

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

PREVALENCIA Y GENOTIPIFICACIÓN DE *Giardia intestinalis*
EN BECERROS MENORES DE TRES MESES DE EDAD DE LA
CUENCA LECHERA DE TIZAYUCA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ESTEBAN CRUZ GÓMEZ

Asesor: DRA. MARTHA PONCE MACOTELA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS:**

Prevalencia y genotipificación de *Giardia* intestinalis en becerros menores de tres meses de edad de la cuenca lechera de Tizayuca

Que presenta el pasante: **Esteban Cruz Gómez**
 Con número de cuenta: **09731670-1** para obtener el Título de: **Médico Veterinario Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE,
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Enero de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	MVZ. Gloria Josefina Ortíz Gasca	
VOCAL	Dra. Martha Ponce Macotela	
SECRETARIO	MVZ. Irma Tovar Corona	
1er SUPLENTE	MVZ. Ramón González Pacheco	
2do SUPLENTE	MC. Verónica Lozano Mejía	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 HHA/pm

Agradecimientos

Con un agradecimiento especial a la Dr. Martha Ponce Macotela (Jefa del laboratorio de Parasitología Experimental en el Instituto Nacional de Pediatría) en primera instancia por aceptarme, capacitarme, y ayudarme a realizar este gran estudio, porque sin su ayuda, paciencia y conocimientos este trabajo no hubiese tenido el nivel de seriedad, ni profundidad de conocimientos sobre *Giardia intestinalis*.

A los MVZ de la Cuenca Lechera de Tizayuca Mario Bernardino Santa Cruz Aguilar (Jefe del departamento de Patología y Diagnóstico de la Asociación Ganadera de Productores de Tizayuca Hidalgo) y Rafael Soto Castor (Medico Independiente) por haberme abierto las puertas de la cuenca y haber permitido el muestreo.

A Leticia Riverón Negrete y a Mario Noé Martínez Gordillo por su apoyo y enseñanzas en las técnicas de biología molecular y desenquistamiento *in vitro*.

A Gustavo Peralta Abarca por su apoyo en la confirmación del diagnóstico en los exámenes coproparasitoscópicos, cultivo *in vitro*, la preparación de reactivos y medios de cultivo.

Y a todos los integrantes del laboratorio de parasitología experimental del Instituto Nacional de Pediatría (Aarón Rodríguez Caballero, Silvia Caballero Sánchez, Yadira Rufino Gonzáles) por apoyarme y despejarme dudas cuando las hubo.

A Ruby Rodríguez Córdova y a Cecilia Arcos Zavaleta por su ayuda en la técnica de Sheather.

A Laura Enedina Soto Serna por ser mi amiga y haberme comentado sobre la oportunidad de realizar este gran estudio.

A mis queridísimos amigos de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia (Scarlett, Raúl, Javier, Luis, Diana, Alma, Isaac, Katy, Irma, Omar, etc.) por habernos conocido y compartir nuestras vidas.

Finalmente a los sinodales por haberse tomado el tiempo para revisar este trabajo y hacer las correcciones y sugerencias pertinentes.

Dedicatoria

Dedico esta tesis primeramente a mis padres Carlos Cruz Téllez y Rosa María Gómez García, quienes desde pequeño me han dado todo el apoyo necesario, agradezco todos y cada uno de sus consejos, cada uno de sus sermones, cada una de sus felicitaciones, así como su infinita paciencia y sobre todos sus sacrificios que me han permitido llegar hasta donde hoy estoy y transformarme en quien hoy soy.

Gracias por darme la libertad necesaria que permitió crear mi propio criterio y despertar mi curiosidad por los animales y otras disciplinas, jamás podre remunerarles de alguna manera todo lo que me han otorgado y quiero que sepan que este trabajo lo hice pensando siempre en ustedes y así poder poner sus apellidos en algún lugar de la ciencia.

Agradezco a todas las mascotas, ganado, animales de laboratorio, héroes anónimos, etc. que contribuyeron y contribuyen en la formación de todos los Médicos Veterinarios Zootecnistas, este trabajo también es por ustedes y para ustedes.

Índice	Página
1. Resumen	4
2. Introducción	5
2.1. Taxonomía	5
2.2. Historia	6
2.3. Morfología	6
2.4. Mecanismos de infección	9
2.5. Ciclo biológico	9
2.6. Mecanismos patogénicos	10
2.7. Cuadro clínico	12
2.8. Diagnóstico	12
2.9. Tratamiento	14
2.10. Epidemiología	15
2.11. Importancia zoonótica	16
2.12. Medidas preventivas	17
3.0. Justificación	18
4.0. Objetivos	18
5.0. Hipótesis	18
6.0. Diseño experimental	19
7.0. Material y métodos	19
7.1. Estrategia	19

7.2. Carta de consentimiento informado	21
7.3. Obtención del material biológico	21
7.4. Técnicas parasitológicas	22
7.4.1. Coproparasitológico (CPS) directo en fresco	22
7.4.2. CPS Concentración flotación (Faust)	22
7.5. Purificación y concentración de quistes de <i>Giardia</i>	24
7.5.1. Sheather	24
7.6. Desenquistamiento in vitro	26
7.7. Cultivo de trofozoítos de <i>Giardia</i>	27
7.8. Técnicas moleculares	27
7.8.1. Obtención de ADN	27
7.8.1.2. Lisis de quistes y obtención de ADN	28
7.8.1.3. Lisis de trofozoítos y obtención de ADN	28
7.8.2. Amplificación de un segmento del gen de la enzima glutamato deshidrogenasa ..	29
7.8.3. Electroforesis	30
7.8.4. Restricción con la enzima <i>Nla IV</i>	30
8.0. Resultados	31
8.1. Establos de la Cuenca Lechera de Tizayuca	31
8.2. Prevalencia de <i>Giardia intestinalis</i>	36
8.3. Desenquistamiento y cultivo in vitro	37
8.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP)	39
8.5. Obtención del ADN de las muestras de becerros	39
8.5.1. Patrón electroforético para la determinación de los diferentes ensambles	40
8.5.2. Polimorfismos de los fragmentos de restricción de las muestras analizadas	41

9.0. Discusión	49
10. Conclusiones	52
11. Perspectivas	52
12. Referencias	53
13. Anexos	59

1. Resumen

Giardia intestinalis (Sinonimias: *G. duodenalis* y *G. lamblia*) es un protozooario intestinal zoonótico de distribución mundial. Produce diarrea, mala absorción intestinal y mala conversión alimentaria. Debido a que los trofozoítos de *G. intestinales* obtenidos de diferentes hospederos son morfológicamente semejantes, se han utilizado técnicas moleculares para poder discriminarlos y se describieron ocho ensambles (genotipos): A y B con potencial zoonótico y de C - H especie específicos. Se ha documentado alta prevalencia de giardiosis en ungulados jóvenes y predominio del ensamble E; pero, también existen reportes de infecciones con ensambles zoonóticos. En México no hay reportes de prevalencia y predominio de ensambles de *Giardia* en becerros; por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue: Determinar la prevalencia y genotipos predominantes de *G. intestinalis* en becerros menores de tres meses de la Cuenca Lechera de Tizayuca. Se obtuvieron muestras de 222 becerros de trece establos de la Cuenca Lechera de Tizayuca. La prevalencia se determinó por coproparasitoscópico directo en fresco y de concentración flotación. Para la genotipificación se obtuvo el DNA y mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó una secuencia de 432 pb (pares de bases) del gen de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*). El producto se restringió con la enzima *Nla IV* y se obtuvieron los genotipos. La prevalencia de la giardiosis fue del 36.48% y se encontraron becerros infectados en 12/13 establos. Por desenquistamiento *in Vitro* se obtuvieron cuatro aislados y los trofozoítos se mantuvieron en cultivo axénico durante todo el estudio. Se genotipificaron 27 muestras: en 17 becerros se detectó el ensamble E, siete tuvieron mezcla de genotipos (E+AI+AII+B) y tres fueron AI, AII o B respectivamente. Se concluye que los becerros de la cuenca lechera son reservorios y diseminadores de los ensambles E, A y B.

2. Introducción

Giardia intestinalis, sinónimas *G. duodenalis*, *G. lamblia* es un protozooario flagelado que produce una de las enfermedades intestinales más extendida y común en los humanos y varias especies de animales vertebrados alrededor del mundo (Adam RD., 2001; Berrilli *et al.*, 2004). Se estima que existen más de 280 millones de personas infectadas por año (Yason *et al.*, 2007). En 1979, la Organización Mundial de la Salud reconoció el potencial zoonótico de *Giardia* (Geurden., 2007) y en el 2004 se le ubicó en el grupo de las enfermedades desatendidas (Savioli *et al.*, 2006). La prevalencia de *G. intestinalis* en animales de granja (bovinos, porcinos, caprinos, ovinos y equinos) es del 3.7% hasta el 57% (Feng & Xiao., 2011). Con técnicas moleculares se han descrito ocho ensambles: A (AI y AII) y B potencialmente zoonóticos, C y D en cánidos, E en artiodáctilos, F en felinos, G en ratas y H en mamíferos acuáticos (Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010), en México solamente hay un reporte de genotipificación de *Giardia* en bovinos (Otero *et al.*, 2011).

2.1 Taxonomía de *Giardia Intestinalis*

Giardia es eucarionte amitocndriado, binucleado, octoflagelado, tiene retículo endoplásmico y una estructura semejante a un aparato de Golgi transitorio que se observa solamente cuando los trofozoítos están en proceso de enquistamiento (Cavalier-Smith, 1998).

Imperio: Eucariota.

Reino: Protozoa.

Subreino: Archezoa.

Phylum: Metamonada.

Subphylum: Eopharyngia.

Clase: Trepomonadea.

Orden: Diplomonadida.

Suborden: Diplomonadina.

Género: *Giardia*.

Especie: *Giardia intestinalis*.

2.2 Historia

Este protozoo fue primeramente descrito por Van Leewenhoek, en 1681, quién lo encontró en sus propias heces diarreicas (Boreham *et al.*, 1990). En 1859 Wilhelm Lambl lo describió con gran detalle, llamándola *Cercomonas intestinalis*, en 1888 Blanchard sugirió la denominación de *Lambliia intestinale* y en 1902 Stiles la nombró *Giardia duodenalis*.

Con base en la especificidad del hospedero se describieron más de 50 especies de *Giardia*; posteriormente, fue reemplazada por una taxonomía basada en la forma del trofozoíto y de los cuerpos medios e inicialmente se describieron tres especies: *G. duodenalis* en humanos y otros mamíferos; *G. agilis* en anfibios y *G. muris* en ratones (Filice, 1952). Por microscopia electrónica se describió una especie en aves *G. psittaci* (pericos) y se caracteriza porque carece del flanco ventrolateral, *G. ardeae* (garzas) solamente tiene un flagelo caudal (Trout *et al.*, 2005). *G. microti* (roedores) que contiene dos trofozoítos en el quiste (Ponce *et al.*, 2008). Además, por análisis molecular se han descrito ocho ensambles (genotipos) de *Giardia intestinalis*: A y B (zoonóticos), C y D (en cánidos), E (en animales de granja), F (en gatos), G (en ratas) y H (en mamíferos marinos) (Read *et al.*, 2004; Berrilli *et al.*, 2004; Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010).

2.3 Morfología

G. intestinalis es piriforme y los cuerpos medios son en forma de clava de martillo; *G. muris* es semirredonda y los cuerpos medios también son redondos; *G. agilis* es más larga que ancha y los cuerpos medios tienen la forma de lágrima (Filice, 1952) Figura 1.

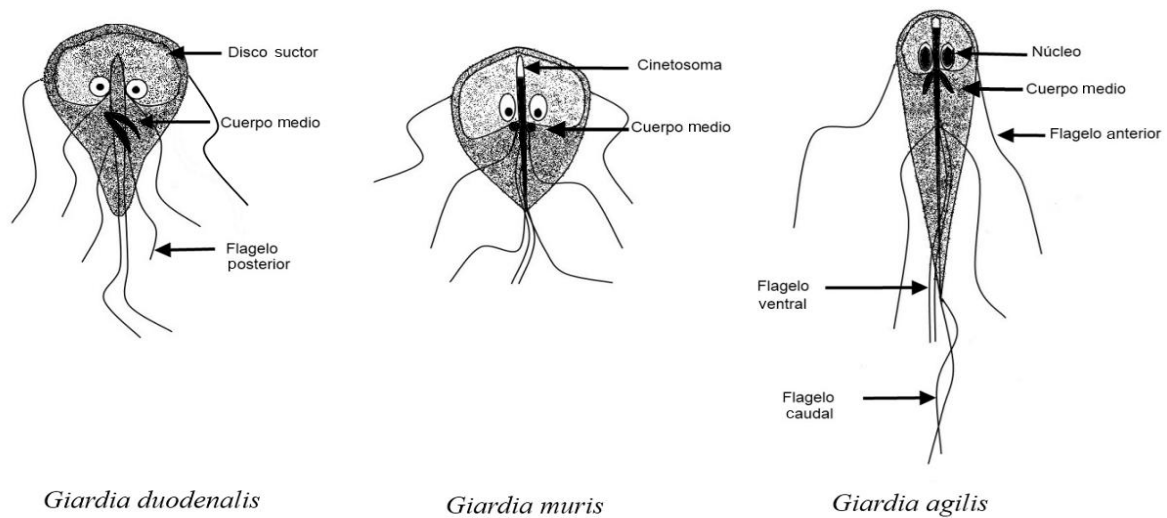


Figura 1. Esquema que muestra la morfología de las tres especies de *Giardia* descritas por Filice en 1952.

En este trabajo nos referiremos a *Giardia intestinalis* (Sinonimias: *G. lambia*, *G. duodenalis*) porque es la que se encuentra en una gran cantidad de mamíferos incluido el hombre.

El trofozoíto tiene forma de pera, mide de 12 a 15 μm de largo por 5 a 9 μm de ancho, la región ventral es cóncava y la dorsal es convexa, tiene dos cuerpos medios, cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral), disco ventral, dos núcleos con nucléolos, vacuolas lisosomales, gránulos ribosomales, glucógeno y complejo de Golgi visible únicamente cuando el trofozoíto está en fase de enquistamiento (Adam R.D. 2001) Figura 2.



Figura 2. Microfotografía que muestra un trofozoíto de *G. intestinalis* encontrado en el becerro 1149 con iluminación en contraste de fases y observado a 40X.

El quiste es de forma ovoide, mide de 8–14 μm de longitud y de 7-10 μm de ancho. La pared es de 0.3-0.5 μm de espesor, compuesta de una capa filamentosa externa y una membranosa interna, la primera está cubierta de filamentos de 7-10 nm, con N-acetilgalactosamina y proteínas de 29, 75, 88 y 102 kDa. La porción exterior de la pared del quiste está cubierta por una red de filamentos de 7-20 nm. Se observan de dos a cuatro núcleos, vacuolas, cuerpos basales, axonemas y fragmentos del disco suctor; entre la pared y la membrana plasmática se encuentra un espacio lacunar (Adam R.D. 2001). Figuras 3 y 4.

