111:11-17.
- Meloni BP, Lymbery AJ, Thompson RC. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from human and felines. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1988;38:65-73.
- Meloni BP, Thompson RCA, Hopkins RM, Reynoldson JA, Graceey M. The prevalence of *Giardia* and other intestinal parasites in children, dogs and cat from aboriginal communities in the Kimberly. Med J Austr. 1993; 158:157-9.
- Meloni BP, Thompson RCA, Reynoldson JA, Seville P. Albendazole: a more effective anti-giardial agent in vitro than metronidazole or tinidazole. Trans Roy Trop Med Hyg. 1990;84:375-9.
- Mendelson RM. The treatment of giardiasis. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1980;74:438-9
- Meyer EA. Isolation and axénico cultivation of *Giardia* trophozoites from the rabbit, chinchilla and cat. Exp. Parasitol. 1970;27:179-83.

- Meyer EA. *Giardia lamblia*: Isolation and axénico cultivation. Exp. Parasitol. 1976;39:101-5.
- Miller HRP. Gastrointestinal mucus, a medium for survival and for elimination of parasitic nematodes and protozoa. Parasitology. 1987;94:S77-S100.
- Mineno T & Avery MA. Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. Current Pharmaceutical Desing. 2003; 9:841-55.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. Mol Biol Evol. 1999;16:1135-1144.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Isaac-Renton JL, Ey PL. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. Parasitol. 1998;116:7-19.
- Monis PT, Mayrhofer G, Andrews RH, Homan WL, Limper L, Ey PL. Molecular genetics analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. Parasitol. 1996;112:1-12.
- Moss DM, Visvesvara GS, Mathews HM, Ware DA. Isoenzyme comparison of axenic *Giardia lamblia* strains. Protozool. 1992;39: 559-64.
- Mowatt MM, Aggarwal A, Nash TE. Carboxy-terminal sequence conservation among variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia*. Mol Biochem Parasitol. 1991;49:215-27.
- Mowatt MR, Luján HD, Cotton DB, Bowers B, Yee J, Nash TE, Stibbs H. Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. Mol Microbiol. 1995;15:955-63.
- Murphy TV, Nelson JD. Five v ten day therapy with furazolidone for giardiasis. Am J Dis Child. 1983;137:267-70.
- Nain CK, Dutt P, Vinayak VK. Interactions in enzymatic activities of the intestinal mucosa during the course of *Giardia lamblia* infection in mice. Ann Trop Med Parasitol. 1991;85:515-22.
- Nash TE, Keister DB. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. J Infect Dis. 1985a;152:1166-71.
- Nash TE, McCutchan T, Keister D, Dame JB, Conrad JD, Gillin FD. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. J Infect Dis. 1985b;152: 64-73.
- Nash TE, Mowatt MR. Identification and characterization of a *Giardia lamblia* group-specific gene. Exp Parasitol. 1992;75:369-78.

- Nash TE, Mowatt MR. Variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia* are zinc-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90:5489-93.
- Narcisi EM, Paulin JJ, Fechheimer M. Presence and localization of vinculin in *Giardia*. *J Parasitol.* 1994;80:468-73.
- Ortega YR, Adam RD. *Giardia*: Overview and update. *Clin Infect Dis.* 1997;25:545-50.
- Owen RL. The ultrastructural basis of *Giardia* function. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1980; 74:429-33.
- Oxberry ME, Reynoldson JA, Thompson RCA. The binding and distribution of albendazole and its principal metabolites in *Giardia duodenalis*. *J Vet Pharmacol Therap.* 2000;23:113-20.
- Paintlia AS, Mahajan RC, Chakraborti A, Sehgal R, Ganguly NK. Characterization of *Giardia lamblia* groups A and B from North India by isoenzyme and random amplified polymorphic DNA analysis. *Parasitol Res.* 1999;85:510-2.
- Parenti DM. Characterization of a thiol proteinase in *Giardia lamblia*. *J Infect Dis.* 1989;160:1076-80.
- Pickering LK. Problems in diagnosing and managing giardiasis. *Pediatric Infect Dis.* 1985;S6-S10.
- Polis MA, Tuazon CU, Alling DW, Talmanis E. Transmission of *Giardia lamblia* from a day care center to the Community. *Am J Public Health.* 1986;76:1142-4.
- Ponce-Macotela M, Gómez-Garduño J, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Anislado-Tolentino V, Martínez-Gordillo Mario N. Determinación in vitro de la susceptibilidad a la nitazoxanida de cuatro aislados de *Giardia duodenalis* obtenidos de diferentes huéspedes. *Rev Inv Clin.* 2001a; 53:41-5.
- Ponce-Macotela M, González-Maciel A, Reynosos-Robles R, Rufino-González Y, De la Mora-De la Mora JI, Martínez-Gordillo MN. Mortality and morphological changes of *Giardia duodenalis* induced by exposition to *Justicia spicigera*. *Proc West Pharmacol Soc.* 2001b;44:151-2.
- Ponce-Macotela M, Martínez-Gordillo MN, Alvarez-Chacón R. Obtención y cultivo de *Giardia* spp. *Infectología.* 1990;10:91-5.
- Ponce-Macotela M, Navarro-Alegría I, Martínez-Gordillo MN, Alvarez-Chacón R. Efecto anti-giardiasico in vitro de 14 extractos de plantas. *Rev Inv Clin.* 1994;46:343-7.

