



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Tesis de Maestría

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Giardia lamblia*  
EN COMUNIDADES URBANAS Y RURALES DE  
BUENOS AIRES Y MENDOZA, ARGENTINA.

Tesis para obtener el título de Magister en Ciencias del Laboratorio Clínico

Tesista: **Nora Beatriz Molina.**

Director: **Dra. Marta Cecilia Minvielle**

Codirector: **Dr. Antonio Lagares**

Lugar de trabajo: Cátedra de Microbiología y Parasitología.  
Facultad de Ciencias Médicas. UNLP.

2009

*He aquí tres reglas de trabajo:  
En el caos se encuentra la simpleza,  
En el desacuerdo se encuentra la armonía,  
En la dificultad se encuentra la oportunidad.*

*Albert Einstein*

*Un viaje de mil millas comienza con el primer paso.*

*Lao Tsé*

*A mis padres*

*La Tesis es un camino que se recorre solo pero nunca en soledad.*

### *Agradecimientos*

A mi esposo Víctor y a mi hijo Ignacio. Gracias a los dos por su amor incondicional, su comprensión y su increíble aliento. A Marcela, Claudio, Paula, y mis sobrinos Camila, Julián y Amparo, y en especial a mis entrañables amigos Darío y Claudia.

A la Dra. Marta Minvielle por su inestimable guía, su apoyo incondicional y su voluntad incansable. Gracias por escucharme, por compartir conmigo tus proyectos y permitirme explorar con libertad mis ideas.

Al Dr. Antonio Lagares por aceptar codirigir esta tesis. Gracias por las reuniones de los miércoles a la tarde, por el estímulo constante y el apoyo al discutir los resultados.

Al Dr. Juan Basualdo por aceptarme en la Cátedra hace unos cuantos años, por confiar en mí y permitirme recorrer el camino de la investigación.

Al Dr. Van Keulen por el ADN de referencia de *Giardia* y al Dr. Pablo Pérez por su desinteresada donación de los trofozoítos de *Giardia* y su amable predisposición para compartir conmigo la receta para congelarlos.

Al Dr. Mario Aguilar y a su equipo de trabajo del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) por brindarme la oportunidad de aprender sobre la PCR en el Laboratorio del IBBM y contarme los secretos de cocina de las reacciones de amplificación.

A Marieli García y César Bianchi del Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA) por su constante buena disposición y su ayuda inestimable en la documentación de los geles.

A la Prof. María Apezteguía y a la Ing. en Sistemas Evangelina Bertucci por el asesoramiento en el análisis estadístico.

A Valeria y Alejandra por los kilómetros recorridos en los viajes a los campos de Bavio a recolectar muestras. ¡Quién hubiera pensado que nosotras íbamos a sostener los terneros!

A mis compañeras Paula, Betina, Laura y Cristina, con ellas compartí muchas horas en el “ciber del cuarto piso”. Gracias por su compañerismo.

A Verónica por su valiosa ayuda en la obtención de las fotografías de esta tesis.

A mis compañeras del “tercer piso” María Marta y Celia, por las charlas y su buena onda.

A Víctor y Leo por su colaboración en la preparación y limpieza de los materiales del laboratorio.

A la Facultad de Ciencias Médicas de La Plata por permitirme desarrollar este trabajo de tesis.

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<hr/>	
1.1 Historia.....	2
1.2 Epidemiología.....	3
1.3 Ciclo Biológico.....	5
1.4 Trofozoíto de <i>G. lamblia</i> .....	7
1.4.1 Morfología.....	7
1.4.2 Proteínas variantes de superficie (VSP).....	10
1.4.3 Variación antigénica de las VSP (Switching).....	11
1.5 Quiste de <i>G. lamblia</i> .....	14
1.5.1 Morfología.....	14
1.5.2 Proteínas de la pared quística (CWP).....	15
1.6 Genoma de <i>G. lamblia</i> , cromosomas y variantes.....	18
1.7 Clasificación de <i>G. lamblia</i> .....	20
1.7.1 Caracterización mediante estudios de laboratorio.....	20
1.7.2 Especificidad de huésped.....	23
1.8 Fisiopatogenia de la giardiosis.....	23
1.9 Defensas del huésped contra <i>G. lamblia</i> .....	25
1.10 Presentación clínica de la infección.....	27
1.11 Diagnóstico de laboratorio de giardiosis.....	28
<hr/>	
<b>OBJETIVOS</b> .....	30
<hr/>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<hr/>	
2.1 Muestras.....	31
2.2 Características más relevantes de las localidades donde se recolectaron las muestras fecales.....	32
2.3 Encuestas realizadas a los participantes del estudio.....	37
2.4 Obtención de quistes de <i>G. lamblia</i> .....	41
2.5 Ruptura de quistes.....	43

2.6 Obtención de ADN.....	43
2.7 Reacción de Polimerasa en cadena (PCR).....	44
2.8 Polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP).....	45
2.9 Electroforesis en geles de agarosa.....	46
2.10 Purificación de ADN con polivinilpirrolidona (PVP).....	48

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN: OBJETIVO 1

---

3.1 Identificación de los genotipos zoonóticos de <i>G. lamblia</i> en muestras de origen humano.....	49
3.1.1 Distribución geográfica de los genotipos hallados.....	50
3.2 Identificación de los genotipos zoonóticos de <i>G. lamblia</i> en muestras de origen animal.....	51
3.3 Distribución de los genotipos en zonas rurales y urbanas.....	52
I) Zona Rural.....	52
II) Zona Urbana.....	53
3.4 Discusión.....	55

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN: OBJETIVO 2

---

4.1 Relaciones entre las variables sexo, edad y genotipo de <i>G. lamblia</i> .....	60
4.2 Análisis de las variables socioeconómicas de las comunidades analizadas y su relación con el genotipo detectado.....	62
4.3 Discusión.....	65

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN: OBJETIVO 3

---

5.1 Relación entre signosintomatología y genotipo infectante.....	68
5.2 Relación entre genotipo infectante y coinfección parasitaria.....	71

---

5.3 Discusión.....	72
--------------------	----

---

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN: OBJETIVO 4**

---

6.1. Obtención de quistes de <i>G. lamblia</i> .....	75
6.1.1 Optimización de las condiciones de obtención.....	75
6.1.2 Amplificación de ADN de quistes de <i>Giardia</i> obtenidos por colchón de sacarosa.....	78
6.2 Ruptura de quistes de <i>G. lamblia</i> .....	80
6.3 Amplificación de ADN de <i>Giardia</i> mediante Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR).....	83
6.4 Estimación del porcentaje de amplificación.....	85
6.5 Estimación de la sensibilidad y especificidad de la aproximación experimental utilizada.....	86
6.6 Discusión.....	87

---

<b>CONCLUSIONES FINALES.....</b>	<b>93</b>
----------------------------------	-----------

---

<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>95</b>
-------------------------	-----------

---

<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>111</b>
---------------------------	------------

---

*Giardia lamblia* (*G. duodenalis*; *G. intestinalis*), es un parásito del intestino delgado que afecta principalmente a niños y produce cuadros clínicos de variada intensidad desde la infección asintomática hasta cuadros graves de diarrea crónica con síndrome de malabsorción. Si bien, en los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la fisiopatogenia de la infección por *Giardia*, hasta el momento, los factores que determinan la variabilidad de las manifestaciones clínicas de giardiosis no están completamente esclarecidos.

*Giardia lamblia* presenta siete genotipos (A, B, C, D, E, F, G) morfológicamente indistinguibles al microscopio óptico pero con diferentes características genotípicas y fenotípicas. Si bien, estos genotipos presentan diferente especificidad de huésped, solamente los genotipos A y B producen enfermedad en el hombre.

En este trabajo de Tesis se analizó la distribución de los genotipos de *Giardia lamblia* presentes en el país y las eventuales relaciones entre el genotipo hallado y las características clínico-epidemiológicas de las comunidades estudiadas.

## **1.1 Historia**

*Giardia* fue descrita inicialmente en 1681 por van Leeuwenhoek al examinar heces diarreicas en el microscopio óptico. Lambl (1859) describió con gran detalle a este parásito y lo llamó *Cercomonas intestinalis*. Luego Kunstler (1882) le otorgó el nombre de *Giardia*. Blanchard (1888) propuso *Lamblia intestinalis* y Stiles (1902) eligió *Giardia duodenalis*. Finalmente, Kofoid y col. (1915) propusieron el nombre *Giardia lamblia*. En los años 50, Filice describió 3 especies de *Giardia*: *G. duodenalis*, *G. muris* y *G. agilis* basándose en criterios morfológicos al microscopio óptico (Adam, 2001).

Con el advenimiento del microscopio electrónico de barrido (SEM), se reconocieron dos nuevas especies *G. ardeae* y *G. psittaci*. Años más tarde, Feely (1988) describió una nueva especie denominada *G. microti* que se diferencia de *G. lamblia* en la morfología del quiste y en la subunidad pequeña del ribosoma (SSU-ADNr) (Adam 2001; Thompson y Monis, 2004).

A partir de 1970, se aceptó ampliamente el nombre de *Giardia lamblia* para este parásito aunque diversos autores prefieren utilizar sinónimos como *G. duodenalis* o *G. intestinalis*. Según Adam (2001), no existe razón para abandonar el término *Giardia lamblia* que ha sido aceptado por la literatura científica.

En resumen, actualmente se reconocen 6 especies de *Giardia*: *G. lamblia*, *G. agilis*, *G. muris*, *G. psittaci*, *G. ardeae* y *G. microti* con distinta especificidad de huésped (Adams y col., 2004; van Keulen y col., 1998) (tabla 1.1)

**Tabla 1.1:** Especies de *Giardia* y huéspedes involucrados. Extraído de Adam (2001).

Especies de <i>Giardia</i>	Huéspedes
<i>G. lamblia</i>	Humanos y otros mamíferos
<i>G. muris</i>	roedores
<i>G. microti</i>	ratones y ratas almizcleras
<i>G. psittaci</i>	aves
<i>G. ardeae</i>	aves
<i>G. agilis</i>	anfibios

## 1.2 Epidemiología

*G. lamblia* es el parásito productor de diarrea diagnosticado con más frecuencia en todo el mundo. Afecta principalmente a los niños y produce infecciones de espectro clínico variable, desde cuadros asintomáticos hasta diarreas graves con malabsorción (Thompson, 2004)

La giardiosis es una infección cosmopolita de tipo zoonótico cuya prevalencia varía entre 2 y 5% en países industrializados, y puede superar el 30% en países en desarrollo (Eligio-García et al., 2005; Minvielle y col., 2004). Según la OMS, la giardiosis tiene una distribución global estimada en  $2,8 \times 10^8$  casos anuales y *G. lamblia* es el parásito intestinal más frecuentemente detectado en seres humanos. En Asia, África y Latinoamérica, alrededor de  $2 \times 10^8$  personas presentan giardiosis sintomática y se diagnostican  $5 \times 10^5$  nuevos casos por año (Thompson, 2004).

En 2004, un estudio llevado a cabo por Minvielle y colaboradores ha detectado una prevalencia de *G. lamblia* del 6% en una comunidad rural de Buenos Aires. Otros relevamientos epidemiológicos realizados en habitantes de hogares transitorios y asentamientos precarios de Argentina han reportado prevalencias de 23 y 29% (Minvielle y col., 2004). Estudios realizados en La

Plata, Argentina han encontrado prevalencias de *G. lamblia* de 10 a 34% en humanos (Gamboa y col., 2003).

En Chaco, se ha reportado una prevalencia de *G. lamblia* de 24% (López Santorno y col., 2006) y en distintos barrios de La Rioja se ha encontrado *G. lamblia* en el 52% de los niños y en el 48% de los animales estudiados (Amaya y col., 2006). Además, este parásito ha sido detectado en muestras ambientales, en aguas de consumo y de recreación en diferentes zonas del país (Pierangeli y col., 2003).

La fuente de infección de *G. lamblia* es la materia fecal contaminada con quistes proveniente de humanos o animales como perros, gatos, ovejas, cabras, vacas, cerdos, caballos, entre otros. Por otro lado, una persona infectada con *G. lamblia* puede eliminar hasta  $9,0 \times 10^8$  quistes por día, una cantidad mucho mayor que la necesaria para causar infección (100 quistes) (Cueto Rua y Feldman, 2006).

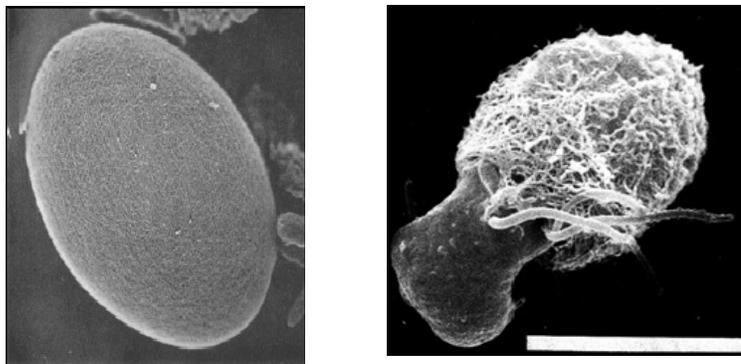
La giardiosis se propaga tanto en forma endémica por contagio interpersonal, ingestión de alimentos contaminados, falta de saneamiento ambiental o ausencia de normas higiénicas, como en forma epidémica a través del agua contaminada. La diseminación hídrica de este parásito se produce principalmente cuando las aguas cloacales contaminan los acuíferos o las fuentes de agua potable. En muchos países del mundo se han detectado epidemias por consumo de agua contaminada con quistes de *Giardia*. Por ejemplo, entre 1942 y 1980, en Estados Unidos se produjeron 42 brotes de giardiosis por consumo de agua contaminada. Sumado a ello, este parásito presenta varias características que favorecen su transmisión: posee una dosis infectante baja, sus quistes son infectantes al ser excretados con las heces, pueden sobrevivir en el ambiente durante semanas o meses y pueden contaminar el agua y los alimentos de consumo, además de transmitirse directamente entre los seres humanos y de los humanos a los animales o viceversa (Cueto Rua y Feldman, 2006).

La transmisión directa o indirecta entre distintos huéspedes se incrementa en lugares con alta densidad de población o por contacto estrecho entre las personas y los animales. Otros factores de riesgo están asociados a la inmersión en aguas contaminadas, al consumo de agua no tratada y al consumo de vegetales crudos como lechuga y frutas (Caccio y col., 2005).

### 1.3 Ciclo Biológico

Como otras especies de este género, el ciclo biológico de *G. lamblia* incluye dos fases o estados: el trofozoíto (forma vegetativa) y el quiste (forma de resistencia e infecciosa).

La infección del huésped comienza cuando los quistes ingresan por la vía oral. Luego de su paso por el estómago, llegan al segmento duodeno-yeyunal y se produce el desenquistamiento, liberando los trofozoítos al lumen intestinal (figura 1.1).



**Figura 1.1:** Quiste de *Giardia lamblia* en el lumen intestinal (en reposo y durante el desenquistamiento). El quiste mide 8-12  $\mu\text{m}$  por 5-8  $\mu\text{m}$ . Extraído de Hehl (2007).

El desenquistamiento *in vitro* de *G. lamblia* puede ser inducido utilizando soluciones ácidas que imitan las condiciones del estómago. El pH óptimo para este proceso oscila entre 1,3 y 4. La citoquinesis del desenquistamiento es rápida, se completa en 30 min dando origen a dos trofozoítos binucleados (Cueto Rúa y Feldman, 2006).

Los trofozoítos liberados atraviesan la barrera de moco, se adhieren al epitelio intestinal y se alimentan captando nutrientes de la luz intestinal mediante vesículas pinocitóticas. Esta predilección de los trofozoítos por el yeyuno sugiere que requieren una alta concentración de nutrientes para su supervivencia y proliferación, entre ellos, el colesterol, elemento fundamental para la biogénesis de sus membranas y en el proceso de enquistamiento (Lujan y col., 1997).