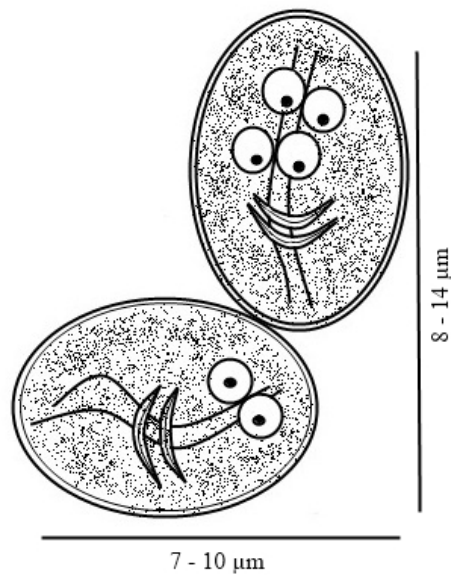


Figura 3. Esquema que muestra la morfología de los quistes de *Giardia intestinalis*.

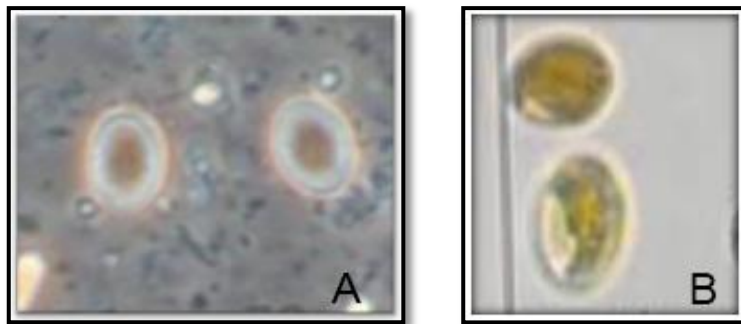


Figura 4. Microfotografías de quistes de *Giardia intestinalis* observados 40X A) Iluminación en contraste de fases, B) Teñidos con lugol.

2.4 Mecanismos de infección

El mecanismo de infección es por fecalismo y la fase infectante es el quiste, éste puede ser ingerido en el agua de beber, alimentos contaminados, transmisores mecánicos y fómites. Los quistes son muy resistentes al ambiente y pueden permanecer infectantes durante meses en zonas frías y húmedas (Feng, Xiao., 2011). Tabla 1.

Tabla 1. Viabilidad de los quistes en diferentes condiciones

Ambiente	Temperatura	Inefectividad Días	Temperatura	Inefectividad Días
Agua Grifo	0°C y 4°C	56	20°C y 28°C	14
Agua Lago	0°C y 7°C	56	17°C y 20°C	28
Agua Río	0°C y 4°C	84	20°C y 28°C	28
Agua Mar	4°C	65	ND	ND

ND = Datos no disponibles.

2.5 Ciclo biológico

Los animales pueden infectarse con 1-10 quistes. Cuando un hospedero los ingiere pasan por el pH ácido del estómago y el pH alcalino del duodeno en donde se libera el trofozoíto. La reproducción es asexual por fisión binaria longitudinal y algunos trofozoítos inician la división celular inmediatamente después de salir del quiste. Se adhieren con su disco suctor a las células epiteliales y colonizan el duodeno y yeyuno. Los trofozoítos no sintetizan de nuevo ningún nutriente; por tal motivo todo lo obtienen del hospedero. Cuando las condiciones son desfavorables para los trofozoítos, por ejemplo la carencia de colesterol en el medio, éstos se enquistan y salen con las heces (Ponce *et al.*, 2008). Figura 5.

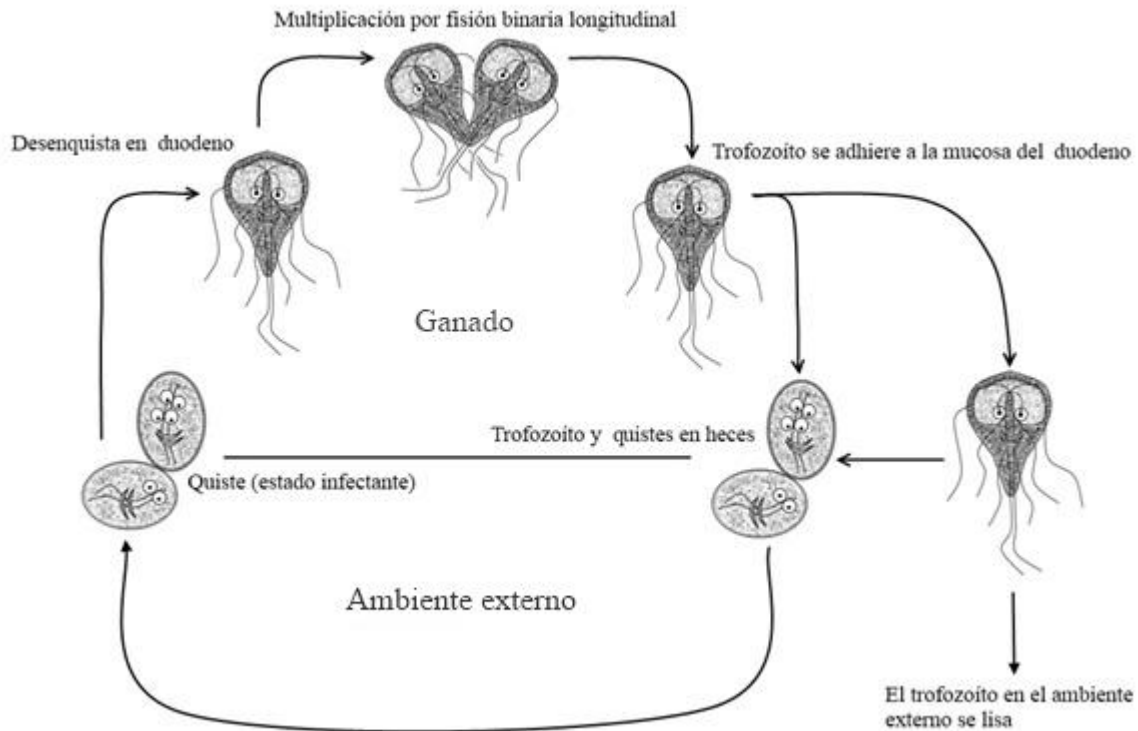


Figura 5. Esquema del ciclo biológico de *Giardia intestinalis* (Ponce *et al.*, 2008).

2.6 Mecanismos patogénicos

Son varios los mecanismos patogénicos en la giardiosis: traumático, enzimático, tóxico, obstrucción mecánica, competencia con el huésped y alteraciones celulares (Ponce *et al.*, 2008).

Traumático: Físicamente por la fuerza hidrodinámica generada debajo del disco suctor, por la actividad continua de los flagelos ventrales, y bioquímicamente por las proteínas contráctiles del disco suctor (Ponce *et al.*, 2008).

Enzimático: Los trofozoítos de *G. intestinalis* secretan proteinasas como las sulfatasas, fosfatasa acida, hidrolasas y tiolproteinasas que pueden contribuir al daño de los enterocitos (Ponce *et al.*, 2008).

Tóxico: Aunque todavía no se ha logrado aislar alguna toxina, el medio de cultivo donde han crecido trofozoítos produce alteraciones en el epitelio intestinal; además se ha descrito el gen de una proteína variable de superficie (CRP136) que tiene una homología del 57% con una sarafotoxina, péptido encontrado en el veneno de una serpiente (*Ataraspis enggadensis*) y los síntomas por la mordedura de esta serpiente producen dolor abdominal, diarrea, vómito, náuseas, síntomas semejantes a los observados en la giardiasis (Ponce *et al.*, 2008).

Obstrucción mecánica: Los trofozoítos no tapizan todo el epitelio intestinal; sin embargo, en las zonas colonizadas existirá interferencia con la absorción intestinal del nutriente (Ponce *et al.*, 2008).

Competencia con el huésped: Los trofozoítos no sintetizan de novo carbohidratos, lípidos, proteínas ni nucleótidos y compiten por estos nutrientes con el huésped. *Giardia* consume sales biliares y la disminución de éstas en el ambiente, evita la formación de micelas y los ácidos grasos no se pueden absorber y por tal motivo salen con las heces (esteatorrea) (Ponce *et al.*, 2008).

Se ha planteado que otra causa del aumento de la permeabilidad epitelial es producto de la apoptosis inducida por *Giardia* la que conduce a un mayor número de linfocitos intraepiteliales y a la activación de los linfocitos T. Ambos tipos de células T (CD4+ y CD8+) se activan, lo que resulta en la atrofia de las vellosidades y en una hiperplasia de las criptas (Ruest *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 2000, 2002, 2004; Buret *et al.*, 1990^a, 1990^b). Hay disminución de la actividad de las enzimas intestinales del borde de cepillo, tales como la lipasa, proteasas, disacaridasas, lactasas, maltasa y sacarasas (Buret *et al.*, 1990^b, Scott *et al.*, 2000).

El acortamiento de las microvellosidades conduce a una disminución de la superficie de absorción en el intestino delgado, el efecto combinado de la disminución de la resorción y los efectos de las deficiencias de enzimas del borde de cepillo culminan en diarrea, mala absorción y por lo tanto disminución del aumento de peso (Buret A. *et al.*, 1990^b).

La reducción de la actividad de la lipasa, más el aumento de la producción de mucina por las células caliciformes puede explicar la esteatorrea y diarrea mucosa que ha sido descrita en hospedadores infectados con *Giardia* (Zajac., 1992; Moncada et al., 2003).

El genotipo de *Giardia* ha sido propuesto como importante en la inducción de los síntomas pero no hay consenso sobre la relación entre el genotipo y virulencia. (Roxstrom *et al.*, 2006).

2.7 Cuadro clínico

En rumiantes el periodo prepatente es de 3-10 días. En poligástricos se reporta: apatía, hiporexia ligera y diarrea aguda crónica o intermitente. Los animales presentan deterioro en la ganancia de peso (St. Jean, G., 1987; Koudela y Vitovec., 1998; Moncada *et al.*, 2003; Geurden *et al.*, 2009). Se ha demostrado que los cabritos presentan atrofia de las vellosidades intestinales, hiperplasia de las criptas e infiltrado inflamatorio en la lámina propia del yeyuno. Este fenómeno es similar al descrito en giardiasis experimental en terneros y corderos (Koudela y Vitovec., 1998; Ruest *et al.*, 1997).

Es importante resaltar que se han propuestos múltiples factores para establecer los cuadros clínicos: estado nutricional, sistema inmune, la edad del huésped, la carga parasitaria, genotipo y coinfecciones (Roxstrom, K. *et al.*, 2006, (Fricker, C.R. & Smith H.V., 2002).

En humanos la giardiosis puede ser asintomática y sintomática aguda o crónica. Los pacientes tienen dolor abdominal transperidial, hiporexia, náuseas, vómito, diarrea, evacuaciones esteatorréicas, malabsorción intestinal, pérdida de peso y déficit intelectual (Ponce *et al.*, 2008; Roxstrom *et al.*, 2006).

2.8 Diagnóstico

El diagnóstico clínico de la giardiosis en becerros es difícil por la vaguedad de los síntomas. Debido a que los quistes se eliminan de forma intermitente, especialmente en la fase crónica de la infección, es necesario solicitar una serie de tres coproparasitoscópicos

(CPS) y que se especifique que la toma de la muestra debe ser en días alternos (O'Handley *et al.*, 1999).

Coproparasitoscópico directo en fresco.

El CPS directo en fresco está indicado cuando las heces son blandas o diarreicas para buscar trofozoítos. Tiene menor sensibilidad que los CPS de concentración. Se homogeniza toda la muestra, se toma una pequeña cantidad de muestra y se disuelve en una gota de lugol previamente colocada sobre un porta objetos, una vez hecho se coloca el cubre objetos y se observa al microscopio (De Haro Arteaga I. et al., 1995).

Coproparasitoscópico de concentración flotación

Se homogeniza la muestra, se toman 5gr, se disuelve en 15 ml de agua destilada, se pasa la solución por un cedazo para filtrarla, se coloca la muestra filtrada en tubos de 10 ml, se llenan hasta los 8 ml, se centrifugan a 1200 rpm durante 5 min, se decanta el sobrenadante y se agrega la solución de sulfato de zinc, se rehomogeniza la muestra y se centrifuga nuevamente a 800 rpm durante 1 minuto, con el asa bacteriológica se toma de la superficie del menisco una pequeña gota, se coloca en un porta objetos y se tiñe con una gota de lugol, se observa al microscopio a 16X o 40X (De Haro Arteaga I. et al., 1995).

Inmunodiagóstico

ELISA Se han utilizado varios kits comerciales para humanos y la sensibilidad es del 98% y la especificidad del 97% (Schuurman T. *et al.*, 2007)

Moleculares: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación.

Para los métodos moleculares se han utilizado genes que codifican para el rRNA (RNA ribosomal), *gdh* (enzima glutamato deshidrogenasa), *tpi* (enzima triosa fosfato isomerasa), proteínas variables de superficie y giardinas. Esta herramienta es muy útil porque se puede

detectar DNA desde un quiste y además se obtiene el ensamble (genotipo) (Amar *et al.*, 2002; McGlade *et al.*, 2003).

2.9 Tratamiento

Para el ganado se utilizan los bencimidazoles, tales como el fenbendazol y albendazol. Los bencimidazoles interfieren con la polimerización de la tubulina del citoesqueleto de los trofozoítos, por consiguiente éstos no se pueden adherir y se eliminan con las heces.

Se ha demostrado que el fenbendazol (5mg/Kg/3 días) es eficaz en el tratamiento de la giardiosis en los terneros lecheros (O'Handley, R.M., 1999).

La dosis del albendazol es de 20mg/Kg/24 horas/ 3 días (Xiao L. *et al.*, 1996).

La paromomicina es un antibiótico que se une a la subunidad pequeña del ARNr e inhibe la síntesis de proteínas. No se absorbe en el tracto gastrointestinal y es bien tolerada por los terneros, se administran 50 a 75 mg/Kg/ 5 días (Geurden *et al.*, 2006).

Vacunación

Los terneros vacunados tuvieron una mayor respuesta inmune humoral; sin embargo, no presentaron disminución de la excreción de quistes y los signos clínicos se mantuvieron (Uehlinger *et al.*, 2007). A pesar de que se han propuesto varios antígenos de *Giardia* como candidatos potenciales para la vacuna (Olson *et al.*, 2000; Abdul-Wahid & Faubert., 2007) es necesario identificar proteínas que se expresan comúnmente en todos los ensamblajes y que induzcan una respuesta inmune específica y de protección en animales de producción (Geurden *et al.*, 2009).