- Ponce-Macotela M, Martínez-Gordillo MN, Bermúdez-Cruz RM, Salazar-Schettino PM, Ortega-Pierres G, Ey PL. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *Int J Parasitol.* 2002;32: 1201-2.
- Ponce-Macotela, M Peralta-Abarca GE, Martínez-Gordillo MN. *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico City. *Vet Parasitol.* 2005; 131:1-4.
- Ponce-Macotela M, Rufino-González Y, González-Maciél A, Reynosos-Robles R, Martínez-Gordillo MN. Orégano (*Lippia* spp) kills *Giardia intestinalis* trophozoites in vitro: anti-giardiasis activity and ultrastructural damage. *Parasitol Res.* 2006;98;557-60.
- Pungpak S, Singhasivanon V, Bunnag D, Radomyos B, Nibaddhasopon P, Harinasuta KT. Albendazole as a treatment for *Giardia* infection. *Ann Trop Med Parasitol.* 1996;90:563-5.
- Read MR, Monis PT, Thompson RCA. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genetic Evol.* 2004;4:125-30.
- Read MR, Walters J, Robertson ID, Thompson RCA. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol.* 2002;32:229-1.
- Romero-Cabello R, Robert-Guerrero L, Muñoz-García MR, Geyne-Cruz A. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1997;91:701-3.
- Rossignol JF, Ayoub A, Ayers MS. Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E dispar*. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *J Infect Dis.* 2001;184:381-4.
- Seow F, Katelaris P, Ngu M. The effect of *Giardia lamblia* trophozoites on trypsin, chemotrypsin and amylase in vitro. *Parasitol.* 1993;106:233-8.
- Sheffield H, Bjorvatn B. Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. *Am J Trop Med Hyg.* 1977;26:23-30.
- Silverman JD, Simpson AGB, Kulda J, Cepicka I, Hampl V, Johnson PJ, Roger JA. Retortamonad flagellates are closely related to diplomonads-implications for the history of mitochondrial function in eukaryotic evolution. *Mol Biol Evol.* 2002;19:777-786.

- Singer SM, Elmendorf HG, Conrad JT, Nash TE. Biological selection of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia*. J Infect Dis. 2001;183:119-24.
- Smith PD, Gillin FD, Brown WR, Nash TE. IgG antibody to *Giardia lamblia* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Gastroenterol. 1981;80:1474-80.
- Strandén AM, Eckert J, Köler P. Electrophoretic characterization of *Giardia* isolates from human, cattle, sheep, and dog in Switzerland. J parasitol. 1990;76: 660-8.
- Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Truot JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. Emerg Infect Dis. 2003;9:1444-50.
- Tay J, Ruíz A, Schenone H, Robert L, Sánchez-Vega JT, Uribarren T, Becerril MA, Romero R. Frecuencia de las protozoosis intestinales en la República Mexicana. Bol Chil Parasitol. 1994;49:9-15.
- Taylor DN, Houston R, Shlim DR, Bhaibulaya M, Ungar BLP, Echeverria P. Etiology of diarrhea among travelers and foreign residents in Nepal. JAMA. 1988;260:1245-8.
- Thompson SC. *Giardia lamblia* in children and the child care setting: A review of the literature. J Pediatr Child Health. 1994;30:202-9.
- Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. Int J Parasitol. 2000a;30:1259-67.
- Thompson RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. Vet Parasitol. 2004;126:15-35.
- Thompson RCA, Hopkins RM, Homan WL. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. Parasitology Today. 2000b;16:210-3.
- Tovar J, León-Avila G, Sutak R, Tachezy J, Van der Giezen M, Hernández M, Müller M, Lucocq JM. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. Nature. 2003;426:172-6.
- Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RCA. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among human and dogs living in the same community. Parasitol. 2004;128:253-62.
- Traub R, Wade S, Read C, Thompson A, Mohammed H. Molecular characterization of potentially zoonotic isolates of *Giardia duodenalis* in horses. Vet Parasitol. 2005;130:317-21.