Luego, los trofozoítos se multiplican y colonizan la superficie intestinal. Ante ciertos estímulos como la exposición a sales biliares, algunos de ellos se enquistan en el yeyuno. Las condiciones específicas que promueven el enquistamiento incluyen el pH levemente alcalino y sales biliares conjugadas con ácidos grasos (Adam, 2001; Cueto Rúa y Feldman, 2006). En 1996, Luján y colaboradores demostraron que el estímulo inductor del enquistamiento de *Giardia* es la ausencia de colesterol, ya que la adición de este lípido del medio bloquea el enquistamiento por mecanismos no totalmente conocidos.

La biogénesis de la pared protectora es el mecanismo clave para la continuación del ciclo biológico. Es un proceso coordinado que puede dividirse en 3 etapas: i) el estímulo de enquistamiento y la regulación de la expresión de los genes específicos del proceso; ii) la síntesis, el transporte intracelular de las proteínas de la pared quística (CWP) y su secreción y iii) el ensamble extracelular de la pared en formación en la superficie del trofozoíto enquistante (Lujan y col., 1997).

Por último, los quistes formados son eliminados con las heces, completando el ciclo biológico al infectar un nuevo huésped (Noemí y Atías, 1993) (figura 1.2)

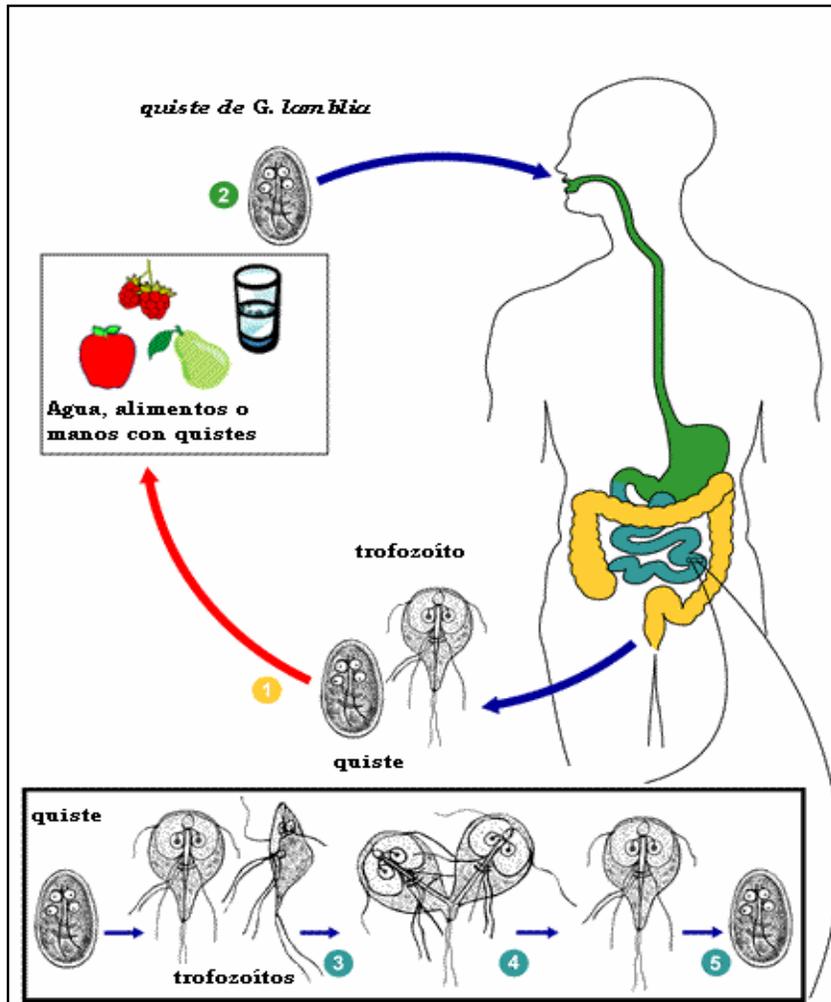


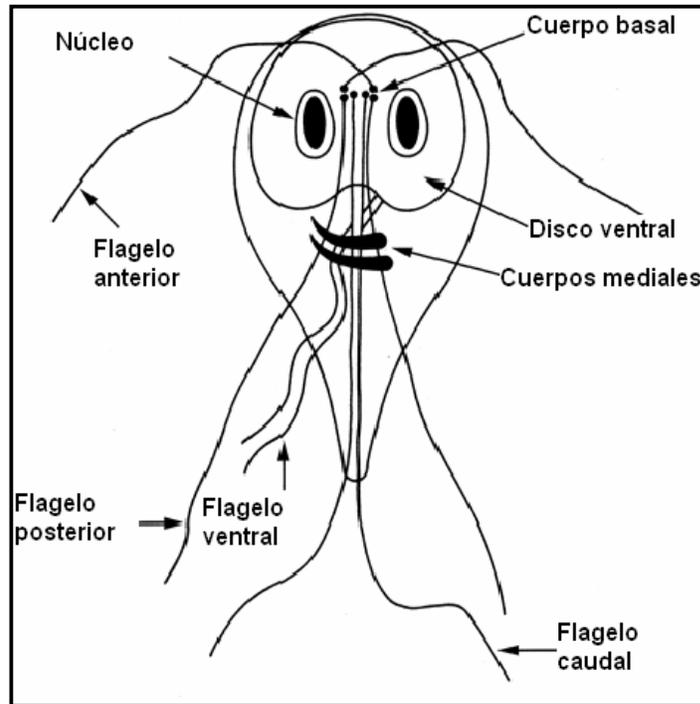
Figura 1.2: Ciclo biológico de *Giardia lamblia*. Extraído de CDC, <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

## 1.4 Trofozoíto de *G. lamblia*

### 1.4.1 Morfología

El trofozoíto es piriforme, de 12-15  $\mu\text{m}$  x 5-9  $\mu\text{m}$ , convexo dorsalmente y con una concavidad ventral. El citoesqueleto incluye un cuerpo medial, cuatro pares de flagelos y un disco ventral (adhesivo o suctorio) (Adam, 2001) (figura 1.3). Además, posee 2 núcleos, retículo endoplasmático (RE) y vesículas periféricas tipo lisosoma (PV). Según Abdul-Wahid y Faubert (2004) los trofozoíto muestran una ausencia aparente de organelas como mitocondrias,

peroxisomas y compartimientos necesarios para el tráfico y la secreción intracelular de proteínas, tales como el aparato de Golgi y gránulos de secreción.



**Figura 1.3:** Trofozoíto de *G. lamblia*, Extraído de Faubert (2000).

Dentro del trofozoíto de *Giardia* se distinguen las siguientes estructuras:

#### **Núcleos:**

Posee dos núcleos ovoides, situados simétricamente a cada lado de la línea media, con un gran cariosoma central. Mediante coloraciones nucleares con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) o PI (ioduro de propidio) se determinó que ambos núcleos poseen aproximadamente la misma cantidad de ADN.

No se ha demostrado la presencia de nucléolo lo que sugiere que la transcripción de ARNr y su procesamiento no están localizados en ciertas regiones del núcleo (Adam, 2001).

**Citoplasma:**

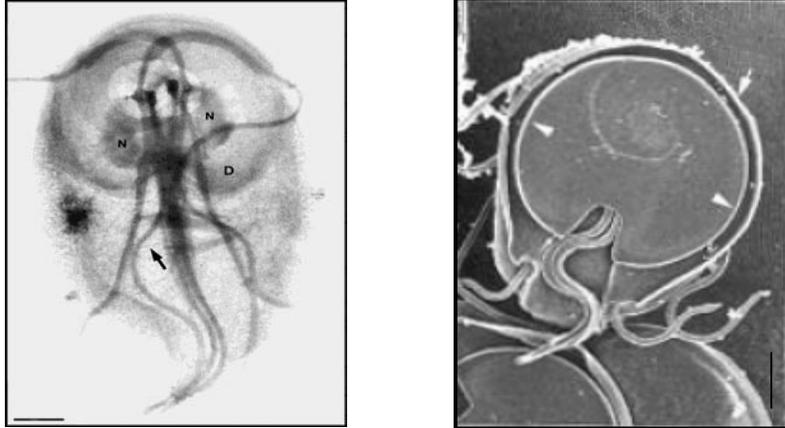
Posee una estructura característica denominada disco ventral que se encuentra implicada en la adherencia al epitelio intestinal. Las proteínas constituyentes de este disco son las giardinas, un grupo de proteínas de conformación alfa hélice y pesos moleculares entre 29 a 38 kDa. Además, el disco contiene proteínas contráctiles como actinina, miosina y tropomiosina que constituyen la base bioquímica para la contracción y adherencia, y tubulinas, proteínas que constituyen los microtúbulos del disco ventral y de los flagelos (Adam, 2001).

Los cuerpos mediales son componentes del citoesqueleto que están localizados en la línea media del trofozoíto y son el sitio de ensamble de los microtúbulos del disco ventral.

Además, presenta cuatro pares de flagelos que se originan de cuatro pares de cuerpos basales en la cara ventral del trofozoíto con sus correspondientes axonemas (Adam, 2001) (figuras 1.4 y 1.5).

Recientemente, en el trofozoíto de *Giardia* se ha identificado y caracterizado la presencia de mitosomas, pequeñas organelas con doble membrana y sin ADN, cuya función está relacionada con la maduración de proteínas ferro-sulfúricas y no con el metabolismo energético.

Morfológicamente se diferencian en mitosomas periféricos que se distribuyen al azar en el citoplasma y mitosomas centrales que se encuentran fijados al cuerpo basal en el centro de la célula (Hehl y col., 2007).



**Figuras 1.4 y 1.5:** Microfotografías del trofozoíto y del disco ventral de *Giardia lamblia*. Barra: 1  $\mu\text{m}$ . Extraído de Benchimol y col. (2004).

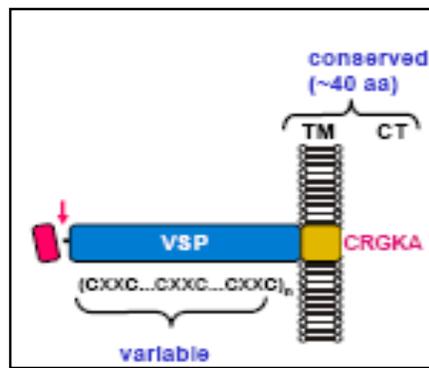
Basado en estudios morfológicos y de proteínas marcadoras se han documentado 3 tipos de compartimientos membranosos en los trofozoítos.

El compartimiento mejor caracterizado es el retículo endoplasmático (RE), el cual se extiende bilateralmente a través de toda la célula y se continúa con la membrana nuclear. El segundo compartimiento es un sistema de vesículas periféricas (PV) con actividad lisosomal y endosómica. El tercer tipo de compartimiento es el único que contiene material de secreción y son las vesículas secretorias específicas de enquistamiento (ESV). Estas estructuras subcelulares contienen sustancias (proteínas y glicanos) destinadas a la formación de la pared quística (Hehl y Marti, 2004).

### **1.4.2 Proteínas variantes de superficie (VSP)**

Los trofozoítos presentan en la superficie, un tipo especial de proteínas integrales de membrana, denominadas proteínas variantes de superficie o VSP que son codificadas por los genes *vsp* presentes en el genoma de *Giardia*.

Estas VSP son una familia inusual de proteínas ricas en cisteína con pesos moleculares entre 50 y 200 kDa (Singer y col., 2001). Todas tienen un alto contenido en cisteína (alrededor de 12%) y la mayoría presenta un motivo CXXC, donde XX son 2 aminoácidos cualquiera, así como una región altamente conservada en C-terminal, una región con estructura tipo dedos de Zn y otras regiones comunes (figura 1.6). Las VSP varían en su resistencia a proteasas intestinales por lo que ciertos autores sugieren que esta propiedad actuaría como un mecanismo de selección positiva, ya que los trofozoítos con estas VSP serían capaces de sobrevivir en el medio intestinal (Nash, 2002; Svärd y col., 1998).



**Figura 1.6:** Características estructurales de las proteínas variantes de superficie. Extraído de Hehl (2007)

El número de genes *vsp* en el genoma se ha estimado en 150 aproximadamente. Sin embargo, debido a que el repertorio de genes *vsp* varía en los distintos aislamientos, el número de estas proteínas es considerablemente mayor (Nash, 2002). Estos genes están presentes en la mayoría de los cromosomas de *G. lamblia* y corresponden aproximadamente al 2% del genoma (Adam, 2001).

### **1.4.3 Variación antigénica de las VSP (Switching)**

El trofozoíto de *G. lamblia* presenta variación antigénica de sus proteínas de superficie. Este fenómeno ocurre en una amplia variedad de microorganismos,

incluyendo protistas, bacterias y virus. Si bien se han descrito numerosos roles biológicos para este fenómeno, el rol más citado es el escape inmunológico. Sin embargo, se ha documentado la variación biológica en organismos de vida libre en respuesta a estímulos ambientales, lo que es difícil de reconciliar con el rol de evasión de la respuesta inmune del huésped, indicando que la variación biológica cumple con otras funciones además del escape inmunológico (Singer y col., 2001).

Estudios llevados a cabo por Nash (2002) han reportado que ciertas VSP interactúan mejor con un tipo de huésped que con otro y que existen claras preferencias de ciertas VSP por diferentes huéspedes. Una explicación posible para el gran repertorio de VSP presentes en el genoma sería que la variación antigénica de las proteínas de superficie permitiría que el parásito aumente su supervivencia en muchas especies de huéspedes. Por lo tanto, la variación de los antígenos de superficie de *Giardia* podría promover la transmisión a especies diversas a partir de un solo huésped infectado. (Singer y col., 2001).

Las VSP son antígenos de superficie inmunodominantes que cambian espontáneamente cada 6 a 13 generaciones y durante el enquistamiento y desenquistamiento de algunos aislamientos de *Giardia*. La expresión de las VSP es de tipo reversible sin un orden pre-establecido y la frecuencia del cambio de una VSP a otra depende del aislamiento. Este fenómeno ocurre *in vivo* e *in vitro* y se desconoce si la variación antigénica esta asociada a la cronicidad. Por ende, podría estar involucrado en infecciones repetidas en un mismo huésped o a una diseminación a un mayor rango de huéspedes susceptibles (Nash, 2002).

Para determinar la naturaleza del cambio antigénico, Nash y colegas (2001), utilizaron 2 Anticuerpos fluorescentes para 2 VSP distintas. Estos autores documentaron que el cambio de una VSP a otra es un proceso gradual, donde una de ellas va disminuyendo su expresión mientras que la otra aumenta gradualmente. En forma transitoria y durante un corto período de tiempo (36 h o menos), los autores detectaron ambas VSP en la superficie del trofozoíto.

Estudios *in vitro* realizados por Singer y colaboradores (2001) han demostrado que el cambio de una VSP a otra ocurre sin un orden preestablecido, resultando en una disminución gradual del número de parásitos que expresa la VSP original y la aparición de una población con expresión heterogénea de VSP.

El mecanismo molecular involucrado en la variación antigénica de *Giardia* no está totalmente esclarecido. A diferencia de otros parásitos como los tripanosomas africanos en los que se han detectado rearrreglos cromosómicos del tipo transposición duplicativa, en *G. lamblia* la variación antigénica no se encuentra directamente asociada a rearrreglos genómicos de las VSP (Adam, 2001).