2.10 Epidemiología

Una fuente de infección muy importante en sistemas de producción es el contacto directo con un animal infectado, y fundamentalmente con animales jóvenes porque eliminan hasta 10^6 quistes por gramo de heces. Las hembras periparturientas también eliminan muchos quistes. Otro mecanismo de infección es el indirecto, es decir, a través del ambiente contaminado. Los animales que se mantienen en interiores tienen tres veces más probabilidades de infectarse que los criados en ambientes externos. Algunos estudios muestran prevalencias altas en animales menores de 6 meses (Xiao *et al.*, 1994; Nydam *et al.*, 2001; Ralston *et al.*, 2003; Becher *et al.*, 2004).

La prevalencia de *Giardia* en bovinos es del 9% al 73%. Tabla 2. En terneros < 6 meses de edad es del 20% al 73% (Wade *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 1997; Geurden *et al.*, 2007). Se ha propuesto que el ser humano se infecta con quistes de *Giardia* eliminados por otros seres humanos y no por quistes en las heces de otros mamíferos domésticos (Becher *et al.*, 2004). También se ha considerado que algunos animales silvestres; como castores y ratones almizcleros son diseminadores de quistes de *Giardia* que contaminan las fuentes de agua que infectan al humano (Xiao., Fayer. 2008).

La variabilidad de la prevalencia de *Giardia* en sistemas de producción, a nivel mundial, puede deberse a las diferencias en los diseños de los estudios: número de animales, edades, técnica diagnóstica, etc. (Geurden *et al.*, 2009).

Tabla 2. Prevalencia de *Giardia* y genotipos predominantes en bovinos

País	Edad	Prevalencia N (%)	Genotipo	Autor
México	Adultos y Becerras	174 (5.17)	AI,BIII y E	Otero NJ <i>et al.</i> , 2011
India	Adultos y Becerras	180 (12.2)	A,B,E	Khan SM <i>et al.</i> , 2011
Nueva Zelanda	Becerras	30 *	A y B	Winkworth CL <i>et al.</i> , 2008
Turquía	Becerras	182 (9.43)		GÜL A <i>et al.</i> , 2008
Bélgica	Becerras	499 (22)	A y E	Geurden T <i>et al.</i> , 2007
USA	Becerras	456 (52)	A y E	Trout JM <i>et al.</i> , 2005
Australia	Becerras	64 (58)	A y E	O'Handley RM <i>et al.</i> , 2000
Canadá	Becerras	386 (73)		Olson ME <i>et al.</i> , 1997

*Referente a asilados (cultivos *in vitro*)

2.11 Importancia zoonótica

Debido a que *Giardia intestinalis* infecta a una gran cantidad de mamíferos, es probable que los quistes provenientes de humanos, animales domesticados y silvestres contaminen el agua o los alimentos y haya un flujo de quistes de *Giardia* de humanos a animales silvestres y domesticados, y viceversa. Fig. 6 (Hunter, P.R., 2005). Se ha documentado que el ensamble E predomina en ungulados y los ensambles A (AI, AII) y B que infectan a humanos también se encuentran en ungulados (Becher *et al.*, 2004; Thompson RC., 2000). Por otro lado, en bovinos se han reportado infecciones con mezcla de ensambles; por ejemplo E+A, E+B. Tabla 2.

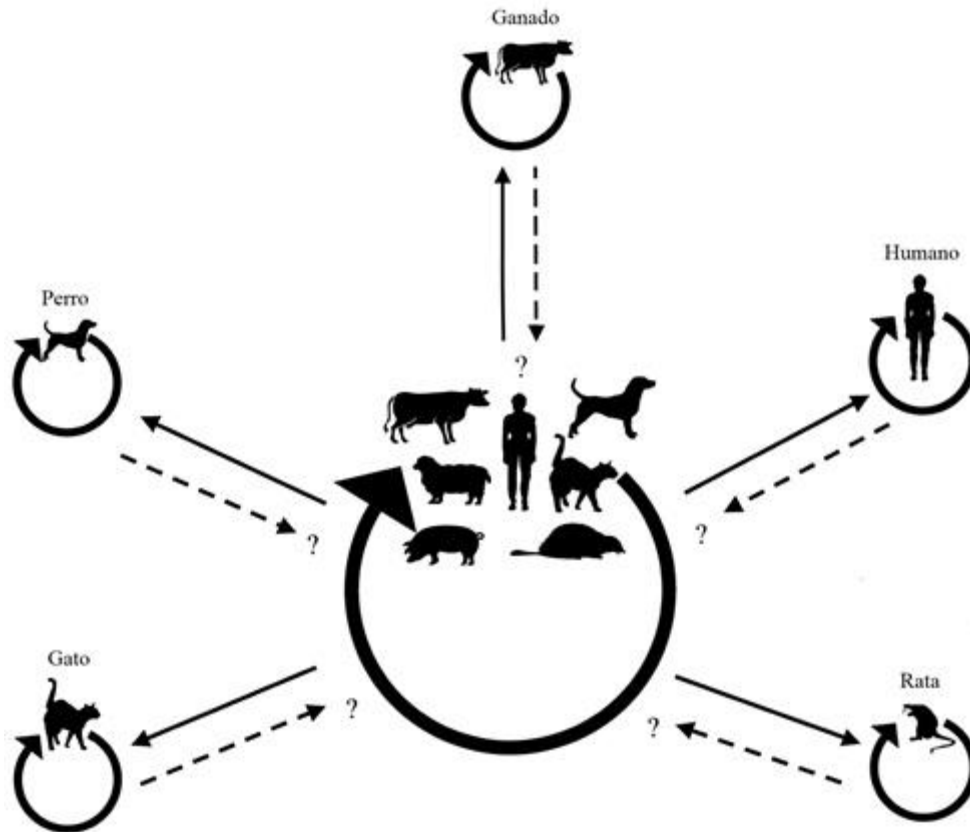


Figura 6. El esquema representa el probable flujo de la diseminación de los quistes de *Giardia* (Thompson RC. 2000)

2.12 Medidas preventivas

En México *Giardia* debe considerarse como parte de un programa de salud del hato lechero porque las infecciones en terneros lecheros perjudican su rendimiento y contaminan el ambiente (Olson *et al.*, 1997).

Existen reportes en sistemas intensivos lecheros de transmisión de la giardiasis por viviendas contaminadas por mal manejo (desinfección inadecuada) y se ha documentado que los corrales con suelo sólido favorecen la transmisión (Maddox-Hyttel *et al.*, 2006). Los corrales de maternidad también son una fuente indirecta de infección importante en todos los sistemas de producción (Maddox-Hyttel *et al.*, 2006).

Para evitar la transmisión de la giardiosis se deben mantener pocos especímenes y un cambio frecuente del piso de la cama, limpieza y desinfección (Wade *et al.*, 2000^a; Bomfim *et al.*, 2005; Maddox-Hyttel *et al.*, 2006). Además, la ingestión adecuada de calostro puede ayudar a prevenir la infección (Godden, 2008).

3.0 Justificación

La giardiosis es una protozoosis intestinal zoonótica de distribución mundial. Afecta a una gran cantidad de mamíferos incluido el humano. En becerros de sistemas intensivos la prevalencia es alta (73%) pudiendo producir diarrea, malabsorción y mala conversión alimenticia; con pérdidas económicas para los productores. Los becerros pueden ser reservorios y diseminadores de quistes de *Giardia* del ensamble E (ungulados) pero también de ensamblajes zoonóticos (A y B). En México, hasta donde se sabe solamente hay un reporte que muestra la prevalencia y genotipificación de *Giardia* en bovinos y ovinos. Pero, no hay reportes de giardiosis en becerros. Por estos motivos es necesario demostrar la prevalencia y ensamblajes predominantes de *Giardia* en becerros.

4.0 Objetivos

Determinar la prevalencia y de *Giardia intestinalis* en becerros menores de tres meses de la cuenca lechera de Tizayuca en el estado de Hidalgo en México.

Determinar el predominio de genotipos de *Giardia intestinalis* en becerros menores de tres meses de la cuenca lechera de Tizayuca.

5.0 Hipótesis

Se encontrará una alta prevalencia de *Giardia intestinalis* en becerros confinados de la Cuenca Lechera de Tizayuca y predominará el genotipo E.

6.0 Diseño experimental

Se realizó un estudio observacional, transversal y prospectivo.

7.0 Material y métodos

7.1 Estrategia

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría y para cumplir con el objetivo se diseñó la siguiente estrategia. Figura 7.

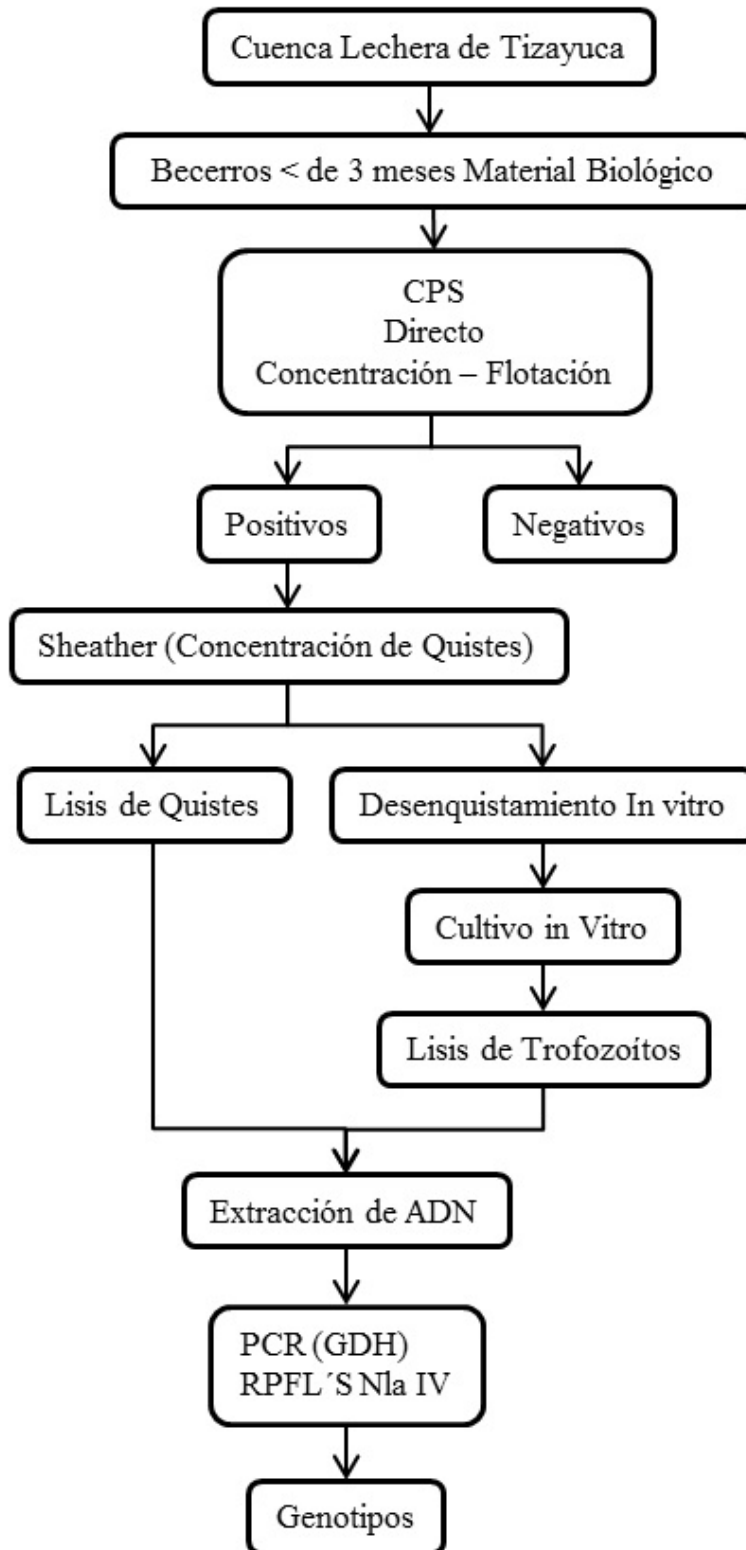


Figura 7. Diagrama de la estrategia para cumplir con el objetivo

7.2 Carta de consentimiento informado

Se obtuvo el permiso de los responsables y Médicos Veterinarios para la obtención del material biológico de cada uno de los establos de la Cuenca Lechera de Tizayuca. Ésta se ubica a 2,260 metros sobre el nivel del mar, a 19° 50' latitud Norte y 98° 59' longitud Oeste del Meridiano de Greenwich. Colinda al Norte con Tolcayuca, estado de Hidalgo, y al Sur y Oeste con el Estado de México.

7.3 Obtención de material biológico

El tamaño total de la muestra fue de 213. Éste se obtuvo utilizando el paquete Epiinfo (software estadístico) versión 2005. Se consideró el número de becerros menores de tres meses de edad en toda la Cuenca, con un nivel de confianza del 95%, una prevalencia esperada del 20% y un error del 5%. Previa colocación del guante de palpación se obtuvo el material biológico directamente del recto de cada uno de los becerros. Las heces se pusieron en tubos de plástico de 50 ml., con tapón de rosca, se identificaron con el número de arete del animal, se colocaron en una hielera térmica a 4°C y se trasladaron al laboratorio de Parasitología Experimental del INP. Figura 8.



Figura 8. Fotografía que muestra un establo con becerros para la obtención del material biológico.

7.4 Técnicas parasitológicas

7.4.1 Coproparasitológico (CPS) directo en fresco

Objetivo: Detectar trofozoítos de *Giardia*.

Fundamento: Para observar estructuras lábiles (trofozoítos) mediante una solución isotónica.

Material:

1. Portaobjetos y cubreobjetos.
2. Aplicador de madera.
3. Solución salina de fosfatos (PBS). (**Anexo 1**).
4. Lugol parasitológico. (**Anexo 4**).
5. Microscopio óptico.

Desarrollo:

- a) En un extremo del portaobjetos se colocó una gota de PBS, y en el lado contrario una de lugol parasitológico (con 2-4 mm de separación).
- b) Con un aplicador se homogeneizó la muestra de heces, se tomó aproximadamente 0.5g., e inicialmente se colocó en el extremo de la gota de PBS y posteriormente en la gota de lugol.
- c) Se homogeneizaron, se colocaron los cubreobjetos y finalmente se observaron al microscopio 16X y 40X.

7.4.2 CPS Concentración flotación (Faust)

Objetivo: Detección de quistes de *Giardia*.

Fundamento: Mediante un proceso de diferencia de densidades, los quistes, ooquistes o huevos flotan y el detrito vegetal se precipita, por consiguiente las estructuras parasitarias se concentran en la superficie de la solución.