- Upcroft P. Multiple drug resistance in the pathogenic protozoa. *Acta Tropica*. 1994;56:195-12.
- Upcroft JA, Campell RW, Upcroft P. Quinacrine-resistant *Giardia duodenalis*. *Parasitology*. 1996;112:309-13.
- Upcroft P, Chen N, Upcroft JA, Telomeric organization of a variable and inducible toxin gene family in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Genome Res*. 1997;7:37-46.
- Upcroft JA, Upcroft P. Two distinct varieties of *Giardia* in a mixed infection from a single human patient. *J Euk Microbiol*. 1994;4:189-194.
- Upcroft J, and Upcroft P. My favorite cell: *Giardia*. *BioEssays*. 1998;20.3: 256-63.
- Upcroft P, Upcroft JA. Drugs targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:150-64.
- Van Keulen H. An overview of *Giardia* taxonomy: A historical perspective. En Olson BE, Olson ME, Wallis PM. *Giardia*. The cosmopolitan parasite CAB International 2002, Wallingford, UK.
- Van Keulen H, Feely D, Macechko P, Jarroll E, Erlandsen S. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. *J Parasitol*. 1998;84:294-300.
- Van Keulen H, Homan WL, Erlandsen SL, Jarroll EL. A three nucleotide signature sequence in small subunit rRNA divides human *Giardia* into two different genotypes. *J Eukar Microbiol*. 1995;42:392-4.
- Van Keulen H, Macechko PT, Wade S, Sschaf S, Wallis PM, Erlandsen SL. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet Parasitol*. 2002;108:97-107.
- Venkatesan P. Albendazole. *J Antimicrob Chemother*. 1998;41:145-7.
- Vesy CJ, Peterson WL. Review article: the management of giardiasis. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13:843-50.
- Visvesvara GS. Axenic growth of *Giardia lamblia* in Diamond's TPS-1 medium. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 1980;74:213-5.
- Wallis PM, Erlandsen SL, Issac-Renton JL, Olson ME, Robertson WJ, van Keulen H. Prevalence of *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* oocysts and

characterization of *Giardia* spp. Isolated from drinking water in Canada. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62:2789-97.

Weis JB, Van Keulen H, Nash TE. Classification of subgroups of *Giardia lamblia* based upon ribosomal RNA gene sequence using the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.*1992;54:73-86.

WHO. The World health report 1996. Fighting disease fostering development. World Health Organization. Geneva. 1996.

Xiao L, Herd RP. Epidemiology of equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections. *Equine Vet J.* 1994;26:14-7.

Xin DD, Wen JD, Ile D, Lu SQ. Identification of a *Giardia* Krr1 homolog gene and the secondarily anucleolate condition of *Giardia lamblia*. *Mol Biol Evol.* 2005. 22(3); 391-394.



ELSEVIER

International Journal for Parasitology 32 (2002) 1201–1202



INTERNATIONAL  
Journal for  
PARASITOLOGY

www.parasitology-online.com

## Letter to the Editor

### Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico

Defined by Filice in 1952 as *Giardia duodenalis* (syn. *Giardia lamblia*) on the basis of morphological characteristics, the species includes organisms that are ubiquitous in a variety of mammalian hosts. However, this morphological similarity masks genetic and biotypic differences that are sufficiently large for *G. intestinalis* now to be considered a species complex. Seven major sublineages (A–G) representing widely distributed genotypes, some with discernable host range differences, have been defined by phylogenetic analyses (Monis et al., 1999; Thompson et al., 2000). The prevalence and biological impact in local communities of these distinct genotypes remains largely unknown. *Giardia* from humans fall exclusively into assemblages A and B, although some of these same genotypes are also found commonly in animals. Axenic culture favours assemblage A organisms, especially the group I genotype which is zoonotic, over those belonging to assemblage B (Karaniš and Ey, 1998). A second, less prevalent (group II) subtype of assemblage A isolated from humans has been detected in some axenic collections (Karaniš and Ey, 1998). It is not yet clear whether assemblage B genotypes represent a zoonosis or several distinct biotypes. In Mexico, *Giardia* infections have an incidence within the human population of 7–68%. Isolates from this country have been established in axenic culture (Cedillo-Rivera et al., 1991) but none have been typed genetically.