Un avance fundamental en el estudio de la regulación de la expresión génica fue descubrimiento de la vía del ARN de interferencia (ARNi). A partir del secuenciamiento del genoma de *G. lamblia*, se han reconocido varios genes centrales para la vía del ARNi. Entre ellos, los genes de las enzimas DICER y ARN polimerasa ARN dependiente (RdRP) (Ullu y col., 2005).

Diversos investigadores han puesto en evidencia que el mecanismo de ARNi controla la expresión de las proteínas VSP. Este mecanismo propuesto involucra la formación de ARN de doble hebra (ARNds) por la enzima RdRP y su posterior clivaje en fragmentos de 23 a 26 bp por la enzima DICER. Estos autores indican que la función de RdRP es necesaria para restringir la expresión de un solo gen de *vsp* a la vez y que la inhibición de esta enzima permite la expresión de varias VSP al mismo tiempo en el trofozoíto (Ullu y col., 2004).

Según Nash (2002), las características más notorias de la variación antigénica son:

- Presentes en todos los aislamientos de *Giardia*
- Ocurrencia espontánea *in vitro* e *in vivo* (humanos y animales)
- Velocidad de cambio dependiente del aislamiento cada 6 a 13 generaciones
- Gran repertorio de genes *vsp* (más de 150)
- Repertorio de VSP puede diferir entre aislamientos

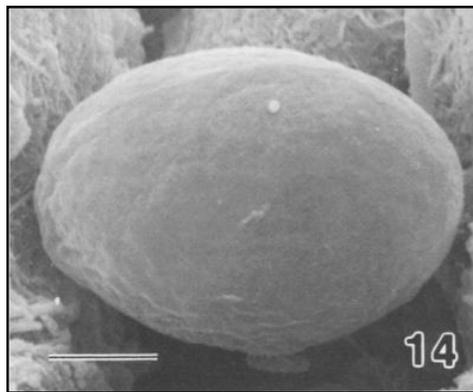
- Repertorio de genes *vsp* difiere entre los diferentes genotipos pero es altamente similar dentro del genotipo.
- Epitopes idénticos pueden presentarse en moléculas con tamaños variables
- El switching que ocurre en el enquistamiento/desenquistamiento depende del aislamiento
- La variación antigénica no está relacionada con la modificación de la secuencia de bases en el ADN ni se observan rearrreglos genéticos.

## 1.5 Quiste de *G. lamblia*

### 1.5.1 Morfología

Los quistes de *G. lamblia* son elípticos, de 8-12  $\mu\text{m}$  de longitud por 5-8  $\mu\text{m}$  de ancho (figura 1.7). Poseen una pared quística filamentosa de 0,3  $\mu\text{m}$  de espesor compuesta de proteínas e hidratos de carbono.

La pared del quiste de *Giardia* está compuesta por una región filamentosa externa y una región membranosa interna. La pared interna consiste en 2 membranas separadas por el espacio peritrófico. La pared externa tiene un espesor de 0,3 a 0,5  $\mu\text{m}$  y está compuesta por filamentos de 7 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro (Adam, 2001).



**Figura 1.7:** Microfotografía del quiste de *G. lamblia*. Barra: 1 $\mu\text{m}$ . Extraído de Luchtel y col. (1980).

El análisis bioquímico de la pared del quiste de *Giardia* ha demostrado que los componentes principales son proteínas denominadas CWP y

carbohidratos. Los estudios de la pared externa del quiste mediante cromatografía gaseosa, espectrometría de masas y análisis enzimático, demuestran que la galactosamina en forma de N-acetilgalactosamina (NAcGal) es el azúcar que se encuentra en mayor proporción (Adam, 2001).

En el citoplasma del quiste se observan ocho axonemas. Asociados a los axonemas se encuentran dos láminas de microtúbulos, que probablemente representan al axostilo. También se observan numerosos ribosomas, vacuolas y fragmentos del disco ventral. Por el contrario, no se observan mitocondrias, aparato de Golgi, ni retículo endoplasmático. Los núcleos se suelen localizar en un extremo del quiste y cada quiste maduro es tetranucleado. El cariosoma nuclear, puede tener una posición central o excéntrica y la membrana nuclear carece de cromatina periférica. La actividad metabólica de los quistes es solo de un 10-20% de la desarrollada por los trofozoítos (Adam, 2001).

### **1.5.2 Proteínas de la pared quística (CWP)**

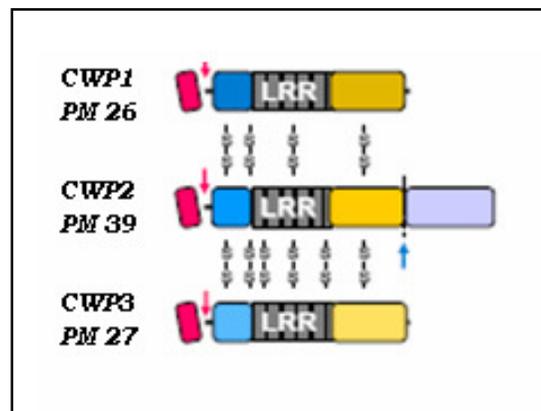
Se han investigado intensamente las proteínas constitutivas de la pared del quiste de *Giardia* y hasta la fecha, se han clonado y secuenciado los genes de 3 proteínas, sin embargo sólo dos de ellas, CWP1 y CWP2, han sido caracterizadas funcional y bioquímicamente (Abdul-Wahid y Faubert, 2004).

Estas 2 proteínas poseen pesos moleculares de 26 y 39 kDa respectivamente. Ambas contienen regiones ricas en cisteína, 5 copias en tandem de una secuencia repetida de 24 residuos con alto contenido de leucina (LRR o repeticiones ricas en leucina, un motivo implicado en la interacción proteína-proteína), un péptido señal en N-terminal, así como varios sitios de glicosilación y fosforilación. Además, ambas proteínas poseen un alto grado de identidad de secuencia aunque CWP2 se distingue de CWP1 por la presencia de 121 residuos de aminoácidos básicos en la región C-terminal (Luján y col., 1997).

Los genes de estas 2 proteínas (CWP1 y CWP2) poseen una única copia codificada en los cromosomas III y IV respectivamente y se transcriben

únicamente durante el enquistamiento y con cinéticas idénticas, detectándose un aumento en los niveles transcritos de 140 veces con respecto a los trofozoítos no enquistantes (Luján y col., 1995).

En el 2003, Sun y colegas identificaron 5 nuevas proteínas que contienen secuencias LRR, de las cuales solamente 1 de ellas (CWP3) se regula positivamente durante el enquistamiento y se incorpora a la pared del quiste. La comparación de las 3 CWP revela que existen secuencias conservadas del tipo LRR entre ellas aunque CWP3 es más divergente (figura 1.8)

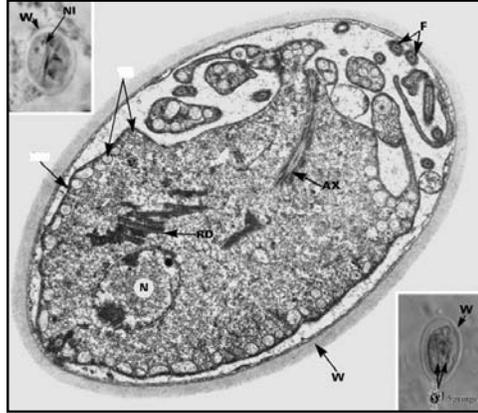


**Figura 1.8:** Estructura de las 3 proteínas de la pared quística, CWP1, CWP2 y CWP3. (PM indica peso molecular y LRR indica regiones ricas en leucina) Extraído de Hehl (2007).

Luego de su síntesis, las CWP se combinan para formar un heterocomplejo estable, que se localiza dentro de vesículas secretorias específicas (ESV), para luego ser incorporadas a la pared de los trofozoítos enquistantes. Dentro de las ESV, las proteínas no se pliegan completamente sino que se mantienen en forma soluble, probablemente unidas a otras proteínas y con bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  (Luján y col., 1995).

Se ha sugerido que el proceso de liberación de las ESV en la membrana del trofozoíto enquistante ocurre luego de la fragmentación de grandes ESV en pequeñas vesículas secretorias seguido de exocitosis. En el año 2004, Benchimol, estudió el proceso de liberación de las vesículas secretorias en trofozoítos de *Giardia* mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión. También

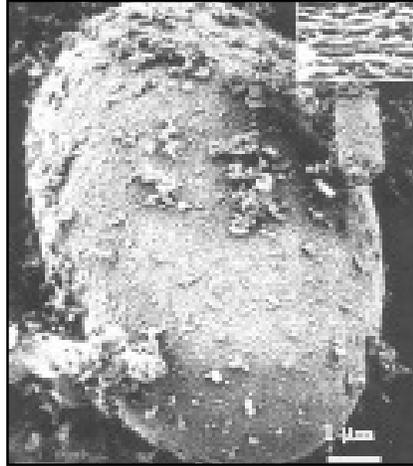
observó que el proceso de liberación de los componentes de la pared se producía por exocitosis incompleta con la fusión parcial de las membranas (ESV y trofozoíto enquistante) (figura 1.9).



**Figura 1.9:** Microfotografía electrónica de transmisión del quiste de *Giardia*. W indica la pared quística; F, las vesículas de secreción; N, el núcleo y Ax, el axostilo. Extraído de Benchimol (2004).

Por último, luego de la exocitosis, las CWP se exponen a altas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  y dichas proteínas forman la estructura filamentosa de la pared quística (Abdul-Wahid y Faubert, 2004; Luján y Touz, 2003) (figura 1.10).

Estas proteínas presentan ciertas regiones altamente conservadas que le confieren flexibilidad y estabilidad a la pared, permitiendo la deformación del quiste y el movimiento de los trofozoítos en su interior, lo que favorece el pasaje de los quistes a través de poros más pequeños que su diámetro como los filtros utilizados en la potabilización del agua (Kedzierski y col., 2004; Luján y col., 1995).



**Figura 1.10:** Microfotografía del quiste de *G. lamblia*. En la imagen superior se visualiza la estructura fibrilar de la pared quística. Barra: 1  $\mu\text{m}$ . Extraído de Hehl (2007).

## 1.6 Genoma de *G. lamblia*

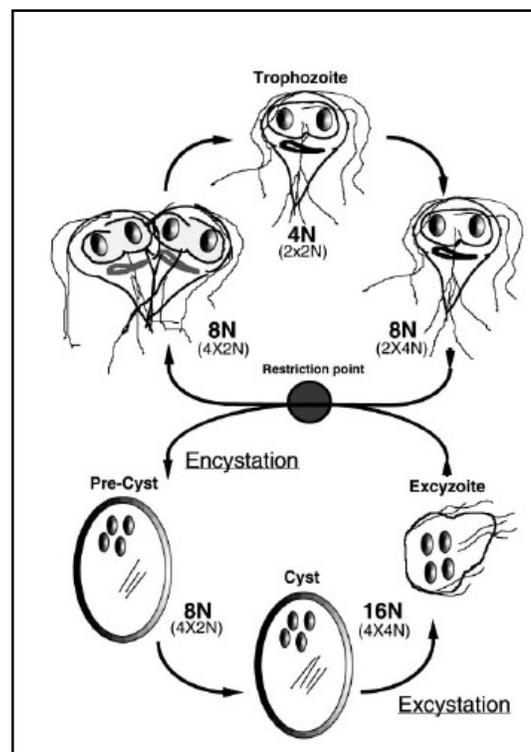
El trofozoíto de *G. lamblia*, al igual que otros parásitos del orden Diplomonadida, es binucleado; ambos núcleos poseen idéntico contenido de ADN y son transcripcionalmente activos (Sagolla y col., 2006).

El contenido total de ADN de este parásito se estima en  $1,34 \times 10^8$  pares de bases (bp) y un tamaño haploide de aproximadamente  $1,2 \times 10^7$  bp (12 Mb). Utilizando electroforesis en gel con campo pulsante (PFGE) y sondas específicas para cada cromosoma, se determinó que *G. lamblia* posee 5 cromosomas, cuyo tamaño varía entre 1,6 y 3,8 Mb (Adam, 2000; Erlandsen y Rasch, 1994). Estos resultados sugieren que el trofozoíto contiene entre 30 y 50 moléculas de ADN y por ende, de 8 a 12 copias de cada cromosoma (Adam, 2000).

En 2002, Yu y colaboradores, mediante hibridación *in situ*, confirmaron que cada núcleo contiene al menos una copia del genoma. Estudios previos realizados por Adam y colegas (1988) revelaron la existencia de variantes de tamaño de algunos de los cromosomas. Estudios más detallados en líneas clonales de trofozoítos de *G. lamblia* han demostrado que el cromosoma 1 tiene

4 variantes de tamaño y diversos autores han demostrado que dicho cromosoma puede presentar una variación de hasta el 30% en su tamaño, debido al número variable de copias del gen ADNr (Adam, 2000; Le Blancq y Adam, 1998).

Bernarder y col (2001) han determinado la ploidía nuclear y celular del genoma de *G. lamblia* en los distintos estadios del ciclo celular. Durante el crecimiento vegetativo, el genoma del trofozoíto varía entre diploide ( $2n$ ) y tetraploide ( $4n$ ), siendo  $n$  el genoma haploide. Cuando comienza a formarse el quiste, el trofozoíto realiza 2 rondas sucesivas de replicación cromosómica sin división celular dando origen a 4 núcleos con una ploidía de  $4n$  cada uno. Durante el desenquistamiento, el trofozoíto se divide 2 veces dando 4 células con 2 núcleos diploides (figura 1.11).



**Figura 1.11:** Ploidía y número de cromosomas de *G. lamblia* durante el enquistamiento y desenquistamiento. Extraído de Bernarder y col. (2001)

Para una completa división celular, *G. lamblia* debe duplicar y segregarse todos los componentes celulares y ambos núcleos en dos células hijas. Utilizando microscopía electrónica de transmisión en 3D, Sagolla y colegas (2006) reportaron que la mitosis es de tipo semi-abierta y detectaron dos husos mitóticos extranucleares que interactuaban con la cromatina a través de poros presentes en la membrana nuclear y eran los responsables de la segregación de los cromosomas.

## **1.7 Clasificación de *G. lamblia***

### **1.7.1 Caracterización mediante estudios de laboratorio**

Las clasificaciones de los organismos eucariotas dependen fundamentalmente de métodos moleculares. Un sistema de clasificación ideal está basado en un conjunto de genes requeridos para la vida y altamente conservados en el tiempo como para poder comparar y clasificar los distintos organismos. El gen más utilizado para estudios filogenéticos es el ARN ribosomal porque es un grupo de genes altamente conservados que se utilizan para la detección de diversidad genética entre especies de organismos (Adams y col., 2004).

Los primeros avances en la caracterización de *G. lamblia* fueron realizados mediante electroforesis de enzimas. La mayoría de los estudios electroforéticos han tenido limitada utilidad debido al estudio de pocos caracteres, el análisis de pocas muestras o ambos. Diversos autores han utilizado electroforesis de isoenzimas o aloenzimas demostrando una gran heterogeneidad genética dentro de *G. lamblia* (Thompson y Monis, 2004).

Se ha encontrado el mismo patrón de bandas electroforéticas en aislamientos de *G. lamblia* provenientes de humanos y animales, cuestionando la validez de los zimodemas como marcador taxonómico para evaluar la especificidad por el huésped. La mayoría de los estudios posteriores mostraron un amplio grado de homogeneidad entre aislamientos y no han detectado

ninguna correlación entre el curso de la enfermedad y el patrón de zimodemas de los aislamientos de *Giardia* (Thompson y Monis, 2004).

Del mismo modo, Wallis y colegas (1996) usaron una combinación de técnicas moleculares y patrones de isoenzimas para caracterizar muestras de *Giardia* de origen ambiental y no encontraron correlación entre ambos métodos de clasificación de los distintos aislamientos. (Thompson y Monis, 2004).