Material:

1. Copropacks (contenedor y colador comercial montable)
2. Centrífuga

3. Portaobjetos y cubreobjetos
4. Asas bacteriológicas
5. Solución saturada de Sulfato de Zinc (densidad mínima de 1.18 grados Baumé) (g/cm^2). **(Anexo 5)**.
6. Lugol parasitológico
7. Agua destilada
8. Aplicador desechable
9. Microscopio óptico

Desarrollo:

- a) Se colocaron de 2 a 5g de materia fecal en el copropack.
- b) Se añadieron de 10 a 15 ml de agua destilada sobre la muestra y paulatinamente se fueron homogeneizando con el aplicador.
- c) Se vertió el contenido ya filtrado en tubos de 13mm x 100mm.
- d) Se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos.
- e) El sobrenadante se decantó, se añadieron 8 ml de agua en el tubo, se homogeneizó nuevamente y centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos. (El procedimiento se repitió dos veces más).
- f) El precipitado se suspendió nuevamente con la solución de sulfato de zinc y centrifugó a 800 rpm durante 1 min.
- g) Con el asa bacteriológica se tomó una muestra de la superficie del menisco y colocó sobre el portaobjetos, se añadió una gota de lugol, se homogeneizo y se observó al microscopio con los objetivos 16X y 40X. Figura 9.

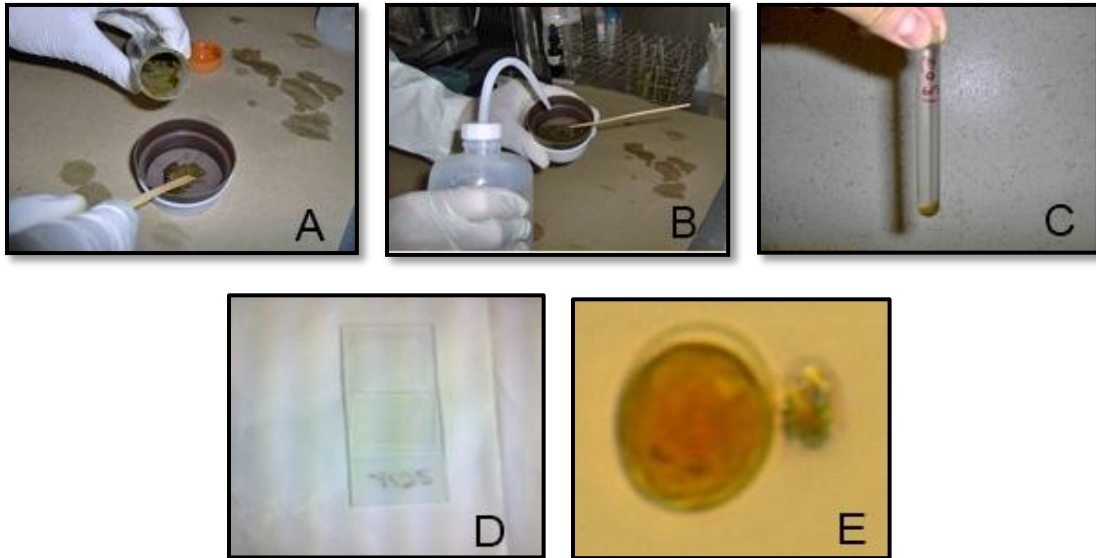


Figura 9. Fotografías que muestran el proceso para la técnica de concentración flotación. A) Muestra pasada por un cedazo. B) Homogeneización. C) Muestra en el sulfato de zinc después de la centrifugación. D) Muestra colocada en un portaobjetos. E) Quiste de *Giardia*

7.5 Purificación y concentración de quistes de *Giardia*

7.5.1 Sheather

Objetivo: Concentrar quistes de *Giardia*.

Fundamento: Mediante un proceso de diferencia de densidades, los quistes flotan en la solución 2, el detrito se precipita en la solución 1.

Material:

1. Copropacks
2. Soluciones de trabajo I y II. (**Anexo 9**)
3. Centrífuga.
4. Tubos cónicos de plástico de 15 ml.
5. Portaobjetos, cubreobjetos y microscopio óptico.

Desarrollo:

- a) La muestra con quistes de *Giardia* se depositó en un copropack, se homogeneizó con agua destilada, se filtró y se vertió en un tubo de 15ml.
- b) Se centrifugó a 3500 rpm, el sobrenadante se decantó, y al precipitado se le agregó más agua, se homogenizó y se centrifugó nuevamente (Hasta la eliminación del color amarillo de las heces).

c) El precipitado se suspendió en 8 ml de agua destilada.

6. Gradientes (**Anexo 9**)

Solución I

Solución II

1. En los tubos cónicos de 15 ml, se colocaron 4.0 ml de la solución I.
 2. Con una pipeta Pasteur se agregan 2.0 ml de la solución II (deslizándola por las paredes del tubo con cuidado para evitar mezclar y destruir los gradientes).
 3. Se añadieron 500 μ l de la muestra con heces y lentamente se deslizó por la pared del tubo evitando destruir los gradientes.
 4. Se centrifugó a 2500 rpm, durante 25 min.
 5. De cada uno de los tubos se aisló el anillo superior o el inferior y se colocaron en tubos que contenían agua destilada o PBS, se homogeneizaron para romper el gradiente y para quitarles el exceso de sacarosa. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se decantó y el precipitado con los quistes se concentró en un tubo de 15 ml. con PBS o agua destilada.
 6. Se monitorearon en el microscopio a 16X y se almacenaron a 4°C hasta su uso
- Figura 10.

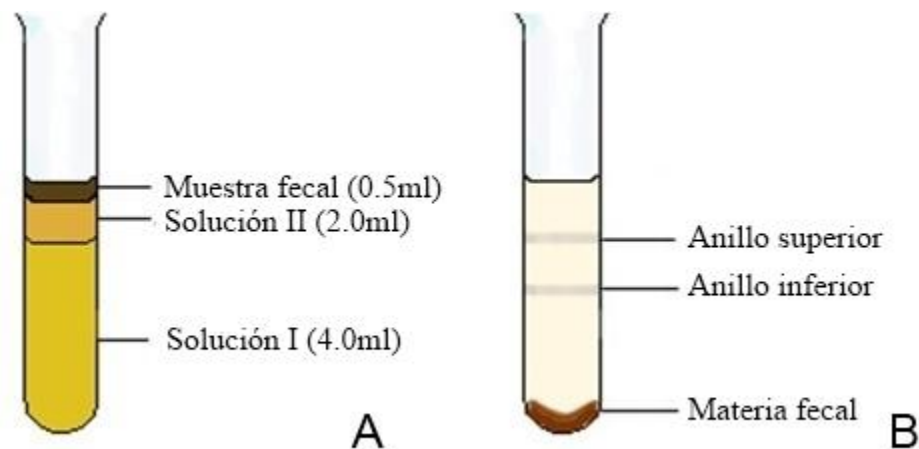


Figura 10. Esquema que muestra: A) Gradiente de Sheather. B) Fases con anillos en donde se encuentran los quistes de *Giardia*

7.6. Desenquistamiento *in vitro*.

Objetivo: Ecllosionar los trofozoítos de los quistes, mantenerlos en cultivo axénico y determinar el genotipo.

Fundamento: Mediante una digestión química se estimula a los trofozoítos para liberarse del quiste.

Material:

1. 50 ml. de solución de HANK'S (**Anexo 2**).
2. Ácido clorhídrico concentrado.
3. Bicarbonato de sodio.
4. Vaso de precipitado de 50 ml.
5. 2 tubos estériles de 8 ml y con tapón de rosca.
6. Quistes de *Giardia* viables.
7. Potenciómetro.
8. Medio de cultivo TYI'S33 complementado con suero fetal bovino.
9. Incubadora a 37.5°C.
10. Invertoscopio.

Desarrollo:

- a) A los 50 ml de la solución de HANK'S se les ajustó el pH a 7.4 con bicarbonato de sodio. La solución se dividió en dos lotes.
- b) Un lote se incubó a 37.5°C hasta su uso.
- c) El otro lote se ajustó a pH 2.0 con ácido clorhídrico.
- d) Los quistes de *Giardia* se pusieron en la solución de HANK'S pH 2.0 y se incubaron a 37°C/40min.
- e) Posteriormente, el tubo con los quistes se centrifugó a 1000 rpm/1 minuto, evitando que la temperatura disminuyera durante el proceso. El sobrenadante se decantó y se le agregó la solución de Hanks pH 7.4 para neutralizar el pH ácido. Nuevamente se centrifugó a 1000 rpm/1 min., se decantó la solución y el precipitado se colocó en dos tubos con medio de cultivo TYI'S 33 complementado con suero fetal bovino y se incubaron a 37°C.
- f) La eclosión de los trofozoítos se monitoreó directamente en los tubos con un microscopio invertido.

7.7. Cultivo de trofozoítos de *Giardia*

Objetivo: Mantener trofozoítos de *Giardia* en cultivo axénico.

Fundamento: El medio de cultivo TYI-S-33 tiene nutrientes que permiten la multiplicación exponencial de los trofozoítos. (**Anexo 18**).

Material:

1. Medio de cultivo TYI-S-33 suplementado con suero fetal bovino al 10%.
2. Tubos de 13X100 con tapón de rosca estériles
3. Gradilla para tubos
4. Vaso de precipitado estéril de 50 ml
5. Probeta estéril de 10 – 50 ml
6. Frasco estéril con tapón de rosca de 250 ml
7. Hielo
8. Campana de flujo laminar

Desarrollo:

- a) Se preparó el medio de cultivo TYI-S-33.
- b) Los tubos con trofozoítos en monocapa se dejaron en hielo durante 15 min para que éstos disminuyeran su metabolismo y se desprendieran de la superficie del tubo.
- c) Los tubos con trofozoítos de *Giardia* se homogenizaron y con una pipeta Pasteur se tomaron 5µl., y se pusieron en tubos con medio nuevo.
- d) Los tubos nuevos se etiquetaron y se incubaron a 37.5°C.

7.8 Técnicas moleculares

7.8.1 Obtención de ADN

Los quistes que se concentraron mediante el Sheather se procesaron para la obtención del DNA. Adicionalmente, se obtuvo el DNA de cinco muestras de becerros que fueron negativas a los exámenes coproparasitoscópicos.

7.8.1.2 Lisis de quistes y obtención de ADN.

1. Los quistes inicialmente se sometieron a lisis física, mediante cinco ciclos de congelación (nitrógeno líquido por 30 segundos)-descongelación (baño maría a 37°C).
2. Posteriormente los quistes se pusieron en solución de lisis (amortiguador para lisis de tejidos ATL (Qiagen) con proteinasa K y se incubaron a 56°C durante toda la noche.
3. El ADN se obtuvo con el kit (DNA kit Qiagen DNeasy Tissue) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, para eliminar el ARN de la muestra, se añadieron 5.0 µl (50µg/ml) de RNAsa A y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Se añadieron 200 µl del amortiguador de lisis AL, se mezcló con el vortex y se incubó a 70°C por 10 minutos.
4. Se adicionaron 200 µl de etanol absoluto, se mezcló, se colocó en la columna, se centrifugó 8000 rpm/1 minuto y la solución se eliminó.
5. Se añadieron 500 µl del amortiguador de lavado AW1, se centrifugó a 8000 rpm/1 minuto y líquido restante se eliminó.
6. Se pusieron 500 µl del amortiguador de lavado AW2 y se centrifugó a 13,000 rpm.
7. La columna se colocó un tubo eppendorf nuevo y se añadieron 50 µl de buffer AE se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 8000 rpm/1 minuto y se obtuvo el ADN.

7.8.1.3 Lisis de trofozoítos y obtención de ADN.

1. Los trofozoítos inicialmente se sometieron a lisis física, mediante tres ciclos de congelación (nitrógeno líquido por 30 segundos) descongelación (baño maría a 37°C).
2. Posteriormente los trofozoítos se pusieron en solución de lisis con proteinasa K y se incubaron a 56°C durante toda la noche.
3. Para la obtención del ADN se realizaron extracciones fenólicas con fenol-cloroformo (1:1), se mezcló durante 10 minutos y se centrifugó a 12500 rpm/10

min/4°C. La fase acuosa se colocó en otro tubo que contenía fenol-cloroformo (1:1), este procedimiento se repitió tres veces.

4. La última extracción fue con cloroformo 1ml, se mezcló durante 10 minutos, se centrifugó a 12500 rpm/10 min/4°C., se obtuvo el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo.
5. El ADN se precipitó con una décima de acetato de sodio (3.0M) y 1.4ml de etanol frío, se mezcló y se dejó toda la noche a -20°C.
6. Se centrifugó a 12500 rpm/10min/4°C, el sobrenadante se decantó, se dejó que se eliminara todo el etanol y el ADN se disolvió en 30 microlitros de amortiguador de tris EDTA (TE)
7. Se cuantificó la cantidad y pureza en un espectrofotómetro.

7.8.2 Amplificación de un segmento del gen de la enzima glutamato deshidrogenasa

1. Se amplificó un segmento de 1200 pb del gen de la enzima glutamato deshidrogenasa (*gdh*) siguiendo el procedimiento descrito (Monis *et al* 1996) en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600. Con el oligonucleótido 578: GAG AGG ATC CTT GAR CCN GAG CGC GTN ATC, y el 579: CCG CGN TTG TAD CGN CCN AAG ATC TTC CA.
2. El volumen final de la mezcla de la reacción contenía: MgCl₂, 4.0 mM; dNTP's, 200 μM; oligonucleótidos, 0.8 μM; DNA taq polimerasa (Roche), 2.5 unidades; y DNA de *Giardia*, 50-100 ng. El control positivo fue: DNA de *Giardia* de dos aislados obtenidos de pacientes pediátricos. El control negativo contenía toda la mezcla de la reacción, excepto el DNA de *Giardia*.
3. Para la amplificación: una etapa de desnaturalización a 95°C/4 min, 30 ciclos a 94°C/30 segundos, 56°C/30 segundos y 72°C/2 min. Seguido de una extensión final de 72°C/6 min.

4. Para la segunda PCR se siguió el protocolo descrito por (Read *et al.*, 2004). Se amplificó un producto de 432 pb con los oligonucleótidos GDHiF: CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG y el GDHiR: GTT RTC CTT GCA CAT CTC C
5. El volumen final de la mezcla de la reacción contenía: MgCl₂, 1.5 mM; dNTP's, 200 μM; oligonucleótidos, 0.8 μM; DNA taq polimerasa (Roche), 0.625 unidades; y 3.0 μL del producto de la primera reacción se amplificaron.
6. Condiciones para la PCR: una etapa de desnaturalización a 94°C/2 min, 56°C/1 min y 72°C/2 min; seguido de 55 ciclos a 94°C/30 segundos, 56°C/20 segundos, 72°C/45 segundos y un ciclo de extensión a 72°C/ 7 min.

7.8.3. Electroforesis.

- a) Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa al 1%, con 0.5 μg/ml de bromuro de etidio, en amortiguador de Tris boratos EDTA (TBE). El corrimiento electroforético fue a 30 milliamperes, 60 volts y 10 watts, durante 60 minutos. La observación de los productos amplificados se hizo en un digitalizador de imágenes "Biomaging systems Epichemi3 darkroom.

