



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**Eficacia *in vitro* del albendazol, nitazoxanida y del compuesto Alfa, contra
aislados genotipificados de *Giardia spp***

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

JUANA JIMENA OTERO NEGRETE

TUTOR:

FROYLAN IBARRA VELARDE

COMITÉ TUTORAL:

PAZ MARIA SALAZAR SCHETTINO

RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA



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.

DEDICATORIA

A mi mamá Rosa Ma. Negrete García, quien me ha apoyado en todo los proyectos de mi vida.

A mi padre Luis Otero Nova, que aunque no esté presente, siempre estará con nosotros.

A mi tío Francisco Negrete, gracias por tus consejos y apoyo.

A todos los animales que involuntariamente contribuyen a la ciencia.

A Chiquita, Peque, Chapa, Asterix, Merlina, Yaqui, Zucky y Morrito.

Y a ti mi amada ratita gruñona.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha Ponce Macotela, jefa del Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Pediatría, por abrirme las puertas de su laboratorio, compartir sus conocimientos y asesorarme en la realización de este proyecto. Por mostrarme el camino en el mundo de la *Giardia*.

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Pediatría.

A la Dra. Yadira Rufino, por sus consejos, por brindarme su amistad y por enseñarme que la investigación es más que una disciplina.

Al Dr. Froylán Ibarra, por su apoyo y consejos para la realización de este trabajo.

Al Dr. Alberto Ramírez Guadarrama, al Dr. Antonio Yáñez y a Don Gaby por su apoyo, amistad y por mostrarme lo que es el compañerismo.

Al PMVZ Emmanuel Galván Ramírez, por ayudar en la obtención de muestras y manejo de animales, para este proyecto.

A la Dra. Susana Rojas por su apoyo en la parte técnica de algunos experimentos.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Paz María Salazar Schettino y el Dr. Rafael Castillo Bocanegra, por asesorarme durante la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado:

Dr. Enrique Angeles Anguiano

Dra. Inés Fuentes Noriega

Dra. Yolanda Vera Montenegro

Dra. Irene Cruz Mendoza

Dr. Froylán Ibarra Velarde

por sus observaciones y correcciones de ésta tesis.

Al proyecto PAPIIT-DEGPA-UNAM No. IN207106

A todos los compañeros del Departamento de Parasitología de la FMVZ-UNAM, que hacen que el laboratorio tenga un ambiente muy agradable.

A todos los médicos veterinarios, criadores y productores que permitieron manejar y muestrear a sus animales para la obtención de muestras para éste proyecto.

Y por último pero no menos importante a mi mamá Rosa Ma. Negrete y a mi esposo Héctor Rico, por tener que madrugar, por ayudarme y por acompañarme en la realización de los experimentos de ésta tesis.

Índice	Página
Resumen	1
Introducción	3
Historia	3
Clasificación	5
Morfología	6
Trofozoíto	6
El quiste, el enquistamiento y el desenquistamiento	7
Ciclo biológico	9
Mecanismos patogénicos	11
Traumático	11
Enzimático	13
Tóxico	13
Barrera mecánica	13
Competencia con el huésped	13
Manifestaciones clínicas y hallazgos histológicos	14
Epidemiología	16
Genotipos	18
Diagnóstico	21
Tratamientos	23
Planteamiento del problema	27
Hipótesis	27

Hipótesis nula	27
Objetivo general	28
Objetivos particulares	28
Material y métodos	29
Obtención de muestras	29
Desenquistamiento y cultivo de trofozoítos de <i>Giardia in vitro</i>	29
Purificación de DNA.	30
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's).	30
Evaluación farmacológica.	32
Microscopía electrónica	37
Resultados.	38
Discusión.	54
Conclusiones	62
Referencias	63
Anexo	79

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 1 Especies de <i>Giardia</i> , descritas en base a su morfología.	4
Cuadro 2 Factores de virulencia de <i>G. intestinalis</i>	12
Cuadro 3 Genotipos de <i>G. intestinalis</i> y los huéspedes donde se encuentran.	19
Cuadro 4 Fármacos y compuesto utilizados en la evaluación <i>in vitro</i> .	33
Cuadro 5 Prevalencia de <i>Giardia</i> y genotipos predominantes en bovinos y ovinos de granjas de cinco Estados de la República Mexicana	42
Cuadro 6 Actividad giardiásica del albendazol y compuesto alfa con 4 y 24 h de incubación y 24 h de recultivo	44
Cuadro 7 Actividad giardiásica del albendazol, compuesto Alfa y la nitazoxanida en diferentes aislados de <i>G. duodenalis</i> .	47
Cuadro 8. Actividad giardiásica del albendazol y el compuesto alfa con 72 h de incubación	50

Índice de figuras	Página
Figura 1. Esquematación del ciclo biológico de <i>Giardia duodenalis</i>	10
Figura 2. Moléculas de los compuestos utilizados en la evaluación farmacológica.	34
Figura 3. Metodología que se siguió para la evaluación farmacológica	36
Figura 4. Análisis electroforético de los polimorfismos de los fragmentos de restricción con Nla IV.	39
Figura 5 Análisis electroforético de los polimorfismos de los fragmentos de restricción con Rsa I	40
Figura 6. Genotipos que se obtuvieron por estado.	43
Figura 7. Porcentajes de mortalidad a diferentes concentraciones, con los diferentes compuestos, con 4 h de incubación y 24 h de recultivo.	45
Figura 8. Porcentajes de mortalidad a diferentes concentraciones, con los diferentes compuestos, con 24 h de incubación y 24 h de recultivo.	46
Figura 9. Porcentajes de mortalidad de los diferentes aislados incubados 24 h con el albendazol y 24 h de recultivo.	48
Figura 10. Porcentajes de mortalidad de los diferentes aislados incubados 24 h con el compuesto Alfa y 24 h de recultivo.	49
Figura 11. Porcentajes de mortalidad de los diferentes aislados incubados 24 h con la nitazoxanida y 24 h de recultivo.	49
Figura 12. Foto de microscopía electrónica	51
Figura 13. Foto de microscopía electrónica	52
Figura 14. Foto de microscopía electrónica	53

Abstract

Giardia intestinalis (*G. duodenalis*, *G. lamblia*), is a worldwide parasite, is found in a wide range of domestic mammals, wild animals and humans. This parasite produces malabsorption syndrome, formless faeces, loss of weight, in production animals it also produces lower weight gain and economic losses for producers. The morphology of *Giardia* cysts and morphological group *G. duodenalis* is similar in samples obtained from animals and humans, so, molecular techniques have been used for genotype. Efforts to control giardiasis have been based on the therapeutic use of certain drugs such as: derivatives of acridine orange (quinacrine), nitroimidazoles, benzimidazoles, nitrothiazole, nitrofurans and furazolidone. However, the use of these drugs can cause side effects such as nausea, vomiting, diarrhea, and may even affect the normal flora of the individual. For this reason, the aim of this project was to obtain *Giardia* isolated from sheep and cattle genotyped and to use them to evaluate the efficacy of compounds with potential giardicida. Stool samples were collected from 439 animals from backyard flocks. The positive samples were processed to concentrate *Giardia* cysts, performing *in vitro* excystation and to keep cultures in TYI-S-33. DNA was obtained from trophozoites and it was used to obtain the polymorphisms genotyping by restriction fragment (RFLP). Nine cattle (5.1%) and 30 sheep (11.3%) were found positive for *Giardia* and zoonotic genotypes showed a predominance of (AI and BIII). The drug part was conducted with different concentrations and different incubation times. The drugs used were albendazole and nitazoxanide, the compound that was used as possible giardicida, was the compound alpha (5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)-1-H-benzimidazole). It was noted that there are variations in the sensitivity that showed the isolates to different drugs. The compound Alfa needs to be evaluated *in vitro* with cysts of *Giardia intestinalis* and *in vivo* to determine whether it can be considered as a drug of choice for treating giardiasis in production animals. This is the first study in Mexico where a pharmacological evaluation essay was carrying out in cultures genotyped obtained from livestock.

Keywords. Giardia, zoonoses, animal breeds, cattle, sheep.

Resumen

Giardia intestinalis (*G. duodenalis*, *G. lamblia*), parásito de distribución mundial, se encuentra en un amplio rango de mamíferos domésticos, selváticos y el hombre. Produce síndrome de malabsorción, pérdida de peso, evacuaciones anormales, en los animales de producción produce mala conversión alimenticia y pérdidas económicas para el productor. La morfología de los quistes y trofozoítos de *Giardia* del grupo morfológico *G. duodenalis* es similar en las muestras obtenidas de animales y de humanos, por lo tanto se ha recurrido a técnicas moleculares para genotipificarlas. Los esfuerzos en controlar la giardiosis se han basado en el uso terapéutico de ciertos fármacos como son: derivados de la naranja de acridina (la quinacrina), nitroimidazoles, bencimidazoles, nitrotiazoles, nitrofuranos y furazolidona. Sin embargo, el uso de éstos fármacos puede producir efectos adversos, como: náusea, vómito, diarrea, e incluso llegan a afectar la flora normal del individuo. Por tal motivo el objetivo fue obtener aislados de *Giardia* provenientes de ovinos y bovinos, genotipificarlos y utilizarlos para evaluar la eficacia de compuestos con potencial giardicida. Se colectaron heces de 439 animales de rebaños de traspatio. Las muestras positivas a *Giardia* se procesaron para concentrar los quistes, realizar el desenquistamiento *in vitro* y mantener los aislados en medio TYI-S-33. Se obtuvo el ADN de los trofozoítos y se procedió a la genotipificación mediante los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP). Se encontraron nueve bovinos (5.1 %) y 30 ovinos (11.3 %) con *Giardia*, se observó que presentaron predominio de genotipos zoonóticos (AI y BIII). La parte farmacológica se llevó a cabo con diferentes concentraciones y a diferentes tiempos de incubación. Los fármacos utilizados fueron albendazol y nitazoxanida, el compuesto utilizado con posible actividad giardicida fue el compuesto alfa (5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1-H-bencimidazol). Se observó que hay variaciones en la sensibilidad que presentaron los aislados a los fármacos. El compuesto Alfa necesita ser evaluado *in vitro* con los quistes de *Giardia intestinalis* e *in vivo* para poder determinar si se le puede considerar un fármaco de elección para tratar la giardiosis en animales de producción. Este es el primer trabajo en México donde

se realiza la evaluación farmacológica de fármacos giardicidas en aislados genotipificados obtenidos de animales de producción.

Palabras clave. *Giardia*, zoonosis, genotipos, bovinos, ovinos.

INTRODUCCIÓN

La primera descripción de *Giardia intestinalis* (sinonimias *G. lamblia*, *G. duodenalis*) fue en 1859, sin embargo su importancia clínica como causante de diarreas, no se consideró si no hasta la mitad del siglo 20. En pacientes humanos causa una de las infecciones más comunes a nivel mundial. Contribuye a que 280 millones de personas estén infectadas anualmente y ha sido incluida por la OMS dentro de las enfermedades desatendidas desde 2004. (Adam 2001, Geurden 2010). *G. intestinalis* es un patógeno con potencial zoonótico, y la infección de animales en producción jóvenes puede impactar negativamente en la economía del productor. Éste parásito puede sobrevivir en el medio ambiente por períodos prolongados y la dosis infectiva para que un organismo resulte parasitado es de 10000 quistes. (Ankarklev 2010). En medicina veterinaria no fue sino hasta la década de los 90's, cuando se le empieza a dar importancia a ésta parasitosis dado su aspecto zoonótico y las pérdidas económicas que produce. (Geurden 2010 Sprong 2009, Ankarklev 2010).

Historia

Giardia fue inicialmente descrita por van Leeuwenhoek en 1681 cuando estaba examinando al microscopio sus heces diarreicas, aunque sus ilustraciones no se difundieron. (Farthing 1996, Adam 2001, Rufino 2007). En 1859, el parásito fue descrito con más detalle por Lambl, quien pensó que éste parásito pertenecía al género *Cercomonas*, y lo nombró *Cercomonas intestinalis*, sin embargo hasta éste momento el parásito todavía recibía poca atención. En 1879, Grassi encontró un organismo en roedores (el cual ahora sabemos era una especie de *Giardia*) al cual nombró *Dimorphus muris*, en ése entonces todavía no conocía la descripción que ya había realizado Lambl. En 1882-1883, Kunstler describe un organismo en renacuajos al cual nombra *Giardia*, siendo ésta la primera vez que se utiliza como género. En 1888, Blanchard sugiere el nombre de *Lambliia intestinalis*, el cual es cambiado por el parasitólogo americano Charles Wardell Stiles quien en 1902, lo

nombra *Giardia duodenalis*. (Adam 2001, Rufino 2007) Subsecuentemente, Kofoid y Christiansen proponen el nombre de *G. lamblia* en 1915 y *G. enterica* en 1920. (Adam 2001). En 1921, Clifford Dobell sugirió que *Giardia sp.*, era un patógeno y en 1926 Reginald Millar trabajando en Londres, demostró que algunos niños infectados con *Giardia*, presentaban mala absorción, otros que eran reservorios y diseminadores de quistes. En 1954, los estudios de Robert Rendtorff relacionaron al parásito con la enfermedad. (Rufino 2007). Sin embargo, continuó la controversia en cuanto al número de especies de *Giardia*. Algunos investigadores sugirieron asignarle la especie en base al huésped. Por ejemplo se han asignado cerca de 40 especies dependiendo del huésped. En 1952, Filice, describe detalladamente la morfología de *Giardia* y propone 3 especies (*G. duodenalis*, *G. muris*, *G. agilis*) (Adam 2001, Thompson 2000). Sin embargo, en la última década con el uso de técnicas moleculares y microscópicas, se han identificado otras especies de *Giardia*. (Adam 2001, Lassek-Nesselquist 2010) Cuadro 1.

Cuadro 1. Especies de *Giardia*, descritas en base a su morfología.

Género y especie	Huésped	Características morfológicas	Dimensiones de los trofozoítos
<i>G. agilis</i>	Anfibios	Trofozoítos alargados, cuerpos medios en forma de gotas.	20-30 µm de largo por 4-5 µm de ancho.
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoítos redondeados, con pequeños y redondos cuerpos medios. Esta especie se diferencia de <i>G. intestinalis</i> en su secuencia genética.	9-12 µm de largo por 5-7 µm de ancho.
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos	Trofozoítos con forma de pera, con dos flagelos ventrolaterales y cuerpos medios en forma de garra.	12-15 µm de largo por 6-8 µm de ancho.
<i>G. psittaci</i>	Aves domésticas	Trofozoítos con forma de pera, con cuerpos medios semejantes a los de <i>G. intestinalis</i> pero sin el flanco ventrolateral.	14 µm de largo por 6 µm de ancho.
<i>G. ardeae</i>	Garzas	Trofozoítos redondeados, presentan una prominente muesca en el disco ventral y un flagelo caudal rudimentario.	10µm de largo por 6.5 µm de ancho.
<i>G. microti</i>	Roedores.	Los quistes contienen dos trofozoítos con sus discos ventrales ya maduros.	

Cuadro tomado de Adam 2001

Clasificación

Giardia es un organismo eucarionte considerado miembros de los protozoarios. Los protozoarios son organismos clasificados en base a su morfología en: flagelados, ciliados, amibas y esporozoarios. *G. lamblia* es clasificada como protozoario flagelado, en los que están incluidos: los kinetoplastidos (ej. *Leishmania spp* y *Trypanosoma spp*), los parabasalidos (ej. *Trichomonas vaginalis*) y Dientamoeba (ej. *Dientamoeba fragilis*). *Giardia* ha sido colocada en el orden Diplomonadida (presenta dos karyomastigotes, con 4 flagelos, 2 núcleos, sin mitocondrias, sin aparato de Golgi) y también pertenece a la familia Hexamitidae (Giardiidae) (6 u 8 flagelos, 2 núcleos, simétrico, con axostilo y cuerpo medio). (Adam 2001, Kolisko 2005, Kolisko 2008, Cavalier-Smith 2003, Plutzer 2010).

Clasificación taxonómica de *Giardia intestinalis*

Reino	Protozoa	(Cavalier-Smith 2003)
Phylum	Sarcomastigophora	Metamonada
Subphylum	Mastigophora	Trichozoa
Superclase		Eopharyngia
Clase	Zoomastigophorea	Trepomonadea
Subclase		Diplozoa
Orden	Diplomonadida	Giardiida
Familia	Hexamitidae	Giardiidae
Género	<i>Giardia</i>	
Especie	<i>intestinalis</i>	

Morfología

G. intestinalis presenta dos formas distintas en su ciclo de vida: el trofozoito que es la forma vegetativa y quien produce los signos clínicos en el huésped, y el quiste, que es la forma de resistencia, responsable de la infección y transmisión del parásito.

Trofozoíto

Presenta una forma de pera o gota de agua, tiene una superficie plana que corresponde a la parte ventral, y una superficie convexa que es su parte dorsal. Presenta un sistema de vesículas periféricas, las cuales corresponden a endosomas y a lisosomas (Benchimol 2002). Mide aproximadamente 12-15 micras de largo y 5-9 micras de ancho. Presenta dos núcleos cada uno con su nucléolo (Jiménez-García 2008, Feng Tian 2010), carecen de típicas mitocondrias, peroxisomas y de un típico aparato de Golgi. (Ankarklev 2010, De Souza 2004, Lane 2002) En el citoesqueleto presenta un cuerpo medio. El disco adhesivo o suctor y los cuatro pares de flagelos (estos emergen de los cuerpos basales y tienen en su interior nueve pares de microtúbulos) están compuestos de las proteínas del citoesqueleto (α -tubulina, β -tubulina, α -giardina, β -giardina y δ -giardina). El trofozoíto tiene gran capacidad de adhesión gracias al disco suctor (el cual es una estructura cóncava que contiene proteínas contráctiles como: actina, α -actina, miosina y tropomiosina) y gran movilidad gracias a los flagelos, los cuales están distribuidos de la siguiente manera: 2 anteriores, 2 latero-posteriores (los cuales proveen el movimiento del trofozoíto), 2 ventrales (al encontrarse cerca del disco suctor, ayudan a expeler el fluido de la concavidad formada por el disco adhesivo incrementando la succión contra la superficie de las microvellosidades) y el par de flagelos caudales (estos se encuentran en la porción terminal, y se mueven vigorosamente, favoreciendo la circulación interna de los fluidos en el citoplasma) (Ankarklev 2010). Durante la división celular, los núcleos del parásito se mueven lateralmente seguidos por una replicación nuclear, dando como

resultado trofozoítos con 4 núcleos. Entonces los trofozoítos se dividen longitudinalmente (Adam 2001).