Los estudios más detallados sobre isoenzimas han sido realizados por Meloni y col. (1995) donde evaluaron 13 sistemas enzimáticos pertenecientes a 97 aislamientos de *Giardia*. Esos resultados confirmaron lo publicado por otros investigadores donde no se reportaron diferencias entre aislamientos de origen humano y animal, aunque si existieron diferencias entre el patrón de zimodemas hallado y la localización geográfica del aislamiento (Thompson y Monis, 2004).

Un gran número de técnicas moleculares han sido empleadas con éxito para caracterizar los aislamientos de *Giardia*. La mayoría de los estudios se han enfocado en la diferenciación de los distintos aislamientos más que en la determinación de las relaciones genéticas entre aislamientos. Como resultado de ello, se ha documentado la heterogeneidad genética entre los aislamientos, pero el origen y significado biológico de esta heterogeneidad aún permanece incierto (Thompson y Monis, 2004).

Los aislamientos de *Giardia* se han caracterizado por una variedad de métodos moleculares. Ey y colaboradores (1992) examinaron mediante polimorfismo del largo de fragmentos de restricción (RFLP), los genes de las proteínas variantes de superficie e identificaron 2 patrones que se correspondían con los grupos genéticos I y II previamente publicados. En 1994, Upcroft y Upcroft diferenciaron los genotipos involucrados en una infección mixta estudiando los genes del ARNr. Otro estudio publicado por Hopkins y col. (1999) reportó la amplificación de secuencias conservadas de los genes ribosomales de *G. lamblia* indicando una estrecha correlación entre los genotipos ya establecidos y los perfiles de isoenzimas de los mismos aislamientos.

La información del genoma de *G. lamblia* obtenida mediante el secuenciamiento de nucleótidos se ha incrementado sustancialmente en los últimos años y la heterogeneidad genética ha sido documentada por diversos autores. Con el fin de caracterizar 16 aislamientos, Baruch y col. (1996), secuenciaron el gen *tpi* de *G. lamblia* y encontraron 3 grupos genéticos correspondientes a la clasificación de Nash y Mowatt (1992). Otros autores analizaron las secuencias de bases del gen *gdh* y reportaron que todas las muestras humanas correspondían a 2 genotipos (A y B). (Thompson y Monis, 2004).

Una de las metodologías más utilizadas para la caracterización de los aislamientos de *Giardia* es la PCR-RFLP amplificando diversos genes como glutamato deshidrogenasa (*gdh*), trifosfato isomerasa (*tpi*), factor de elongación 1 alfa (*ef1a*), 5S rRNA y beta- giardina, entre otros (Adams y col., 2004; Amar y col., 2002; Caccio y col., 2002; Homan y col., 1998; Hopkins y col., 1999; Mahbubani y col., 1992; McIntyre y col., 2000; Monis y col., 1999; Sulaiman y col., 2003; Traub y col., 2004).

A la fecha, los aislamientos de *G. lamblia* identificados como patógenos humanos son los genotipos A y B (tabla 1.2). Estos genotipos se asocian con enfermedad en el hombre y presentan potencial zoonótico (Thompson, 2004; Eligio-García y col., 2005).

**Tabla 1.2:** Clasificaciones de los genotipos de *G. lamblia*, extraído de Adam (2001)

Genotipo propuesto	Nash (1985)	Mayrhofer (1995)	Homan (1992)
A I	Grupo 1	A (grupo 1)	<i>Polish</i>
A II	Grupo 2	A (grupo 2)	<i>Polish</i>
B	Grupo 3	B (grupos 3 y 4)	<i>Belgium</i>
		C	
		D	
		E	
		F	
		G	

### 1.7.2 Especificidad de huésped

Los estudios moleculares realizados por diversos investigadores han demostrado que la mayoría de los genotipos presentan distintas preferencias de huésped (tabla 1.3). Algunos parasitan sólo una especie, mientras que otros genotipos presentan un rango más amplio de huéspedes (Ey y col., 1997; Mayrhofer y col., 1995; Monis y col. 1999). A la fecha, los genotipos A y B son los responsables de todas las infecciones de origen humano, sin embargo han sido detectados en una amplia variedad de mamíferos (Monis y col. 2003; Read y col. 2004).

**Tabla 1.3:** Genotipos de *Giardia lamblia* y huéspedes involucrados en el ciclo biológico. Extraído de Adam (2001)

Genotipos de <i>Giardia lamblia</i>	Huéspedes involucrados
<b>A</b>	<b>humanos</b> - perros - gatos - bovinos - ovinos - porcinos - chinchillas - alpacas - caballos - castores
<b>B</b>	<b>humanos</b> - perros - chinchillas - ratas - castores
C – D	perros
E	vacas - ovejas - cerdos
F	gatos
G	ratas - ratones

### 1.8 Fisiopatogenia de la giardiosis

Se ha investigado ampliamente la patogenia de la giardiosis y la interacción entre el parásito y el huésped. Si bien, el mecanismo por el cual *Giardia* produce diarrea no ha sido completamente caracterizado, se postula que este proceso es multifactorial y ocurre por combinación de varios de factores. Entre ellos, aumento de la permeabilidad epitelial, acortamiento o atrofia de las vellosidades; disrupción de las microvellosidades del epitelio; hiperplasia de las criptas; reducción de la actividad de las disacaridasas y de las proteasas

intestinales; inflamación de la mucosa intestinal y sobrecrecimiento de la flora intestinal (Farthing, 1997).

Utilizando diversos modelos experimentales, Müller y von Allmen (2005) demostraron que la adhesión de los trofozoítos al epitelio es crucial para el aumento de la permeabilidad epitelial.

La adherencia de los trofozoítos al epitelio intestinal se produce a través del disco ventral. Se ha comprobado que dicha unión a la mucosa puede ser inhibida por manosa y glucosa, indicando que las lectinas pueden estar involucradas en la unión a la célula huésped. Hasta la fecha se ha identificado una adhesina llamada taglina, una lectina que se une a manosa-6-P y otra lectina desconocida que se une a manosa y glucosa. Además, *G. lamblia* produce N-acetilglucosaminidasa, una enzima que podría favorecer la penetración de la capa de moco (Moncada y col., 2003; Müller y von Allmen, 2005).

Estudios realizados *in vitro* indican que *G. lamblia* produce rearrreglos en el citoesqueleto y reduce la resistencia eléctrica transepitelial de los enterocitos. Además, los trofozoítos generan un incremento de la permeabilidad intestinal, inducen la apoptosis celular y rompen las uniones estrechas entre enterocitos (Roxström-Lindquist y col., 2006).

En varios modelos experimentales de infección se han observado que los trofozoítos utilizan varios nutrientes del lumen intestinal, fundamentalmente glucosa, sales biliares y ciertos aminoácidos, por lo que el secuestro de sales biliares podría explicar el fenómeno de malabsorción de grasas (Hawrelak, 2003; Müller y von Allmen, 2005) y el daño del ribete en cepillo y la disminución de la actividad de las disacaridasas provocan un aumento de disacáridos en el lumen intestinal lo que provocaría una diarrea osmótica (Farthing, 1997).

Según Farthing (1997), la alteración de la flora intestinal estaría involucrada en la predisposición a la giardiosis. En 2000, Singer y Nash inocularon con *Giardia* a dos grupos de ratones, uno de los cuales recibió una mezcla de lactobacilos antes de la infección. A diferencia del primer grupo, el grupo coinfectado con las bacterias lácticas presentó menor susceptibilidad a la infección por *Giardia*.

En la actualidad se ha postulado que el rol protector de la flora intestinal podría estar mediado por distintos mecanismos. Existen evidencias que han demostrado que la composición de la microflora intestinal puede afectar la colonización de *Giardia* en el intestino. Pérez y colegas (2001) estudiaron este efecto protector y revelaron que *Lactobacillus johnsonii* ejerce un efecto antagónico sobre trofozoítos de *Giardia*. Estudios posteriores realizados por Humen y col., (2005) demostraron que este lactobacilo libera sustancias al medio extracelular que interfieren con el ciclo de vida de *G. lamblia*. Por lo tanto, la flora intestinal ejercería su efecto benéfico por distintos mecanismos como secuestro de los nutrientes, competencia por los receptores de la mucosa intestinal, producción de compuestos metabólicos que inhiben el desarrollo de patógenos o la modulación de la respuesta inmune del huésped, entre otros.

### **1.9 Defensas del huésped contra *G. lamblia***

Los mecanismos involucrados en el control de la infección por *Giardia* pueden clasificarse en las barreras naturales y la respuesta inmune tanto innata como adaptativa.

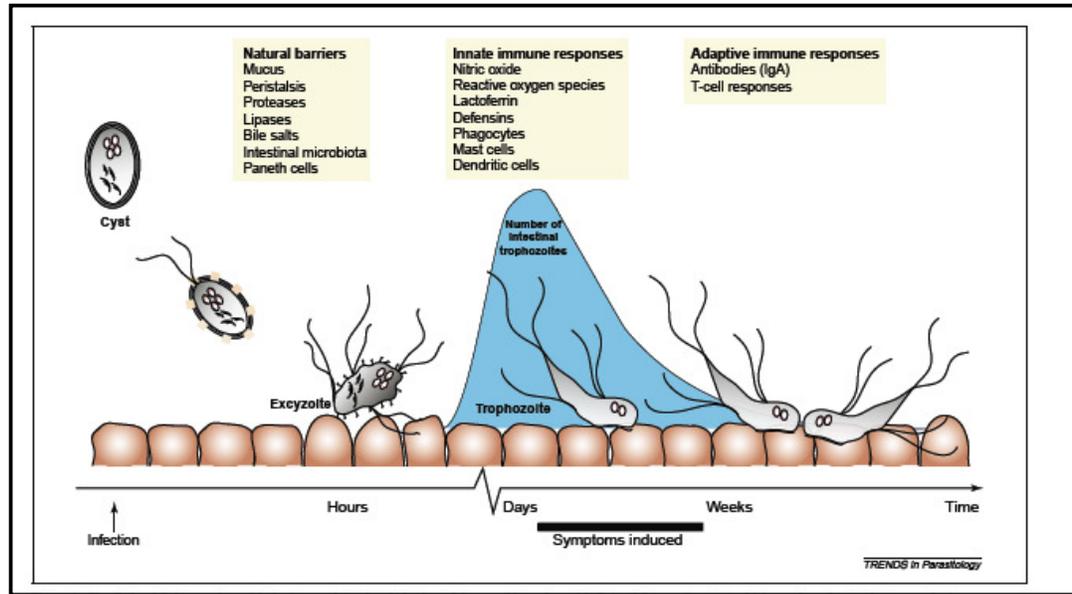
Las mucinas gastrointestinales son la primera línea de defensa del huésped contra los patógenos entéricos porque compiten con los sitios de unión al epitelio y por lo tanto, dificultan la adherencia a la superficie intestinal y la supervivencia de los microorganismos en el tracto intestinal. El óxido nítrico (NO) producido por los enterocitos inhibe la proliferación y diferenciación de los trofozoítos *in vitro*, sin embargo *Giardia* posee un mecanismo que previene la formación del NO por la captación y metabolización de arginina, sustrato necesario para la producción de este compuesto. Otro mecanismo no inmune involucrado son las criptidinas y defensinas, pequeños péptidos antimicrobianos que son liberados por las células intestinales. Las alfa-defensinas se insertan en la membrana de los trofozoítos de *Giardia* y crean poros que producen la lisis celular (Hawrelak, 2003).

Las infecciones intestinales por *Giardia* desencadenan una respuesta inmune humoral y celular. Ambas contribuyen al control de la infección, aunque los mecanismos exactos aún no están completamente dilucidados.

Las células dendríticas, los mastocitos y las células M podrían estar involucradas en la presentación de los antígenos de *Giardia*. (Eckmann y Gillin 2003; Müller y von Allmen, 2005). Estudios previos basados en infecciones experimentales en ratones mostraron que los mecanismos de la respuesta inmune celular son esenciales para la eliminación del parásito (Müller y von Allmen, 2005). Mientras que los anticuerpos presentes en el intestino y más específicamente, las Ig A anti-VSP podrían estar involucradas en la modulación de la variación antigénica del parásito, la respuesta local de anticuerpos en el control de la infección aún está en discusión.

Las inmunoglobulinas M, G y A específicas juegan un rol importante en el control de la infección, al igual que el complemento, los macrófagos, los neutrófilos y las células T. La infección con *G. lamblia* en humanos conduce a la producción de anticuerpos específicos anti-giardia del tipo Ig A, Ig M e Ig G en suero y en secreciones mucosas; además, este aumento se correlaciona con el control de la infección (Roxström-Lindquist y col., 2006).

En resumen, los mecanismos involucrados en el control de la infección por *Giardia* pueden clasificarse en barreras naturales, respuesta inmune innata y adaptativa, siendo los más importantes producción de NO, producción de especies reactivas de oxígeno, producción de criptidinas y defensinas, aumento de la secreción de mucina, respuesta local de anticuerpos, respuesta de linfocitos T, activación de mastocitos y fagocitos, aumento de producción de IL-6, inhibición de *Giardia* por flora entérica (Müller y von Allmen, 2005; Roxström-Lindquist y col., 2006) (figura 1.12).



**Figura 1.12:** Mecanismos de defensa frente a la infección por *Giardia*. Extraído de Roxström-Lindquist y col. (2006).

## 1.10 Presentación clínica de la infección por *Giardia*

La giardiosis está asociada a un espectro muy amplio de signos y síntomas. Puede presentarse en forma asintomática, con diarrea aguda o con diarrea crónica. Los cuadros clínicos más frecuentes incluyen diarrea, dolor abdominal, flatulencia, anorexia, vómitos, pérdida de peso y decaimiento general. En casos severos puede aparecer un síndrome de malabsorción con retardo en el crecimiento infantil. Se han reportado signos y síntomas extraintestinales variados como inflamación de las membranas sinoviales, alteraciones oculares y manifestaciones alérgicas (Boletín EPA 823-R-002).

La giardiosis se autolimita en la mayoría de los casos, aunque existen infecciones crónicas sin inmunodeficiencias aparentes (Eckmann y Gillin, 2003). Existen ciertos factores que podrían indicar una predisposición a la infección con *Giardia*. Los pacientes con hipogammaglobulinemia, fundamentalmente con

déficit de Ig A, presentan mayor incidencia de giardiosis. La inmunodeficiencia común variable presenta mayor riesgo de desarrollar giardiosis crónica, mientras que los pacientes con HIV/Sida, no poseen susceptibilidad aumentada a la infección con *Giardia* (Faubert, 2000; Hawrelak, 2003).

Si bien, en los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la fisiopatogenia de la infección por *Giardia*, hasta el momento, los factores que determinan la variabilidad de las manifestaciones clínicas de giardiosis no están completamente esclarecidos y no existe consenso sobre la correlación entre el genotipo infectante (A o B) de *Giardia* y la presentación clínica de la infección.

Diversos autores han postulado la relación entre genotipo detectado y síntomas observados, no obstante, los resultados han sido contradictorios y hasta la fecha no existe acuerdo sobre la relación entre el genotipo involucrado y la virulencia del aislamiento de *Giardia* (Caccio y col., 2005; Cedillo Rivera y col., 2003; Eligio-García y col., 2005; Haque y col., 2005, Homan y Mank, 2001; Read y col., 2002; Roxström-Lindquist y col., 2006).

### **1.11 Diagnóstico de giardiosis**

La sintomatología y los estudios de rutina no son patognomónicos de la giardiosis. El diagnóstico de certeza se basa en la detección de los quistes o trofozoítos de *Giardia* en las muestras clínicas. Para el diagnóstico de giardiosis, la muestra de elección es la materia fecal recolectada en forma seriada porque permite aumentar la sensibilidad del estudio ya que los quistes parasitarios son liberados con las heces en forma intermitente o en cantidades variables.