7.8.4. Restricción con la enzima *Nla IV* (*Neisseria lactamica* restriction enzyme IV)

1. Para la restricción se utilizaron 10 microlitros del producto de 432 pb y 5 unidades de la enzima *Nla IV* en amortiguador para esta enzima, se incubaron por 12 horas a 37°C.
2. Los productos generados se identificaron en geles de agarosa de alta resolución al 2%, en amortiguador de tris boratos EDTA (TBE), siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. Se obtuvieron fotografías digitalizadas de los geles, se analizaron y se obtuvieron los Ensamblados.

8. Resultados

8.1 Establos de la Cuenca Lechera de Tizayuca.

El muestreo se llevó a cabo previo consentimiento de los encargados de los diferentes establos de la cuenca, del 14/10/2009 al 18/01/2011. Se hicieron diez visitas a la cuenca lechera y en cada una de ellas se obtuvieron desde 6 hasta 26 muestras de becerros menores de tres meses de edad. Se analizaron 222 muestras de 13 establos de la Cuenca Lechera de Tizayuca. Figura 11. Las características de los establos fueron variables. Tabla 3 y Figuras 12 a 17.

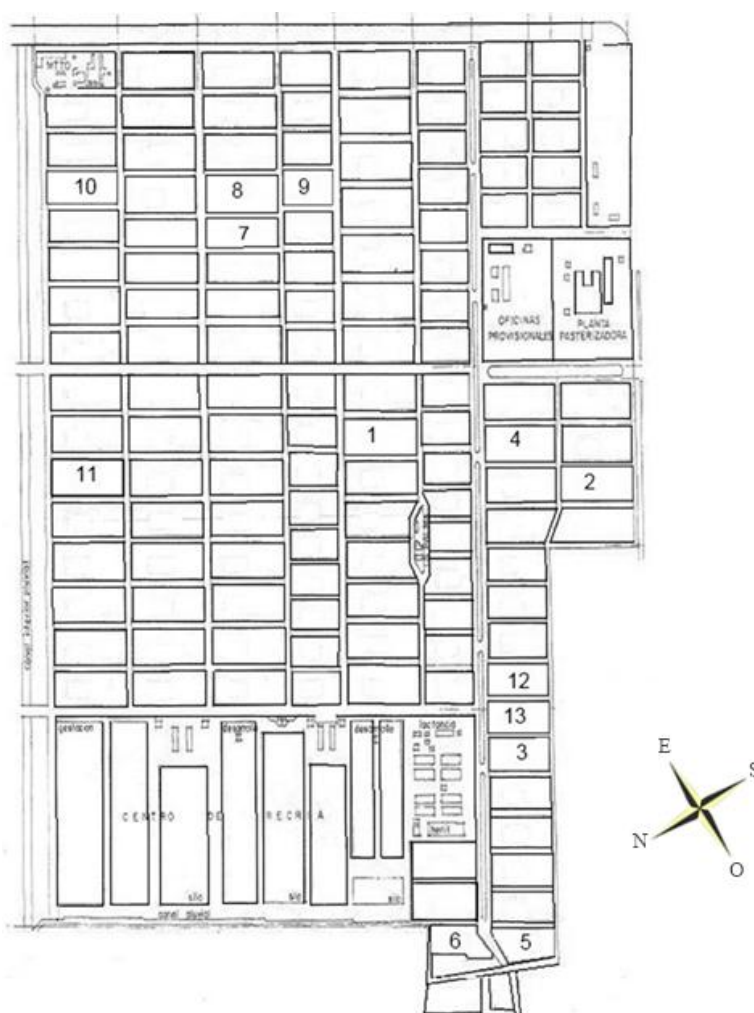


Figura 11. Esquema de la distribución de los establos de la Cuenca Lechera de Tizayuca. Los números corresponden a los establos de donde se obtuvieron muestras de becerros menores de tres meses de edad.

Tabla 3. Características de los establos y tipo de alimentación a los becerros.

Establo	No de Muestras	Observaciones
1	26	Los animales estaban en grupos de 15 o más animales en corrales de 10 x10 metros con piso de tierra, bebederos y comederos de piedra, la alimentación es a base de heno de alfalfa, concentrado y sustituto de leche.
2	25	Los animales estaban en grupos de 25 ejemplares dentro de corrales de 25 x 10 metros, con piso de tierra y cemento, alimentación en comederos y bebederos de piedra.
3	26	Instalaciones con casetas comerciales individuales con piso de arena sílica, los becerros se encontraban separados de los adultos, se alimentaban en cubetas dispuestas a su alcance, la alimentación era a base de leche hervida y concentrado.
4	9	En cuanto los becerros se ponen de pie se ubican en casetas comerciales individuales con piso de tierra, se alimentaban en cubetas dispuestas a su alcance, él calostro se les proporcionaba con mamila y se alimentaban a base de heno de alfalfa, concentrado y leche bronca.
5	6	Animales en casetas individuales improvisadas, piso de tierra y alejadas de los adultos, se alimentaban en cubetas dispuestas a su alcance.
6	11	Los becerros estaban en casetas individuales improvisadas de concreto, con cama a base de heno de trigo, se alimentaban en cubetas dispuestas a su alcance, la alimentación era a base de heno de alfalfa, concentrado y sustituto de leche.
7	19	Los animales se encontraban separados de los adultos, estaban en casetas individuales improvisadas, la cama es a base de arena sílica, se alimentaban y bebían en cubetas dispuestas a su alcance.
8	18	Los becerros estaban en casetas comerciales individuales, el piso era de tierra, la alimentación era a base de concentrado para caballos y sustituto de leche, el concentrado y el agua se les proporcionaba en cubetas dispuestas a su alcance.
9	8	Los becerros estaban en casetas comerciales individuales, el piso era de arena sílica, la alimentación es era a base de concentrado para caballos y sustituto de leche proporcionados en cubetas dispuestas a su alcance.
10	18	Los animales estaban separados de los adultos, en casetas individuales comerciales con piso de arena sílica, se alimentaban en cubetas dispuestas a su alcance, la alimentación era a base de concentrado, heno de alfalfa y leche.
11	20	Los becerros estaban en casetas individuales improvisadas, con piso de arena sílica se alimentaban y bebían en cubetas, la alimentación era a base de concentrado y leche natural.
12	17	Los becerros están en casetas improvisadas de concreto con piso de concreto e individuales con piso de tierra, comederos y bebederos de piedra o improvisados, la alimentación era a base de heno de alfalfa, concentrado y sustituto de leche.
13	19	Instalaciones con casetas comerciales individuales con piso de arena sílica, los becerros se encontraban separados de los adultos, se alimentaban en cubetas dispuestas a su alcance, la alimentación era a base de leche hervida y concentrado.
Total	222	



Figura 12. Fotografía que muestra las características de un establo con casetas comerciales, individuales y limpias.



Figura 13. Fotografía que muestra las características de un establo con casetas comerciales separadas, individuales y limpias.



Figura 14. Fotografía que muestra las características de un establo con casetas improvisadas, separadas, individuales y limpias.



Figura 15. Fotografía que muestra las características de un establo con casetas individuales de concreto y cama de heno de trigo.



Figura 16. Fotografía que muestra las características de un establo donde los becerros están en corrales de 10 x 25 m., con suelo de tierra y concreto.



Figura 17. Fotografía que muestra las características de un establo con corrales improvisados de concreto.

8.2 Prevalencia de *Giardia intestinalis*

Para el diagnóstico de giardiasis se utilizaron dos técnicas coproparasitológicas. Directo en fresco y de concentración flotación (Faust). Como era de esperarse con la técnica de concentración flotación se encontró mayor porcentaje de animales infectados (35%) que con directo en fresco (26%). Solamente en el establo 5 no se encontraron becerros con giardiasis Tabla 4.

Tabla 4. Prevalencia de *Giardia* por establo con la técnica directo en fresco y concentración flotación.

Establo	No de Muestras	<i>Giardia</i> Directo	<i>Giardia</i> Faust	%
1	26	5	8	30.76
2	25	2	3	12
3	26	15	18	69.23
4	9	2	3	33.33
5	6	0	0	0
6	11	4	4	36.36
7	19	6	9	47.36
8	18	5	6	33.33
9	8	3	3	37.5
10	18	2	6	33.3
11	20	3	4	20
12	17	7	9	52.94
13	19	4	6	31.57
Total	222	58	79	35.58

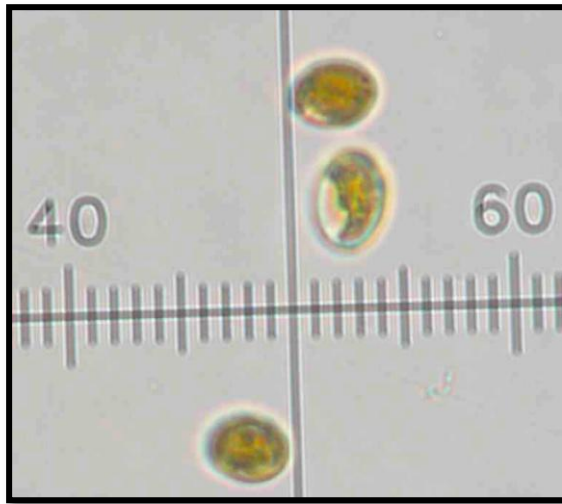


Figura 18. Microfotografía que muestra quistes de *Giardia intestinalis* después de la técnica de concentración flotación. 40x. Cada línea de la regleta corresponde a 2.5 μ m.

8.3 Desenquistamiento y cultivo *in vitro*

De los quistes concentrados de 23 muestras mediante la técnica de Sheather, se realizaron 43 desenquistamientos y este procedimiento se repitió más de una vez en algunas de las muestras (Tabla 5). Se observaron trofozoítos en 13 (30%) ensayos; pero, no todos se mantuvieron, en algunos prevaleció la contaminación bacteriana y en otros los trofozoítos no se adaptaron y murieron. Solamente se obtuvieron cuatro aislados de *Giardia* INP10022010-B1757, INP19032010-BF116, INP27012010-B960 e INP28012011-B3; en todos los casos, los trofozoítos se mantuvieron en cultivo TYI-S-33 axénico durante todo el proceso de la fase experimental. Figura 19.

Tabla 5. Muestras de *Giardia* sometidas a desenquistamiento *in vitro*

Muestra	Desenquistamiento		Resultado
	N	+/-	
2876	1	+	Contaminación
	2	-	
2879	1	-	
1812	2	+	No se establecieron
	4	-	
1748	1	-	
960	1	+	Exitoso
	2	-	
1758	1	+	No se estableció
1757	1	+	Exitoso
F116	1	+	Exitoso
1117	3	-	
M2962	4	-	
M288	3	+	No se establecieron y uno se contaminó
	3	-	
M2701	1	-	
M2707	1	-	
M2320	1	-	
3	1	+	Exitoso
J	1	-	
1	1	-	
2	2	-	
T	1	+	No se estableció
I	1	+	No se estableció
N	1	-	
Q	1	-	
S	1	-	

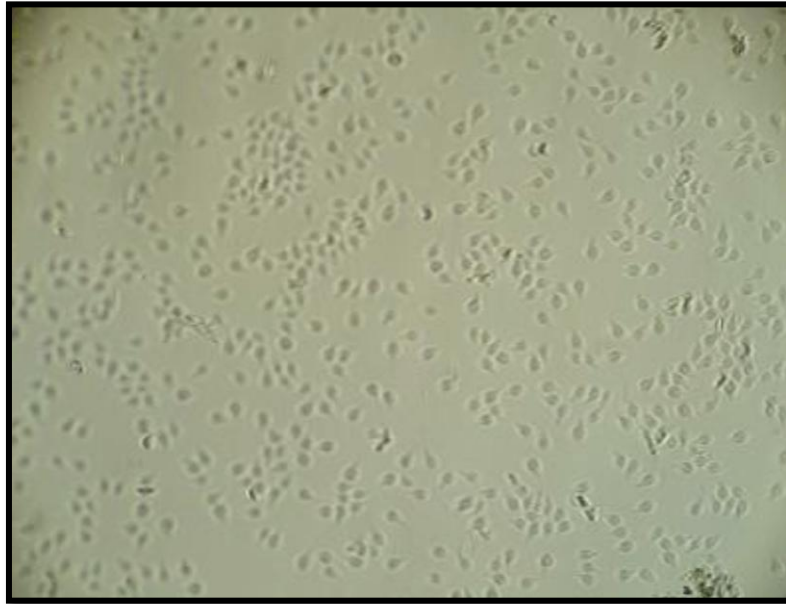


Figura 19. Microfotografía que muestra a trofozoítos de *Giardia intestinalis* formando monocapa al 40% en un tubo de 8.0 ml. 40X.

8.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP)

8.5 Obtención del ADN de las muestras de becerros

Para las amplificaciones se obtuvo el ADN de 25 muestras que por CPS se sabía que contenían quistes de *Giardia*.

Adicionalmente, se obtuvo el ADN de quistes de *Giardia*, de dos muestras (BQ1 y BQI) que salieron negativas en los CPS.

También se contó con el ADN de los trofozoítos (INP10022010-B1757, INP19032010-BF116, INP27012010-B960, INP28012011-B3) que se mantuvieron en cultivo axénico.

8.5.1 Patrón electroforético para la determinación de los diferentes ensambles

Para el análisis de los polimorfismos de los fragmentos de restricción, en la Figura 20 se presenta un cuadro con los tamaños de los fragmentos en pares de bases de los diferentes ensambles después de la restricción con la enzima *Nla IV*.

	A-I	A-II	B	C	D	E	F	G
290								
250								
220								
210								
190								
150								
140								
120								
110								
100								
90								
80								
70								

Figura 20. Cuadro que representa el patrón electroforético para cada ensamble de *Giardia intestinalis*.

8.5.2 Polimorfismos de los fragmentos de restricción de las muestras analizadas

A) ADN de Trofozoítos

El producto de 432 pb de la segunda PCR del ADN de los trofozoítos que se obtuvieron por desenquistamiento in vitro (INP10022010-B1757, INP27012010-B960, INP19032010-BF116, INP28012011-B3) se restringió con la enzima *Nla IV*. En los cuatro se generaron bandas de 70, 100 y 220 pb que son características del (Ensamble E). Figura 21

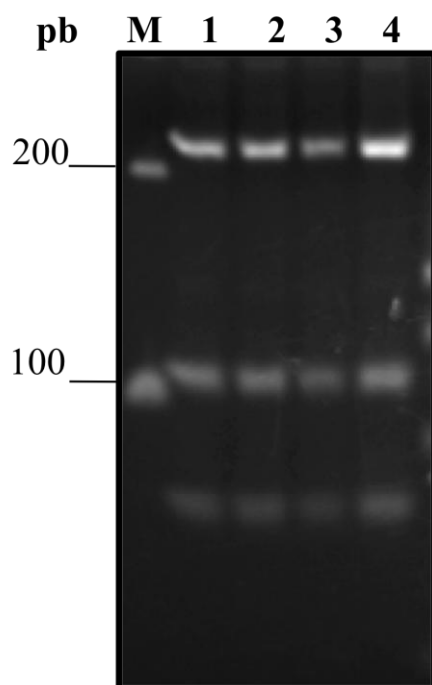


Figura 21. Fotografía que muestra el patrón electroforético del ADN amplificado y restringido con la enzima *Nla IV*. pb: pares de bases; M: escalera de 100 pb. Carriles 1-4: trofozoítos de los cuatro aislados obtenidos in Vitro. Todos correspondieron al Ensamble E.