El quiste, el enquistamiento y el desenquistamiento.

El quiste es una estructura ovalada, que mide aproximadamente 5 por 7-10 micras en diámetro, y está cubierto por una pared de 0.3-0.5 micras de grosor, la cual es una matriz extracelular de fibrillas resistentes compuestas por 43% de carbohidratos, presenta 4 núcleos en su interior (de Souza 2004). Se han identificado 4 proteínas principales en la pared del quiste, estas proteínas tienen un peso de 29,75, 88 y 102 kDa en tamaño. Otro componente de la pared es la galactosamina en forma de N-acetilgalactosamina (Adam 2001). El quiste puede permanecer viable en el medio ambiente por más de 3 meses en condiciones idóneas de temperatura y humedad (Busatti, 2009). Se ha visto que el quiste resiste más a temperaturas bajas, ya que lo conservan, y en cambio a altas temperaturas, lo van a desecar. Resiste 77 días a 8°C, 5-24 días a 21°C, y en condiciones de laboratorio resiste 4 días a 37°C (Hoar 2009).

El enquistamiento es un largo proceso de diferenciación, resultado de la transformación de la fase móvil del trofozoíto, a la fase no móvil, el quiste infectante. Éste proceso es inducido en respuesta a los factores intrínsecos del huésped, como son: altos niveles de bilis, bajos niveles de colesterol y el pH del medio ambiente interno (Ankarklev 2010). Aún así, todos los trofozoítos de una población no se sincronizan para enquistarse (de Souza 2004). El enquistamiento empieza con la internalización de los flagelos del trofozoíto, el parásito pierde la propiedad de adhesión ya que el disco suctor comienza a fragmentarse en cuatro fragmentos con forma de media luna, los cuales se mantienen dentro del citoplasma, y el trofozoíto entra en un estado hipometabólico (Ankarklev 2010). En el citoplasma, se presentan sitios donde se empiezan a sintetizar las proteínas que

van a ensamblar la parte filamentosa de la pared del quiste. El proceso de enquistamiento lleva entre 10-16 horas (Adam 2001)

El desenquistamiento

Este proceso es activado por los jugos ácidos del estómago del huésped, cuando el quiste ya activado pasa al duodeno los primeros en emerger por uno de los polos del quiste son los flagelos, y posteriormente el cuerpo del excizoíto (éste difiere del trofozoíto, en que no contiene disco suctor y presenta 4 núcleos). Las vesículas periféricas del excizoíto empiezan a liberar unas enzimas que van a degradar la pared del quiste desde adentro. Mientras se libera, el excizoíto empieza a dividirse y al mismo tiempo incrementa su metabolismo y sintetiza sus organelos, al poco tiempo da como resultado dos trofozoítos (Ankarklev 2010). *In vitro* un óptimo desenquistamiento se realiza en un pH de 1.3-2.7 (Adam 2001).

Ciclo biológico.

Una vez que el huésped ingiere los quistes, estos en estómago, se activan al contacto con los jugos gástricos, empiezan el proceso de desenquistamiento, dentro del quiste los excizoítos empiezan a diferenciarse en trofozoítos. Cuando los trofozoítos se encuentran en el ambiente duodenal, donde se alimentan de los nutrientes que ingiere el huésped, se adhieren por medio del disco suctor a los enterocitos del duodeno, dividiéndose con un intervalo de 6-12 horas. Conforme los trofozoítos avanzan en su paso por el intestino, empiezan el proceso de enquistamiento, los quistes tienen una tasa metabólica más baja que los trofozoítos, lo que les permite resistir factores ambientales cuando salen con las heces del organismo (Ankarklev 2010). Cuando los quistes son eliminados al exterior, pueden infectar un nuevo huésped, cuando son ingeridos en el alimento, bebida, cuando los animales se limpian la región perianal, o cuando por malas técnicas de manejo, los animales pequeños maman de glándulas mamarias sucias con heces contaminadas con quistes Figura 1. En infecciones experimentales se ha demostrado que la infección puede establecerse con 10 quistes. Después de 5-41 días de haber realizado la infección experimental, se han recuperado quistes en las heces (Hernández 2008).

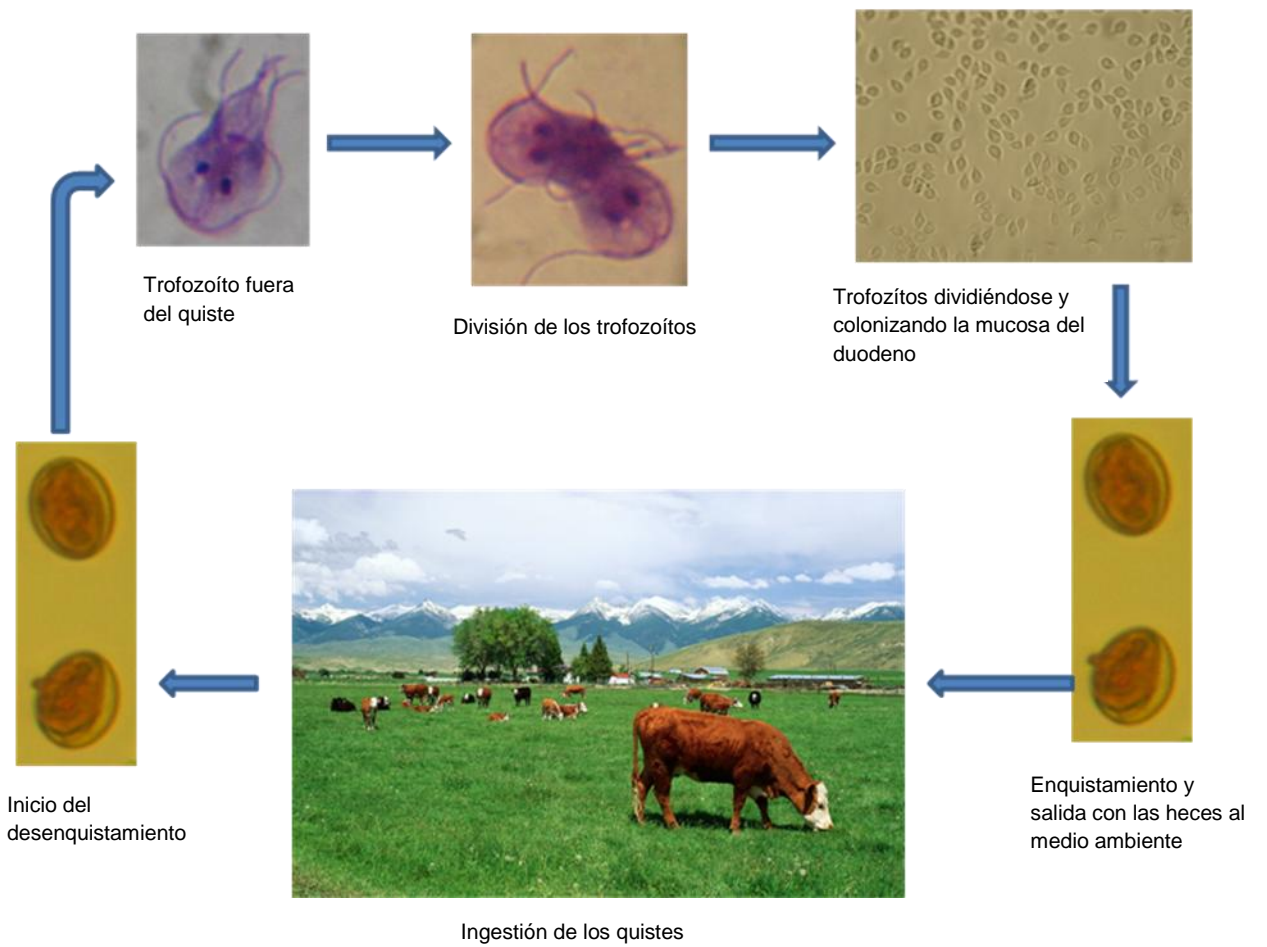


Figura 1. Esquematzación del ciclo biológico de *Giardia duodenalis*.

Mecanismos patogénicos.

Giardia puede producir daño en su huésped mediante diferentes mecanismos, pueden ser: traumático, enzimático, tóxico, formación de barrera mecánica y competencia con el huésped.

Traumático.

La adherencia de los trofozoítos a los enterocitos, permite la colonización del intestino. Esta adherencia es llevada a cabo gracias a factores físicos y químicos. La adherencia se produce por la presión negativa del disco suctor (es el efecto de una ventosa), generada por la fuerza hidrodinámica secundaria a la actividad constante de los flagelos ventrales. Cuando la adhesión es por medios bioquímicos participan las proteínas contráctiles del disco suctor y las lectinas (glicoproteínas que se encuentran en la superficie del trofozoíto y que se activan al contacto con proteasas que se encuentran en el intestino) (Faubert 2000) Cuadro 2. La interacción de las lectinas con los enterocitos produce exfoliación, lisis celular, aumento en el índice mitótico, defectuosa capacidad para transportar carbohidratos y aminoácidos, pérdida del cemento intracelular y aplanamiento de las microvellosidades (Ponce 2004, Martínez 2006). Usualmente los trofozoítos no penetran el epitelio. Sin embargo, la pérdida del cemento intracelular, permite que los trofozoítos penetren el epitelio, esto se ha observado en humanos y ratones (Faubert 2000, Ponce 2008).

Cuadro 2 Factores de virulencia de *G. intestinalis*

Función.	Factor de virulencia.
Adhesión	El disco ventral y las lectinas de superficie permiten la adhesión y la colonización del endotelio intestinal.
Evasión de los factores naturales del lumen intestinal	La motilidad flagelar permite la re-localización en nuevas células endoteliales durante la colonización, las proteínas variables de superficie, ayudan a que el parásito se proteja de las proteasas lumbinales, oxígeno y radicales libres.
Variación antigénica	Las proteínas variables de superficie se modifican para evitar el ataque de las IgA.
Alteración de las defensas naturales del organismo	Liberación de arginina deiminasa y otros productos para bajar la producción de oxido nítrico.
Modificaciones antiinflamatorias	No se conocen los productos que tienen un rol antiinflamatorio.
Supervivencia al ácido del estómago y al ambiente externo.	Diferenciación en quistes.

Tomado de Ankarklev 2010.

Enzimático.

Enzimas del trofozoíto y sulfatasas, fosfatasa ácida, hidrolasas, proteinasas de cisteína y tiolproteinasas, favorecen la adherencia del parásito al epitelio intestinal debido a que atacan las glucoproteínas de los enterocitos y alteran su integridad (Ponce 2004). Las proteinasas de cisteínas inducen la apoptosis de los enterocitos (Ankarklev 2010).

Tóxico.

Se ha observado que el medio de cultivo donde crecen las *Giardias* produce alteraciones en el epitelio intestinal. También se ha referido el gen de una proteína variable de superficie (CRP136) que tiene secuencias repetidas codificadas por un péptido y cuya homología a una sarafotoxina (veneno de la víbora *Ataraspis enggadensis*) es de 57% (Ponce 2004). Se piensa que las toxinas son enzimas hidrolíticas que son secretadas por las vacuolas lisosomales que se encuentran en la superficie del parásito, estas enzimas inducen contracción en la musculatura lisa del intestino, y tienen un efecto citotóxico en los leucocitos. (Martínez 2006). Aunque otros estudios describen que la presencia de aislados más patógenos que otros, depende de la expresión genética de la toxina (Upcroft 1998)

Barrera mecánica.

Cuando las condiciones de crecimiento son óptimas, un gran número de trofozoítos crean una barrera entre las células epiteliales y la luz intestinal que afecta la absorción (Ponce 2004, Martínez 2006).

Competencia con el huésped.

Los trofozoítos compiten con el huésped por las sales biliares, su disminución en el intestino altera la formación de micelas y se produce mala absorción de las grasas y de vitaminas liposolubles (Wolfe 1992), con la consecuente esteatorreal. También compiten por el colesterol y fosfolípidos ya que *Giardia* no los puede

sintetizar de novo. Tampoco sintetiza aminoácidos, ni nucleótidos, y cuando los necesita los adquiere del medio. Para la producción de energía, además de la glucosa, utiliza al aspartato, alanina y arginina. La cisteína la toma del medio para proteger su membrana de los radicales libres. Además, compete por los micronutrientes como el zinc y hierro (Ponce 2004).

Manifestaciones clínicas y hallazgos histológicos.

Cuando *Giardia* coloniza el intestino, aparte de dañar directamente a los enterocitos, reduciendo las microvellosidades, impide la correcta absorción de nutrientes, los cuales al no ser absorbidos por el huésped, inducen un sobrecrecimiento bacteriano en el intestino, favoreciendo procesos fermentativos que se relacionan con la presentación de flatulencia en el huésped (Martínez 2006). También, la actividad de la lactasa, maltasa y sacarasa se ve reducida, resultando en mala digestión (Olson 1995, Ruest 1997), así como la absorción de agua, sodio y cloro, y el transporte de glucosa y aminoácidos se ve alterado (Farthing 1996). La bilis y las sales biliares son importantes en el metabolismo de *Giardia*, por lo tanto las tiene que tomar del huésped. Esto produce una disminución en la solubilidad de las sales en el intestino y una reducción en la formación de micelas en el intestino, además, las sales biliares libres son membranotóxicas y causan aumento en la secreción intestinal. Aunado a todo lo anterior, las concentraciones intraluminares de tripsina, quimotripsina y lipasa se ven reducidas en pacientes sintomáticos. El epitelio de las vellosidades se encuentra infiltrado de neutrófilos y células mononucleares, e hiperplasia de las criptas y de nódulos linfoides. Se presenta una sobreproducción de IgM en la mucosa y en los nódulos linfoides, pero hay deficiencia en la producción de IgA (Farthing 1996). Ya sea en humanos o animales, los signos clínicos incluyen, diarrea aguda o crónica, heces pastosas y a veces con mucosidad, dolor abdominal, deshidratación, pérdida de peso y reducción en la ganancia de peso, lo que hace que las canales salgan con menor peso al esperado (Thompson 2008) y en animales baja la producción de leche (Farthing, 1996, Olson 1997). Se han

realizado estudios donde se observó una variación en la virulencia que hay entre cepas de *Giardia*. Algunas afectan más que otras la integridad de las vellosidades, y otras alteran más la absorción de electrolitos y glucosa (Farthing 1996). En animales, además de la diarrea, que se ha reportado en becerros, corderos y potros (Olson 1997), también hay apetito disminuido (Koudela 1998, Wolfe 1992, Farthing 1996). En los pacientes asintomáticos, sus mecanismos de defensa, están controlando la carga parasitaria y mantienen la infección en forma subclínica (Farthing 1996). Otro órgano donde se han encontrado trofozoítos de *Giardia* ha sido la vesícula biliar, se encontró en bovinos adultos que fueron sacrificados en rastro (Degerli S 2003).

Epidemiología

Giardia intestinalis es un parásito de distribución mundial. Su frecuencia es mayor en zonas tropicales y subtropicales, donde la temperatura, la humedad y las malas condiciones higiénicas favorecen su transmisión (Thompson 2004, Hernández 2008). La giardiasis es considerada como la enfermedad intestinal producida por protozoos más frecuente en países desarrollados y afecta un estimado de aproximadamente de 280 millones de personas a nivel mundial. En países en desarrollo, afecta entre un 20-30% de la población, siendo los niños y los ancianos de más de 65 años los más afectados, debido a los hábitos de higiene y su sistema inmunológico (Hernández 2008). Ya se ha mencionado que la infección es más prevalente en niños que en adultos, pero también lo es en niños de familias grandes, en asilos de ancianos, guarderías, y en escuelas primarias. Lugares de comida con poca higiene, ciertas prácticas sexuales y el ser un individuo inmunosuprimido, también son factores de riesgo para contraer la giardiasis (Bowman 2010). La infección se adquiere por la ingestión de quistes procedentes de materia fecal y la transmisión puede ser de dos formas: a) fecal-oral, cuando sucede por contacto con personas o animales infectados por *Giardia* (Hernández 2008) y b) fecal-oral indirecta, por el consumo de agua (la cual podría ser la más frecuente, ya que los cuerpos de agua pueden contaminarse fácilmente con heces de humano o de animales), o alimento contaminado con quistes (Hernández 2008). Se ha señalado la importancia de algunos fómites entre los que se incluyen desde los juguetes hasta algunos vectores mecánicos como las moscas, las que pueden tener mucha importancia en los mecanismos de diseminación de los quistes (Hernández 2008, Szostakowska 2004). En diferentes partes del mundo la prevalencia es variable, en bovinos oscila del 9 al 73% y en ovinos del 1.5 al 38% (Geurden 2010). Miller en el 2007, realiza un estudio, donde, encontraron que las corrientes de agua localizadas cerca de explotaciones de animales de producción lechera, las cuales normalmente son intensivas (Geurden 2010), podían presentar de 1 a 14000 quistes por litro de agua, la mayor concentración de quistes se

encontraron en las corrientes de agua que se encontraban cerca de animales jóvenes (Miller 2007), por lo que éstos son considerados la mayor fuente de infección de infección (Geurden 2010). Los animales que se encuentran en extensivo, se encuentran en determinadas áreas, pastoreando por un tiempo prolongado, tienen acceso a bebederos o a ojos de agua, y posteriormente son transferidos a otra zona de pastoreo antes de ser llevados a rastro. Con éstas prácticas de manejo se puede disminuir la posibilidad de transmisión entre animales. Sin embargo, el área y las reservas de agua pueden quedar contaminadas con las heces con quistes (Robertson 2009). Por otro lado, los manejadores o cuidadores de animales, también pueden ser la fuente de infección, tanto para los animales como para ellos mismos (Geurden 2010). En el caso de los animales de compañía, por ejemplo en caninos la prevalencia va de 10% en animales bien cuidados hasta 100% en criaderos, donde los animales están en hacinamiento (Thompson 2008), y es lo mismo que con los animales de producción, son susceptibles de adquirir la giardiosis, por lo tanto podrían ser una fuente de infección para ellos mismos y para sus dueños. En el caso de los animales de compañía, algunas veces los dueños le tienen tal cariño a su mascota que mantienen un contacto muy cercano, permitiéndole al animal dormir con ellos, tomar comida del plato del dueño, cargando al animal casi siempre. Por lo tanto la infección con *Giardia*, podría evitarse si los dueños mantuvieran buenas prácticas de higiene, llevar a la mascota regularmente al veterinario, y darle su debido lugar a la mascota (Bowman 2010). Además de los animales domésticos y los humanos, los animales silvestres, también son huéspedes de *Giardia intestinalis*, por lo tanto podrían ser una fuente de infección. Sin embargo, no se conoce bien en qué dirección se realiza la transmisión de *Giardia* cuando están involucradas diferentes especies de huéspedes (Hunter 2005). *Giardia* es un gran problema de países en desarrollo, donde se vuelve a utilizar el agua sucia en regar las hortalizas sin darle un apropiado tratamiento. Esto obviamente es causa de brotes de giardiosis (Lane 2002).