Actualmente, existe una gran variedad de técnicas inmunológicas comerciales para la detección de antígenos en heces que detectan hasta un 30% más que el método de observación microscópica (Faubert, 2000) pero que no se aplican de rutina debido a su mayor costo y complejidad.

El estudio de pacientes con y sin sintomatología de giardiosis reveló que ciertos pacientes con infecciones sintomáticas desarrollan una pobre respuesta de Ac anti-*Giardia*, mientras que otros presentan altos niveles de Ac que

permanecen elevados por largos períodos luego de erradicar la infección. Por lo tanto, el diagnóstico serológico de *Giardia* no permite distinguir entre pacientes sintomáticos y asintomáticos o entre infecciones pasadas o actuales. No obstante, algunos autores indican que la detección de anticuerpos podría utilizarse con fines epidemiológicos (Faubert, 2000).

Las técnicas moleculares como la PCR, permiten la identificación de los genotipos de *Giardia* en muestras fecales y ambientales (suelo y agua). Comparada con la microscopía de fluorescencia, la PCR aumenta en  $10^4$  veces la sensibilidad de detección (Rimhanen-Finne, 2001). La genotipificación de *Giardia* por PCR a partir de materia fecal depende de la calidad y cantidad del ADN purificado y de la eliminación de una gran variedad de sustancias que pueden inhibir la actividad de las polimerasas aún en muy bajas concentraciones (Al-Soud y col., 2000; Morgan y col., 1998; Wilson 1997).

## **Objetivos de la Tesis:**

### **Objetivo general:**

Analizar la distribución de los genotipos A (I y II) y B de *Giardia lamblia* en muestras fecales humanas y animales provenientes de distintas comunidades urbanas y rurales de Argentina y evaluar si existe asociación entre el genotipo infectante detectado y las características clínico-epidemiológicas.

### **Objetivos específicos:**

*Objetivo 1:* Evaluar la distribución de los genotipos A (I y II) y B de *G. lamblia* en muestras fecales de pobladores y animales de las provincias de Buenos Aires y Mendoza aplicando las técnicas previamente optimizadas.

*Objetivo 2:* Evaluar si existe asociación entre las variables epidemiológicas y los genotipos de *G. lamblia* hallados en cada comunidad.

*Objetivo 3:* Determinar si existe relación entre el genotipo hallado y los signos y síntomas reportados por pacientes parasitados con *G. lamblia*.

*Objetivo 4:* Optimizar los protocolos de obtención y ruptura de quistes, preparación de ADN y reacciones de PCR-RFLP para la genotipificación de *Giardia lamblia* en materia fecal formolada. Evaluar la sensibilidad y especificidad de la aproximación experimental utilizada.

## **2.1. Muestras**

Se analizaron 502 heces de humanos y 95 heces de animales: 54 perros, 2 gatos, 6 vacas, 3 caballos y 30 terneros. Las muestras se recolectaron de 5 localidades de la provincia de Buenos Aires y una localidad de Mendoza.

Las heces humanas y de animales domésticos (perros y gatos) fueron remitidas a la Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP (Cátedra). En cambio, las muestras fecales de animales de granja (vacas, caballos y terneros) se recolectaron en 2 campos lecheros de General Mansilla (Bs. As.). El período de recolección fue 2005-2006 y se incluyeron solamente las muestras fecales positivas para *Giardia* de animales que tuvieran dueño y pudieran ser identificados. El tiempo transcurrido desde la recolección de las heces hasta su procesamiento fue menor de 30 días.

Para el análisis coproparasitológico, las heces se recolectaron en forma seriada y se conservaron en formol al 10% a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Además, cada participante del estudio se realizó el escobillado perianal para la búsqueda de *Enterobius vermicularis*.

Todas las muestras fecales fueron procesadas mediante la técnica de Telemann (Feldman y Guardis, 1990) para la búsqueda de quistes de *Giardia* por microscopía óptica (100x y 400x). Las heces que resultaron positivas se seleccionaron teniendo en cuenta los siguientes criterios de inclusión: muestras fecales con quistes de *G. lamblia* detectados por microscopía óptica, provenientes de distintas comunidades de las provincias de Buenos Aires y Mendoza; conservadas en formol al 10% y remitidas para su análisis al Laboratorio de la Cátedra durante el período 2005-2006. Las muestras fecales de animales se seleccionaron bajo los mismos criterios.

Las muestras fecales positivas para *Giardia* que cumplieron todos los criterios de selección fueron 125; de las cuales, 107 fueron de origen humano, y 18 de animales: 11 perros y 7 terneros.

## **2.2 Características más relevantes de las localidades donde se recolectaron las muestras fecales**

- *Provincia de Buenos Aires: General Mansilla (Bartolomé Bavio), Atalaya, Barrio El Palihue, Barrio 4 de Junio y Barrio El Carmen.*
- *Provincia de Mendoza: Barrio Jardín Aeroparque.*

En la provincia de Buenos Aires se recolectaron muestras fecales de 5 localidades. Geográficamente, todas están ubicadas en un radio de 50 Km de la ciudad de La Plata, poseen clima templado, con temperaturas medias de 22°C en verano y de 8°C en invierno. Las lluvias oscilan entre 600 y 1.000 mm anuales y los suelos son pocos permeables. Presentan una altitud de 4 msnm (metros sobre el nivel del mar).

General Mansilla posee un casco urbano en el que habitan cerca de 2.300 pobladores y una zona rural con alrededor 1.700 donde predominan la actividad ganadera y lechera. Atalaya presenta características de población rural costera y posee aproximadamente 750 hab (figuras 2.1, 2.2 y 2.3).

Los tres barrios de la provincia de Buenos Aires son: El Palihue, 4 de Junio y El Carmen. Barrio El Palihue se encuentra ubicado en la zona sur del Gran La Plata, Barrio 4 de Junio pertenece al partido de Florencio Varela en el Gran Buenos Aires y Barrio El Carmen pertenece al partido de Berisso. No se encontraron datos estadísticos de estas poblaciones (figuras 2.4, 2.5 y 2.6).

Los barrios El Palihue y 4 de junio comparten ciertas características comunes, ambos son asentamientos urbanos irregulares sin red cloacal ni suministro de agua de red urbana. Además, las casillas presentan desagües abiertos donde se acumulan aguas y desechos. A diferencia del primero, en el Barrio de Florencio Varela predominan las casillas precarias de madera, cartón y chapa y presenta calles de tierra que se inundan con las lluvias.

El tercer barrio estudiado posee mayor proporción de casas de material, la mayoría las calles están asfaltadas pero no tienen red de desagües pluviales por lo que el agua se acumula en zanjas entre las viviendas.



**Figura 2.1:** Zona urbana de General Mansilla (Bartolomé Bavio).



**Figura 2.2:** Zona rural de General Mansilla (Bartolomé Bavio).



**Figura 2.3:** Vista del Centro de Salud de Atalaya.



**Figura 2.4:** Primer plano de casilla de Barrio El Palihue.



**Figura 2.5:** Primer plano de casilla del Barrio 4 de Junio



**Figura 2.6:** Primer plano de casillas del Barrio El Carmen.

En la provincia de Mendoza se recolectaron muestras de habitantes del barrio Jardín Aeroparque. Geográficamente, pertenece al departamento de Las Heras, Gran Mendoza. Su clima es árido y continental, el invierno es frío y seco, con heladas nocturnas y escasas precipitaciones. La caída de nieve y

aguanieve son poco comunes. Presenta una altitud de 746 msnm y la población del departamento de Las Heras es de aproximadamente 170.000 habitantes. Posee distintos tipos de industrias frutihortícolas, químicas y cementeras. Este barrio está totalmente urbanizado, con calles asfaltadas y todos los servicios urbanos (figura 2.7).



**Figura 2.7:** Vista panorámica del Gran Mendoza.

En la fotografía siguiente se observa uno de los campos de General Mansilla de donde se recolectaron las heces de animales (figura 2.8).



**Figura 2.8:** Vista de los terneros de un campo de General Mansilla

## **2.3 Encuestas realizadas a los participantes del estudio**

Se realizaron encuestas epidemiológicas a cada participante del estudio con el propósito de realizar eventuales correlaciones de los resultados moleculares con las observaciones clínicas y el origen de las muestras.

La encuesta fue estructurada y cerrada. Se registraron variables demográficas, socioculturales, ambientales y de signo-sintomatología de cada individuo estudiado. Se solicitó el consentimiento informado de los participantes (o sus tutores) del estudio.

Los datos se volcaron a una base de datos para su posterior análisis estadístico (software SPSS versión 11.5, Statistical Package for the Social Sciences).

En este trabajo de tesis se utilizaron las siguientes variables:

1.- Demográficas: sexo y edad.

2.- Socioculturales: zona de residencia (Urbana o Rural), considerando rural a la población con menos de 2.000 hab. (INDEC), tipo de vivienda (material o precaria), considerándose como material: vivienda de mampostería con pisos de cemento/mosaico/cerámico, precaria: vivienda de madera/cartón/chapa, piso de tierra; eliminación de excretas (letrina, pozo o cloaca); provisión de agua de consumo (bomba domiciliaria/comunitaria, agua de red); eliminación de residuos domiciliarios (arroja la basura a cielo abierto, recolección municipal), hacinamiento.

3.- Ambientales: anegamiento de la vivienda o peridomicilio. Tenencia de animales en el domicilio. Presencia de animales de granja.

4.- Clínicas: presencia/ausencia de signos/síntomas al momento de la encuesta: (sí, no). Registrándose diarrea, vómitos, anorexia, prurito anal, sueño alterado, fiebre, decaimiento y dolor abdominal.

5.- Parasitarias: presencia de otros parásitos en materia fecal (coinfeción).

<b>ENCUESTA</b>
-----------------

Fecha:

Código de entrevistado:.....

Nombre y apellido:.....Fecha nacimiento: .....

Domicilio.....

...Edad.....años.....meses.....

Sexo:.....

Peso:.....

Talla:.....

Lugar de nacimiento:.....

Residencia (últimos cinco años):.....

Ocupación:.....

---

**Vivienda:**

**Construcción:**

**Piso:** Tierra ( )

Cartón/chapa ( )

Material ( )

Madera ( )

Lona/nylon ( )

**Ambientes:** .....

**Personas por habitación para dormir.....**

**Equipamiento del hogar**

Anafe ( )

Cocina con horno ( )

Heladera ( )

T.V. ( )

Calentador ( )

Brasero ( )

Estufa ( )

**Baño**

Instalado completo ( )

Instalado incompleto ( )

Letrina ( )

Cielo abierto ( )

**Agua**

Corriente domiciliaria ( )

Corriente comunitaria ( )

Bomba domiciliaria ( )

Bomba comunitaria ( )

**Fuente de energía**

Electricidad.....sí ( ).....no ( ).

Gas.....sí ( ).....no ( ), garrafa ( ).....natural ( )

Querosén.....sí ( ).....no ( )

**Eliminación de residuos:**

Arroja a cielo abierto ( )

Quema ( )

Recolección municipal ( )

**Dónde tira los pañales?**

En bolsas de residuos ( )

Cielo abierto ( )

**Eliminación de excretas:**

Red cloacal ( )

Pozo ( )

Letrina ( )

**Anegamiento de la vivienda:**

Nunca ( )

Con frecuencia ( )

**Animales:**

Perro ( ) Número ( )

Gato ( ) Número ( )

Otros ( ) ¿Cuál? (.....) Número ( )

**Desplazamientos**

Ultimo viaje al interior (.....) Fecha: / /

Ultimo viaje al exterior (.....) Fecha: / /

**Nivel de instrucción materno:**

Sin instrucción ( ) Terciario incompleto ( )

EGB incompleto ( ) Terciario completo ( )

EGB completo ( ) Universitario incompleto ( )

Polimodal imcompleto ( ) Universitario completo ( )

Polimodal completo ( )

**¿Se lava las manos antes de comer?** Siempre ( ) A veces ( ) Nunca ( )

**Si no se las lava, porque...**desconoce su importancia ( )

No tiene acceso al agua limpia ( )

¿Se lava las manos luego de ir al baño?? Siempre ( ) A veces ( ) Nunca ( )

Si no se las lava, porque...desconoce su importancia ( )

No tiene acceso al agua limpia ( )

Lava la verdura que consume? Siempre ( ) A veces ( ) Nunca ( )

Si no las lava, porque...desconoce su importancia ( )

No tiene acceso al agua limpia ( )

Consume la carne bien cocida Si ( ) No ( )

Cómo mantiene sus uñas? Cortas ( ) Largas ( )

Anda descalzo? Siempre ( ) rara vez ( ) nunca ( ) solamente en verano ( )

Ingiere tierra? Si ( ) No ( )

Con qué frecuencia baña/lava su cuerpo? 1/2 veces por mes ( ) 1 vez por semana ( )

Más de una vez por semana ( )

---

### Signos/Síntomas

Diarrea: Si ( ) No ( )

Vómitos: Si ( ) No ( )

Prurito anal: Si ( ) No ( )

Sueño alterado: Si ( ) No ( )

Pérdida apetito: Si ( ) No ( )

Afección respiratoria: Si ( ) No ( )

Fiebre inexplicable: Si ( ) No ( )

Decaimiento: Si ( ) No ( )

Dolor abdominal: Si ( ) No ( )

Eliminó parásitos: Si ( ) No ( )

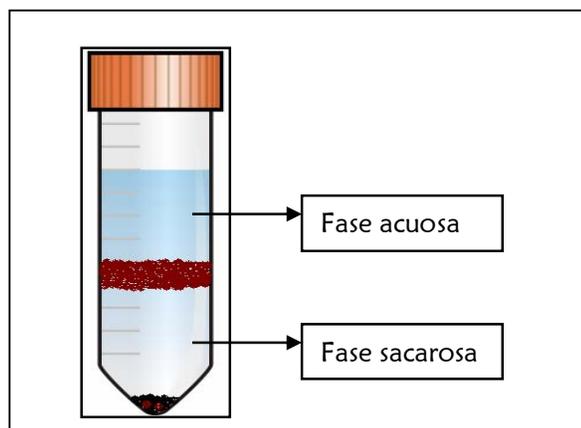
## 2.4. Obtención de quistes de *G. lamblia*

### *Materiales:*

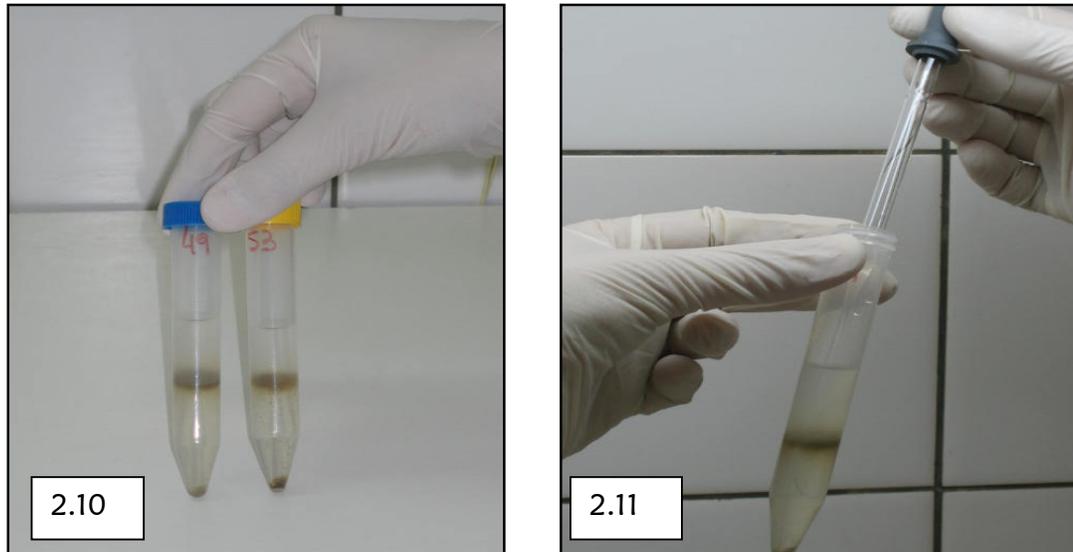
- Materia fecal formolada
- PBS (solución buffer fosfatos, pH 7,2)
- Solución de Sacarosa (densidad 1,27)

### *Procedimiento: Técnica de colchón de sacarosa.*

1. Homogeneizar la materia fecal y filtrar a través de 4 capas de gasa.
2. Recolectar 1 ml de heces en un tubo cónico, agregar 9 ml de PBS y centrifugar a 200 g durante 5 min.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender en 9 ml de PBS y centrifugar a 200 g durante 5 min. Descartar el sobrenadante.
4. Resuspender en 4 ml de PBS. Homogeneizar con vórtex por 15 seg.
5. Agregar 4 ml de sacarosa por las paredes del tubo para formar dos fases.
6. Centrifugar a 200 g durante 5 min.
7. Recolectar la fase sacarosa con pipeta Pasteur en un tubo cónico, agregar 2 volúmenes de PBS y homogeneizar con vórtex 15 seg.
8. Centrifugar a 250 g durante 10 min. Descartar el sobrenadante y resuspender los quistes en 500  $\mu$ l. Conservar a 4°C.