Axenic isolates of *G. intestinalis* were established at the Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, from trophozoites obtained either by in vitro excystation (Ponce-Macotela et al., 1990) of faecal cysts obtained from clinical patients in four states of Mexico or, for one isolate, from a duodenal endoscopy sample. Most of the 19 patients had histories of chronic giardiasis but only 11 were symptomatic at the time of sampling. Isolates from a cat and two dogs in Mexico City were similarly established using excysted trophozoites or, for one of the dog isolates, trophozoites recovered from the intestinal mucosa. Genomic DNA was purified from all 22 isolates, as well as a clone derived from one of the isolates, and samples were tested, together with DNA from reference isolates representative of each major subtype, for amplification of characterised gene segments in polymerase chain reaction (PCR), followed by analysis of the amplified DNA for genotype-specific restriction fragment length polymorphism (RFLP). Isolates belonging to

assemblage A were identified by amplification of variant-specific surface protein gene segments, with the group I (A-I), group II (A-II) and related subtypes being distinguished by restriction analysis (Ey et al., 1996; Karaniš and Ey, 1998). Genotypes belonging to other assemblages were identified by analysis of a 1.2-kb amplified segment of the glutamate dehydrogenase gene (Monis et al., 1998) and by a multiplex assay (P.L.E., unpublished data) that detects all known major subtypes of *G. intestinalis*.

Initial screening revealed an assemblage A genotype within all 22 test isolates and the derived clone. Restriction analysis of the *vsp* gene amplification products yielded, also in every case, cleavage patterns that identified the A-II subtype of *G. intestinalis* unambiguously, viz. a doublet banding pattern following cleavage of the 0.52-kb products (primers 432 + 433) by *Pst* I, recovery of a 1.8-kb product (primers 727 + 433) that was not cleaved by *Hind* III, *Kpn* I or *Xba* I, and except for one isolate, recovery of a 1.6-kb *vsp*1267-like product using primers 733 + 731 (Ey et al., 1996). Each isolate was also tested for additional, non-assemblage A genotypes that may have been derived from mixed (concomitant) infections. Except for the reference isolates, these assays proved uniformly negative. In the multiplex assay, all of the test samples yielded only two amplification products (0.8 and 0.37 kb) that define the A-II genotype, whereas the reference isolates yielded different, genotype-specific products. This constituted clear-cut evidence that each test isolate was comprised solely of organisms that were identical or, in one case, nearly identical to the A-II subtype.

These results are noteworthy for two reasons. Firstly, the dominance of the A-II subtype within the test panel and the absence of other genotypes is unprecedented. Excluding the current results, we know – from published and unpublished data on 499 typed isolates of *G. intestinalis* (P.L.E., unpublished database records) – of only 59 isolates (11.8%) that can be identified as type A-II, compared with 100 (20%) type A-I and 115 (23%) assemblage B genotypes. The highest reported incidence of the A-II subtype in any collection of *G. intestinalis* is 40% from a panel of 15 axenic isolates (Karaniš and Ey, 1998). However, in most typed collections this genotype has a much lower incidence ( $\leq 20\%$ ) and its absence is not uncommon. A lack of assemblage B genotypes is not unusual, due to the selection of assemblage A genotypes during establishment of axenic cultures and the inefficiency of this process which results in propagation of only a minute fraction of the *Giardia* present in source samples. Consequently, this result cannot be taken to reflect

an absence of these organisms within the Mexican community. In contrast, the absence of type A-I organisms from a panel of axenic isolates is unusual. The lack of type A-I organisms and the abundance of type A-II organisms may reflect a local or regional epidemic involving the A-II subtype. Alternatively, there may be geographical differences between countries or continents in the prevalence of infections involving these subtypes, perhaps influenced by historical differences in indigenous host fauna and factors such as human immigration and the introduction of animals from Europe in recent centuries. However, without additional genotypic or epidemiological information about the distribution and prevalence of the various known subtypes of *G. intestinalis* within human and animal populations in Mexico, one can only speculate about the underlying causes of the atypical findings of this study.

Secondly, the identification of three type A-II isolates derived from domestic animals is important because it contrasts with the exclusive recovery of this genotype from humans in previous investigations (Karanis and Ey, 1998). This finding suggests that type A-II organisms may be prevalent in domestic animals as well as humans within the areas sampled in this study and therefore that these particular *Giardia* are, like type A-I organisms, zoonotic. Nevertheless, the published data suggest that in most countries type A-II organisms are generally less prevalent than the A-I and assemblage B genotypes and that they may infect humans more commonly than animals. Previous efforts to culture excysted or intestinal trophozoites from dogs have yielded only four successful in vitro cultures (two type A-I, two assemblage B genotypes), possibly because these animals are infected rarely by assemblage A or assemblage B genotypes but commonly by unique, dog-specific *Giardia* (assemblage C and D genotypes) that are unable to adapt to in vitro culture but grow in suckling mice (Hopkins et al., 1997; Monis et al., 1998; Thompson et al., 2000).