Genotipos.

Como ya se había mencionado el género *Giardia* afecta a diferentes especies, en base a su morfología se han descrito 5 especies. Pero dentro de la especie *G. intestinalis* (la cual es un grupo complejo, en el cual los trofozoítos y quistes son morfológicamente indistinguibles), y gracias al uso de técnicas bioquímicas, isoenzimáticas y de biología molecular, se han encontrado diferentes genotipos, mediante el uso de enzimas de restricción, hibridación, PCR-RFLP'S. Por lo tanto, se han realizado varios estudios tratando de aclarar el comportamiento de éstos genotipos en las rutas de transmisión. Estudios enzimáticos electroforéticos, amplificación de genes de las proteínas variables de superficie (VSP) y el gen de la glutamato deshidrogenasa (gdh), demostraron por primera vez, la evidencia de que algunos ensamblajes están asociados con determinados huéspedes (Monis 1999). Mayhofer en 1995, demostró que todos los aislados provenientes de humanos, pertenecen a alguno de los dos genotipos, designados como ensamble A y ensamble B. El ensamble B parece altamente heterogéneo, con solo dos aislados que exhiben el mismo perfil enzimático (BIII y BIV). Mientras el ensamble A varía un poco más, presentando dos grupos (AI y AII) (Mayrhofer 1995, Monis 1999). El ensamble AI lo podemos encontrar en animales y en humanos que viven en contacto cercano, y se encuentra distribuido en todo el mundo. El ensamble AII se ha localizado exclusivamente en humanos (Thompson 2004). Aunque, en México se encontró éste ensamble en animales domésticos (Ponce 2002). El ensamble B se encuentra tanto en humanos como en animales (Thompson 2004). Los otros ensamblajes están un poco más restringidos a ciertos huéspedes: C y D los encontramos en caninos, el E se encuentra en animales de granja, el F en felinos, el G en roedores (Read 2004, Sprong 2009) y el H en focas (Lassek 2010)

Cuadro 3.

Cuadro 3 Genotipos de *G. intestinalis* y los huéspedes donde se encuentran.

Genotipos de <i>Giardia intestinalis</i>	Huésped en el que se encuentran
AI	Humanos, castores, gatos, lémures, perros, chinchillas, ovejas, alpacas, caballos, cerdos y bovinos.
All	Humanos, castores, perros y gatos.
BIII y BIV	Humanos, castores, perros y monos.
C y D	Perros.
E	Ovinos, caprinos, porcinos y bovinos.
F	Gatos.
G	Ratas.
H	Focas.

Recientes estudios basados en el DNA, han identificado más subtipos de aislados tanto de humanos como de animales, en el ensamble A se han encontrado A3, A4 y A5, en el ensamble B, se han encontrado BS1, BS2 y BS3, o CS1, CS2, CS3, pero hay que considerar que esto a veces depende de que gen se utilizó para amplificar. Ya se mencionaron los ensamblajes que generalmente están restringidos a ciertos huéspedes. Sin embargo, por ejemplo el ensamble F se asoció con infecciones por *Giardia* en 7 humanos en Etiopía (Gelanew 2007).

Diagnóstico.

Anteriormente se mencionaron los signos clínicos que se presentan en la giardiosis. Sin embargo, deben realizarse pruebas de laboratorio, ya que puede confundirse con otras etiologías (bacterianas, virales, e incluso otras parasitarias como coccidias). Por lo tanto el diagnóstico clínico debe realizarse a través de un muestreo seriado de 3, si se realiza una sola toma, la posibilidad de encontrar la muestra positiva se reduce a 70%, y a veces es necesario tomar muestras hasta por 10 días (Wolfe 1992, Farthing 1996), en el caso de animales de producción, podría requerirse un muestreo de varios animales que se encuentren dentro del mismo corral (Geurden 2010), una vez que se colectan las heces hay que realizar un examen coproparasitológico y para poder corroborar la presencia de quistes a través de observación directa al microscopio, por detección de antígenos, o por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR (Geurden 2010).

Observación microscópica. Tanto quistes como trofozoítos pueden ser detectados por observación directa, y después de realizar la concentración con sulfato de zinc. Los trofozoítos se pueden detectar a veces en muestras con diarrea, como resultado del peristaltismo incrementado. Sin embargo, los quistes son los que normalmente se observan al microscopio, el bajo costo de este procedimiento es una ventaja, aunque la necesidad de experiencia en la observación de quistes podría considerarse una desventaja (Geurden 2010). Los trofozoítos, pueden ser detectados fácilmente por citologías endoscópicas, o por biopsias de intestino delgado (Farthing 1996).

Detección de antígenos. Para la detección de antígenos de *Giardia*, se utilizan técnicas de inmunofluorescencia, ensayos de ELISA, las cuales utilizan anticuerpos monoclonales contra las proteínas de pared del quiste. Con una sensibilidad limitada a detectar 1000 quistes por gramo de heces. Este tipo de técnicas tiene las desventajas de que necesitan personal capacitado para realizarlas y son costosas (Geurden 2010). La técnica de PCR es usada principalmente para determinar el genotipo de *Giardia* que está parasitando, se utiliza básicamente para investigación, y se basa en el uso de genes, como son: el

gen de la glutamato deshidrogenasa (gdh), el gen de la unidad ribosomal RNA 18S, genes que codifican a: de proteínas variables de superficie (VSP), β -giardina, triosa fosfato isomerasa (TPI). En teoría ésta técnica es tan sensible que permite detectar desde un quiste. Esta es una técnica demasiado costosa como para considerarse de diagnóstico (Farthing 1996, Geurden 2010, Cacciò 2008).

Tratamientos

Los esfuerzos en controlar la giardiasis, se ha basado en el uso terapéutico de ciertos fármacos, como: derivados de la naranja de acridina (la quinacrina), nitroimidazoles, bencimidazoles, nitrotiazoles, nitrofuranos y furazolidona.

Nitroimidazoles.- El metronidazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol, corresponden a éste grupo. Los nitroimidazoles fueron descubiertos en 1955, y se vio que eran altamente efectivos contra ciertos protozoarios. El metronidazol, actúa contra *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica*, pero en 1962, Darbon reportó que también podía ser usado contra *G. intestinalis*. Su mecanismo de acción se basa en utilizar las vías metabólicas anaeróbicas presentes en Giardia. Una vez que entra al trofozoíto, reduce su grupo nitro tóxico (mediante la cadena de transporte de electrones como flavoproteínas y ferredoxina, siendo la enzima piruvato ferredoxin oxidoreductasa (PFOR), la responsable de dicha acción) e interactúa con las macromoléculas de la doble hélice del DNA produciendo así pérdida de la estructura y ruptura de las cadenas helicoidales y por lo tanto muerte del trofozoíto. También inhibe la respiración del trofozoíto, produciendo radicales tóxicos que reaccionan con los componentes celulares. En el quiste no tiene efecto, gracias a la poca permeabilidad de la pared del quiste. Ya se han generado cepas resistentes al metronidazol, éstas cepas reducen la actividad de la piruvato ferredoxin oxidoreductasa, la cual se requiere para activar la reducción de los nitroimidazoles. Los nitroimidazoles se absorben completamente por vía oral y penetra todos los tejidos del cuerpo, también se le puede encontrar en secreciones como: saliva, sudor, leche, semen y secreciones vaginales. Son metabolizados en hígado y excretados por orina. La dosis es de 250 mg/3veces al día/7días. En niños es de 7.5 mg/kg/día/3 veces al día/5-7 días. La eficacia es de 90 a 97%. Los efectos colaterales son: anorexia, náuseas, sabor metálico, dolor abdominal, mareos, vómito, cefalea y es genotóxico. Pancreatitis y toxicidad del sistema nervioso (desorientación, debilidad, ataxia), se pueden presentar con altas dosis (Caylor, 2001) Estudios en ratas y ratones han demostrado que es

carcinogénico. Tinidazol. Éste tiene una vida media más larga que la del metronidazol, lo cual hace posible tomarlo en una sola toma al día, tiene una eficacia del 80-100%, los efectos adversos son: vértigo y dolor abdominal. El ornidazol tiene una eficacia del 92-100%. El secnidazol, también se administra en una dosis, y la eficacia es del 85%. Los efectos adversos que se han presentado son: náusea, anorexia y dolor abdominal (Gardner 2001, Rossignol 2010).

Quinacrina.- En 1930, fue utilizada como agente antimalárico durante la Segunda Guerra Mundial, pero después de esto, se utilizó principalmente contra *Giardia*, teniendo una eficacia del 90%. Sin embargo, su uso declinó y su producción en Estados Unidos se detuvo en 1992. Éste fármaco se intercala en el DNA y su interacción provoca la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos. *In vitro*, la quinacrina reduce la viabilidad de los quistes y los porcentajes de desenquistamiento. Se ha generado resistencia *in vitro*. Su eficacia se ha determinado en administraciones de 5-10 días, siendo del 95%. Efectos adversos como: sabor metálico, o vómito, se ha reportado en el 28% de los casos, y coloración amarilla de la piel y orina, se ha presentado en 5% de los casos. A veces también se han presentado efectos como: náusea, vómito y dolor de cabeza. Está contraindicada en mujeres embarazadas, por la posibilidad de que provoque espina bífida y agenesia renal (Gardner 2001).

Furazolidona.- Es un compuesto de los nitrofuranos que se descubrieron en 1940. Es efectiva contra varias bacterias: *Klebsiella spp.*, *Clostridium spp.*, *Escherichia coli.*, *Campylobacter spp* y *Staphylococcus aureus*. A principios de la década de los 50's se empezó a usar la furazolidona contra *Giardia*, en Estados Unidos su uso está aprobado y se mantiene su uso a nivel mundial, su presentación es en suspensión y por lo tanto se utiliza para pacientes pediátricos. Su mecanismo de acción es a través de una activación reductiva, a diferencia del metronidazol, lo hace vía NADH oxidasa. La forma en cómo afecta al trofozoíto, está correlacionada con sus productos tóxicos, que pueden dañar los componentes celulares, incluyendo el DNA. La furazolidona es absorbida

rápidamente por vía gastrointestinal y se metaboliza en tejidos. Su porcentaje de eficacia va del 80-96%. Los efectos secundarios como: náuseas, vómito y diarrea, se reportan en el 10% de los pacientes que son tratados con furazolidona. Estudios *in vitro* han demostrado que éste fármaco es mutagénico en bacterias, y cuando se administra por varios días causa tumores mamarios en ratas y tumores pulmonares en ratones (Gardner 2001).

Bencimidazoles.- Los derivados del bencimidazol son de gran importancia en el área de salud animal humana, debido al amplio espectro de actividad biológica que presentan. Éste actualmente los compuestos bencimidazólicos de uso común en la práctica clínica para el tratamiento de las enfermedades parasitarias son el albendazol, el flubendazol y el mebendazol. Sin embargo, sólo el albendazol y el mebendazol, presentan actividad antiprotozoaria contra *G.intestinalis*. Estos fármacos se unen directamente a la tubulina de los microtúbulos del parásito destruyendo así su disco de adhesión en el que hay gran cantidad de dicha proteína y ocasionando de esta manera su muerte (Aguilar 2007). Estudios *in vitro* llevados a cabo al momento del enquistamiento, han demostrado que el albendazol produce una ruptura del disco (Hausen 2009), y éste se localiza en forma aleatoria en el citoplasma del parásito. Sin embargo, también se ha visto que dichos quistes se mantienen viables a pesar del efecto del albendazol (Gardner 2001, Hausen 2006, Rossignol 2010). Se han hecho estudios en becerros donde se ha visto una reducción en la excreción de quistes con febendazol y con albendazol. (Geurden 2010) y por el contrario se ha observado una ganancia de peso en animales tratados con febendazol (Geurden 2010). También se han reportado casos clínicos de giardiosis resistentes al tratamiento con albendazol (Abboud 2001). Se piensa que el mecanismo de resistencia al albendazol se debe a una reorganización de los microtúbulos del cuerpo medio del parásito lo que promueve su expansión y una reorganización del disco ventral (Olvera 2005). También es posible que el protozoario presente una modificación genética en la proteína que es blanco del albendazol (Jiménez-Cardoso 2009).

Nitazoxanida. Es un fármaco antiparasitario de amplio espectro, ya que actúa contra: *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*, contra helmintos como: *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Trichuris trichura*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana* y *Fasciola hepática*. Tiene una excelente biodisponibilidad después de una dosis oral, y sus principales metabolitos (tizoxanida y el glucónido de tizoxanida) son derivados activos, por lo que se ha considerado a este compuesto como una especie de profármaco. Al parecer la nitazoxanida actúa directamente con la PFOR e interfiere con la reacción de transferencia de electrones, los productos de dicha interacción no producen mutación en el ADN (Aguilar 2007). Su eficacia es del 84% (Parashar 2005). En un estudio en rumiantes, se demostró que afecta tanto la flora intestinal como las microvellosidades del intestino (Schnyder 2009), lo mismo se ha reportado en equinos (Viel 2007).

Paramomicina.- Este fármaco es un antibiótico amino glicósido de amplio espectro inhibe la síntesis de proteínas, ya que interactúa con las subunidades 50S y 30S ribosomales, dando como resultado fallas en los codones para leer el mRNA. Tiene una eficacia del 60-70%. Es el fármaco de elección para tratar la giardiasis en pacientes preñadas, ya que no se metaboliza y se excreta directamente en heces (Rossignol 2010). Desafortunadamente también afecta la flora normal del organismo (Geurden 2010).

Muchos otros compuestos o extractos se han utilizado contra la giardiasis (Barbosa 2006, Calzada 2006), para afectar su crecimiento, su mecanismo de adhesión, o simplemente su morfología. Dentro de esto compuestos o extractos, están: la curcumina (Pérez-Arriaga 2006), la menta (Vidal 2007), el orégano (Ponce-Macotella 2006).

Planteamiento del problema

En otros países se han hecho estudios que evidencian el papel zoonótico de *Giardia* en distintas especies animales ya sean de compañía o de producción. A veces no se diagnostica la giardiosis, ya que se le confunde con otras patologías y no se da el tratamiento adecuado; en humanos están probando nuevos compuestos que sean más eficaces y que presenten menos reacciones adversas. En México, en medicina veterinaria, es importante hacer estudios sobre la similitud genética entre *Giardias* de animales de granja y la sensibilidad de estas a diferentes compuestos antiparasitarios.

HIPOTESIS

Los aislados de *Giardia* obtenidos de ovinos y bovinos, tendrán diferente sensibilidad a los compuestos con potencial giardicida.

HIPOTESIS NULA

Los diferentes aislados de *Giardia* obtenidos de ovinos y bovinos presentarán la misma sensibilidad a los compuestos con potencial giardicida.

OBJETIVO GENERAL

Obtener aislados de *Giardia* provenientes de ovinos y bovinos, genotipificarlos, y utilizarlos para evaluar la eficacia de compuestos con potencial giardicida.

OBJETIVOS PARTICUARES

1. Obtener aislados de *Giardia* de ovinos y bovinos.
2. Genotipificarlos
3. Evaluar la sensibilidad de los aislados genotipificados a los compuestos con posible efecto giardicida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y procesamiento del material biológico

Muestras de caninos.

Se colectaron muestras de heces de caninos (3-10 gr), de 53 animales. Las muestras se colocaron en contenedores de plástico y se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

Muestras de bovinos y ovinos.

Se colectaron muestras de heces directamente del recto (aproximadamente 100 g) de 439 animales de pequeños rebaños de traspatio, pertenecientes a cinco Estados de la República Mexicana: Hidalgo (93 ovinos y 69 bovinos), Estado de México (12 ovinos y 30 bovinos), Morelos (160 ovinos y 5 bovinos), Querétaro (6 bovinos) y Veracruz (64 bovinos). Las muestras se colocaron en contenedores de plástico y se almacenaron a 4°C hasta su análisis. Para la búsqueda de quistes de *Giardia* se hicieron coproparasitoscópicos de concentración flotación (Faust).

Desenquistamiento y cultivo de trofozoítos de *Giardia in Vitro*

Las muestras positivas a *Giardia* se procesaron para concentrar los quistes por el método de Sheather. Los quistes se desenquistaron *in vitro*, incubándolos en solución salina balanceada de Hank's (SSBH) pH 2.0 a 37°C durante 45 minutos; posteriormente, la muestra se amortiguó con SSBH pH 7.2, se centrifugó y los quistes activados se colocaron en medio de cultivo TYI-S-33 complementado con 10% de suero fetal bovino y 1.0 mg/1.0 mL de bilis bovina, y se incubaron a 37°C. Para corroborar que los cultivos de *Giardia* estuvieran axénicos, se obtuvieron alícuotas y se sembraron en gelosa sangre y Sabouraud (Ponce-Macotella 1989).