B) ADN de quistes (10 muestras)

Restricción con la enzima *Nla IV* del producto de 432 pb de la segunda PCR del ADN de los quistes de 10 muestras. En el carril 1 (muestra BQ559) se encontró un patrón mixto con bandas de 90, 120 y 150 pb características del Ensamble A-I; 120 y 290 pb del (Ensamble B) y 70, 100 y 220 del (Ensamble E).

En nueve muestras (carriles 2-10: BCQ, BQ1, BQT, BQI, BQ3, BQG, BQN, BCR y BQ2) se generaron bandas características del (Ensamble E) (70, 100 y 220 pb).

Las muestras de heces de los becerros BQ1 y BQI fueron negativas en los coproparasitoscópicos, pero fueron positivas a la PCR Figura 22.

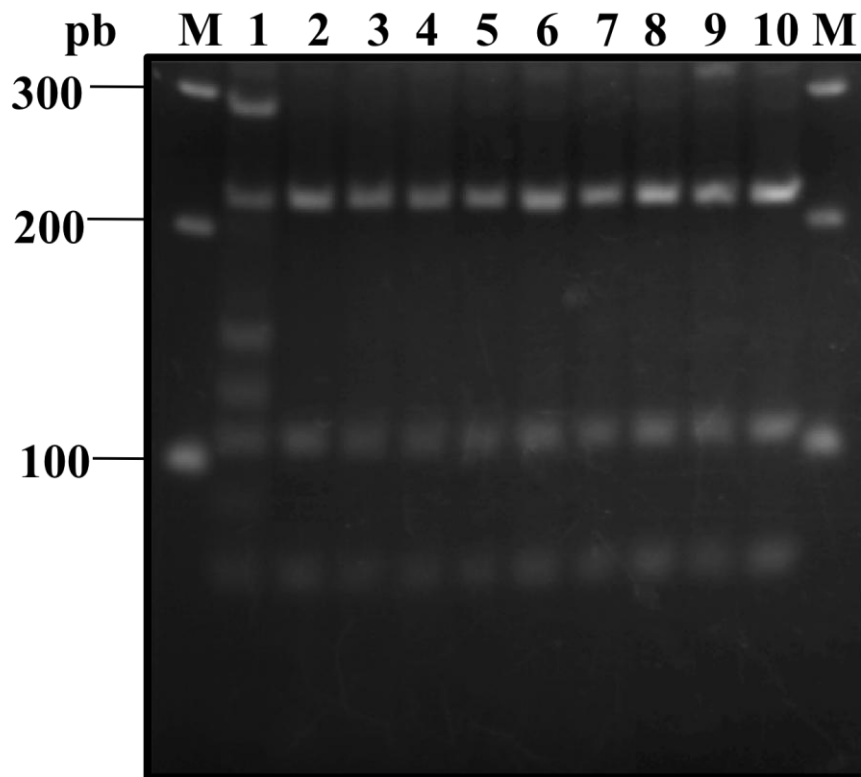


Figura 22. Electroforesis de los productos generados de la restricción con *Nla IV* del segmento de 430 pb del gen de la *gdh* de quistes de *G intestinalis*. pb: pares de bases; M: escalera de 100 pb. Carril 1: Mezcla de Ensambls AI, B y E; Carriles 2-10: Ensamble E.

B-1) ADN de quistes (nueve muestras) y ADN de dos muestras de trofozoítos

La restricción con la enzima Nla IV del producto de 432 pb de la segunda PCR del ADN de los quistes de 11 muestras. Carriles 1-13 (BQ2962, BQ1704, BQ1754, BQ1812, BQ1771, BQ1757, BT960, BQ960, BQ1117, BTF116, BQM2701, BQM288 y BQ1780).

La restricción de las muestras de los quistes obtenidos de los becerros que se muestran en los carriles 1, 3, 4, 6, 8 y 9 generaron bandas de 70, 100 y 220 pb correspondientes al (Ensamble E).

La muestra del carril 12 generó las bandas de 90, 120 y 150 pb (Ensamble AI).

La del carril 13 fueron bandas de 120 y 290 pb (Ensamble B).

En la muestra del carril 11 se encontró una mezcla de dos Ensamblados: bandas de 120 y 290 pb (Ensamble B) y bandas de 70 100 y 220 (Ensamble E).

En las muestras de los carriles 2 y 5 se obtuvo una mezcla de cuatro Ensamblados: bandas de 90, 120 y 150 pb correspondientes al (Ensamble AI); bandas de 70, 80, 90 y 120 pb (AII); 120 y 290 pb (Ensamble B) y 70, 100 y 220 pb (Ensamble E).

Las muestras de los carriles 7 y 10 corresponden al ADN obtenido de trofozoítos (INP27012010-B960, INP19032010-BF116) (Ensamble E) Figura 23.

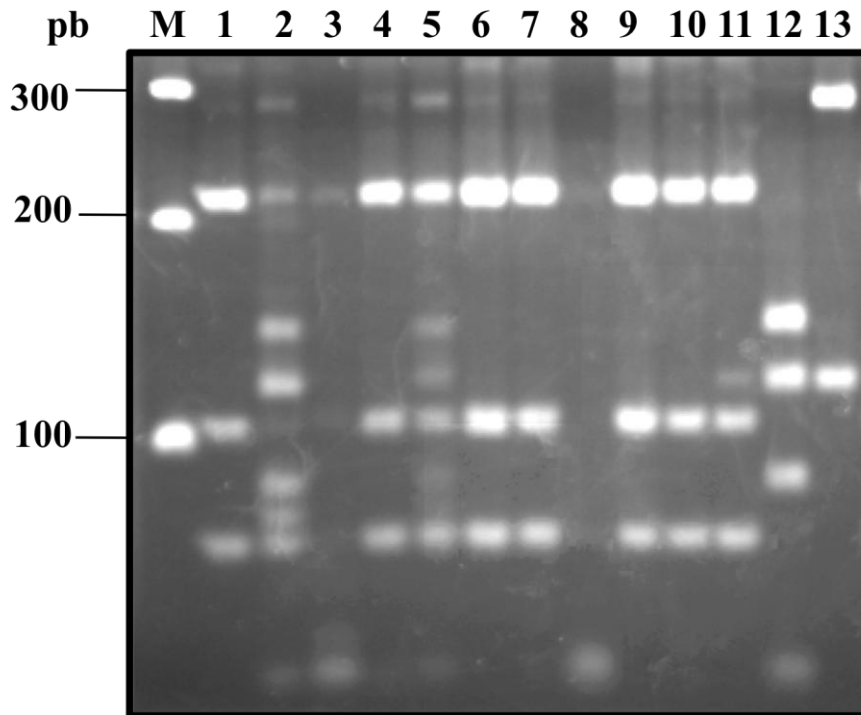


Figura 23. Electroforesis de los productos generados de la restricción con *Nla IV* del segmento de 430 pb del gen de la *gdh* de nueve muestras de quistes de *G intestinalis*. pb: pares de bases; M: escalera de 100 pb; carriles 1, 3, 4, 6, 8, 9 del Ensamble E. Carril 12 del Ensamble A-I. Carril 13 Ensamble B. Carril 11 mezcla de los ensambles B y E. Carriles 2 y 5 Ensamble AI, AII, B y E. Carriles 7 y 10 ADN de trofozoítos, ambos del ensamble E.

B-2) ADN de quistes (tres muestras), y una muestra de ADN de trofozoítos.

La restricción del ADN de los quistes de las muestras de los becerros BQF116 y BQ2879 (carriles 1 y 3) generaron bandas de 70, 100 y 220 características del (Ensamble E). La muestra del becerro BQ2876 (carril 4) generó bandas de 70, 80, 90 y 120 pb correspondientes al (Ensamble AII).

En el carril 2 el ADN de trofozoítos del aislado INP10022010-B1757 (Ensamble E) Figura 24.

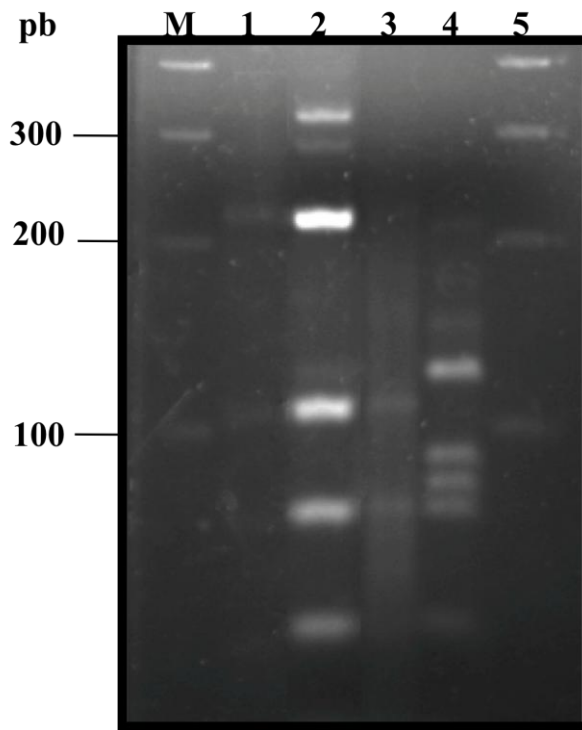


Figura 24. Fotografía que muestra el patrón electroforético después de la restricción con la enzima *Nla IV*. pb: pares de bases, M: Escalera de 100 pb. Carriles 1 y 3 Ensamble E, carril 4 Ensamble AII y carril 2 (ADN de trofozoítos del aislado INP10022010-B1757) Ensamble E.

B-3) ADN de quistes (tres muestras)

La restricción del ADN de los quistes de las muestras de los becerros: BQCaseta 8 y BQ2707 (carriles 1 y 2) presentaron un componente mixto: bandas de 70, 80, 90 y 120 pb (Ensamble AII), bandas de 90,120 y 150 (Ensamble AI) y bandas de 70,100 y 220 (Ensamble E).

La muestra del becerro BQ10805 (carril 3) presentó un patrón más complejo: bandas de 70, 80, 90 y 120 pb (Ensamble AII), 90, 120 y 150 (Ensamble AI), 120 y 290 (Ensamble B), y 70, 100 y 220 (Ensamble E) Figura 25.

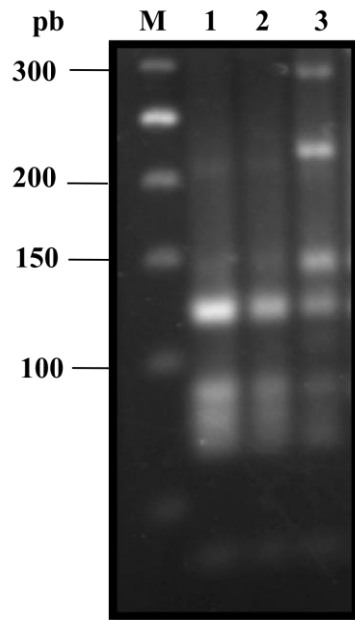


Figura 25. Fotografía que muestra el patrón electroforético después de la restricción con la enzima *Nla IV*. pb: pares de bases, M: Escalera de 50 pb. Carriles 1 y 2 con bandas de pesos moleculares características del Ensamble A (AI, AII). Carril 3 con mezcla de genotipos (AII, AI, B y E).

Resumen de los ensambles detectados

Se obtuvo el ensamble en 27 muestras de 12 establos. En el establo 4 se analizaron las muestras de nueve becerros y tres tuvieron *Giardia*, pero, ninguna fue genotipificada y hubo un establo (5) donde no se encontró *Giardia*. Se obtuvieron trofozoítos *in vitro* de cuatro muestras de quistes y el análisis del ADN (quistes y trofozoítos) mostró que todos fueron del Ensamble E Tabla 6.

Prevaleció el Ensamble E; pero también hubo ensambles zoonóticos A, B y mezcla de ensambles zoonóticos con especie-específicos. Tabla 7. En siete establos hubo becerros infectados con ensambles con potencial zoonótico Figura 26.

Tabla 6. Ensamblas de *Giardia* por establo.

Establo	N	Positivos (%)	Genotipos		
			Quistes	Trofozoítos en cultivo	
1	26	8 (30.76)	1	AII	
			1	E	
2	25	3 (12)	1	E	
			1	AI, AII, E, B	
3	26	18 (69.2)	1	E	
			1	E	E
			1	E	E
			1	AI, AII, E, B	
4	9	3 (33.33)	1	B	
			-	-	
5	6	0	-	-	
6	11	4 (36.6)	1	E	E
7	19	9 (47.36)	1	E	
8	18	6 (33.33)	1	AI, AII, E	
			1	AI, AII, E	
			1	E, B	
			1	AI	
9	8	3 (37.5)	1	E	
			1	AI	
10	18	6 (33.3)	1	AI, AII, B, E	
11	20	4 (20)	1	AI, AII, B, E	
12	17	9 (52.94)	3	E	
13	19	6 (42.10)	1	E	E
			5	E	
Total	222	79 (35.58)	27		

Tabla 7. Prevalencia de ensamblas.