Whilst the detection of particular subtypes in axenic cultures certainly reveals genotypes that must exist within a host population, the combination of potential genotype-specific differences in excystation efficiencies, observed differences in the efficiency of establishing different subtypes in axenic culture, and differential in vitro growth rates observed for different subtypes means that the natural prevalence of various subtypes within host populations may be quite different from frequencies observed within established cultures. Direct quantitative typing of clinical samples (faecal cysts, excysted or intestinal trophozoites) to exclude the bias introduced by culture (even short term, in vitro or in vivo) will be necessary to obtain meaningful epidemiological data that can be used to identify zoonoses, regional differences and epidemic outbreaks (Homan and Mank, 2001; Read et al., 2002). With respect to the current

study, the varied clinical backgrounds of the isolates may be due to the influence of various factors (nutritional, host immunocompetence, etc.) on infections by a single *G. intestinalis* genotype (type A-II).

## References

- Cedillo-Rivera, R., Enciso-Moreno, J.A., Martínez-Palomo, A., Ortega-Pierres, G., 1991. Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Arch. Invest. Med.* 22, 79–85.
- Ey, P.L., Bruderer, T., Wehrli, C., Köhler, P., 1996. Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analyses of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia. *Parasitol. Res.* 82, 52–60.
- Homan, W.L., Mank, T.G., 2001. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int. J. Parasitol.* 31, 822–6.
- Hopkins, R.M., Meloni, B.P., Groth, D.M., Wetherall, J.D., Reynoldson, J.D., Thompson, R.C.A., 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J. Parasitol.* 83, 44–51.
- Karanis, P., Ey, P.L., 1998. Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. *Parasitol. Res.* 84, 442–9.
- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Mackrill, J., Kulda, J., Isaac-Renton, J.L., Ey, P.L., 1998. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology* 116, 7–19.
- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Ey, P.L., 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1135–44.
- Ponce-Macotela, M., Martínez-Gordillo, M.N., Alvarez-Chacón, R., 1990. Obtención y cultivo de *Giardia* spp.. *Infectol. Méx.* 10, 91–95.
- Read, C., Walters, J., Robertson, I.D., Thompson, R.C.A., 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int. J. Parasitol.* 32, 229–31.
- Thompson, R.C.A., Hopkins, R.M., Homan, W.L., 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol. Today* 16, 210–3.

Martha Ponce-Macotela<sup>a,\*</sup>, Mario N. Martínez-Gordillo<sup>a</sup>,  
Rosa Maria Bermúdez-Cruz<sup>b</sup>, Paz Maria Salazar-Schettino<sup>c</sup>,  
Guadalupe Ortega-Pierres<sup>b</sup>, Peter L. Ey<sup>d</sup>

<sup>a</sup>*Parasitología Experimental del Instituto Nacional de  
Pediatria, Insurgentes Sur No. 3700-C, 04530  
Mexico, D.F., Mexico*

<sup>b</sup>*Departamento de Genética y Biología Molecular  
CINVESTAV-IPN,  
Mexico, Mexico*

<sup>c</sup>*Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Mexico, Mexico*

<sup>d</sup>*Department of Molecular Biosciences,  
The University of Adelaide,  
Adelaide SA 5005, Australia*

\* Corresponding author. Tel.: +52-5606-0002-454; fax: +52-5606-9455.  
E-mail address: macotelam@yahoo.com (M. Ponce-Macotela).



# *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: Prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico City

Martha Ponce-Macotela, Gustavo E. Peralta-Abarca, Mario N. Martínez-Gordillo \*

Laboratorio de Parasitología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur No. 3700-C,  
C.P. 04530 México D.F., México

Accepted 24 March 2005

## Abstract

The protozoan *Giardia intestinalis* is a mammalian-infecting parasite. It produces diarrhoea and malabsorption in its hosts. There is growing evidence that dogs could be reservoirs and play an important role in transmission. In Mexico, there are few data on the frequency of *G. intestinalis*. Therefore, we studied the small intestine of stray dogs, euthanized at the “Culhuacan” Control Canine Centre, towards the end of 1997 and during the summer of 1998. We microscopically analysed intestinal contents and mucus samples taken every 3 cm. During the cold season (winter), parasites were not found in 38/100 dogs, in contrast to 8/100 through the warm season. We found that 42/100 in winter and 51/100 in summer harboured *G. intestinalis*. To our knowledge, these *G. intestinalis* frequencies are the highest found in adult dogs worldwide. The results showed a rise in *Ancylostoma* spp. from 23/100 to 67/100 during the cold and warm seasons. *Toxocara canis* frequencies varied between 12/100 and 18/100, respectively. The data suggest that the probability of infection is higher during the hottest months compared to the coldest months of the year. Both puppies and adult dogs are highly infected. Dogs are reservoirs for zoonotic parasites; for this reason, it is imperative for humans to avoid fecal contamination in streets, public gardens and parks.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Giardia intestinalis*; Zoonoses; Parasites frequency; Dogs; Fecal contamination