Purificación del DNA

Los trofozoítos axénicos se lavaron con solución salina fosfatos (PBS) pH 7.0, se concentraron e incubaron en solución de lisis (Tris-HCl, 10mM (pH 7.4); ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 10mM; NaCl, 150mM; duodecil sulfatosódico (SDS), 0.4% y proteinasa K, 0.2 mg/mL) durante toda la noche a 42°C. Posteriormente se realizaron tres extracciones fenólicas con fenol:cloroformo (1:1) y una con cloroformo. Se obtuvo la fase acuosa y para precipitar los ácidos nucleicos se incubó a -20°C toda la noche con acetato de sodio 3M (pH 7.0) y etanol -20°C. Los ácidos nucleicos se disolvieron en amortiguador de TE (Tris, EDTA) (Tris-HCl, 10mM, pH 7.0; EDTA, 1mM). Para eliminar el RNA, los ácidos nucleicos se incubaron con 20µg/mL de RNasa A a 37°C durante 60 minutos, se repitió una extracción fenólica y el DNA se precipitó con etanol-acetato de sodio y se disolvió con amortiguador de TE.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's)

El DNA de *Giardia* de los aislados que se obtuvieron se utilizó para la amplificación de un segmento de ≈ 430 pb del gen de la enzima glutamato deshidrogenasa (*gdh*) mediante la PCR (Read 2004).

La mezcla de la reacción contenía: MgCl₂, 1.5 µM; dNTP's, 200µM; oligonucleótidos, 12.5µM; DNA taq polimerasa (Taq Gold Perkin Elmer Corp), 0.625 unidades; y DNA de *Giardia*, 100ng, todo en un volumen final de 25 µl. El control negativo consistió en la mezcla de la reacción sin el DNA de *Giardia* y el control positivo fue el DNA de un aislado de *Giardia* previamente obtenido de un niño (INP-H12).

Se realizó una primera amplificación con los oligonucleótidos: externo GDHef: TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT, reverso GDHiR: GTT RTC CTT GCA CAT

CTC C y la segunda amplificación fue con el interno GDHiF: CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG y el reverso GDHiR.

Las condiciones de la PCR fueron: una etapa de desnaturalización a 95°C por 10 min, 2 ciclos a 95°C por 30 seg, 56°C por 1 min y 72°C por 2 min; seguido de 55 ciclos a 95°C por 15seg, 56°C por 30 seg y 72°C por 45 seg, y un ciclo de extensión a 72°C por 7 min. Los productos generados se identificaron en geles de agarosa al 1.0% en amortiguador de tris boratos EDTA (TB) y teñidos con 0.5µg/ml de bromuro de etidio.

Para los RFLP's, 10 µl de los productos de la PCR se incubaron toda la noche a 37°C, con 5 unidades de las enzimas *Nla IV* o *Rsa I* (New England Biolabs) en los amortiguadores correspondientes. Los fragmentos de las restricciones se identificaron en geles de agarosa de alta resolución al 1.5% en amortiguador de tris boratos EDTA (TB) y teñidos con 0.5µg/ml de bromuro de etidio.

Evaluación farmacológica.

La parte farmacológica se realizó con 4 aislados genotipificados, dos de ovinos y dos de bovinos y los fármacos utilizados fueron albendazol y nitazoxanida, el compuesto utilizado fue el Alfa (5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1-H-bencimidazol).

Los trofozoítos se cultivaron en medio TYI-S33 suplementado con 10% de suero fetal bovino; posteriormente se lavaron con solución salina fosfatada (PBS) y se determinó el número de células con una cámara de Neubauer.

Se incubaron 50000 trofozoítos en tubos eppendorf de 1.5 ml con diferentes dosis de cada fármaco o compuesto Cuadro 4 y Figura 2. La incubación con los fármacos o compuesto se hizo a 4, 24 y 72 hrs. Posteriormente y para determinar la viabilidad mediante recultivo, a los tubos eppendorf se les retiró el medio con fármaco y se les agregó medio fresco y libre de fármaco se incubaron por 24 hrs, y transcurrido ese tiempo, se enfriaron los tubos por 30 min y se hizo el conteo de los trofozoítos vivos con la cámara de Neubauer Figura 3.

Cuadro 4 Fármacos y compuesto utilizados en la evaluación *in vitro*.

Fármaco o compuesto	Dosis	Tiempo de incubación	Tiempo de recultivo
Albendazol	0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 µg/ml.	4, 24 y 72 hrs.	24 hrs
Compuesto Alfa	0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 µg/ml.	4 y 24 hrs	24 hrs
Compuesto Alfa	5, 10, 15, 20,25,30, 40 µg/ml	24 hrs	24 hrs
Compuesto Alfa	0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 µg/ml	72 hrs.	24 hrs
Nitazoxanida	0.5, 1, 2, 4,6,8, 10, 12, 14mg/ml	24 hrs.	24 hrs.

Posteriormente los resultados se procesaron con el programa Biostat versión 2009 para obtener la concentración mínima inhibitoria 50 (CI 50) a través del análisis PROBIT 2009.

Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron 3 veces.

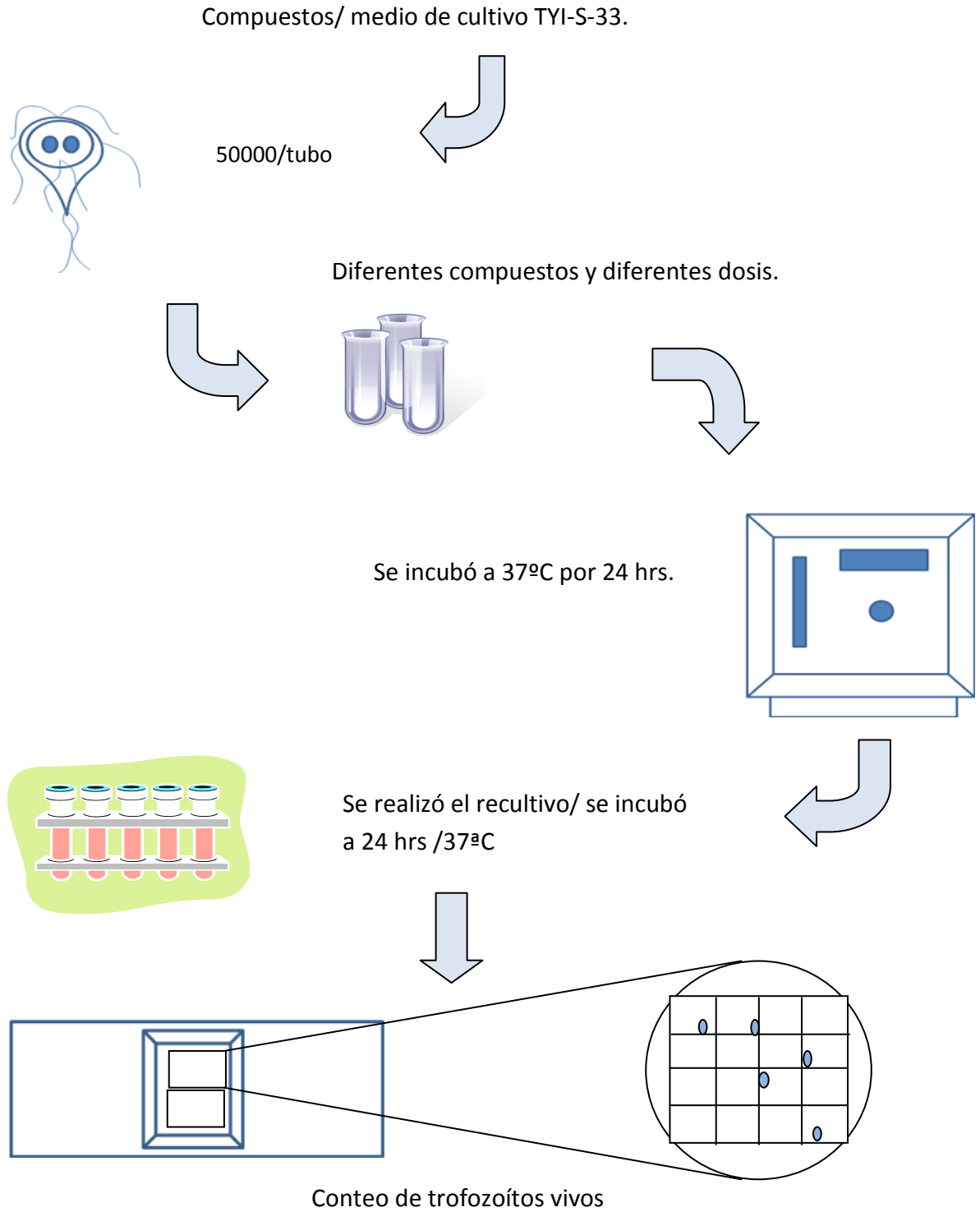


Figura 3 Metodología que se siguió para la evaluación farmacológica

Microscopía electrónica

Se realizó la evaluación del efecto del compuesto Alfa en el aislado 47-INP, primero haciendo la parte farmacológica como se describió anteriormente y después de las 72 hrs de incubación, los tubos se enfriaron a 4°C por 20 min, se centrifugaron a 3500 rpm, se decantó el medio, y se realizó 1 lavado con PBS de pH 7 estéril. Posteriormente se fijaron con glutaraldehído al 2.5% con paraformaldehído al 4% diluído en PBS pH 7, se mantuvieron así toda la noche. La postfijación se hizo con tetraóxido de osmio al 1%. Los cortes ultrafinos se tiñeron con acetato de uranilo 20 min y citrato de plomo 5 min. Las observaciones se hicieron en un microscopio electrónico modelo Zeiss EM900.

RESULTADOS

Prevalencia de *Giardia* y cultivos axénicos

La prevalencia de *Giardia* en caninos fue del 9.4 %. Sin embargo, no se pudieron establecer cultivos de *Giardia*.

La prevalencia de *Giardia* en bovinos fue del 5.17% y en ovinos del 11.3%. Se obtuvieron cultivos axénicos de *Giardia* procedentes de cinco ovinos: INP-O6, INP-O45, INP-O11, INP-O14 e INP-O3. También fueron cinco de bovinos: INP-B43, INP-B47, INP-B438, INP-B704 e INP-BVD3.

Genotipificación

PCR y RFLP's

En todos los casos la amplificación del gen de la *gdh* generó una banda de ≈ 430 pb. La restricción con *Nla IV* de los cinco aislados de ovinos y tres de bovinos generó las bandas de 90, 120 y 150 pb características del genotipo AI. En dos aislados de bovinos las bandas fueron de 80, 100 y 220 pb que corresponden al genotipo E (Fig. 4).

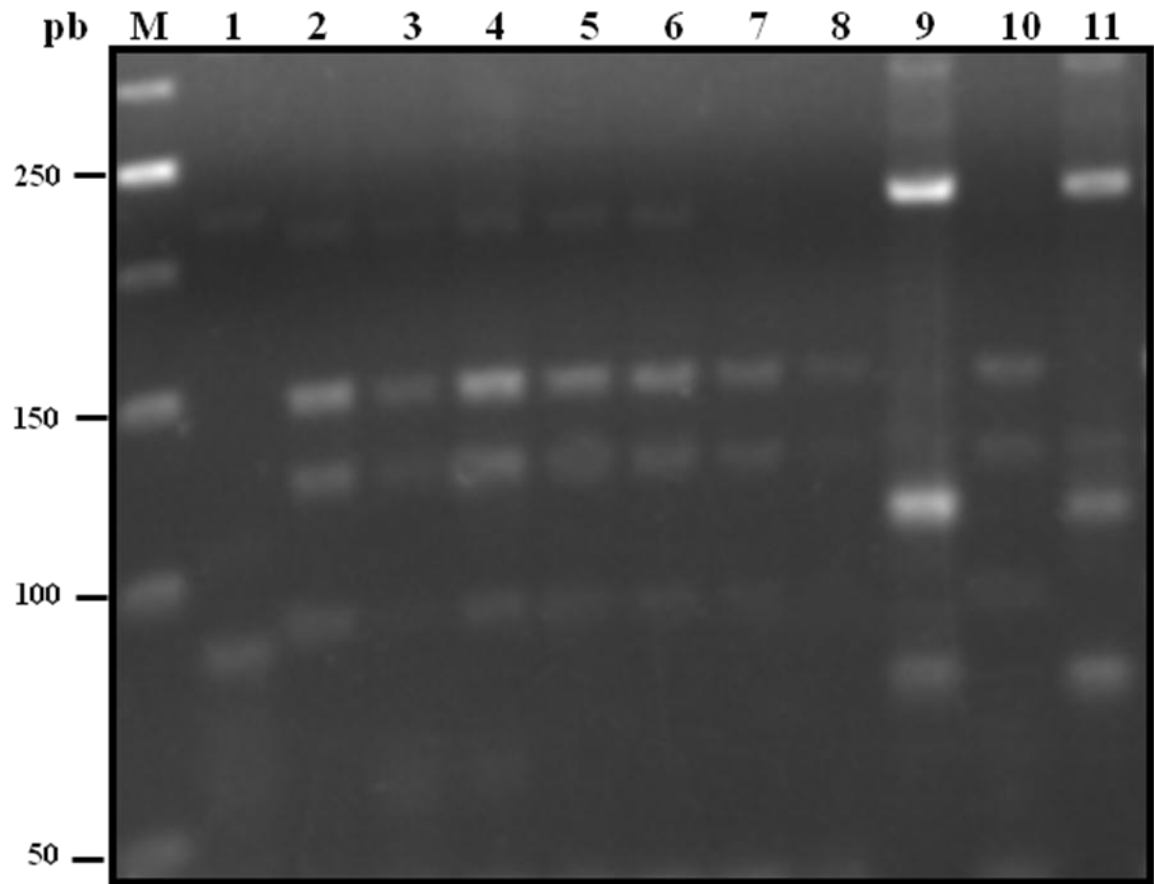


Figura 4. Análisis electroforético de los polimorfismos de los fragmentos de restricción con *Nla IV* de los productos amplificados del gen de la *gdh* de *Giardia intestinalis*. pb: pares de bases. M: escalera de 50 pb. Carril 1: aislado de humano INP-H12, con productos de 70, 80, 90 y 120 (no bien definidos), característicos del genotipo AII. Carriles 2-6: aislados de ovinos (INP-O14, INP-O6, INP-O45, INP-O11 y INP-O3), todos con productos de 90, 120 y 150 pb característicos del genotipo AI. Carriles 7-11: aislados de bovinos (INP-B43, INP-B438, INP-B704, INP-BVD3, INP-B47). 7, 8 y 10 con genotipo AI. 9 y 11 con productos de 80, 100 y 220 pb característicos del genotipo E.

La restricción con la enzima *Rsa I* de cuatro muestras procedentes de ovinos y cuatro de bovinos generaron bandas de 130 y 330 pb características del genotipo BIII (Fig. 5).

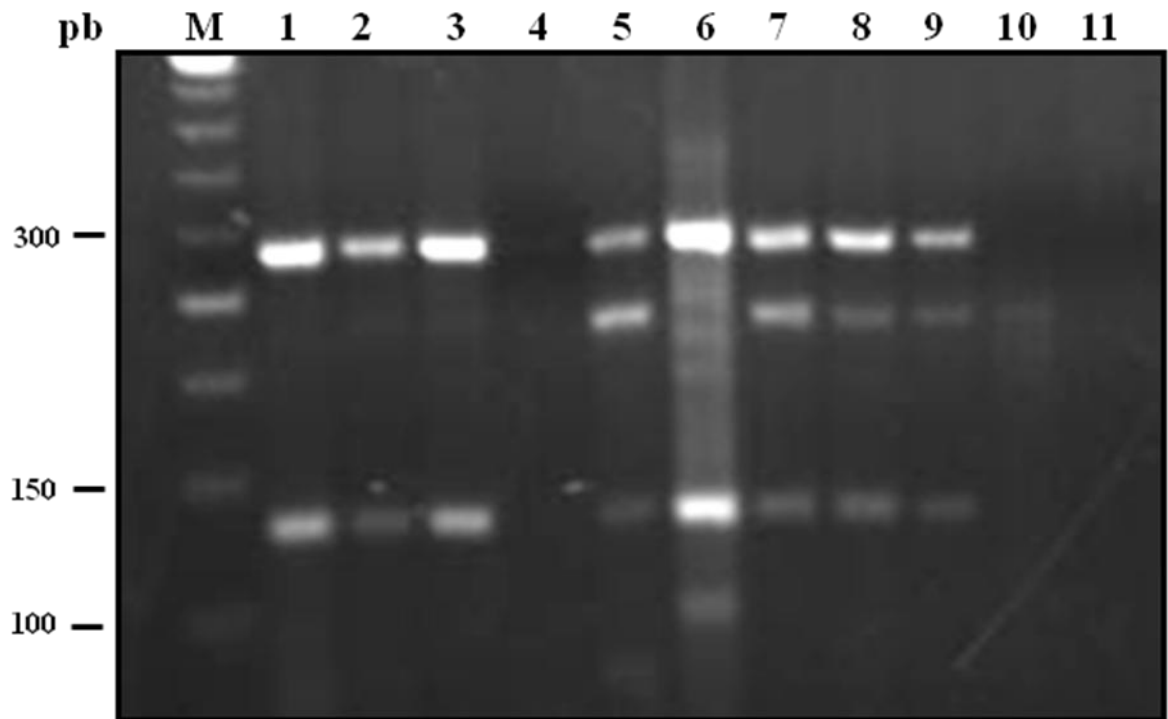


Figura.5. Análisis electroforético de los polimorfismos de los fragmentos de restricción con *Rsa I* de los productos amplificados del gen de la *gdh* de *Giardia intestinalis*. pb: pares de bases. M: escalera de 50 pb. Carril 1: aislado de humano INP-H12, con productos de 130 y 300 pb característicos del genotipo BIII. Carriles 2-6: aislados de bovinos (INP-B47, INP-B438, INP-B43, INP-BVD3 y INP-B704), carriles 2, 3, 5 y 6, con genotipo BIII. Carriles 7-11: aislados de ovinos (INP-O45, INP-O14, INP-O6, INP-O3 y INP-O11), carriles 7-9 con genotipo BIII.

Dos aislados de bovinos (INP-B438 e INP-BVD3) y cuatro aislados de ovinos (INP-O6, INP-O45, INP-O11 e INP-O14) tuvieron mezcla de los genotipos AI + BIII. Dos aislados de bovinos (INP-B704 e INP-B47) tuvieron mezcla de los genotipos BIII + E (Cuadro 5 y Figura 6).