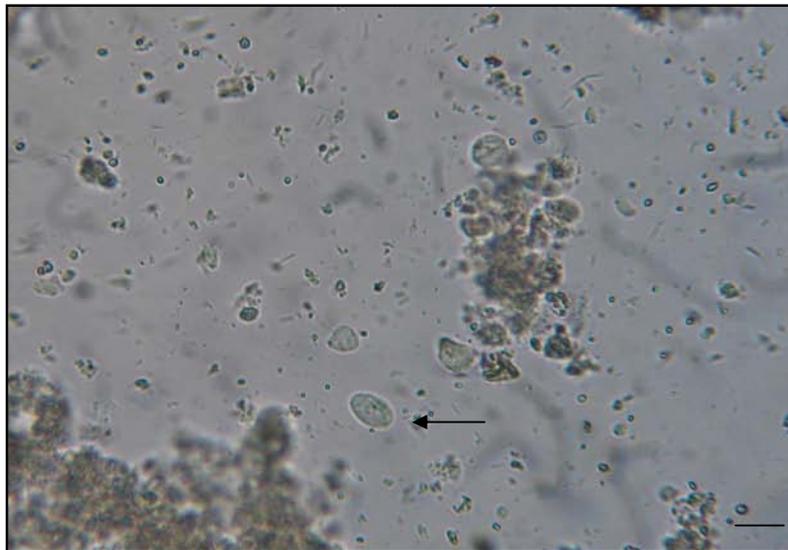


**Figura 2.9:** Técnica de colchón de sacarosa para la purificación de quistes de *G. lamblia*. Esquema de las 2 fases formadas durante el procesamiento.



**Figura 2.10:** Colchón de sacarosa realizado con 2 muestras fecales

**Figura 2.11:** Extracción de fase sacarosa mediante pipeta pasteur.



**Figura 2.12:** quistes de *Giardia*, microfotografía del sedimento fecal luego de realizar la técnica de colchón de sacarosa. La barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

## 2.5 Ruptura de quistes

### *Materiales:*

- Quistes de *Giardia* previamente concentrados en colchón de sacarosa
- Buffer de lisis E (Tris-HCl 100 mM, EDTA 100 mM, SDS 2%, NaCl 0,2 M, Mercaptoetanol 1 mM)
- Proteinasa K (1mg/ml)

### *Procedimiento:*

1. Homogeneizar la suspensión de quistes y colocar 200  $\mu$ l en un tubo eppendorf.
2. Congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, calentar a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Repetir este ciclo 3 veces en total.
3. Agregar 200  $\mu$ l de Buffer de lisis E y 20  $\mu$ l de proteinasa K. Homogeneizar con vórtex por 15 seg.
4. Incubar a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 18 h. Conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.6 Obtención de ADN

### *Materiales:*

- Quistes previamente lisados
- QIAamp DNA Stool minikit (Cat. 51504 Qiagen®)

### *Procedimiento*

1. Protocolo descrito por fabricante. Modificaciones realizadas: incrementar la temperatura de lisis a  $95^{\circ}\text{C}$  e incubar el buffer de elución AE a temperatura ambiente durante 10 minutos.
2. Conservar el ADN a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.7 Reacción de Polimerasa en cadena (PCR)

Se realizó una PCR múltiple semianidada para la amplificación de una región interna del gen *tpi* de *G. lamblia*, utilizando los primers diseñados por Amar y col. (2002) (ver Tabla 2.1).

### *Reactivos para PCR I*

Buffer PCR	3 $\mu$ l; 1X
MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ l; 3 mM
dNTPs	1,5 $\mu$ l; 0,25 mM
Primers (4)	1,5 $\mu$ l; 0,25 $\mu$ M
Albúmina sérica bovina (BSA)	2 $\mu$ l; 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l
Taq DNA polimerasa	0,6 $\mu$ l; 0,1 U/ $\mu$ l
ADN	3 $\mu$ l
Agua Bidestilada	10,9 $\mu$ l

### *Reactivos para PCR II (A y B):*

Buffer PCR	3 $\mu$ l; 1X
MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ l; 1,5 mM
dNTPs	1,5 $\mu$ l; 0,25 mM
Primers (2)	1 $\mu$ l; 1 $\mu$ M c/u
Albúmina sérica bovina (BSA)	2 $\mu$ l; 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l
Taq DNA polimerasa	0,6 $\mu$ l; 0,1 U/ $\mu$ l
Productos de amplificación (Amplicón) (1:10 <sup>3</sup> )	3 $\mu$ l
Agua Bidestilada	15.9 $\mu$ l

*Protocolo de ciclado**PCR I:*

Desnaturalización inicial:	94°C/4 min
Amplificación: 30 ciclos	Desnaturalización: 94°C/30 seg Alineamiento: 52°C/30 seg Extensión: 72°C/1 min
Extensión final:	72°C/10 min

*PCR II:*

Desnaturalización inicial:	94°C/4 min
Amplificación: 33 ciclos	Desnaturalización: 94°C/30 seg Alineamiento: 54°C/30 seg Extensión: 72°C/1 min
Extensión final:	72°C/10 min

*Controles:*

- Control positivo: ADN genotipo A y B (1 ng/ $\mu$ l) (gentilmente cedidos por el Dr. van Keulen, Universidad de Cleveland)
- Control negativo: agua bidestilada

**2.8 Polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP)**

El análisis de los fragmentos de restricción del genotipo A se realizó según la metodología descrita por Amar y col. (2002).

*Reactivos*

Amplicón (PCR IIA)	5 $\mu$ l
Buffer RsaI	3 $\mu$ l; 1X
Enzima RsaI	0,5 $\mu$ l; 5U
Agua Bidestilada	21,5 $\mu$ l

*Procedimiento*

1. Incubación a 37°C por 3 h.

## **2.9 Electroforesis en geles de agarosa**

Los productos amplificados de las PCR II (A y B) y los productos de digestión obtenidos por RFLP se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

### Preparación del gel de agarosa al 1,5%

*Reactivos:*

Agarosa	0,5 g
Buffer TAE (1X) (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM)	33 ml

### Preparación del gel de agarosa al 3 %

*Reactivos:*

Agarosa	1 g
Buffer TAE (1X) (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM)	33 ml

*Procedimiento*

1. Sellar los extremos del molde plástico para preparar el gel y colocar el soporte plástico (peine)
2. Calentar la agarosa disuelta en el buffer TAE hasta disolución completa

3. Enfriar, agregar 1  $\mu$ l de Bromuro de Etidio y volcar en molde preparado
4. Dejar solidificar 30-45 min

### Electroforesis de productos de amplificación y de restricción

#### *Procedimiento*

1. Colocar el gel y el buffer TAE en la cubeta de electroforesis
2. Sembrar 10  $\mu$ l de ADN mezclado con 1  $\mu$ l de gel marcador (gel loading)
3. Aplicar 80 V durante 30 min
4. Observar en transiluminador la presencia de bandas fluorescentes

**Tabla 2.1:** Secuencias de primers, pesos moleculares de amplicones y de productos de restricción del gen tpi. (Amar y col., 2002)

PCR	Genotipo A	Genotipo B
Primera etapa	TPIA-FI: CGAGACAAGTGTTGAGATG	TPIB-FI: GTTGCTCCCTCCTTTGTGC
	TPIA-R: GGTCAAGAGCTTACAACACG	TPIB-R: CTCTGCTCATTGGTCTCGC
Productos	576 bp	208 bp
Segunda etapa	TPIA-FII: CCAAGAAGGCTAAGCGTGC	TPIB-FII: GCACAGAACGTGTATCTGG
	TPIA-R: GGTCAAGAGCTTACAACACG	TPIB-R: CTCTGCTCATTGGTCTCGC
Productos	476 bp	140 bp
RFLP	AI	AII
Rsa I	437 bp 39 bp	235 bp 202 bp 39 bp

## 2.10 Purificación de ADN con polivinilpirrolidona (PVP)

El ADN de las heces positivas para *Giardia* por microscopía óptica que no amplificaron por PCR, recibieron el tto propuesto por Lawson y col. (1997).

### *Materiales*

- ADN de heces positivas para *Giardia*
- PVP-TE (10% PVP p/v en buffer Tris – EDTA)
- Acetato de amonio 2 M
- Isopropanol

### *Procedimiento*

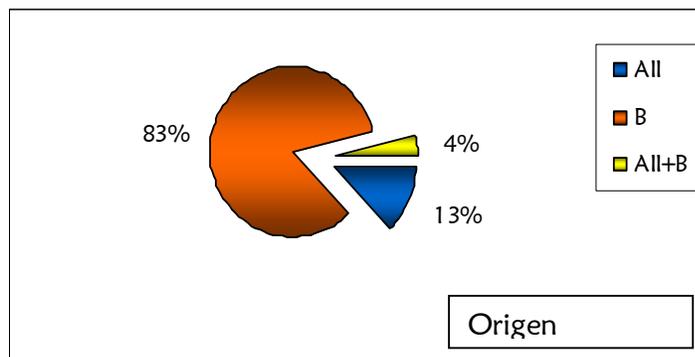
1. Colocar 50  $\mu$ l de ADN en un tubo eppendorf
2. Agregar 150  $\mu$ l de PVP-TE, incubar a temperatura ambiente durante 10 min.
3. Agregar 100  $\mu$ l de Acetato de amonio 2 M y 600  $\mu$ l de Isopropanol. Congelar a -20°C durante 30 min.
4. Centrifugar a 13.000 g por 10 min. Resuspender en 50  $\mu$ l de buffer TE y conservar a -20°C.

Como ya se mencionó previamente, *G. lamblia* es una especie compleja que comprende siete genotipos morfológicamente iguales pero fenotípica y genéticamente distintos. Diversos estudios han confirmado que la giardiosis en humanos es producida únicamente por los genotipos A y B de ese parásito. Ambos genotipos también han sido detectados en un amplio rango de mamíferos, lo que indicaría su potencial zoonótico (Cacciò y col., 2008)

### 3.1 Identificación de los genotipos zoonóticos de *G. lamblia* en muestras de origen humano

De los 502 estudios coproparasitológicos realizados se detectaron 107 heces humanas positivas para *G. lamblia* (21,3%). Se logró la genotipificación en 84 de ellas (79%) y se hallaron los genotipos zoonóticos All y B.

Sobre un total de 84 heces humanas genotipificadas, 11 de ellas tuvieron genotipo All; 70 resultaron genotipo B; y las 3 muestras restantes presentaron 2 genotipos, All y B (figura 3.1).



**Figura 3.1:** Genotipos de *G. lamblia* en muestras fecales de origen humano (n=84). **All:** genotipo All, **B:** genotipo B, **All+B:** ambos genotipos en la misma muestra.

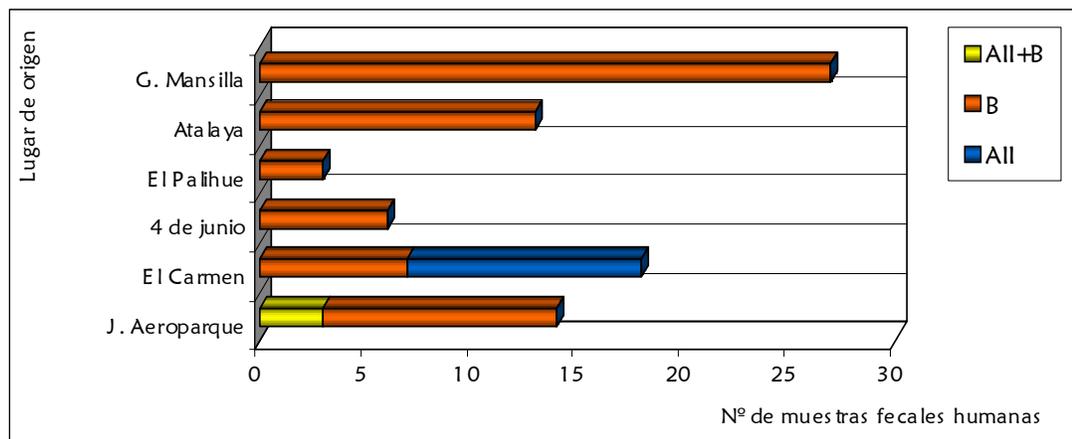
Las heces que contenían quistes de *Giardia* genotipo All presentaron un promedio de  $1,29 \cdot 10^5$  quistes/ml de heces ( $SD= 164,1$ ); con genotipo B tenían  $1,57 \cdot 10^5$  quistes/ml ( $SD= 199,1$ ). Las heces con ambos genotipos exhibieron un promedio de  $1,47 \cdot 10^5$  quistes/ml ( $SD= 119,3$ ). El análisis estadístico reveló que no

se observaron diferencias significativas entre el número de quistes eliminados y el genotipo infectante (Test de Mann-Whitney,  $p=0,706$ ).

### 3.1.1 Distribución geográfica de los genotipos hallados

El genotipo B fue detectado en todas las localidades estudiadas, en cambio, el genotipo All solamente se halló en 2 barrios. Las infecciones mixtas (All+B) únicamente fueron halladas en la provincia de Mendoza. Por otro lado, el genotipo B se halló tanto en zonas urbanas como rurales mientras que el genotipo All solo se detectó en zonas urbanas, al igual que las infecciones con ambos genotipos.

En las muestras analizadas, el genotipo B fue predominante en todas las localidades excepto en Berisso. En este barrio predominó el genotipo All. El análisis estadístico indicó diferencias significativas entre el genotipo de *Giardia* identificado y la localidad estudiada ( $p=0,000$ ; test de Chi cuadrado) (figura 3.2).

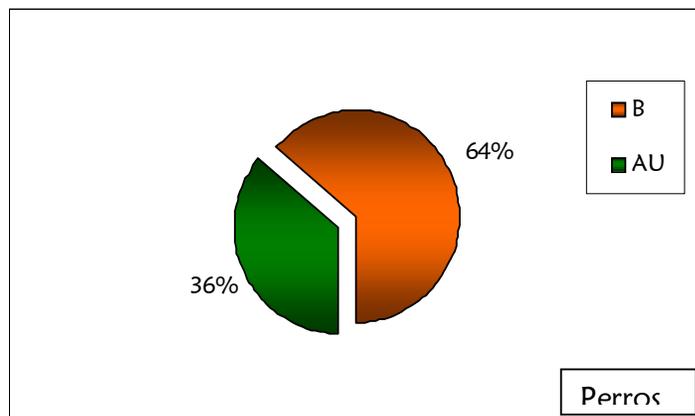


**Figura 3.2:** Distribución de los genotipos de *G. lamblia* en muestras fecales humanas clasificadas según las distintas localidades. (n=84). **All:** genotipo All, **B:** genotipo B, **All+B:** ambos genotipos en la misma muestra.