## 1. Introduction

Giardiasis is a worldwide prevalent parasitic disease that affects humans, domestic and wild animals (Adam, 2001). The etiologic agent is *Giardia intestinalis* (Syn. *G. duodenalis*, *G. lamblia*). Since

1988, the WHO has estimated that in Africa, Asia and Latin America there are over 280 million *Giardia* infections yearly. The infection can be symptomatic or asymptomatic; however, independent of the clinical course, *G. intestinalis* trophozoites hinder nutrient absorption and produce different degrees of malabsorption (Astiazarán-García et al., 2000). In the transmission of human infection, in developing countries, human feces play a fundamental role in water and food contamination. However, this fact does not explain the high prevalence of *Giardia* infection in

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 1084 0900;  
fax: +52 55 1084 3883.

E-mail address: [marionmgordillo@correo.unam.mx](mailto:marionmgordillo@correo.unam.mx)  
(M.N. Martínez-Gordillo).

developed countries. A possible explanation includes zoonotic transmission and fecal contamination from animal sources. There are data that suggest that *G. intestinalis* from A and B assemblages infect humans and animals (Van Keulen et al., 2002; Read et al., 2004). For this reason, it is very important to be aware of the prevalence of *Giardia* in domestic animals. The giardiasis prevalence rate estimated in animals in different parts of the world ranges between 1 and 39% in fecal samples from dogs (Leib and Zajac, 1999) and 1–11% in cats (Olson et al., 1996). In domestic cattle in Canada, the prevalence rate ranges between 7 to 60% (Appelbee et al., 2003). On the other hand, from 220 muskrat fecal samples, 70% contained *Giardia* cysts (Kirkpatrick and Benson, 1987). In voles from Mazury Lake, the *Giardia* prevalence rate ranged from 48 to 96% (Bajer et al., 2002). In Mexico, the prevalence of human infection was 7–68% (Tay et al., 1994); however, we have previously been unaware of the prevalence of *Giardia* in animal populations. In this study, we demonstrated the high prevalence of *G. intestinalis* and other zoonotic parasites of medical importance found in adult dogs from the southern part of Mexico City.

## 2. Material and methods

We obtained samples from stray and unwanted dogs from the “Centro de Control Canino Culhuacan” from the southern part of Mexico City. The sampling period comprised the winter of 1997 and summer of 1998. We used the small intestines from euthanized dogs. For gut sampling, we opened the dog’s abdominal cavity, and identified the beginning and the end of the small intestine. The pylorus and cecum valves were identified and the small intestine excised with scissors. Each specimen was transported to the laboratory in a wide-mouth bottle filled with phosphate buffered saline pH 7.2 (PBS).

To search for microscopic parasitic structures, we sampled the gut contents every 3 cm. A small incision was made with a scalpel and the mucus and intestinal contents was sampled with a sterile metallic handle. We re-suspended the mucus in PBS on a slide and covered it with a cover slip. We viewed the samples under phase contrast in a Carl Zeiss microscope. To recover macro-parasites, a longitudinal incision

opened all of the small intestine and the macro-parasites were picked up with a paintbrush. We washed and relaxed the parasites in warm PBS at 37 °C. All of the retrieved helminths were fixed in 5% buffered formaldehyde. Afterwards, using different keys we identified the genus and species (Khalil et al., 1994; Averbek et al., 1995).

## 3. Results

During the cold season, we analysed 100 dogs (47 males and 53 females). During the warm season, the dog population studied consisted of 49 males and 51 females.

Table 1 shows the parasite diversity between dogs sacrificed in both cold and warm seasons. The results were interesting because in the wintertime, the number of dogs without parasites in the small intestine was higher than in summertime. The major diversity was seen during the hot and rainy season.

Fig. 1 shows the parasite prevalence in dogs living in the southern part of Mexico City in two seasons of the year. The greatest difference was in *Ancylostoma* spp., a soil-transmitted nematode and the tapeworm *Dipylidium caninum*, which showed a high dependence for humidity and high temperatures. The most important protozoan parasite was *G. intestinalis*. We found it in 42 dogs during the cold season and in 51 dogs during the warm period.