Cuadro 5 Prevalencia de *Giardia* y genotipos predominantes en bovinos y ovinos de granjas de cinco Estados de la República Mexicana

Estado	Granjas	Bovinos analizados	Prevalencia (%)	Cultivo <i>in vitro</i>	Genotipos	Ovinos analizados	Prevalencia (%)	Cultivo <i>in vitro</i>	Genotipos
Morelos	1	NA				27	2 (7.4)	2	2 (AI + BIII)
	2	NA				93	12 (12.9)		
	3	5	0			11	0		
	4	NA				14	3 (21.4)		
	5	NA				15	0		
E México	1	30	0			12	4 (33.3)	1	1 (AI)
Hidalgo	1	8	3 (37.5)	1	1 (AI)	29	3 (10.3)	1	1 (AI + BIII)
	2	NA				64	6 (9.37)	1	1 (AI + BIII)
	3	5	0			NA			
	4	10	0			NA			
	5	46	5 (10.8)	3	1 (AI + BIII) 2 (E + BIII)	NA			
Querétaro	1	6	1 (16.6)	1	1 (AI + BIII)	NA			
Veracruz	1	64	0			NA			
Total	13	174	9 (5.17)	5		265	30 (11.3)	5	

NA no aplica

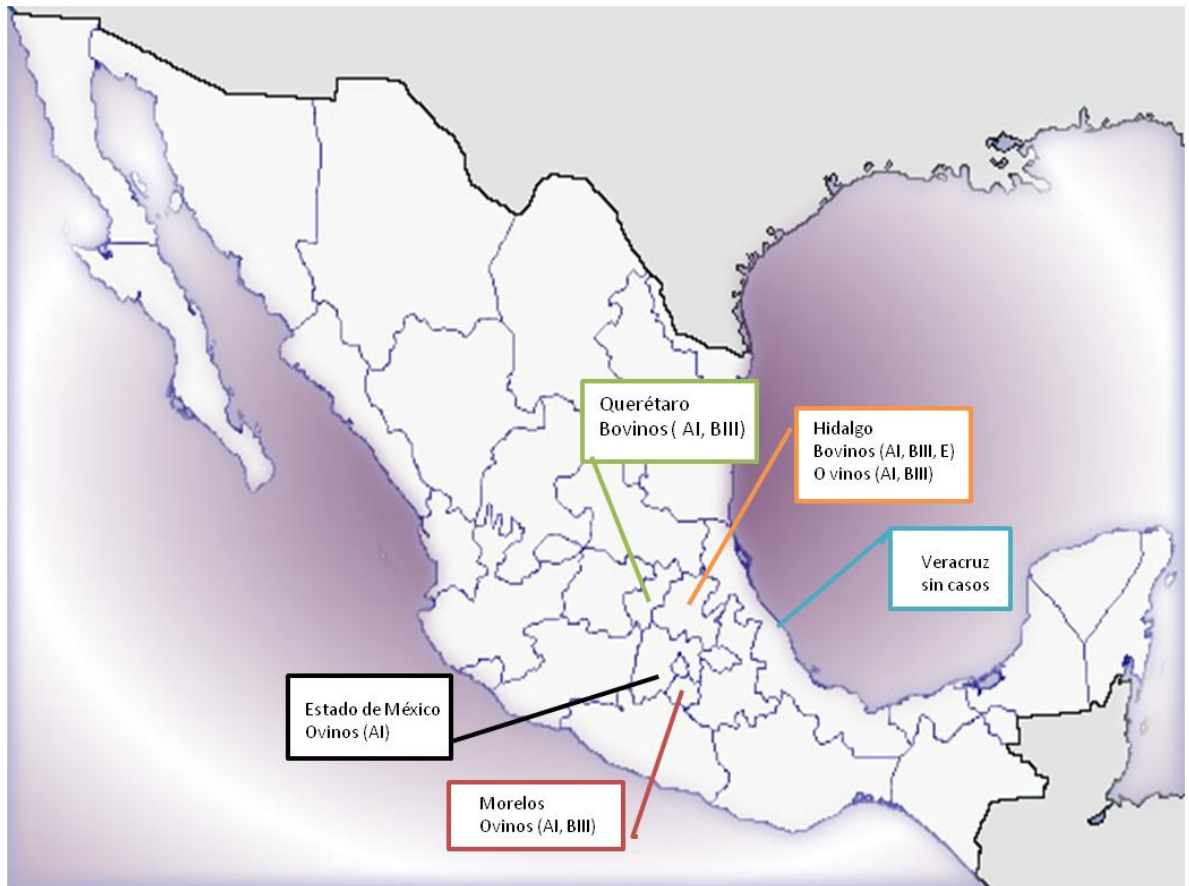


Figura 6. Genotipos que se obtuvieron por estado.

Evaluación farmacológica.

La evaluación de los compuestos se desarrolló considerando diferentes tiempos de incubación, esto se hizo con el propósito de identificar el tiempo en el que los aislados presentaran el 100 %, también se reporta la CI 50.

Cuadro 6. Actividad giardiásica del albendazol y el compuesto alfa, con 4 y 24 hrs de incubación y 24 hrs de recultivo

Aislado	4 horas de incubación		24 horas de incubación	
	Albendazol	Compuesto Alfa	Albendazol	Compuesto Alfa
43 INP (genotipo AI)	CI 50 0.0936 µg/ml 0.3527 µM	CI 50 0.0017 µg/ml 0.0049 µM	CI 50 0.0085 µg/ml 0.03203 µM	CI 50 0.1259 µg/ml 0.3693 µM

Se puede observar que hay diferencias en las CI 50 entre los 3 compuestos, tanto a las 4 horas y a las 24 horas.

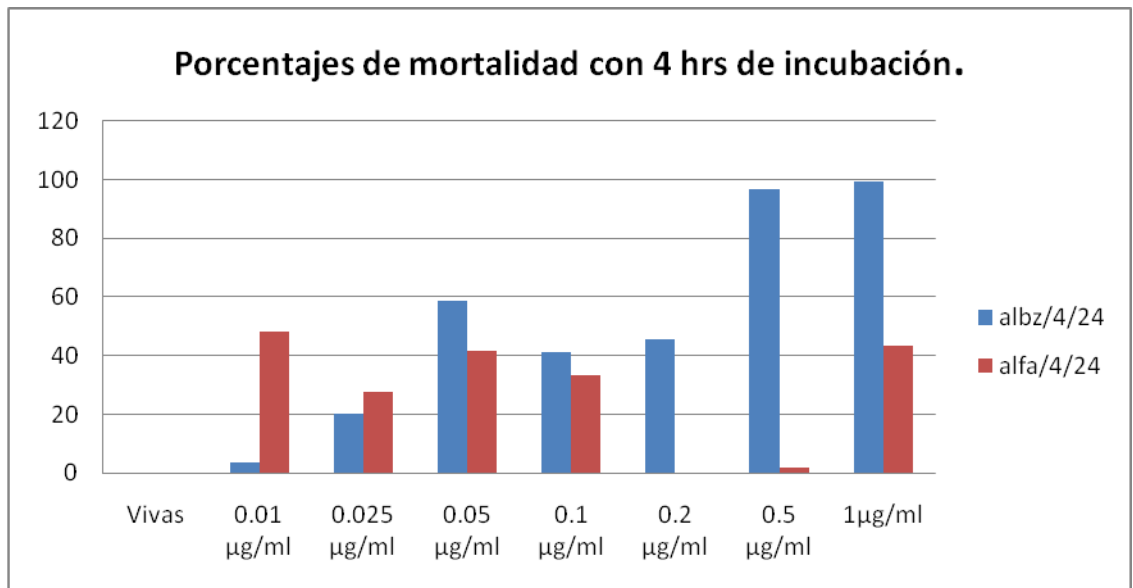


Figura 7. Porcentajes de mortalidad a diferentes concentraciones, con los diferentes compuestos, con 4 hrs de incubación y 24 hrs de recultivo

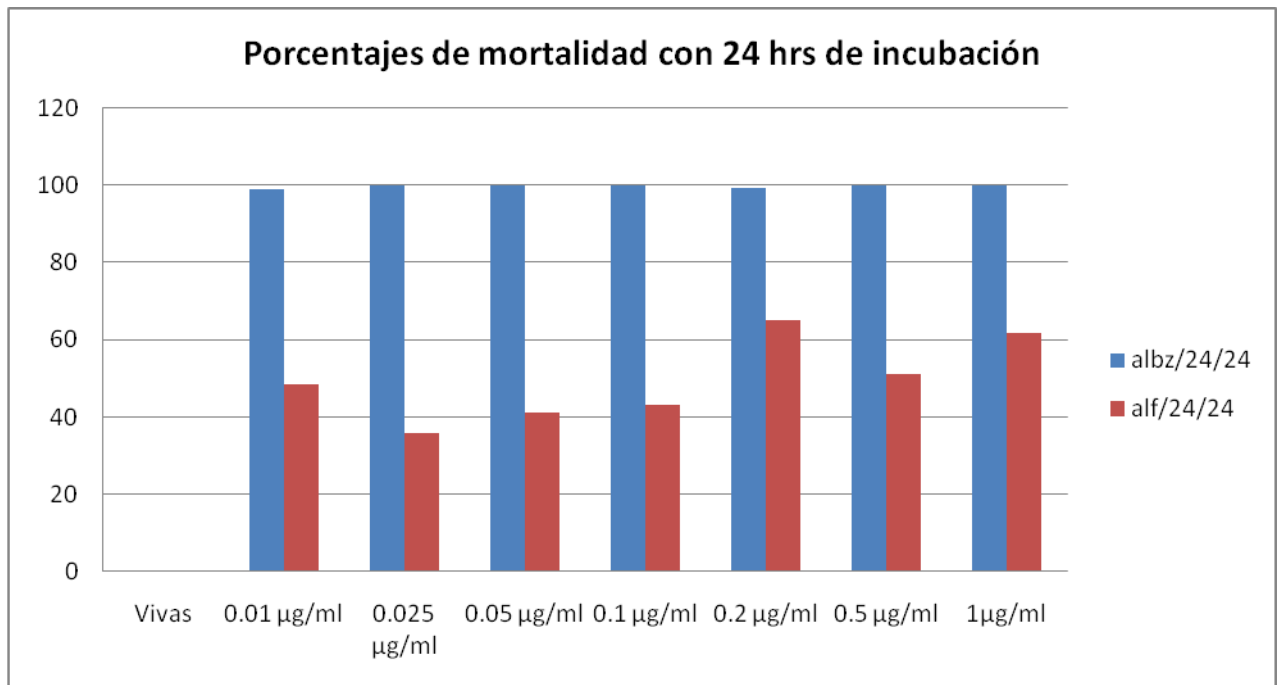


Fig. 8. Gráfica con los porcentajes de mortalidad a diferentes concentraciones, con los diferentes compuestos, con 24 hrs de incubación y 24 hrs de recultivo.

Posteriormente se consideró evaluar 4 aislados (dos de ovinos y dos de bovinos) con cada fármaco a 24 horas de incubación pero con diferentes dosis, para ver con que dosis se podía alcanzar el 100 % de mortalidad.

Cuadro 7. Actividad giardiásica del albendazol, compuesto Alfa y la nitazoxanida en diferentes aislados de *G. duodenalis*.

Aislado	Albendazol	Compuesto Alfa	Nitazoxanida
45 INP (AI+BIII)	CI 50	CI 50	CI 50
	0.0072 µg/ml	1.3731 µg/ml	0.2596 µg/ml
	0.0271 µM	4.0283 µM	0.8447 µM
6 INP (AI+BIII)	CI 50	CI 50	CI 50
	0.0021 µg/ml	2.8238 µg/ml	1.5033 µg/ml
	0.00791 µM	8.2843 µM	4.8919 µM
47 INP (E+BIII)	CI 50	CI 50	CI 50
	0.0001 µg/ml	8.4812 µg/ml	0.13 µg/ml
	3.7688 µM	24.8817 µM	0.4230 µM
43 INP (AI)	CI 50	CI 50	CI 50
	0.0085 µg/ml	0.1259 µg/ml	0.1588 µg/ml
	0.0320 µM	0.3693 µM	0.5167 µM

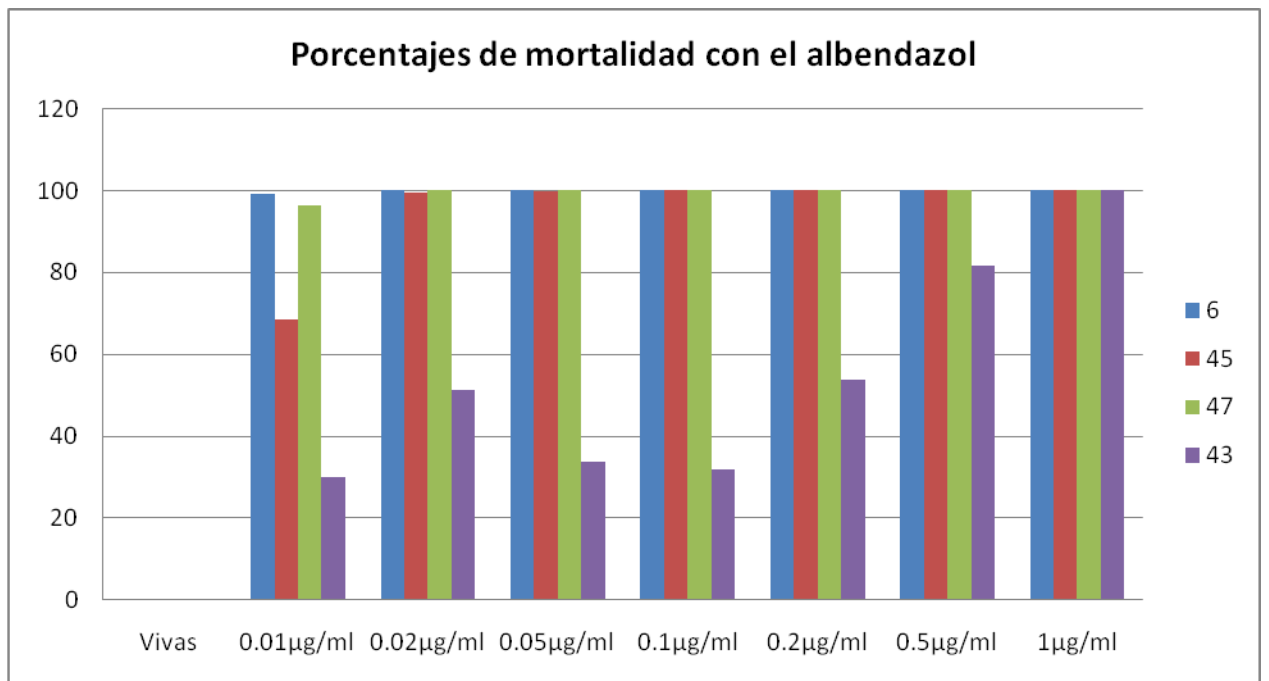


Figura 9. Porcentajes de mortalidad de los diferentes aislados incubados 24 hrs con el albendazol y 24 hrs de recultivo.

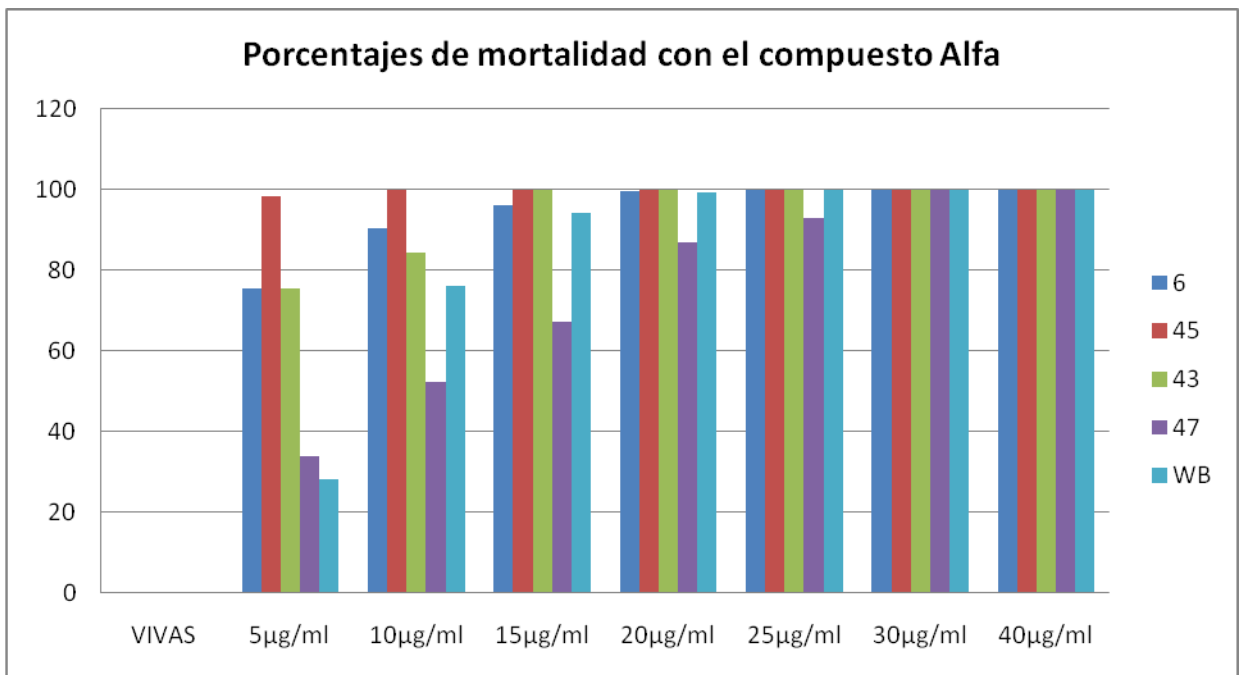


Figura 10. Porcentajes de mortalidad de los diferentes aislados incubados 24 hrs con el compuesto Alfa y 24 hrs de recultivo.