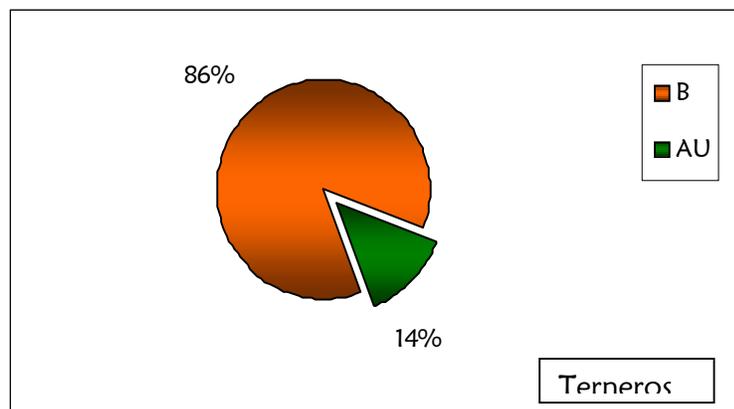
### 3.2 Identificación de los genotipos zoonóticos de *G. lamblia* en muestras de origen animal

De las 95 heces de animales analizadas se detectaron quistes de *Giardia* en 11/54 (20,3%) perros y en 7/30 (23,3%) terneros. Todos los animales infectados pertenecieron a las localidades de General Mansilla y Atalaya. No se detectaron muestras positivas en heces de gatos, de caballos ni de vacas.

En las muestras positivas solamente se detectó el genotipo B y se obtuvo amplificación en 7/11 heces caninas y en 6/7 de terneros (figuras 3.3 y 3.4).



**Figura 3.3:** Genotipos de *G. lamblia* en muestras fecales de origen canino, positivas por microscopio óptica (n=11). **B:** genotipo B, **AU:** ausencia de amplificación.



**Figura 3.4:** Genotipos de *G. lamblia* en muestras fecales de origen vacuno, positivas por microscopio óptica (n=7). **B:** genotipo B, **AU:** ausencia de amplificación.

### **3.3 Distribución de los genotipos en zonas rurales y urbanas**

Sobre un total de 84 muestras humanas genotipificadas, 21 de ellas (25%) se localizaron en zonas rurales, mientras que las 63 restantes se hallaron en zonas urbanas (75%).

Con respecto a las 13 heces de animales genotipificadas, 2 perros y todos los terneros correspondieron a zonas rurales, en tanto que 5 perros pertenecían a familias de zonas urbanas.

#### **I) *Zona rural***

El 100% de las muestras fecales de humanos (21/84) y animales (2 perros y 6 terneros) genotipificadas resultaron genotipo B. Estas heces correspondían a pobladores de las zonas rurales de 2 localidades de la provincia de Buenos Aires.

En dos campos de General Mansilla, se hallaron niños, perros y terneros infectados con genotipo B. En el campo I se detectaron 3 hermanos de 2, 6 y 7 años infectados con *G. lamblia*, y en 2 de ellos se obtuvo el genotipo B. De los animales analizados en ese campo se encontró 1 perro y 2 terneros parasitados con el genotipo B de *Giardia*.

En el campo II se hallaron 3 hermanos (2, 4 y 6 años) y 1 adulto infectados con *Giardia*, de los cuales, 2 niños presentaron genotipo B. También se encontraron 4 terneros parasitados con el mismo genotipo zoonótico. Como se observa en la tabla siguiente, en ese campo y durante el período estudiado no se detectaron perros parasitados con *Giardia*.

La distribución de los genotipos detectados en muestras de los campos lecheros (I y II) se observa en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1:** Genotipos detectados en las muestras positivas para *Giardia* de origen humano y animal, en los 2 campos lecheros de General Mansilla.

Campo lechero	Humanos códigos	Humanos genotipo	Perros códigos	Perros genotipo	Terneros códigos	Terneros genotipo
I	Ba9	B	Ba11	AU	Ba112	B
	Ba18	B	Ba17	B	Ba113	AU
	Ba13	AU			Ba121	B
II	Ba86	AU	-	-	Ba109	B
	Ba72	AU			Ba114	B
	Ba85	B			Ba115	B
	Ba87	B			Ba122	B

En resumen, se encontraron 6 niños de 2 a 7 años y un adulto infectados con *Giardia* genotipo B. También, se detectó un perro y 6 terneros parasitados con el mismo genotipo los niños de esos campos.

## II) Zona urbana

En las zonas urbanas se detectaron los genotipos All y B en heces humanas y solamente el genotipo B en perros. Sobre un total de 63 heces humanas, en 11 de ellas se detectó el genotipo All (17,4%); en 49, el genotipo B (77,7%) y en 3, una infección mixta por los genotipos All y B (4,9%). Todos los perros urbanos infectados con *Giardia* presentaron genotipo B.

En varias viviendas de zonas urbanas se hallaron niños y sus perros mascotas parasitados con el mismo genotipo zoonótico B. En el hogar I se detectaron 2 hermanos de 4 y 8 años y 2 perros infectados con *Giardia*. De los cuales, un niño y un perro presentaron genotipo B. En el hogar II se encontró un perro parasitado con genotipo B. Esta mascota convivía con un niño de 3 años también infectado con el mismo parásito pero la muestra no pudo ser genotipificada. Las viviendas III y IV eran colindantes y en ellas se detectaron

niños de (3, 6 y 10 años) y sus perros infectados con el mismo genotipo zoonótico. En el hogar III tenían 2 gatos como mascotas que no presentaron infección con *Giardia*. En el hogar V se detectó un niño de 2 años con genotipo All que tenía 3 perros también infectados con *Giardia*. Ninguno de estas heces caninas pudo amplificarse.

Existen varios estudios que indican que la presencia de perro en el hogar aumenta el riesgo de infección para los humanos (Traub y col., 2004). Según Ratanapo y col. (2008), el contacto con perros más de una vez por semana produce un incremento de 2,3 veces la infección con *Giardia*. En este estudio no se encontraron diferencias significativas (test de Chi cuadrado,  $p=0,19$ ) entre la presencia de perro en el domicilio y el genotipo de *Giardia* en los niños infectados.

Los resultados de la genotipificación de las muestras humanas y caninas de zonas urbanas se observan en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2:** Genotipos detectados en muestras positivas para *Giardia* de origen humano y canino, provenientes de hogares de zonas urbanas de General Mansilla (I y II), Atalaya (III y IV) y Berisso (V).

Vivienda	Humanos	Genotipo	Perros	Genotipo
I	Ba4	AU	Ba5	AU
	Ba32	B	Ba15	B
II	Ba10	AU	Ba16	B
III	At31	AU	At35	B
IV	At27	B	At29	AU
	At34	B	At59	B
V	Be93 (2)	All	Be123	AU
			Be124	AU
			Be125	AU

### 3.4 DISCUSIÓN

En las 502 muestras fecales humanas analizadas se detectaron quistes de *Giardia* en 107 (21,3%). La genotipificación de las heces fue exitosa en 84 de ellas (79%). Fue evidente el predominio de genotipo B. Estas observaciones están en concordancia con Cacciò y colaboradores (2008) que indicaron un predominio global del genotipo B en el mundo.

Diversos estudios realizados en Estados Unidos y Francia reportaron que la mayoría de las infecciones fueron causadas por el genotipo B (Amar y col., 2002; Bertrand y col. 2005; Read y col., 2002). En Inglaterra, Thompson (2004), reveló un predominio de genotipo B (64%). Similarmente, Lebbad y col. (2008) indicaron que el 80% de infecciones por *Giardia* en una población de Nicaragua se debieron al genotipo B. Las mismas conclusiones fueron reportadas por Guy y col. (2004), indicando que el genotipo B fue predominante en India, Perú y Estados Unidos.

En cambio, en otros países como Brasil, Uganda, México y Canadá se reportó que el genotipo A fue el más prevalente. (Cacciò y col. 2008; Gelanew y col., 2007; van der Giessen y col., 2006; Volotao y col., 2007). De modo similar, el genotipo A se caracterizó en 7 pacientes de Corea (Yong y col., 2000). Resultados análogos se obtuvieron en dos localidades distintas de México donde se detectó el genotipo All en todos los infectados con *Giardia*. (Ponce-Macotella y col., 2002; Cedillo-Rivera y col. 2003).

El predominio de un genotipo sobre otro en un área de estudio ha sido atribuido a varios factores biológicos o geográficos (Sulaiman y col., 2004). A la fecha, la información sobre los diferentes genotipos de *Giardia* ha sido obtenida mediante estudios de focos endémicos localizados o por estudios longitudinales de observación y genotipificación de casos positivos. Diversos investigadores destacaron que en ciertas zonas endémicas existe un predominio absoluto de un genotipo zoonótico y la ausencia del otro genotipo (Ponce Macotella y col., 2002; Volotao y col., 2007). Al igual que estos autores, en General Mansilla,

Atalaya y en los 2 asentamientos precarios se encontró una dominancia absoluta del genotipo B.

La ocurrencia de infecciones mixtas ha sido reportada en diversos países como Australia, Inglaterra, India, Italia y Etiopía, con porcentajes que varían entre el 2 y 21%, siendo mayor en países con menor desarrollo económico. (Cacciò y col., 2008; Gelanew y col., 2007; Lalle y col., 2005; Traub y col., 2004). En este trabajo de tesis se encontraron solamente 3 niños con infección mixta por los genotipos All y B, que vivían en Mendoza. Estos resultados concuerdan con los reportados por Guy y col. (2004) que al procesar 15 heces humanas y encontraron 3 pacientes con ambos genotipos (A+B).

Teniendo en cuenta que la giardiosis se presenta de manera endémica por contagio interpersonal, por ingestión de agua o alimentos contaminados, por falta de saneamiento ambiental sumado a la ausencia de normas higiénicas podemos afirmar que en las muestras estudiadas el genotipo endémico es el B, siendo el All de distribución más restringida en nuestro país.

Sobre un total de 95 heces de animales, se detectaron quistes de *Giardia* en 18 muestras, 11 perros y 7 terneros. Se logró la genotipificación en 13 heces y en todas se halló el genotipo B. Como se mencionó previamente, los animales pueden estar infectados con diferentes genotipos de *Giardia*. Los perros pueden presentar infecciones con genotipos zoonóticos (A y B) o con genotipos especie-específicos (C y D) (Caccio y col., 2005; Thompson y col., 2008).

En el mundo, se han encontrado perros infectados con diversos genotipos en áreas urbanas de numerosos países como México, Brasil, Japón, Italia, Polonia y Tailandia (Berrilli y col., 2004; Eligio-García y col., 2005, Lalle y col., 2005; Palmer y col., 2008; Volotao et al., 2007). Estudios recientes han revelado que los perros de ciertos países se encuentran infectados predominantemente con genotipos C y D, y en menor medida el A. En Alemania, van der Giessen y col. (2006) encontraron que el 100% de los perros estaban infectados con genotipo

especie-específico (D). Palmer y colaboradores (2008) analizaron 88 heces de perros domésticos y refugiados de Australia, detectando 87 con genotipos C y D y sólo uno con genotipo A. Barutzki y col. (2007) reportaron un predominio casi absoluto de genotipos no zoonóticos en 92 perros de Alemania, indicando que los perros presentarían bajo riesgo zoonótico para el hombre.

En contraste con esos estudios, la presencia de los genotipos zoonóticos en caninos ha sido publicada por diversos autores. Leonhard y col. (2007) reportaron que el 60% de los perros de una zona urbana de Alemania estaban parasitados con genotipo A. De igual modo, en Italia, Berrilli y col. (2004) encontraron que el 23% de los perros infectados tenían genotipo A o A/C. En la India, Traub y col. (2004) revelaron que los perros presentaban solamente los genotipos zoonóticos de *Giardia*. En Estados Unidos, van Keulen y colegas (2002) reportaron la presencia de genotipos A y B en diversos animales domésticos y silvestres.

Investigaciones recientes en focos localizados han brindado evidencia sobre el rol de los perros en la transmisión zoonótica de *Giardia*. Varios estudios llevados a cabo en India y Bangkok revelaron que los perros y sus dueños compartían el mismo genotipo de *Giardia* (Traub y col., 2004; Thompson y col., 2008).

Inpankaew y col. (2007) analizaron las heces de monjes y perros de numerosos templos de Bangkok y encontraron que las muestras humanas presentaron genotipos A y B mientras que la mayoría de los perros tenían genotipo A. Estos autores sugieren que los perros de los templos de Tailandia poseen potencial zoonótico para los pobladores de esas comunidades.

El rol de los perros como transmisores de *Giardia* ha sido ampliamente estudiado y es reconocido como un problema de salud pública, especialmente en países en desarrollo y en barrios carenciados o con bajos niveles socioeconómicos. En esas comunidades, los bajos niveles de higiene y prácticas humanas tales como la defecación al aire libre y la eliminación inadecuada de los

residuos domésticos que pueden ser ingeridos por animales; exacerbando el riesgo de transmisión zoonótica de la giardiasis.

En referencia al ganado vacuno, investigadores de diversos países como Australia, Canadá, Bélgica, Italia y Estados Unidos reportaron que las vacas y terneros se infectan mayormente con los genotipos E y A (O' Handley y col., 2000). Similarmente, dos estudios llevados a cabo en Estados Unidos por Trout y col. (2006; 2007) revelaron que el ganado vacuno se encontraba parasitado en forma preponderante con el genotipos E y menos del 10%, con genotipo A. Del mismo modo, Uehlinger y col. (2006) recolectaron muestras fecales vacunas de distintas granjas de Estados Unidos y revelaron un 94% de genotipo E y 6% de genotipo A. (Caccio y col., 2005; Thompson y col., 2008).

En cambio, Langkjær y col. (2007) estudiaron vacas lecheras de Bélgica y revelaron que el genotipo A fue predominante. Además, encontraron que el 31% de los terneros sufrían infecciones mixtas de 2 genotipos (A y E). Resultados similares obtuvieron en una granja de cría intensiva de Canadá, Appelbee y col., (2003). Todos estos autores han sugerido los terneros se infectan con genotipo A y por lo tanto, podrían ser un reservorio zoonótico importante para *Giardia*.

Por el contrario, estudios realizados en Australia y Estados Unidos reportaron 100% de genotipo no zoonótico (E) (Becher y col., 2004; Trout y col., 2006). Por consiguiente, estos autores han sugerido que la detección del genotipo especie-específico en la mayoría de los animales estudiados indicaría un bajo potencial zoonótico para el hombre.

A la fecha, existen pocos reportes sobre el genotipo B en el ganado vacuno. van Keulen y col. (2002) detectaron un ternero que presentó genotipo B en Canadá. Resultados similares fueron reportados por Giangaspero y col. (2007) y por Coklin y col. (2007), ambos indicaron la presencia de genotipos zoonóticos en animales de granja de Italia y de Canadá. Del mismo modo, en Italia, Lalle y col. (2005) encontraron genotipos zoonóticos A y B en el 33% de los perros y el 88% de los terneros analizados.