## 4. Discussion

It is important to note that this parasitological study was restricted to the small intestine; parasites living in the large intestine were not detected. This was a

Table 1  
Number of parasites species infecting the small intestine of dogs in the southern part of Mexico City, in two seasons of the year

Number of parasites species	Cold weather% infected dogs	Hot weather% infected dogs
No parasites	38	8
One	34	26
Two	18	24
Three	8	32
Four	1	9
Five	1	1

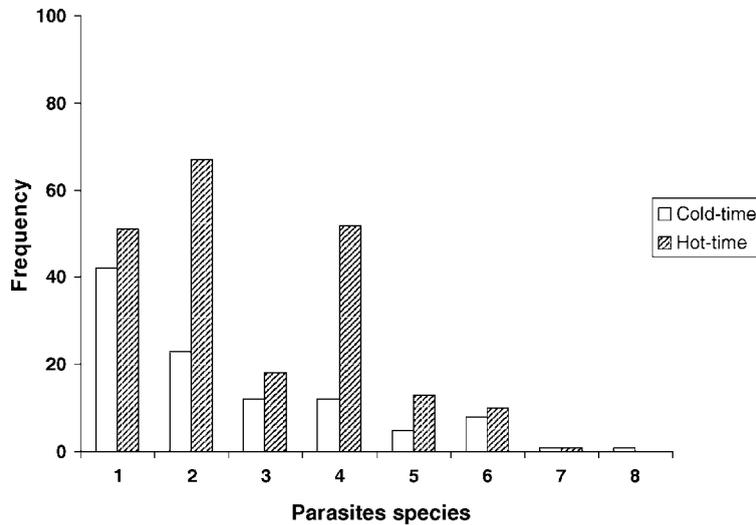


Fig. 1. Parasites frequency during two seasons of the year: (1) *Giardia intestinalis*, (2) *Ancylostoma* spp., (3) *Toxocara canis*/*Toxascaris leonina*, (4) *Dipylidium caninum*, (5) *Taenia* spp., (6) Coccidia, (7) *Hymenolepis diminuta* and (8) *Mesocostoides* spp.

limitation of the study. We believe that the overall frequencies are underrepresented for stray dogs from the southern part of Mexico City. In general, 62 and 92% of the dogs had intestinal parasites in both the cold and warm seasons, respectively. These results are different from those published by Ramírez-Barrios et al. (2004), which reported a prevalence of 35.5 in the veterinary clinic at the University of Zulia. The sampled populations are quite different. Ramirez-Barrios worked with pets, whereas we worked with stray dogs and surrendered dogs. However, tendencies exist. The data showed a low parasitic frequency with single infections during cold periods, and a high parasitic frequency including multiple parasitic infections in hotter months.

We found that in dogs, the prevalence of *G. intestinalis* was 42–51% in both seasons. These results are important because these frequencies are from adult dogs, showing that in the southern part of Mexico City, there are strong *G. intestinalis* infections. What is the source of the canine infection? We do not know. However, our results are the highest reported in the international literature.

On the other hand, in a work published elsewhere (Ponce-Macotela et al., 2002), we genotyped two *Giardia* axenic cultures from dogs that belonged to the A-II subtype. Van Keulen et al. (2002) found that *Giardia* from dogs pertained to assemblages A and B.

To date, there are seven assemblages described for *G. intestinalis*, from A to G (Monis et al., 1999; Read et al., 2004). They found that *G. intestinalis* from dogs were assemblages C and D. The results from the works of Monis et al. (1999), Ponce-Macotela et al. (2002), Van Keulen et al. (2002) and Traub et al. (2004) suggest that dogs can hold *G. intestinalis* from assemblages A–D.

Based on these findings, we believe that there are two transmission cycles in dogs: (a) the normal cycle between dogs, which involves transmission of *G. intestinalis* cysts that belong to assemblages C or D; and (b) the other cycle, includes cross transmission of *Giardia* from humans belonging to assemblages A or B (Van Keulen et al., 2002) and to subtype A-II (Ponce-Macotela et al., 2002; Traub et al., 2004) that grow in dog intestine. If this is true, as the evidence supports, then dogs are *G. intestinalis* reservoirs, and transmit cysts in at least two ways: (1) from dog to dog and (2) from humans to dogs and perhaps from dogs to humans.

Other investigated parasites showed strong seasonal variation, and the size of the population was affected by the temperature and humidity conditions at the sampled times. The most dramatic change was in the *Ancylostoma* spp. and *D. caninum* populations, which rose from 23 to 67% and from 12 to 52%, respectively. In both cases, the explanation is quite simple: (a) The *Ancylostoma* spp. is a soil-transmitted

parasite and the parasite eggs hatch in the soil at warm temperatures and high humidity. During its life cycle, there are two larval stages, the rabditoid larva and the filariform larva and (b) *D. caninum* requires an intermediate host, larvae fleas from the genus *Pulex*, *Ctenocephalides* and lice of the genus *Trichodectes*, which are also dependent on temperature and humidity. Toxocarosis is another zoonosis transmitted by soil, but the prevalence does not change as dramatically as with *Ancylostoma* spp. or *Dipylidium*. In human beings, the parasite can generate blindness by larval migration in the eyes, cough, fever, chronic eosinophilia, abdominal pain, neurological symptoms and eventually, death (Lowichik and Ruff, 1995).