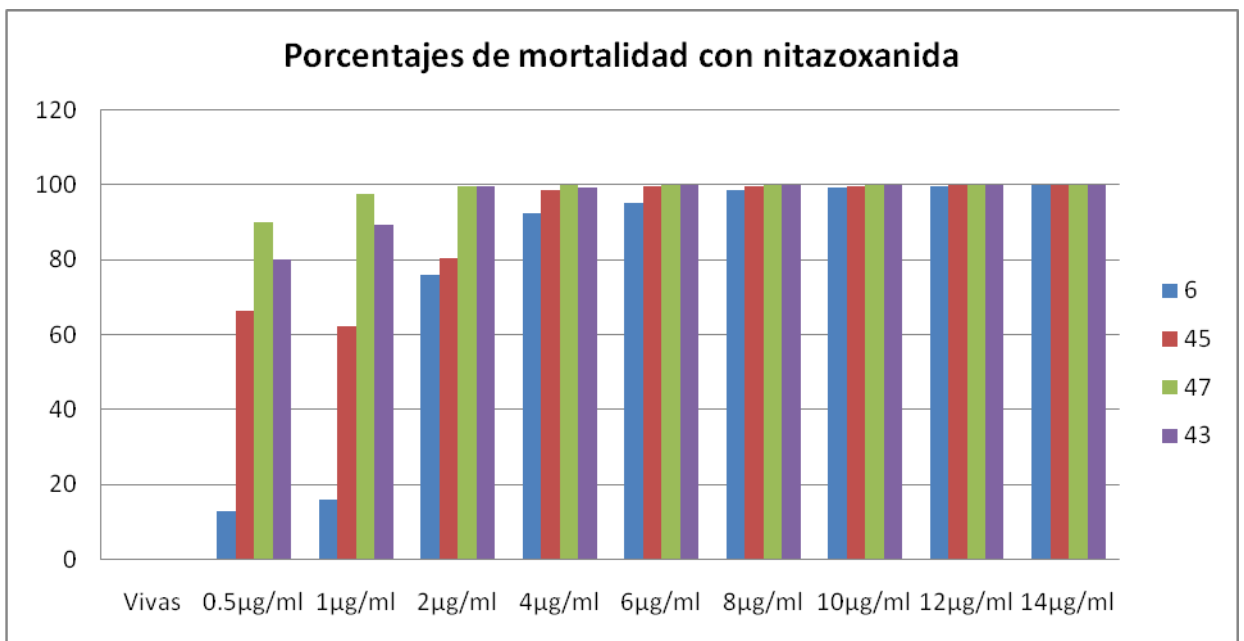


Figura 11. Porcentajes de mortalidad de los diferentes aislados incubados 24 hrs con la nitazoxanida y 24 hrs de recultivo.

Como algunos fármacos pierden efectividad después de algún tiempo, se decidió evaluar la actividad giardiásica del albendazol y del compuesto alfa con 72 hrs de incubación, en dos aislados.

Cuadro 8. Actividad giardiásica del albendazol y el compuesto alfa con 72 de incubación.

Aislado	Albendazol	Alfa
45 INP	CI 50	CI 50
	0.0126 µg/ml	0.8206 µg/ml
	0.0474 µM	2.40 µM
47 INP	CI 50	CI 50
	0.0081 µg/ml	0.4012 µg/ml
	0.0305 µM	1.1770 µM

Siendo el compuesto Alfa, un derivado bencimidazólico que demostró actividad giardiásica, se realizó la evaluación con microscopía electrónica con dos concentraciones a 72 horas en el aislado 47.

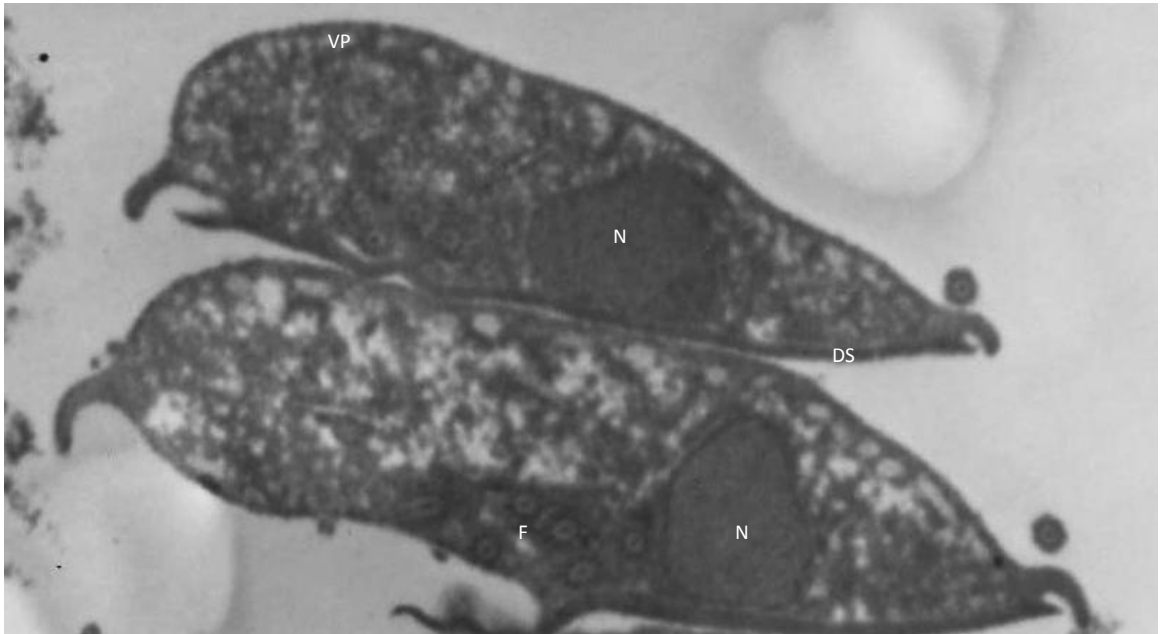


Figura 12. Fotografía de microscopía electrónica 4,400 X trofozoítos del tubo control donde se observan (VP) vesículas periféricas, (N) núcleos, (F) flagelos, (DS) disco suctor y citoplasma en condiciones normales.

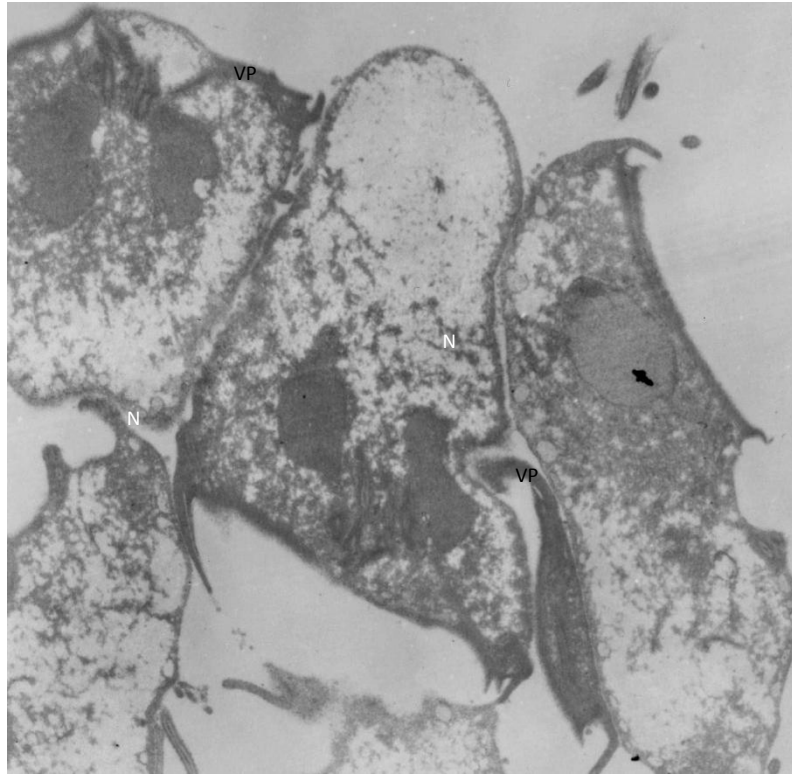


Figura 13. Fotografía aumento 4,400 X de trofozoítos con 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de compuesto alfa, incubado a 72 hrs. Se puede observar cambios de electrodensidad en el citoplasma, pérdida de simetría en algunos (N) núcleos y aumento en el volumen de las (VP) vesículas periféricas.

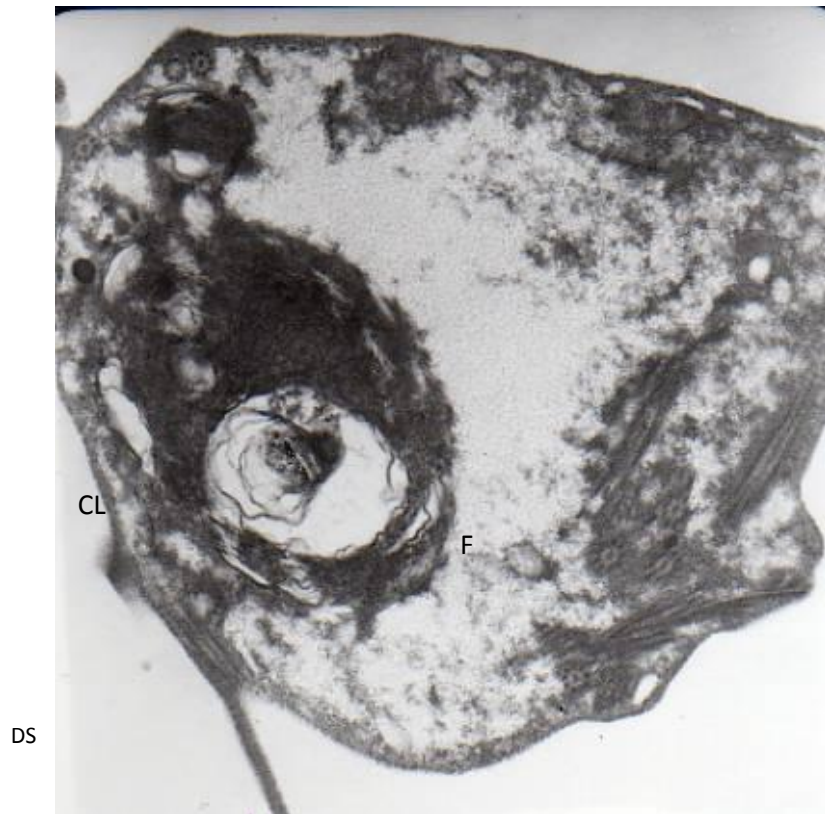


Figura 14 Fotografía de microscopía electrónica con aumento 7000, trofozoítos con 10 µg/ml de compuesto alfa con 72 hrs de incubación. Se puede observar pérdida de núcleos, el citoplasma tiene áreas electrolúcidas, los (F) flagelos pierden su distribución normal dentro del citoplasma, el trofozoíto pierde su forma típica de pera y aparecen (CL) cuerpos redondeados en láminas, hay partes del (DS) disco suctor desprendido.

DISCUSIÓN

La importancia que se le ha dado a la giardiosis en medicina veterinaria, ha sido específicamente por el aspecto zoonótico de la enfermedad. Desde la década de los 90, los estudios con aislados de animales, se han venido enfocando a genotipificar las *Giardias* provenientes de éstos, para tratar de esclarecer el potencial zoonótico que los animales de producción, de compañía o silvestres, puedan representar en la transmisión de *G. intestinalis* a los humanos. (Geurden, 2010). Por otro lado las variaciones de genotipos han demostrado influir en la virulencia del aislado, susceptibilidad por parte del huésped y susceptibilidad del aislado a los diferentes fármacos (Busatti 2009). Sabiendo que hay resistencia a los antiparasitarios comerciales, los cuales producen efectos adversos, tienen ciertas restricciones al ser administrados en animales y que además la sensibilidad entre giardias de distintos huéspedes varia (Ponce, 2001), se consideró que era necesario, obtener aislados de *G. intestinalis* de diferentes huéspedes, genotipificarlos y evaluar la sensibilidad de los aislados a 3 compuestos: el albendazol que se usa como desparasitante tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, la nitazoxanida el más reciente anti giardiásico de uso exclusivamente en humanos, y un compuesto que es una propuesta de anti giardiásico: el compuesto Alfa, el cual es un derivado bencimidazólico evaluado principalmente contra *Fasciola hepatica* en ovinos y bovinos y ha demostrado disminuir la producción de huevos por parte del parásito y lesionar el tegumento del trematodo (Ibarra 1997^a, Ibarra 1997^b, McConville 2008)

Éste es el primer reporte que presenta la prevalencia de *Giardia* y predominio de genotipos con potencial zoonótico (A1 y B) en muestras de ovinos y bovinos procedentes de cinco Estados de la República Mexicana. Contrario a lo esperado, porque los animales analizados eran de pequeños rebaños de traspatio, en este estudio se encontró baja prevalencia de *Giardia* en ovinos (11.3%) y bovinos (5.1%); probablemente esta baja prevalencia se debió a que solamente se obtuvo

una muestra por animal, ya que se ha demostrado que los coproparasitoscópicos en serie de tres incrementan la posibilidad de encontrar animales parasitados, porque la eliminación de los quistes de *Giardia* es de forma intermitente (Buret 1990). A pesar de la baja prevalencia en ovinos (30/265) los datos son importantes porque: a) en México no hay registros de esta parasitosis en ovinos, b) se encontró en los tres Estados de donde se obtuvieron las muestras: Morelos, Estado de México e Hidalgo, c) los cinco aislados que se mantuvieron en cultivo axénico fueron del genotipo “AI” zoonótico y d) en cuatro muestras se encontró mezcla de los genotipos potencialmente zoonóticos AI+BIII (Cuadro 5). Los resultados son significativos porque a nivel mundial se han reportado más casos de giardiosis en bovinos que en ovinos y porque fundamentalmente se ha reportado el genotipo “E” que es específico de rumiantes (Adam 2001; Aloisio 2006; Buret 1990; Cedillo-Rivera 2003; Ey 1996; Ey 1997; Geurden 2010; Lalle 2005; Monis 1999; Olson 1995; Ponce-Macotela 1989, Ponce-Macotela 2002; Ponce-Macotela 2005; Read 2004; Robertson 2009; Savioli 2006; Thompson 2004; Xiao 2008).

Una prevalencia menor se reportó en un estudio que se realizó en Italia, de 325 ovinos, de 20 granjas, encontraron cinco infectadas (1.5%), pero, concuerda con nuestros datos ya que ellos también encontraron el genotipo “AI” (Giangaspero 2005). Prevalencias mayores se reportaron en Canadá, 38% de 89 ovinos (Olson 1997) y en Bélgica de 137 muestras, el 25.5 % tuvo *Giardia*, el análisis molecular demostró mayor prevalencia del genotipo “E”, dos tuvieron el genotipo “A” y dos presentaron mezcla de los genotipos E+A (Geurden 2008). En otro estudio, el análisis de 63 muestras mostró mayor sensibilidad con la PCR (25.4%) que la inmunofluorescencia (12.7%), prevaleció el genotipo “E”, pero también tuvieron una muestra con genotipo “A” (Santin 2007).

Por otro lado, en este trabajo se encontró baja prevalencia de *Giardia* en bovinos (9 de 174), comparado con estudios realizados en Canadá donde han encontrado desde prevalencias de 80-100% de animales infectados (Coklin 2010), pero el

resultado es fundamental ya que por primera vez se reporta el genotipo “E” (característico de rumiantes) en muestras de bovinos en México, los dos procedían de una granja del Estado de Hidalgo; además, otros tres bovinos incluido el del Estado de Querétaro tuvieron el genotipo “A1” (zoonótico). Hasta donde sabemos, no había registros de estos genotipos en muestras de bovinos en México. Adicionalmente, se encontró mezcla del genotipo especie-específico con genotipo zoonótico E+BIII (2) y mezcla de genotipos zoonóticos A1+BIII (2). Pocos estudios en otras partes del mundo también muestran mezclas de genotipos especie específicos con genotipos zoonóticos (E+A) o (E+B). Por ejemplo, en granjas de Bélgica, de 101 muestras de bovinos con *Giardia*, el 53% tuvo genotipo “E”, 16% genotipo “A” y 31% mezcla de genotipos (E+A) (Geurden 2008). En Canadá de 35 animales encontraron el 57% con genotipo “E”, el 34% con genotipo “B” y el 9% con genotipo “A” (Dixon 2010). En Italia, 12 muestras de bovinos fueron genotipo “A”, cinco “B”, tres “E”, y cuatro tuvieron mezcla de los genotipos A+B (2) y A+E (2) (Lalle 2005). En el estudio de tres granjas de Georgia, EU, se reportó el 83% con el genotipo “E”, el 14% con el genotipo “A” y el 3% con mezcla de los genotipos (E+A) (Feng 2008). En otras partes del mundo predomina el genotipo “E” en ovinos y bovinos, (Trout 2005, Trout 2006, Souza 2007), sin embargo, en este trabajo se encontró mayor prevalencia del genotipo “A1”.

Hay que tomar en cuenta la presencia de otros animales, como por ejemplo los gatos, que se encuentran frecuentemente en granjas de traspatio o de producción lechera, ya que hay un estudio donde se reporta el genotipo “E” (Bowman 2010).

Los resultados de este trabajo muestran que los animales de producción, sobre todo en producciones de traspatio, como son los ovinos y bovinos, son portadores de genotipos zoonóticos de *G. intestinalis* y pueden ser una fuente de diseminación de quistes potencialmente infectantes para los propietarios, debido a que regularmente son los que manejan al ganado.

Al evaluar la sensibilidad de los aislados a los compuestos, se decidió utilizar el albendazol, compuesto que se ha utilizado en animales de producción, principalmente contra helmintos. Sin embargo se han presentado efectos adversos al utilizar éste fármaco como son: diarreas, malestar general (Campanati 2001), e incluso toxicidad en médula ósea (Gary 2004, Stokol, 1997, Meyer 1998, Gruntman 2009), además de haber ciertas restricciones para poder utilizar su leche o carne (Moreno 2005, Hu 2010).