Muestras de becerros (%)	Ensamble
1 (3.7)	AI (zoonótico)
1 (3.7)	AII (zoonótico)
1 (3.7)	B (zoonótico)
17 (62.9)	E (ungulados)
7 (25.9)	Mezcla (zoonóticos con ungulados)

n = 27

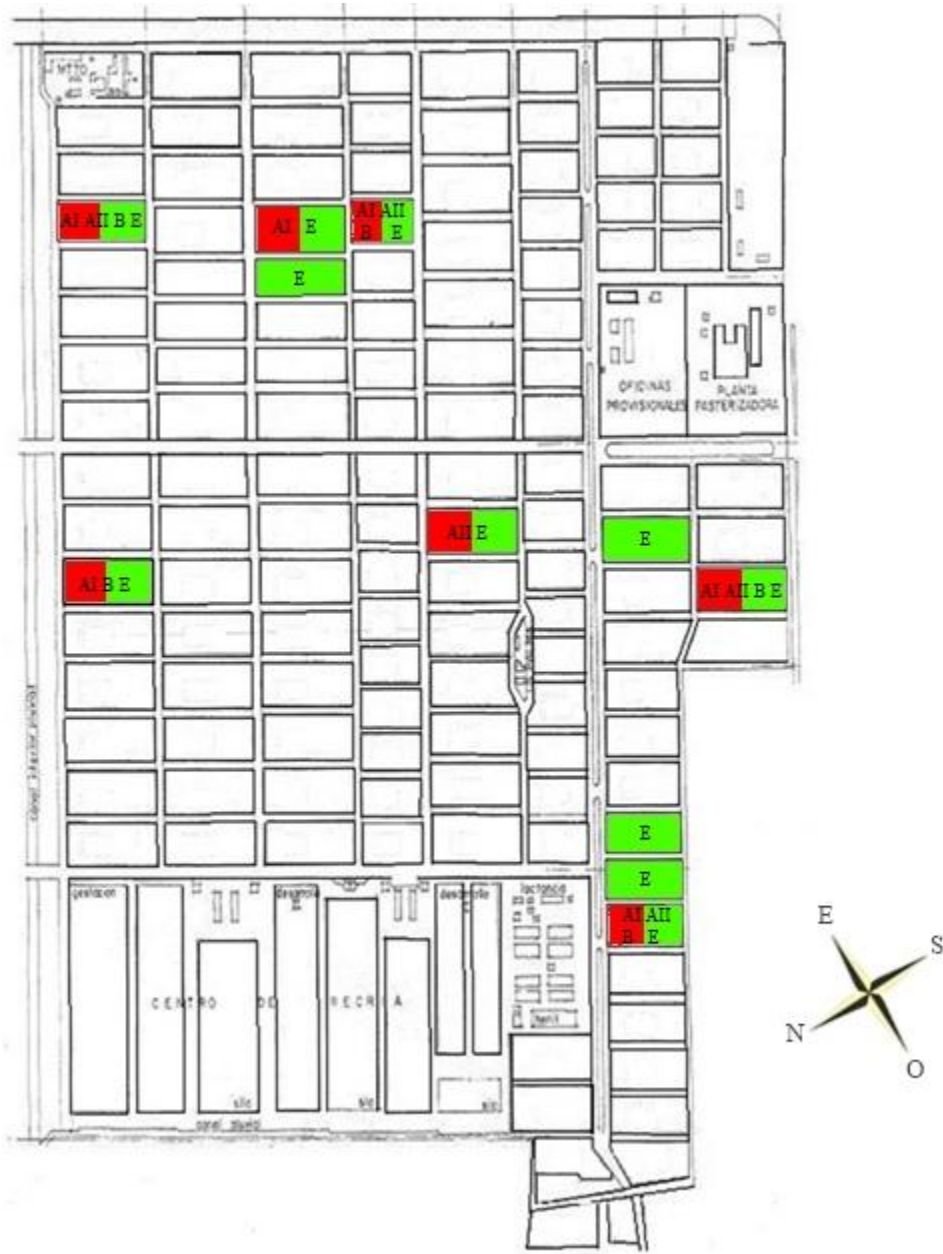


Figura 26. Mapa de la distribución de los establos de la Cuenca Lechera de Tizayuca en donde se muestra la distribución de los ensambles AI, AII y B potencialmente zoonóticos en (rojo), y en (verde) E específico de artiodáctilos.

9. Discusión

En este estudio se analizaron muestras de 222 becerros de 13 establos de la cuenca lechera de Tizayuca y se encontró una prevalencia de *Giardia* del (36.48%), mayor a la esperada (20%). El resultado es importante porque hasta donde sabemos solamente hay un estudio de prevalencia de *Giardia* en bovinos en nuestro país; los autores analizaron muestras de 174 bovinos de rebaños de traspatio de cinco estados (Morelos, Edo. de México, Hidalgo, Querétaro y Veracruz) y solamente en Hidalgo y Querétaro encontraron bovinos parasitados con *Giardia*, pero la prevalencia fue del 5.1% y no describieron la edad de los animales analizados (Otero *et al.*, 2011). En nuestro caso, el muestreo se hizo en becerros menores de tres meses de edad, de establos que contaban con casetas individuales comerciales o improvisadas de una zona confinada y contrario a lo esperado la prevalencia fue mayor. La alta prevalencia probablemente se debió a que se analizaron muestras de becerros y no de adultos. Algunos estudios señalan que la prevalencia máxima se observa en animales con edades comprendidas entre 1 y 6 meses (Xiao *et al.*, 1994; Nydam *et al.*, 2001; Ralston. *et al.*, 2003; Becher *et al.*, 2004) ya que los animales jóvenes tienen un lento desarrollo de la inmunidad adaptativa (Yanke *et al.*, 1998; O'Handley *et al.*, 2003).

La cuenca lechera es una zona muy importante del Estado de Hidalgo, por la gran producción lactea y es necesario que constantemente sea monitoreada para la búsqueda de parásitos que producen malabsorción, como es el caso de *Giardia*; ya que se ha demostrado que la giardiosis en becerros produce diarrea que puede perdurar por varios meses (Xiao *et al.*, 1993; Xiao., 1994; Xiao and Herd., 1994; O'Handley *et al.*, 1999). En cabras y ovinos este parásito produce diarrea y los animales no ganan peso, lo que repercute en pérdidas económicas para los granjeros (Koudela y Vitovec., 1998; Olson *et al.*, 1995). Nosotros no hicimos un análisis clínico, ya que nos enfocamos fundamentalmente en la prevalencia de *Giardia* y ensambles predominantes; sin embargo, la mayoría de los becerros tenían buen aspecto físico salvo algunos que presentaban el pelaje de la cola cubierto de heces diarreicas secas con olor fétido, en general las heces presentaron las siguientes características: Heces sólidas y consistentes, pastosas con moco y sin moco, algunas presentaron pequeños coágulos de sangre no digerida, pero en nuestro caso la mayoría de

las muestras eran pastosas y solamente en una (establo 7) se encontró un trofozoíto sin quistes en la materia fecal diarreica.

No obstante que la mayoría de los establos de la cuenca lechera estaban en aceptables condiciones de higiene y la alimentación de los becerros en general era buena, el porcentaje de establos con animales infectados fue del (92.30%) ya que solamente en un establo de un total de 13 no se encontraron becerros con *Giardia*. Se analizaron desde 6 hasta 26 becerros por establo y la prevalencia fue desde el (12%) hasta el (69.2%) Tabla 4. A pesar de que la mayoría de estos becerros estaban en casetas individuales, hubo un alto porcentaje de establos con animales infectados con *Giardia*; probablemente el agua de beber, los artrópodos (*musca*, *periplaneta*), la fauna nociva (aves, roedores), los animales domésticos (cánidos) o el proceso de eliminación de las heces jueguen un papel importante para la diseminación de esta parasitosis.

A nivel mundial la prevalencia de giardiosis en bovinos es variable, se reporta desde un (3.7%) al (57.8%) (Feng & Xiao, 2011); esta gran diferencia puede deberse a la edad de los bovinos, técnica de muestreo o número de muestras analizadas por animal. Pero, estudios realizados en becerros muestran alta prevalencia; por ejemplo, en el análisis de muestras de 386 becerros de 20 granjas productoras de leche en Canadá se reportó una prevalencia de *Giardia* del (73%) y todas las granjas tuvieron becerros infectados; la prevalencia por edad fue desde el (37%) en becerros desde 0 a 2 semanas y del (81%) en becerros de 16 a 24 semanas de edad (Olson *et al.*, 1997). En Bélgica se analizaron 499 becerros de 100 establos productores de leche, la prevalencia de *Giardia* fue del (22%) y el porcentaje de granjas con animales infectados fue del (48%) (Geurden *et al.*, 2008). Nuestros resultados se encuentran en medio de los reportados en estos dos estudios. Recientemente se detectó una prevalencia del (51%) en un análisis de 183 becerros de 11 granjas canadienses (Uehlinger *et al* 2011).

Por otro lado, en el desenquistamiento *in vitro* intervienen varios factores: calidad y cantidad de quistes, temperatura, pH, tiempos de incubación y contaminación bacteriana o fúngica (Bénére, E. *et al.*, 2010). En este estudio se hicieron varios desenquistamientos con 26 muestras y cuando los trofozoítos no salieron o cuando la contaminación bacteriana predominó el desenquistamiento se repitió. Se obtuvieron cuatro aislados (INP10022010-

B1757, INP19032010-BF116, INP27012010-B960, INP28012011-B3) de *Giardia* que se mantuvieron en cultivo TYI-S-33 axénico. En tres casos se obtuvieron los trofozoítos en el primer desenquistamiento *in vitro*, pero, los trofozoítos del aislado INP27012010-B960 se obtuvieron después de tres repeticiones Tabla 5.

La amplificación del segmento de 432 pb del gen *gdh* del DNA de los trofozoítos de los cuatro aislados y la restricción con la enzima *Nla IV* generaron bandas de 70, 100 y 220 pb que son características del ensamble E (ungulados). El análisis del DNA de los quistes también tuvo el mismo patrón que los trofozoítos Figura 21. Estos resultados fueron importantes porque se demostró que, en estos casos, no hubo selección de genotipos de los trofozoítos cultivados *in vitro*, ya que se ha descrito que el medio de cultivo selecciona genotipos (Mayrhofer G. *et al.*, 1992). En México solamente hay un reporte de genotipificación de *Giardia* de muestras obtenidas de bovinos y ovinos. De los nueve bovinos con giardiasis, obtuvieron cinco aislados de *Giardia*, dos fueron del ensamble E y tres del ensamble A (AI) (Otero *et al.*, 2011).

Para evitar la selección de genotipos, se ha planteado la necesidad de genotipificar directamente DNA obtenido de los quistes y no de los trofozoítos en cultivo axénico (Mayrhofer G. *et al.*, 1992). A nivel mundial los reportes de genotipificación a partir de quistes obtenidos de bovinos muestran prevalencia del ensamble E (artiodáctilos) (Feng & Xiao, 2011; Xiao & Fayer, 2008; Trout *et al.*, 2005; Read *et al.*, 2004). En este estudio se genotipificaron 27 muestras (34.17%) de DNA que se obtuvieron directamente de quistes de los becerros; por lo menos una muestra de cada uno de los 11 establos fue genotipificada Tabla 6. El (88.8%) de las muestras contenían el ensamble E, (69.2%) únicamente el ensamble E y el (25.9%) mezcla de E + A + B); además, otros tres becerros que tuvieron A (AI y AII) o B respectivamente Tabla 6. El resultado es significativo porque el (37%) de los becerros tuvieron ensamblajes A (AI, AII) y B que son potencialmente zoonóticos. La genotipificación de muestras de becerros de diferentes partes del mundo reportan mayor prevalencia del ensamble E. En muestras de 54 becerros de Australia y tres de Italia se detectó únicamente el ensamble E (Becher *et al.*, 2004; Berrili *et al.*, 2004); pero, en 456 muestras de becerros de Estados Unidos de Norte América el 87% fue del ensamble E y el (13%) de ensamble A (Trout *et al.*, 2005).

De 10 muestras de becerros de Canadá, ocho fueron del ensamble E y dos del ensamble A, y de cinco de Australia cuatro fueron del ensamble E y uno del A (O'Handley *et al.*, 2000). También se han reportado mezclas de genotipos, por ejemplo en 101 muestras de becerros para doble propósito en Bélgica se detectó el 53% del ensamble E, 16% del ensamble A y 31% de mezcla de A+E (Geurden *et al.*, 2008).

En este estudio es importante resaltar las implicaciones que tiene la detección de becerros con giardiosis: a) los becerros pueden dejar de ganar peso y perjudicar la producción para el ganadero, b) los becerros son diseminadores de quistes que pueden infectar a otros becerros, c) las heces de los becerros con quistes de *Giardia* de los ensambles A y B pueden infectar a las personas que cuidan a los animales a través de transmisores mecánicos como los artrópodos (*Musca* o *Periplaneta*) y d) la fauna nociva puede infectarse y posteriormente ser diseminadora de quistes de *Giardia*.

Sabemos que en la ganadería es indispensable llevar buenas prácticas de manejo para disminuir las pérdidas por infecciones parasitarias. Por tal motivo, es necesario que los becerros con giardiosis sean separados del establo, proporcionarles el tratamiento adecuado y procesar las excretas de los animales para evitar la diseminación de la parasitosis.

10. Conclusiones

- La prevalencia de giardiosis fue mayor a la esperada.
- Prevalció el ensamble E.
- Los becerros son portadores y diseminadores de quistes de *Giardia* del ensamble E (ungulados) y de ensambles con potencial zoonótico (A y B).

11. Perspectivas

- Demostrar cuál de los ensambles (E o A) son más virulentos en becerros.

12. Referencias

- Abdul-Wahid A., Faubert G., 2007. Mucosal delivery of a transmission-blocking DNA vaccine encoding *Giardia lamblia* CWP2 by *Salmonella typhimurium* bactofection vehicle. *Vaccine* 2007;25:(50)8372–8383.
- Adam R.D. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 13:447-475.
- Amar C.F.L., P.H. Dear., S. Pedraza-Diaz., N. Looker., E. Linnane., J. McLauchlin. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40, 446–452.
- Becher KA., Robertson ID., Fraser DM., Palmer DG., Thompson RC. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Vet Parasitol* 2004;123:1–9.
- Berrilli F, Di Cave D, De Liberato C, Franco A, Scaramozzino P, Orecchia P. Genotype characterisation of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animals by SSU-rRNA gene sequencing. *Vet Parasitol* 2004;122:193-199.
- Boreham P.F., Upcroft J.A., Upcroft P. Changing approaches to the study of *Giardia* epidemiology 1681-2000. *Int J Parasitol* 1990; 20(4):479-487.
- Bomfim TC., Huber F., Gomes RS., Alves LL. Natural infection by *Giardia sp.* and *Cryptosporidium sp.* in dairy goats, associated with possible risk factors of the studied properties. *Vet Parasitol* 2005;134:9–13.
- Buret A., Gall DG., Nation PN., Olson ME. Intestinal protozoa and epithelial cell kinetics, structure and function. *Parasitology Today* 1990a;6:375–380.
- Buret A., Gall DG., Olson ME. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. *J Parasitol* 1990b;76:403-409.
- Bénére E., Geurden T., Robertson L., Assche T., Cos P., Maes L. Infectivity of *Giardia duodenalis* Assemblages A and E for the gerbil and axenisation of duodenal trophozoites. *Int Parasitol* 2010;59:634-637
- De Haro Arteaga I., Salazar Schettino PM., Cabrera Bravo M. Diagnóstico morfológico de las parasitosis. Segunda Edición 1995. Méndez Editores, S.A. de C.V. ISBN 968-6596-51-8 impreso en México

- Feng Y., Xiao L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. Clin Microbiol Rev. 2011;24(1):110-140.
- Filice F.P. Studies on the cytology and the life history of a *Giardia* from the laboratory rat. Univ. California Publ. Zool. 1952; 57, 53–146.
- Fricker CR. & Smith HV. Guidelines for drinking-water quality 2nd ed. Addendum Microbiological agents in drinking water. Malta: World health organization Geneva 2002:70-101.
- Geurden T., Claerebout E., Dursin L., Deflandre A., Bernay F., Kaltsatos V, et al. The efficacy of an oral treatment with paromomycin against an experimental infection with *Giardia* in calves. Vet Parasitol 2006;135:241–247.
- Geurden T. *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves in Belgium. Tesis para obtener el grado de Doctor en la ciencia veterinaria en la Facultad de veterinaria Universidad de Gante, 2007.
- Geurden T, Geldhof P, Levecke B, Martens C, Berkvens D, Casaert S, et al. Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. Int J Parasitol 2008;38:259-264.
- Geurden T., Vercruyse J., Claereboutis E. *Giardia* a significant pathogen in production animals? Exp parasitol 2009;124(1):98-106.
- Godden S. Colostrum management for dairy calves. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 2008;24:19–39.
- Gül A., Çiçek M., Kiliç O. Prevalence of *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Calves in the Van Province. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2008;32(3)202-204.
- Hunter PR., Thompson RC, The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. Int J Parasitol 2005;(35):1181-1190.
- Khan SM, Debnath C, Pramanik AK, Xiao L, Nozaki T, Ganguly S. Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. Vet Parasitol 2011;178:342-345.
- Koudela B, Vítovec J. Experimental giardiasis in goat kids. Institute of Parasitology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic. Vet Parasitol 1998;15;74(1):9-18.

- Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML. 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 Parasitol* 2010; 40:1063-1074.
- Maddox-Hyttel C., Langkjaer RB., Enemark HL., Vigre H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs-occurrence and management associated risk factors. *Vet Parasitol* 2006;141:48-59.
- Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Albert MJ, Grimmond TR, Merry DJ. The use of suckling mice to isolate and grow *Giardia* from mammalian faecal specimens for genetic analysis. *Parasitology* 1992;105:255–63.
- McGlade TR., Robertson ID., Elliot AD., Thompson RCA., High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Vet Parasitol.* 2003;110:197-205.
- Moncada DM., Kammanadiminti SJ., Chadee K. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends in Parasitology* 2003;19, 305-311.
- Monis PT., Mayrhofer G., Andrews RH., Homan WL., Limper L., and Ey PL. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology.* 1996;112:1-12.
- Nydam DV., Wade SE., Schaaf SL., Mohammed, HO. Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia spp.* cysts shed by dairy calves after natural infection. *American Journal of Veterinary Research.* 2001;62:1612–1615.
- O’Handley RM., Cockwill C., McAllister TA., Jelinski M., Morck DW., Olson ME. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1999;214:391–396.
- O’Handley RM., Cockwill C., Jelinski M., McAllister TA., Olson ME. Effects of repeat fenbendazole treatment in dairy calves with giardiasis on cyst excretion, clinical signs and production. *Vet Parasitol.* 2000;89:209–218.
- O’Handley RM., Olson ME., Fraser D., Adams P., Thompson RC. Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. *Vet Parasitol* 2000;90:193-200.
- O’Handley RM., Ceri H., Anette C., Olson, ME. Passive immunity and serological immune response in dairy calves associated with natural *Giardia duodenalis* infections. *Vet Parasitol* 2003;113:89–98.

- Olson ME., McAllister TA., Deselliers L., Morck DW., Cheng KJ., Buret AG, et al. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. *American Journal of Veterinary Research* 1995;56:1470–1474.
- Olson ME., Guselle NJ., O’Handley RM., Swift ML., McAllister TA., Jelinski MD, et al. *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in British Columbia. *Canadian Veterinary Journal*. 1997;38:703–706.
- Olson ME., Ceri H., Morck DW. *Giardia* vaccination. *Parasitology Today* 2000;16:213–217.
- Otero-Negrete J., Ibarra-Velarde F., Martínez-Gordillo M. N, Ponce-Macotela M. Prevalence of *Giardia intestinalis* and zoonotic genotype predominance in small scale sheep and cattle farms of five states of the Mexican Republic. *Vet Méx* 2011;42:219–226.
- Ponce-Macotela M., Martínez-Gordillo MN, Álvarez-Chacon R. Obtención y Cultivo de *Giardia* spp. *Infectología*. 1989;(10):91-95.
- Ponce-Macotela M, Martínez-Gordillo MN. Giardiosis En Becerril-Flores, M.A., Y Romero-Cabello, R., Editores, *Parasitología médica*. Segunda Edición. Editorial, MacGraw-Hill, Interamericana, México. ISBN:970-10-4519-X; 49-57.
- Ponce-Macotela M., Martinez-Gordillo M.N., Bermudez-Cruz R.M., Salazar-Schettino P.M., Ortega-Pierres G., Ey P.L. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *Int. J. Parasitol.* 2002;32:1201–1202.
- Ralston B.J., Cockwill CL., Guselle NJ., Van Herk FH., McAllister, TA., Olson ME. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* andersoni and their effect on performance in feedlot beef calves. *Canadian Journal of Animal Science*. 2003;83:153–159.
- Read CM, Monis PT, Thompson RCA. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* 2004;4:125-130.
- Roxstrom K., Palm D., Reiner D., Ringqvist E., Svard S. *Giardia* immunity – an update. *Trends in Parasitol* 2006;22:26–31.
- Ruest N., Couture Y., Faubert GM., Girard C. Morphological changes in the jejunum of calves naturally infected with *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. *Vet Parasitol* 1997;69:177-186.

- Santin M., Dargatz D., Fayer R. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblages in weaned cattle on cow-calf operations in the United States *Vet Parasitol* 2012;183:231-236.
- Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the neglected diseases initiative. *Trends Parasitol* 2006;22:203-208.
- Schuurman T, Lankamp P, van Belkum A, Kooistra-Smid M, van Zwet A. Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. *Clin Microbiol Infect* 2007;13(12):1186-1191.
- Scott KG., Logan MR., Klammer GM., Teoh DA., Buret AG. Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia muris*-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. *Infect Immun* 2000;68:3412-3418.
- Scott KG., Meddings JB., Kirk DR., Lees-Miller SP., Buret AG. Intestinal infection with *Giardia spp.* reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology* 2002;123:1179-1190.
- Scott KG., Yu LC., Buret AG. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun* 2004;72:3536-3542.
- St Jean G, Couture Y, Dubreuil P, Fréchette JL. Diagnosis of *Giardia* infection in 14 calves. *J Am Vet Med Assoc* 1987;191(7):831-832.
- Thompson RC. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 2000;(30):1259-1267.
- Trout Jm, Santin M, Greiner E, Fayer R. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves. *Vet Parasitol* 2005;130:177-183.
- Uehlinger FD., O'Handley RM., Guselle NJ., Greenwood SJ., Barkema HW. Efficacy of vaccination in preventing giardiasis in calves. *Vet Parasitol* 2007;146:182-188.
- van Keulen H, Macechko PT, Wade S, Schaaf S, Wallis PM, Erlandsen SL. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet Parasitol* 2002;(108):97-108.
- Wade SE., Mohammed HO., Schaaf SL. Epidemiologic study of *Giardia sp.* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Vet Parasitol* 2000a;89:11-21.
- Winkworth CL., Learmonth JJ., Matthaei CD., Townsend CR. Molecular characterization of *Giardia* isolates from calves and humans in a region in which dairy farming has recently intensified. *Appl. Environ. Microbiol* 2008;74:5100-5105.

- Yanke SJ., Ceri H., McAllister TA., Morck DW., Olson ME. Serum immune response to *Giardia duodenalis* in experimentally infected lambs. *Vet Parasitol* 1998;75:9–19.
- Yason JA., Rivera WL. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. *Parasitol Res* 2007;101:681–687.
- Xiao L., Herd RP. Quantitation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2944-2946.
- Xiao L., Herd RP., Rings DM. Concurrent infections of *Giardia* and *Cryptosporidium* on two Ohio farms with calf diarrhea. *Vet Parasitol* 1993;51:41–48.
- Xiao L. *Giardia* infection in farm animals. *Parasitology Today* 1994;10:436–438.
- Xiao L., Herd RP. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Vet Parasitol* 1994;55:257–262.
- Xiao L., Saeed K., Herd RP. Efficacy of albendazole and fenbendazole against *Giardia* infection in cattle. *Vet Parasitol* 1996;61:165–170.
- Xiao L., Herd RP. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Vet Parasitol* 1994;55:257–262.
- Xiao L., R Fayer. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol* 2008;38:1239–1255.
- Zajac A. Giardiasis. *Comp Cont Educ Pract.* 1992;14:604-609.
- Zajac AM., Johnson J., King SE, Evaluation of the importance of centrifugation as a component of zinc sulfate fecal flotation examinations. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002;38:221-224

13. Anexos

1. Solución salina fosfatos (PBS) 200ml

Reactivo	Cantidad (g)
NaCl	16
KCl	0.4
Na ₂ HPO ₄	1.2
KH ₂ PO ₄	0.38

2. Solución salina balanceada de Hanks (SSBH)

Reactivo	Cantidad (g)
CaCl	0.360
KCl	0.999
KH ₂ PO ₄	102 mg
MgSO ₄	247 mg
NaCl	20.14
Na ₂ HPO ₄	107 mg
MgCl ₂	1.19

NaHCO₃: Se añade para modificar el pH a la escala deseada.

3. Solución salina isotónica

Reactivo	Cantidad (g)
Cloruro de sodio	8.5
H ₂ O	1000 ml

4. Lugol parasitológico

Reactivo	Cantidad (g)
Yoduro de potasio	10
Yoduro cristaloides	5
H ₂ O	90 ml

a) Solución concentrada: se disolvieron 10 g de yoduro de potasio y 5 g de yodo cristaloides por agitación constante en 90 ml de agua destilada, posteriormente se aforaron a 100 ml y almacenó en un frasco ámbar hasta su uso.

b) Solución de trabajo: se mezclaron volúmenes iguales 1:1 de la solución concentrada y agua destilada. (Nota, se sugiere evitar los frascos goteros por que el lugol los destruye, utilizar goteros especiales con tapón esmerilado).

5. Sulfato de zinc 1.180° Bé

Reactivo	Cantidad (g)
Sulfato de Zinc	350
H ₂ O	500 ml

Se disolvió el sulfato de zinc en agua destilada, hasta ajustar (con un densitómetro) a una densidad a 1.180° Bé y la solución se almacenó hasta su uso.

6. Solución Concentrada de Sacarosa (Sheather)

Reactivo	Cantidad (g)
Sacarosa	500
Fenol	5
Agua destilada	320 ml

En un vaso de precipitados se colocó el agua, se adicionó la sacarosa lentamente y con agitación continua (agitador magnético). Al llegar al punto de saturación se agregó el fenol y el resto de la sacarosa. Se vació a un frasco de vidrio con tapón de rosca, se etiquetó y se almacenó a 4°C hasta su uso.

7. Amortiguador de fosfatos (0.025M)

Reactivo	Cantidad (g)
Fosfato de sodio monobásico	1.72
Fosfato de sodio dibásico	1.77
Agua destilada	400 ml

En un vaso de pp se colocaron 400 ml de agua, se adicionaron los fosfatos, se disolvieron por agitación continua y se ajustó a pH 7.0. Se aforó a 500 ml.

8. Amortiguador de fosfatos (0.025M) y Tween 80 (1%)

Reactivo	Cantidad (ml)
Tween 80%	1
Amortiguador de fosfatos	99

Se mezclaron las soluciones (se agitó con cuidado, debido a que el Tween es un detergente). Se vació en un frasco de vidrio con tapón de rosca, se etiquetó y almacenó a 4°C hasta su uso.

9. Solución I de Sheather (Más densa)

Sol. A 50 ml.

Solución C 100 ml.

Solución II de Sheather

Sol A 50 ml.

Sol C 200 ml.

10. Amortiguador tris boratos con sal disódica del ácido etilendiamina tetraacético (TBE) 20X. 1000 ml

Reactivos	Cantidad (g)
Tris base	121.0
Ácido bórico	61.7
EDTA-Na ₂ *2H ₂ O(20.0 mM)	7.44
H ₂ O desionizada	1000.0 ml

Los reactivos se disolvieron en 800 ml de agua desionizada, se aforó a 1000 ml y se almacenó a temperatura ambiente.

11. Amortiguador TE (Tris/EDTA) 100 ml

Reactivo	Cantidad
EDTA-Na ₂ *2H ₂ O	93.05 g
H ₂ O desionizada	Aforar a 500 ml

El EDTA se vació en un vaso de 600 ml, se agregaron 300 ml de agua, se ajustó el pH a 8.0 con NaOH 10 M, se aforó a 500 ml y se esterilizó por autoclave.

12. RNAsa A

Reactivo	Cantidad
RNAsa A	10.0 mg
TE	1.0 ml

La RNAsa A se disolvió en 1.0 ml de TE, se alícuotó en 10 partes iguales (100.0 µl) y se almacenó a -20° C hasta su uso.

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

Reactivo	Cantidad
Bromuro de etidio	50.0 mg
Agua desionizada esterilizada	5.0 ml

Se mezcló el bromuro con el agua, se depositó en un frasco de color ámbar y se almacenó a 4° C hasta su uso.

Este reactivo se utilizó para visualizar ácidos nucleicos (DNA y RNA) ya que emite fluorescencia cuando se excita con una longitud de onda de 250 a 310 nm. Se manejó con guantes y se evitó la inhalación, ya que es un reactivo altamente mutagénico y produce daño irreversible.

14. Gel de agarosa al 1%

Reactivo	Cantidad
Agarosa	300 mg
TBE	30.0 ml
BrE	0.5 μ l

El molde para hacer el mini gel se selló en los dos extremos laterales con cinta adhesiva (permacel) y se colocó el peine formador de pozos.

En un matraz de 100.0 ml se añadió la agarosa y el amortiguador TBE, se fundió la agarosa, se agregó el BrE, se mezcló evitando la formación de burbujas y se vació al molde en un ambiente de 4° C para que gelifique.

15. Proteinasa K

Reactivo	Cantidad
Proteinasa K	10.0 mg
TE	1.0 ml

La proteinasa K se disolvió en 1.0 ml de TE, se alicuotó en 10 partes (100.0 ml) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

16. Solución de lisis

Solución de lisis 5.0 ml.

Reactivo	Concentrada	Necesaria	Tomar μ l
Tris pH 7.4	2.0 m	10.0 mm	25.0
EDTA	0.5 m	10.0 mm	100.0
NaCl	5.0 m	50.0 mm	150.0
SDS	10.0%	0.4%	200.0
H2O			4525.0
Proteinasas K	10.0 mg/ml	200.0 μ g/ml	20.0

En este orden se disolvieron los primeros cuatro reactivos, se aforó a 5.0 ml con agua desionizada y esterilizada. La proteinasas K se agregó en el momento de la lisis de los quistes.

17. Medio de Cultivo TYI'S33 500ml

Reactivo	Cantidad (g)
Glucosa	5.0
NaCl	1.0
Fosfato de potasio Bibásico	0.5
Fosfato de Potasio Monobásico	0.3
L-Cisteína	0.5
Ac ascórbico	0.1
Citrato Férrico de Amonio	0.0115
Bilis bovina	0.25
Extracto de Levadura	5.0
Tripticasa	10.0