## 5. Conclusion

Our results showed that dogs harbour parasites that are important from a medical and veterinary standpoint; in addition, some of these parasites require dissemination mechanisms such as the fecal contamination of food, water or soils.

*G. intestinalis* infection showed a minor seasonal variation, with high prevalence persisting in both seasons. We must avoid fecal contamination of water supplies and food with dog feces. There is supporting evidence for a zoonotic transmission cycle. On the other hand, it is imperative to genotype the *G. intestinalis* population from dogs, in order to find clear evidence that substantiates zoonotic transmission.

Finally, we must to prevent fecal contamination on streets, public gardens and parks. To achieve this goal, it is essential to reinforce social behaviour, to take care of pets and avoid having stray dogs.

## Acknowledgment

We wish to acknowledge the invaluable help of the head of the “Culhuacan” Canine Control Centre, Dr. Raúl Coss Lira.

## References

Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447–475.

- Appelbee, A.J., Frederick, L.M., Heitman, T.L., Olson, M.E., 2003. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. Vet. Parasitol. 112, 289–294.
- Astiazarán-García, H., Espinoza-Cantellano, M., Castañón, G., Chávez-Mungía, B., Martínez-Palomo, A., 2000. *Giardia lamblia*: effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the growth of gerbils (*Meriones unguiculatus*). Exp. Parasitol. 95, 128–135.
- Averbeck, G.A., Vanek, J.A., Stromberg, B.E., Laursen, J.R., 1995. Differentiation of *Baylisascaris* species, *Toxocara canis* and *Toxascaris leonina* infections in dogs. Small Anim. Parasitol. 17, 475–478.
- Bajer, A., Bednarska, M., Pawelczyk, A., Behnke, A.J., Gilbert, F.S., Sinski, E., 2002. Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake district region of Poland. Parasitology 125, 21–34.
- Khalil, L.F., Jones, A., Bray, R.A., 1994. Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates. Cab International, Wallingford, UK.
- Kirkpatrick, C.E., Benson, C.E., 1987. Presence of *Giardia* spp. and absence of *Salmonella* spp. in New Jersey Muskrats (*Ondatra zibethicus*) Appl. Environ. Microbiol. 53, 1790–1792.
- Leib, M.S., Zajac, A.M., 1999. Giardiasis in dogs and cats. Vet. Med. (September), 793–802.
- Lowichik, A., Ruff, A.J., 1995. Parasitic infection of the central nervous system in children. Part II: disseminated infections. J. Child. Neurol. 10, 77–87.
- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Ey, P.L., 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoa *Giardia intestinalis*. Mol. Biol. Evol. 16, 1135–1144.
- Olson, M.E., Morck, D.W., Ceri, H., 1996. The efficacy of a *Giardia lamblia* vaccine in kittens. Can. J. Vet. Res. 60, 249–256.
- Ponce-Macotela, M., Martínez-Gordillo, M.N., Bermúdez-Cruz, R.M., Salazar-Schettino, P.M., Ortega-Pierres, G., Ey, P.L., 2002. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. Int. J. Parasitol. 32, 1201–1202.
- Ramírez-Barrios, R.A., Barboza-Mena, G., Muñoz, J., Angulo-Cubillan, F., Hernández, E., González, F., Escalona, F., 2004. Prevalence of intestinal parasites in dogs under veterinary care in Maracaibo. Venezuela Vet. Parasitol. 121, 11–20.
- Read, C.M., Monis, P.T., Thompson, R.C.A., 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect. Gen. Evol. 4, 125–130.
- Tay, J., Shenone, A., Robert, L., Sánchez-Vega, J.T., Urribaren, T., Becerril, M., Romero, C.R., 1994. Frecuencia de protozoosis intestinales en la República Mexicana. Bol. Chil. Parasitol. 49, 9–15.
- Traub, R.J., Monis, P.T., Robertson, I., Irwin, P., Mencke, N., Thompson, R.C.A., 2004. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. Parasitology 128, 253–262.
- Van Keulen, H., Macechko, I.T., Wade, S., Shaaf, S., Wallis, P.M., Erlandsen, S.L., 2002. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggest a zoonotic potential for giardiasis. Vet. Parasitol. 108, 97–107.