En éste estudio, la evaluación *in vitro* de la sensibilidad de los trofozoítos al albendazol, se realizó a diferentes concentraciones, desde 0.01 µg/ml hasta 1.0 µg/ml. Se observó que con 1.0 µg/ml y con 4 de incubación se alcanza el 100% de mortalidad (Fig 7) y se obtuvo una CI 50 con 0.0936 µg/ml (0.3527µM) (Cuadro 6), lo que contrasta con lo encontrado en un estudio donde reportan una CI 50 con 10 µM con 4 hrs de incubación (Oxberry 1994); con 24 horas de incubación, el 100% de mortalidad se obtuvo en la mayoría de los aislados con 0.025 µg/ml, sólo para el aislado 43-INP el 100 % de mortalidad se alcanzó hasta con 1.0 µg/ml (Fig 7), sin embargo las CI 50 en los diferentes aislados si variaron, para el aislado 6-INP fue de 0.0021 µg/ml (0.00791 µM), para el aislado 45-INP fue 0.0072 µg/ml (0.0271 µM), en el aislado 43-INP fue 0.0085 µg/ml (0.0320 µM) y el que presento una CI 50 mayor fue el 47-INP con 0.0001 µg/ml (3.7688 µM) (Cuadro 7). Estos resultados en comparación con dos estudios donde se evaluó la actividad del albendazol en 24 hrs de incubación en aislados obtenidos de humanos, y que se obtuvo una CI 50 de 0.25 µM (Morgan 1993) y de 0.24 µM (Argüello-García 2004) demuestran que en su mayoría los aislados obtenidos de animales son más sensibles al albendazol que el aislado obtenido de humano (Argüello-García 2004). En un estudio donde generaron cepas de *Giardia* resistentes al albendazol, reportaron una CI 50 de 1.31 a 2.12 µg/ml (Jiménez-Cardoso 2009), en el presente estudio ningún aislado presentó es CI 50. También se realizó un ensayo con 2 aislados, incubándolos a 72 horas y se observó lo siguiente: para el aislado 45-INP se obtuvo una CI 50 con 0.0126 µg/ml (0.0474 µM) y para el aislado 47-INP la

CI 50 fue de 0.0081 $\mu\text{g/ml}$ (0.0305 μM) (Cuadro 10), lo que demuestra que el albendazol si perdió un poco de efectividad a las 72 hrs.

Otro compuesto que se utilizó fue la nitazoxanida, el cual se ha usado para tratar la giardiosis, pero exclusivamente en humanos, por lo tanto se decidió evaluar la sensibilidad de los aislados obtenidos de animales a éste compuesto. La nitazoxanida solamente se probó con 24 hrs de incubación en los diferentes aislados con concentraciones diferentes a las usadas en el albendazol o al compuesto Alfa. Los resultados son los siguientes: el aislado 6-INP alcanzó el 100% de mortalidad con 14 $\mu\text{g/ml}$ y presentó una CI 50 de 1.5033 $\mu\text{g/ml}$ (4.8919 μM), con el aislado 45-INP el 100% de mortalidad se alcanzó con 6 $\mu\text{g/ml}$ y la CI 50 fue de 0.2596 $\mu\text{g/ml}$ (0.8447 μM), para el aislado 47-INP el 100% de mortalidad fue con 4 $\mu\text{g/ml}$ y la CI 50 fue con 0.13 $\mu\text{g/ml}$ (0.4230 μM) y finalmente el aislado 43-INP obtuvo el 100% de mortalidad con 6 $\mu\text{g/ml}$ y la CI 50 se consiguió con 0.1588 $\mu\text{g/ml}$ (0.5167 μM). Como se puede observar hay variaciones entre los aislados (Fig. 11), esto concuerda con un estudio donde se evaluó la sensibilidad a diferentes concentraciones de nitazoxanida, de diferentes aislados, obtenidos de dos humanos, un perro y un gato, y se observó que en el aislado obtenido de un gato se necesitó (1-3 $\mu\text{g/ml}$) es decir menor cantidad de nitazoxanida que en los aislados obtenidos de humanos donde se necesitó (7 $\mu\text{g/ml}$) una mayor cantidad para obtener el 100% de mortalidad (Ponce, 2001), comparando esto con los resultados del presente estudio, se aprecia que solamente un aislado (6-INP) necesitó mayor cantidad de nitazoxanida para alcanzar el 100% de mortalidad. En otro estudio donde sometieron quistes de *G. intestinalis* obtenidos de un paciente pediátrico a diferentes concentraciones de nitazoxanida y después fueron desenquistados, se observó una IC 50 de 0.067 $\mu\text{g/ml}$ (Bernal-Redondo 2004), valor que fue menor a los reportados en éste estudio. Hay pocos estudios sobre el efecto de la administración de la nitazoxanida en animales, pero ha encontrado que tiene cierto efecto en la flora y mucosa intestinal de becerros y lechones,

siendo a veces peor el tratamiento con nitazoxanida que la enfermedad en sí (Schnyder, 2009).

Por lo tanto aunque en la actualidad son pocos los fármacos giardicidas de nueva creación, la búsqueda de nuevos fármacos anti giardiásicos se sigue desarrollando, sobre todo en el campo de derivados bencimidazólicos (Torres-Gómez 2008).

El último compuesto que se utilizó fue el derivado bencimidazólico 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy) 1H-benzimidazole conocido como compuesto Alfa. Éste compuesto es un polvo cristalino con ligero olor a azufre, su peso molecular es de 340.86 y se ha utilizado previamente contra la fasciolosis y los animales, adultos o jóvenes, no han presentado efectos adversos a una concentración de 12 mg/kg. Se han hecho estudios donde, las fasciolas son incubadas con 10 mg/kg de peso a diferentes tiempos con éste compuesto y se ha observado que tiene efecto principalmente en el tegumento del parásito, mostrando inflamación, vacuolizaciones, hubo reducción en las fibras musculares del parásito y se observaron vacuolas autofágicas (Rivera 2004, McConville 2008). En éste estudio se observó que con 4 hrs y 24 hrs. de incubación y a diferentes concentraciones (0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 µg/ml) lo más que se alcanzaba era el 40% de mortalidad con 4 hrs de incubación y 60% de mortalidad con 24hrs de incubación, por lo tanto se aumentaron las concentraciones y solamente se expusieron a 24 horas. Los resultados fueron los siguientes: el aislado 45-INP alcanzó el 100% de mortalidad con 10 µg/ml y una CI 50 de 1.3731 µg/ml (4.0283 µM), el aislado 6-INP la alcanzó hasta con 25 µg/ml y presentó una CI 50 de 2.8238 µg/ml (8.2843 µM), el aislado 43-INP necesitó 15 µg/ml para llegar al 100% de mortalidad y mostró una CI 50 de 0.1259 µg/ml (0.3693 µM), el aislado 47-INP necesitó 30 µg/ml y presentó una CI 50 de 8.4812 µg/ml (24.8817 µM) y el aislado WB, que es un aislado de referencia, necesitó 25 µg/ml para el 100% de mortalidad (Cuadro 7, Fig 9). También se evaluó el compuesto Alfa con menores concentraciones pero con 72 hrs de incubación y se obtuvo lo siguiente: el 100% de mortalidad se

obtuvo con 10 µg/ml y la CI 50 se obtuvo con 0.8206 µg/ml (2.40 µM) para el aislado 45-INP y para el aislado 47-INP se obtuvo el 100% de mortalidad con 20 µg/ml y la CI 50 fue de 0.4012 µg/ml (1.1770 µM) (Cuadro 8).

En la evaluación del compuesto Alfa por medio de microscopía electrónica de transmisión, se esperaba ver fragmentaciones en el disco suctor como se ha visto anteriormente en estudios hechos con albendazol (Sandhu 2004) sin embargo lo que si se observó fue pérdida de la típica forma de pera que presenta el trofozoíto (Fig 13), ubicación irregular de los flagelos y desplazamiento del disco suctor, a la concentración de 10 µg/ml, tal y como se ha reportado en otros estudios con 0.1µg/ml de albendazol (Chávez 1992). En el citoplasma se observaron estructuras redondeadas laminares (Fig 14) que no se habían reportado como efecto del albendazol, pero si se había presentado en otros estudios donde se analizaba el efecto del metronidazol en el quiste (Bernal-Redondo 2004, Hausen 2006), con el pamoato de pirantel en el trofozoíto (Campanati 2001) y con algunos extractos de plantas aromáticas (Machado 2010). En éste estudio se describen áreas del citoplasma electrolúcidas, lo que indica que la organización de los microtúbulos, los cuales forman parte de los flagelos y del citoplasma de éste parásito (de Souza 2004), se vieron afectados con el compuesto alfa, en contraste con el efecto que la nitazoxanida presenta en los trofozoítos donde no los altera (Cedillo-Rivera 2002). Al igual que con *Mentha X piperita* y con el albendazol (Vidal 2007 Morgan 1993), el compuesto alfa también afecta la capacidad de dividirse de los trofozoítos.

Las diferentes respuestas que se presentaron entre aislados, confirma que hay una respuesta heterogénea en las poblaciones de *Giardia* (Argüello-García, 2004)

La patogenia de la giardiosis es sin embargo una combinación de factores propios del huésped, del medio ambiente, en el caso de animales, del tipo de producción (intensiva o extensiva) y el tipo de alojamiento (Monis 2003, Hoar 2009), hay que considerar que los signos clínicos pueden variar entre huéspedes, incluso algunos

pueden tener la enfermedad pero en forma asintomática, aún así los animales pueden estar perdiendo peso, o incluso con un poco de estrés pueden empezar a eliminar los quistes infectantes (Geurden 2010, Monis 2003). Éste tipo de huéspedes necesitan un adecuado diagnóstico y tratamiento oportuno, obviamente sin correr el riesgo de desarrollar la resistencia del parásito al fármaco empleado, al estar administrando subdosis que puedan generar poblaciones de trofozoítos resistentes (Argüello-García 2004). Se debe evitar que los animales puedan volverse diseminadores de *Giardia* para otros organismos.

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio que se realiza en México, en donde se demuestra que los ovinos y bovinos de granjas de traspatio son portadores de la giardiosis. La caracterización molecular mostró mayor prevalencia de genotipos zoonóticos “A1” y “B111”, que del genotipo especie-específico “E”. Se ha observado que la giardiosis impacta negativamente en la ganancia de peso del ganado, por lo tanto, es necesario evaluar las consecuencias en la producción de ovinos y bovinos de granjas de traspatio mexicanas, establecer medidas de control y prevención para evitar su diseminación, así como también el desarrollo de estudios epidemiológicos integrales que esclarezcan el flujo de los genotipos zoonóticos entre animales de producción, animales de compañía y humanos.

Los aislados mostraron sensibilidad variable a los compuestos comerciales, en general fue menor y puede ser debido a que los animales no están tan expuestos a estar recibiendo distintos tipos de antibióticos o antiparasitarios, que puedan favorecer el desarrollo de resistencia.

El compuesto alfa necesita ser evaluado *in vitro* con los quistes de *Giardia intestinalis* e *in vivo* para poder determinar si se le puede considerar un fármaco de elección para tratar la giardiosis en animales de producción sin que éstos presenten efectos adversos al fármaco y que tampoco tengan restricciones para poder llevarlos a rastro o para poder utilizar su leche.

REFERENCIAS

1. Abboud P, Lemée V, Gargala G, Brasseur P, Ballet JJ, Borsa-Lebas F, Caron F, Favennec L (2001) Successful Treatment of metronidazole and albendazole-resistant Giardiasis with nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Inf Dis* 32:1792-1794.
2. Adam RD (2001) "Biology of *Giardia lamblia*". *Clin Microbiol Rev* 14 pp. 447-475.
3. Aguilar S (2007) *Síntesis de derivados benzimidazólicos con posible actividad antiparasitaria*. (Tesis de licenciatura) Facultad de Química UNAM.
4. Aloisio F, Filippini G, Antenucci P, Lepri E, Pezzotti G, Cacciò SM, Pozio E (2006) "Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B". *Vet Parasitol* 142 pp.154-158.
5. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K and Svärd S (2010) "Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species". *Nat Rev Microbiol*. 8 pp. 413-422.
6. Argüello-García R, Cruz-Soto M, Romero-Montoya L, Ortega-Pierres G. (2004) "Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*". *J Antimicrobial Chemotherapy* 54 pp.711-721.
7. Barbosa E, Calzada F, Campos R. (2006) "Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus*

- coriifolius* Focke in suckling mice CD-1". *J Ethnopharmacology* 108 pp.395-397.
8. Benchimol M (2002) "A new set of vesicles in *Giardia lamblia*". *Exp Parasitol* 102 pp.30-37.
 9. Bernal-Redondo R, Martínez-Méndez LG, Mendoza-Chávez A, Velasco-Perales D, Chávez-Munguía B. (2004) "Evaluation of the *in vitro* effect of albendazole, metronidazole and nitazoxanide on viability and structure of *Giardia lamblia* cysts". *J Submicrosc Cytol Pathol* 36(3-4) pp. 241-245.
 10. Bowman DD, Lucio-Forster A (2010) "Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance". *Exp Parasitol* 124 pp.121-127.
 11. Buret A, denHollander N, Wallis PM, Befus D, Olson ME (1990) "Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants". *J Infect Dis* 162 pp.231-237.
 12. Busatti HGNO, Santos JFG, Gomes MA (2009) "The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: Where are we?". *Biologics: Targets and Therapy* 3 pp.273-287.
 13. Cacciò SM, Ryan U (2008) "Molecular epidemiology of giardiasis". *Mol and Biochem Parasitol.* 160 pp.75-80.
 14. Calzada F, Yépez-Mulia L, Aguilar A. (2006) "*In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders". *J Ethnopharmacology* 108 pp.367-370.

15. Campanati L, Rocha Gadelha AP, Monteiro-Leal LH. (2001) "Electron and video-light microscopy analysis of the *in vitro* effects of pyrantel pamoate on *Giardia lamblia*". *Experimental Parasitology* 97 pp.9-14.
16. Cavalier ST. (2003) "Protist phylogeny and the high level classification of Protozoa". *European J Protist* 39 pp.338-348.
17. Caylor KB, Cassimatis MK. (2001) "Metronidazole neurotoxicosis in two cats". *J Am Anim Hosp Assoc.* 37 pp.258-262.
18. Cedillo-Rivera R, Chávez B, González-Robles A, Tapia A, Yépez-Mulia L. (2002) "*In vitro* effect of nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites". *J Eukaryot Microbiol* 49(3) pp. 201-208.
19. Cedillo-Rivera R, Darby JM, Enciso-Moreno JA, Ortega-PierresG, Ey PL (2003) "Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico". *Parasitol Res* 90 pp.119-123.
20. Coklin T, Farber JM, Parrington LJ, Coklin Z, Ross WH, Dixon BR. (2010) "Temporal changes in the prevalence and shedding patterns of *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium spp.* oocysts in a herd of dairy calves in Ontario". *Can Vet J* 51 pp.841-846.
21. Chávez B, Cedillo-Rivera R, Martínez-Palomo A. (1992) "*Giardia lamblia*: Ultrastructural study of the *in vitro* effect of benzimidazoles". *J Protozoo.* 39(4) pp. 510-515.

22. De Souza W, Lanfredi-Rangel A and Campanati L (2004) "Contribution of microscopy to a better knowledge of the biology of *Giardia lamblia*". *Microsc Microanal* 10 pp.513-527.
23. Degerli S, ÖzÇelik S (2003) "The first Giardia infection in cattle gall bladder". *Turk J Vet Anim Sci* 27 pp.1231-1233.
24. Dixon B, Parrington L, Cook A, Pintar K, Pollari F, Kelton D, Farber J (2010) "The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium spp.* from beef and dairy cattle in Ontario, Canada". *Vet Parasitol* 175 pp.20-26.
25. Ey PL, Bruderer T, Wehrli C, Kôhler 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 pp.52-60.
26. Ey PL, Mansouri M, Kulda J, Nohýnková, Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G (1997) "Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes". *J Euk Microbiol* 44 pp.626-635.
27. Farthing MJ (1996) "Giardiasis". *Parasitic Dis of the Liver and Intestines*. 25 pp. 493-515.
28. Faubert G (2000) "Immune Response to *Giardia duodenalis*". *Clin Microb Rev*. 13 pp.35-54.

29. Feng Tian S, Hong Yang Z, Shen H, Adam RD, Qi Lu S (2010) "Identification of the nucleoli of *Giardia lamblia* with TEM and CFM". *Parasitol Res.* 106 pp.789-793.
30. Feng Y, Ortega Y, Cama V, Terrell J, Xiao L (2008) "High intragenotypic diversity of *Giardia duodenalis* in dairy cattle on three farms". *Parasitol Res* 103 pp.87-92.
31. Gardner TB and Hill DR (2001) "Treatment of Giardiasis". *Clin Microb Rev.* 14 pp.114-128.
32. Gary AT, Kerl ME, Wiedmeyer ChE, Turnquist SE, Cohn LA. (2004) "Bone marrow hypoplasia associated with febendazole administration in a dog". *J Am Anim Hosp Assoc* 40 pp.224-229.
33. Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM (2007) "Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia". *Acta Trop.* 102 pp.92-99.
34. Geurden T Casaert S, Vercruyssen J, Claerebout E (2008) "Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat in Belgium". *Vet Parasitol* 155 pp.142-145.
35. Geurden T, Geldhof P, Levecke B, Martens C, Berkvens D, Casaert S, Vercruyssen J, Claerebout E (2008) "Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves". *Int J Parasitol* 38 pp.259–264.
36. Geurden T, Vandenhoute E, Pohle H, Casaert S, De Wilde N, Vercruyssen J, Claerebout E. (2010) "The effect of a febendazole

- treatment on cyst excretion and weight gain in calves experimentally infected with *Giardia duodenalis*". *Vet Parasitol* 169 pp.18-23.
37. Geurden T, Vercruyssen J, Claerebout E (2010) "Is *Giardia* a significant pathogen in production animals?" *Exp Parasitol*. 124 pp.98-106.
38. Giangaspero A, Paoletti B, Iorio R, Traversa D (2005) "Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from sheep in central Italy". *Parasitol Res* 96 pp.32-37.
39. Gruntman A, Nolen-Walston R, Parry N, Wilborn R, Maxwell H. (2009) "Presumptive albendazole toxicosis in 12 alpacas". *J Vet Intern Med* 23 pp.945-949.
40. Hausen MA, Freitas JCM, Monteiro-Leal LH (2006) "The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts". *Exp Parasitol* 113 pp.135-141.
41. Hausen MA, Pereira de Oliveira R, Rocha AP, Campanati L, de Carvalho JJ, de Carvalho L (2009) "*Giardia lamblia*: a report of drug effects under cell differentiation". *Parasitol Res* 105 pp.789-796.
42. Hernández García ME. (2008) *Cultivo axénico de Giardia lamblia en un medio libre de suero*. (Tesis de maestría) Facultad de Ciencias biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
43. Hoar Br, Paul RR, Siembiedal J, das Gracias M, Pereira C, Atwill ER. (2009) "*Giardia duodenalis* in feedlot cattle from the central and western United States". *BMC Vet Res* 5 pp.37-46.

44. Hu Xi, Wang J, Feng Y (2010) "Determination of Benzimidazole residues in edible animal food by polymer monolith microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry". *J Agric Food Chem* 58 pp.112-119.
45. Hunter PR, Thompson RCA (2005) "The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*". *Int J for Parasitol* 35 pp.1181-1190.
46. Ibarra VF, García SE, Fernández RM, Vera MY, Castillo BR, Hernández CA (1997a) "Eficacia fasciolicida de dos compuestos de síntesis química in vitro e in vivo en ovinos". *Vet Méx* 28 pp.291–296
47. Ibarra VF, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR (1997b) "Eficacia fasciolicida del compuesto "alfa" contra estadios juveniles y adultos en ovinos" *Vet Méx* 28 pp.297–301
48. Jiménez-García LF, Zavala G, Chavez-Munguía B, Ramos-Godinez MP, Lopez-Velazquez G, Segura-Valdez ML, Montanez C, Hehl AB, Arguello-Garcia R, Ortega-Pierres G (2008) "Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*". *Int J Parasitol* 38 pp.1297-1304.
49. Jiménez-Cardoso E, Eligio-García L, Cortés-Campos A, Flores-Luna A, Valencia-Mayoral P, Lozada-Chávez I (2009) "Changes in β -giardina sequence of *Giardia intestinalis* sensitive and resistant to albendazole strains". *Parasitol Res* 105 pp.25-33.
50. Kolisko M, Cepicka I, Hampl V, Leigh J, Roger A, Kulda J, Simpson AGB and Flegr J (2008) "Molecular phylogeny of diplomonads and

enteromonads based on SSU rRNA, alpha-tubulin and HSP90 genes: implications for the evolutionary history of the double karyomastigont of diplomonads". *BMC Evol Biol* 8 pp.205.

51. Kolisko M, Cepicka L, Hampl V, Kulda J, Flegr J (2005) "The phylogenetic position of enteromonads: a challenge for the present models of diplomonad evolution". *Int J Syst Evol Microbiol* 55 pp.1729-1733.
52. Koudela B, Vítovec J (1998) "Experimental giardiasis in goat kids". *Vet Parasitol.* 74 pp.9-18.
53. Lalle M, Jimenez-Cardosa E, Cacciò SM, Pozio E (2005) "Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay". *J Parasitol* 91 pp.203-205.
54. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Caccio SM (2005) "Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subtypes". *Int J Parasitol* 35 pp. 207-213.
55. Lane S and Lloyd D (2002) "Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*". *Critical Rev in Microbiol.* 28 pp.123-147.
56. Lassek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML (2010) "The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems". *Int J Parasit* doi:10.1016/j.ijpara.2010.02015

57. Machado M, Dinis AM, Salgueiro L, Cavaleiro C, Custódio JBA, Céu Sousa M. (2010) "Anti-Giardia activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure". *Parasitol Res* 106 pp.1205-1215.
58. Martínez JP, Giardiosis. En: Quiroz H e Ibarra F, editores Enfermedades parasitarias en perros. México D.F.: Castdel, 2006:71-86.
59. Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB (1995) "Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*". *Parasitology* 111 pp.11-17.
60. McConville M, Brennan GP, Flanagan A, Edgar HWJ, McCoy M, Castillo R, Hernández-Campos A, Fairweather L.(2008) "Surface and internal tegumental changes in juvenile *Fasciola hepatica* following treatment in vivo with the experimental fasciolicide, compound alpha". *Vet Parasit.* 153 pp.52-64.
61. Meyer EK. (1998) "Adverse events associated with albendazole and other products used for treatment of giardiasis in dogs". *J Am Vet Med Assoc.* 213 pp.44-46.
62. Miller WA, Lewis DJ, Lennox M, Pereira MGC, Tate KW, Conrad PA and Atwill ER (2007) "Climate and On-farm risk factors associated with *Giardia duodenalis* cysts in storm runoff from California coastal dairies". *Appl and Environ Microb* 17 pp.6972-6979.

63. Monis PT, Andrews RS, Mayrhofer G, Ey PL (1999) "Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*" *Mol Biol Evol* 16 pp.1135-1144.
64. Monis PT, Thompson RCA (2003) "Cryptosporidium ad Giardia zoonoses: fact or fiction?" *Infect Genet Evol* 3 pp.233-244.
65. Moreno L, Imperiale F, Mottier L, Alvarez L, Lanusse C. (2005) "Comparison of milk residue profiles after oral and subcutaneous administration of benzimidazole anthelmintics to dairy cows". *Analytica Chimica Acta* 536 pp.91-99.
66. Morgan UM, Reynoldson JA, Thompson RCA. (1993) "Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia spp in vitro*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37 pp.328-331.
67. Olson ME, McAllister TA, Deselliers L, Morck DW, Cheng KJ, Buret AG, Ceri H (1995) "Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model". *Am J Vet Res* 56 pp.1470-1474.
68. Olson ME, Thorlakson CL, Deselliers L, Morck DW, McAllister TA (1997) "*Giardia y Cryptosporidium* in Canadian farm animals". *Vet Parasitol* 68 pp.375-381.
69. Olvera EA. (2005) *Eficacia in vitro de la actividad biológica de análogos de la nitazoxanida contra trofozoítos de Giardia intestinalis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

70. Oxberry ME, Thompson RCA, Reynoldson JA (1994) "Evaluation of the effects of albendazole and metronidazole on the ultrastructure of *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Spironucleus muris* using transmission electron microscopy". *Int J Parasitol* 24 pp.695-703.
71. Parashar A, Arya R (2005) "Drug therapy. Nitazoxanide". *Indian Ped* 42 pp.1161-1165.
72. Pérez-Arriaga L, Mendoza-Magaña ML, Cortés-Zárate R, Corona-Rivera A, Bobadilla-Morales L, Troyo-Sanromán R, Ramírez-Herrera MA (2006) "Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites". *Acta Tropica* 98:152-161.
73. Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. (2010) "Giardia taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions". *Int J Hyg and Env Health* 213 pp.321-333.
74. Ponce-Macotela M, Gómez-Garduño J, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Anislado-Tolentino V, Martínez-Gordillo M (2001) "Determinación *in vitro* de la susceptibilidad a la nitazoxanida de cuatro aislados de *Giardia duodenalis* obtenidos de diferentes huéspedes". *Rev Inv Clín* 53 pp.41-45.
75. Ponce M. (2004) Giardiosis, en: Becerril MA y Romero R, editores *Parasitología médica de las moléculas a la enfermedad*. México: Mc Graw Hill, 49-58.

76. Ponce-Macotela M, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Martínez-Gordillo MN (2008) "Goblet cells: are they an unspecific barrier against *Giardia intestinalis* of a gate?". *Parasitol Res.* 102 pp.509-513.
77. Ponce-Macotela M, Martínez-Gordillo MN, Álvarez-Chacón R (1989) "Obtención y cultivo de *Giardia* spp". *Infectología* 10 pp.91-95.
78. Ponce-Macotela M, Martínez-Gordillo MN, Bermúdez-Cruz RM, Salazar-Schettino PM, Ortega-Pierres G, Ey PL (2002) "Unusual prevalence of *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico". *Int J Parasitol* 32 pp.1201-1202.
79. Ponce-Macotela M, Peralta-Abarca GE, Martínez-Gordillo MN (2005) "*Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico City". *Vet Parasitol* 13 pp.1-4.
80. Ponce-Macotela M, Rufino-González Y, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Martínez-Gordillo MN (2006) "Orégano (*Lippia* spp) kills *Giardia intestinalis* trophozoites in vitro: anti-giardiasis activity and ultrastructural damage". *Parasitol Res* 20 pp.1-4.
81. Read CM, Monis PT, Thompson RCA (2004) "Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP". *Infect Genet Evol* 4 pp.125-130.
82. Rivera N, Ibarra F, Zepeda A, Fortoul T, Hernández A, Castillo R, Cantó G. (2004) "Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment in vitro and in vivo with an experimental fasciolicide". *Parasitol Res* 93 pp.283-286.

83. Robertson LJ (2009) "*Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: a review of the potential for transmission to humans via environmental contamination". *Epidemiol Infect* 137 pp.913-921.
84. Rossignol JF (2010) "*Cryptosporidium* and *Giardia*: Treatment options and prospects for new drugs". *Exp Parasit* 124 pp.45-53.
85. Ruest N, Couture Y, Faubert GM, Girard C (1997) "Morphological changes in the jejunum of calves naturally infected with *Giardia spp* and *Cryptosporidium spp*". *Vet Parasitol.* 69 pp.177-186.
86. Rufino Y. (2007) *Fraccionamiento e identificación de compuestos del orégano (Lippia graveolens)* (tesis de maestría). México: Facultad de Ciencias UNAM 2007.
87. Sandhu H, Chander Mahajan R, Kumar Ganguly N. (2004) "Flowcytometric assessment of the effect of drugs on *Giardia lamblia* trophozoites *in vitro*". *Molecular and Cellular Biochemistry* 265 pp.151-160.
88. Santin M, Trout JM, Fayer R (2007) "Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland". *Vet Parasitol* 146 pp.17-24.
89. Savioli L. Smith H, Thompson A (2006) "*Giardia* and *Cryptosporidium* join the neglected diseases initiative". *Trends in Parasitol* 22 pp.203-208.
90. Schnyder M, Kohler L, Hemphill A, Deplazes P (2009) "Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in

- experimentally challenged neonatal calves". *Vet Parasitol* 160 pp.149-154.
91. Souza SLP, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HFJ, Funada MR, Cortez A, Gregori F, Soares RM (2007) "Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from human, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene". *Vet Parasitol* 149 pp.258-264.
92. Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JWB (2009) "Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*". *PLOS Neglected Trop Dis* vol 3.
93. Stokol T, Randolph JF, Nachbar S. (1997) "Development of bone marrow toxicosis after albendazole administration in a dog and cat". *J Am Vet Med Assoc* 210 pp.1753-1756.
94. Szostakowska B, Kruminis-Lozowska W, Racewicz M, Knight R, Tamang L, Myjak P, Graczyk TK (2004) "*Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* recovered from flies on a cattle farm and in a landfill". *Appl and Env Microb.* 70 pp.3742-3744.
95. Thompson RCA, Hopkins RM, Homan WL. (2000) "Nomenclature and Genetic Grouping of *Giardia* infecting Mammals" *Parasitology Today* 16 pp.210-213.
96. Thompson RC, Monis PT (2004) "Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology". *Adv Parasitol* 58 pp 69-137.

97. Thompson RCA, Palmer CS and O'Handley (2008) "The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals". *Vet J* 177 pp.18-25.
98. Torres-Gómez H, Hernández-Núñez E, León-Rivera I, Guerrero-Alvarez J, Cedillo-Rivera R, Moo-Puc R, Argotte-Ramos R, Rodríguez-Gutiérrez MC, Chan-Bacab MJ, Navarrete-Vázquez G. (2008) "Design, synthesis and *in vitro* antiprotozoal activity of benzimidazole-pentamidine hybrids". *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 18 pp.3147-3151.
99. Trout JM, Santin M, Greiner E, Fayer R (2005) "Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves". *Vet Parasitol* 130 pp.177-183.
100. Trout JM, Santin M, Greiner EC, Fayer R (2006) "Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in 1-2 year old dairy cattle". *Vet Parasitol* 140 pp.217-222.
101. Upcroft J, Upcroft P (1998) "My favorite cell: Giardia". *Bioessays* 20 pp.256-263.
102. Vidal F, Vidal JC, Gadelha AP, Lopes CS, Coelho MG, Monteiro-Leal LH (2007) "*Giardia lamblia*: the effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin (Lamiaceae) on trophozoites". *Exp Parasitol* 115 pp.25-31.
103. Viel H, Rocques H, Martin J, Chartier Ch. (2007) "Efficacy of nitazoxanide against experimental cryptosporidiosis in goat neonates". *Parasitol Res* 102 pp.163-166.

104. Wolfe MS (1992) "Giardiasis". *Clin Microb Rev* 5 pp.93-100.
105. Xiao L, Fayer R (2008) "Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission". *Int J Parasitol* 38 pp.1239-1255.

Anexo

Solución salina fosfatos (SSF) pH 7.2-7.4

NaCl 6.5 grs.

K₂HPO₄ 2.8 grs.

KH₂PO₄ 0.4 grs.

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

Solución salina balanceada de Hanks (SSBH) 10X 1000ml

CaCl anhidra 140 mg.

KCl 400 mg

KH₂PO₄ 60 mg

MgSO₄ 97.70 mg

NaCl 8000.0 mg

Na₂HPO₄ 48.0 mg

NaHCO₃ 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-S33 complementado con suero (500ml)

Tryptona	10 gr
Extracto de levadura	5.0 gr
Glucosa	5.0 gr
Bilis bovina	500 mg
NaCl	1.0 gr
K ₂ HPO ₄	500 mg
KH ₂ PO ₄	300 mg
Cisteína	500 mg
Ácido ascórbico	100 mg
Citrato férrico de amonio	15 mg

La mezcla de reactivo se disolvió en 400 ml de agua destilada, 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 fetal bovino.

Solución de Bromuro de Etidio (BrE) 10 mg/ml

Este reactivo se utilizó para visualizar los ácidos nucleicos.

Bromuro de Etidio	50 mg
Agua desionizada esterilizada	5 ml

Tris 2.0 M, 1000 ml a pH 7.4

H ₂ O	850 mg
Tris Base	242.2 g
HCl (concentrado)	5 ml

El tris se vació en un vaso de 1000 ml, se agregó el agua, se fue adicionando el ácido clorhídrico, lentamente, se mezcló con la ayuda de un agitador magnético, se mezcló y almacenó a 4°C.

EDTA 0.5M (Sal disódica del ácido etilendiamina tetraacético)

EDTA-Na ₂ :H ₂ O	93.05 gr
H ₂ O desionizada	Aforar a 500 m

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 10.0mM pH7.4	500 ml del concentrado de 2.0 M
EDTA 0.1 mM pH 8.0	20 ml del concentrado de 0.5 M
H ₂ 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 gr

H₂O desionizada 1000 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 M

NaOH 200 gr

H₂O desionizada 500 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 gr

H₂O desionizada 100 ml

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

Acetato de sodio 3 M

Acetato de sodio 3H ₂ O	40.8 gr
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 (TBE20 X) 1000ml

Tris base (1.0 M)	121 gr
Acido bórico (1.0 M)	61.7 gr
EDTA-Na ₂ *2H ₂ O (20 mM)	7.44 gr
H ₂ O desionizada	1000 ml

Los reactivos se disolvieron en 800 ml de agua previamente esterilizada con autoclave, se aforó a 1000 ml y se almacenó a temperatura ambiente.

Proteínasa K

Proteínasa K	10 mg
TE	1 ml

La proteínasa K se disolvió en 1.0 ml de TE, se disolvió en 10 partes (100 ml) y se almacenó a .20°C hasta su uso.

Solucion de lisis 5.0 ml

FÓRMULA 2:

$$\frac{\mu\text{Mol}}{L} \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{Mol}} \right) \left(\frac{L}{1000 \text{ mL}} \right) = \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

SHEATER

Con esta técnica se concentran ooquistes de *Cryptosporidium* y *Ciclospora*, quistes de *Giardia* y *Entamoeba histolítica*

A. Solución concentrada de sacarosa

Sacarosa 500 g

Fenol 5 g

Agua destilada 320 mL

1. En un vaso de precipitados colocar el agua
2. Adicionar la sacarosa lentamente y con agitación continua (agitador magnético)
3. Al llegar al punto de saturación agregar el fenol
4. Terminar de agregar la sacarosa
5. Vaciar a un frasco de vidrio con tapón de rosca y etiquetar
6. Almacenar a 4°C hasta su uso

B. Amortiguador de fosfatos (0.025M)

Fosfato de sodio monobásico 1.72g

Fosfato de sodio dibásico 1.77g

Agua destilada 500 mL

1. En un vaso de pp colocar 400 mL de agua
2. Adicionar los fosfatos, disolver con agitación continua y ajustar el pH 7
3. Aforar a 500 mL en un matraz aforado

C. Amortiguador de fosfatos (0.025M) mas Tween 80 (1%)

Amortiguador de fosfatos 99mL

Tween 80 1mL

1. Mezclar las soluciones (agitar con cuidado, debido a que el Tween es un detergente)
2. Vaciar en un frasco de vidrio con tapón de rosca
3. Etiquetar y almacenar a 4°C hasta su uso.

I. Solución de trabajo de Sheater.

Solución A 50mL

Solución C 100mL

II. Solución de trabajo de Sheater.

Solución A 50mL

Solución C 200mL

1. Homogeneizar la muestra fecal en un copropac, pasarla a través de un cedazo y vaciar a un tubo de ensayo.
2. Centrifugar a 3500rpm. Decantar el sobrenadante, al precipitado agregarle mas agua y homogenizar.
3. Repetir el procedimiento 2 veces.
4. Resuspender el precipitado en 3 mL de H₂O de agua destilada.

Gradientes

Solución I 4 mL

Solución II 1.5mL

1. En tubos conicos de 15mL, colocar la solución I.
2. Con una pipeta Pasteur, agregar la solución II, deslizándola por las paredes del tubo.
3. Con una pipeta Pasteur, agregar 500 μ L de la muestra de heces deslizándola por las paredes del tubo.
4. Centrifugar a todo lo que da (4000rpm) durante 30 min.
5. Con una pipeta Pasteur, aislar el anillo superior y colectarlo en un tubo de 15 mL agregar agua destilada y homogeneizar la muestra. Centrifugar a 3500rpm por 10 min. Decantar el sobrenadante (repetir)
6. Colectar los precipitados y colocar una alícuota en un porta objetos para realizar un examen microscópico.
7. Vaciar los precipitados a un vial, etiquetarlo y almacenarlo a 4°C.