Este es el primer reporte de la infección de terneros con genotipo B de *Giardia* en Argentina. En este estudio, el 86% de los terneros muestreados de General Mansilla se encontraban parasitados con el genotipo zoonótico B. Además, se detectó un perro del campo I infectado con el mismo genotipo que los terneros y los niños de ese lugar, reforzando el carácter zoonótico de la infección. Estos resultados están en concordancia con los publicados por Traub y col. (2004) que reportaron que los pobladores y los perros provenientes de una comunidad aislada de recolectores de té en la India se encontraban infectados con el mismo genotipo de *Giardia*.

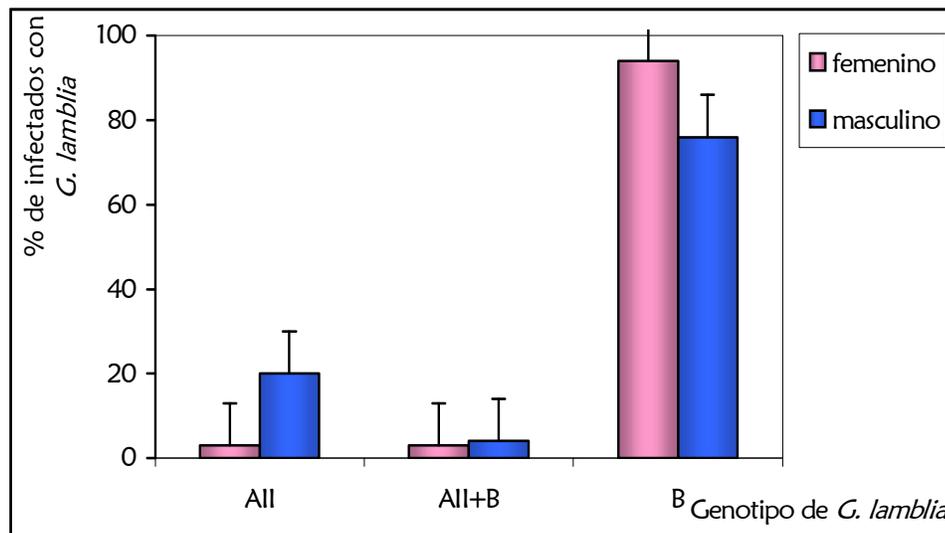
Según Thompson y col. (2008), *G. lamblia* presenta varios ciclos de transmisión parasitaria que pueden interactuar entre sí e involucran a los seres humanos, al ganado, a los perros/gatos y a los mamíferos silvestres. El agua y el suelo contaminados podrían ser considerados como fuente de infección para los animales. Este parecería ser el caso en los campos de General Mansilla, donde los perros podrían ingerir las heces vacunas o humanas o el agua contaminada con quistes de *Giardia*. Posteriormente, estos animales, en su libre deambular, podrían actuar como diseminadores de la infección a los habitantes y animales del lugar, continuando con el ciclo de infección. En estos campos, los animales actuarían como reservorios no humanos de la infección contaminando el agua y el suelo y transmitiendo la infección a las personas favoreciendo la perpetuación de *Giardia* en la naturaleza.

Los cambios demográficos, las alteraciones del medio ambiente, los cambios climáticos, el uso intensivo de la tierra, las migraciones de pobladores y animales y las prácticas humanas convergen a favor de la emergencia y diseminación de las zoonosis parasitarias. En esta tesis, el genotipo B de *Giardia* presentó características zoonóticas. En este relevamiento, el genotipo B se detectó en 64% de los perros y en 86% de los terneros estudiados, reforzando el carácter endémico de este genotipo. La presencia de niños y perros parasitados con el mismo genotipo apoya la hipótesis de la transmisión zoonótica entre humanos y animales en las regiones estudiadas.

#### 4.1 Relaciones entre las variables sexo, edad y genotipo de *G. lamblia*

De las 84 muestras fecales amplificadas, el 60.7% (n=51) correspondió a varones y el 39.3% (n=33) a mujeres. En ambos sexos se observó un predominio de genotipo B.

El 76% de los varones estuvo infectado con genotipo B, el 20% con All y sólo 2 mostraron una infección mixta (All+B). En el sexo femenino se encontró un predominio casi absoluto de genotipo B (94%), una se infectó con genotipo All y otra presentó una infección mixta (All+B). La distribución de los genotipos de *G. lamblia* según el sexo del infectado se observa en la figura 4.1



**Figura 4.1:** Distribución de los genotipos de *G. lamblia* en relación al sexo de los infectados (n=84)

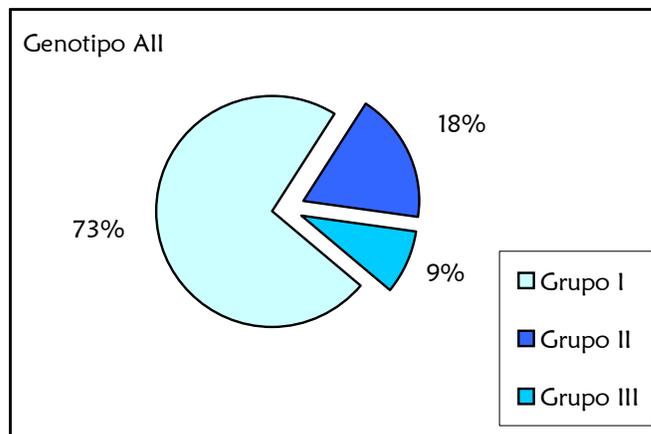
Se estudió la edad promedio de los niños parasitados con cada genotipo al momento de la toma de muestra. Para el genotipo All, la edad promedio fue 3 años y 6 meses, mientras que para el genotipo B fue 6 años y 6 meses ( $p=0,031$ ; test de Mann-Whitney)

Posteriormente, se dividió a la población estudiada en 3 grupos etarios El grupo I correspondió a niños en edad preescolar, el grupo II, niños en edad

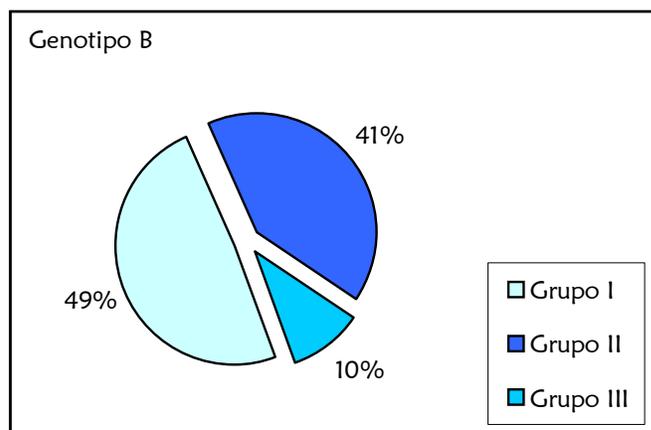
escolar y el grupo III estaba formado por los padres de los niños que se realizaron el estudio. (I: hasta 5 años inclusive, II: 6 a 14 y III: adultos).

En el grupo I, los niños se infectaron con ambos genotipos, mientras que las niñas, solamente con genotipo B. En cambio, en los grupos II y III no hubo diferencias en la infección por uno u otro genotipo.

La distribución de cada genotipo en relación a la edad demostró que 3 de cada 4 personas infectadas con genotipo AII eran niños menores de 5 años. Además, en el grupo II (escolares) se detectaron 2 niños y una niña con infecciones mixtas (AII+B) (figuras 4.2 y 4.3).



**Figuras 4.2:** Distribución del genotipo AII en los distintos grupos etarios.



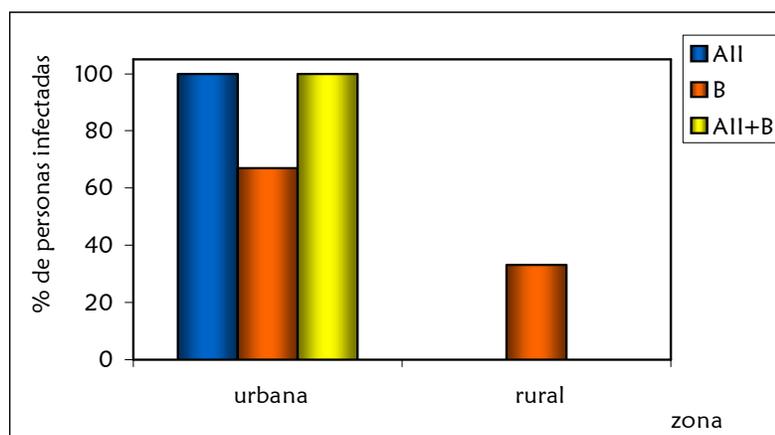
**Figuras 4.3:** Distribución del genotipo B en los distintos grupos etarios.

Posteriormente, se estudió la relación entre el sexo de los infectados y el genotipo en cada grupo etario, observándose diferencia significativa en los varones menores de 5 años en los que predominó el genotipo AII (test de Fisher,  $p=0,015$ ). A diferencia de ello, el sexo femenino y en particular, las niñas menores de 5 años, estaban más frecuentemente infectadas con genotipo B (test de Fisher,  $p=0,0155$ ).

#### 4.2 Análisis de las variables socioeconómicas de las comunidades analizadas y su relación con el genotipo detectado

El 73% (61/84) de las personas vivía en zonas urbanas y el 60% (50/84) tenía vivienda de material. Con respecto a utilización de agua, el 67% (56/84) consumía agua potable y el resto de los pobladores poseía bomba de agua de tipo domiciliaria o comunitaria. El 26% (22/84) de las personas eliminaba las excretas en letrinas, el 52% (44/84) en pozos y solamente el 21% (18/84) poseía cloacas.

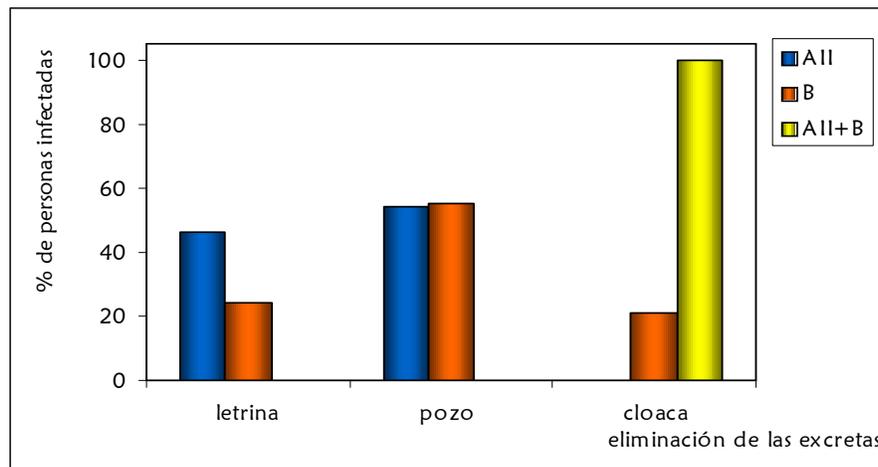
El 73% (61/84) de los hogares tenía recolección periódica de residuos, en cambio, el resto de los pobladores, arrojaba la basura a cielo abierto o la quemaba en descampados cercanos al domicilio. Además, el 46% (39/84) de las viviendas se inundaban con las lluvias (a veces o frecuentemente) (figura 4.5).



**Figura 4.5:** Distribución de los genotipos de *G. lamblia* de humanos según las zonas urbana y rural. (n=84)

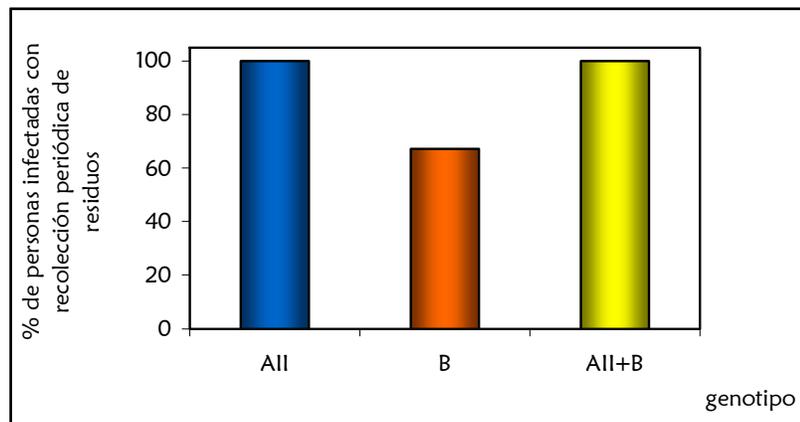
En este relevamiento se hallaron diferencias significativas entre el genotipo hallado y la zona de residencia (test de Chi cuadrado,  $p=0,019$ ).

El genotipo B fue hallado tanto en zonas urbanas como rurales. Más del 30% de los parasitados con este genotipo no tenían recolección periódica de residuos domiciliarios ni agua corriente (figura 4.6).



**Figura 4.6:** Distribución de los genotipos de *G. lamblia* según el tipo de eliminación de las excretas. (n=84)

Con respecto al genotipo de *Giardia* detectado en las zonas rurales se halló una asociación significativa entre el genotipo B y la eliminación de residuos a cielo abierto o en el peridomicilio (test de Chi cuadrado,  $p=0,012$ ) (figuras 4.7 y 4.8). No se encontraron diferencias significativas con las otras variables estudiadas.



**Figura 4.7:** Relación entre el genotipo detectado y el porcentaje de personas que poseen recolección domiciliaria de residuos.



**Figura 4.8:** Vista posterior de la vivienda rural de General Mansilla donde se observan los residuos domiciliarios acumulados en el peridomicilio.

Con respecto a los genotipos hallados en las zonas urbanas, se encontraron diferencias significativas entre el genotipo detectado y el tipo de eliminación de las excretas (test de Chi cuadrado,  $p=0,0046$ ). Todas las personas infectadas con genotipo All habitaban en casas que no tenían red cloacal. (figura 4.9).



**Figura 4.9:** Vista de una casa con letrina ubicada en el barrio de Berisso.

En cambio, el genotipo B se halló en personas que tenían los 3 tipos de eliminación de excretas en sus hogares (letrina, 24%; pozo, 55% y cloacas,

21%). No se encontraron diferencias significativas con el tipo de materiales de la vivienda, con el tipo de agua de consumo ni con la inundación del domicilio con las lluvias.

### 4.3 DISCUSIÓN

En ambos sexos se observó un predominio de genotipo B, hecho que se corresponde con el predominio global del genotipo B en las infecciones humanas (83 %). A diferencia de ello, el genotipo All fue predominante en el sexo masculino, fundamentalmente en los niños, mientras que las infecciones mixtas sólo fueron detectadas en niños de edad escolar.

El hallazgo de niños varones infectados, en su mayoría, con genotipo All, podría explicarse en base a sus conductas o hábitos de juego ya que los niños jugaban y pescaban en las zanjas abiertas peridomiciliarias con aguas servidas. Estos resultados están en concordancia con los reportados por Ratanapo y colegas (2008) que indicaron que la transmisión hídrica podría estar involucrada en la infección por genotipo A de *G. lamblia*. En cambio, el sexo femenino y en particular, las niñas menores de 5 años, estaban más frecuentemente infectadas con genotipo B indicando una fuente de infección diferente a la de los varones.

Con respecto a las infecciones mixtas, se detectaron 3 niños en edad escolar infectados con 2 genotipos (All+B), lo que indicaría que los niños pudieron haber estado en contacto con más de una fuente de infección, por ejemplo aguas servidas. La ocurrencia de infecciones mixtas refleja la compleja circulación del parásito en el medio ambiente y la exposición de las personas y animales a múltiples fuentes de infección (Gelanew y col., 2007).

Resulta evidente que los niños infectados con genotipo All presentaron significativamente menor edad que los infectados con genotipo B. Estos resultados difieren de los publicados por Minvielle (2005) en los que reporta

niños parasitados con genotipo All cuyas edades estaban comprendidas entre 7 y 13 años.

Según Kohli y col. (2008), en Brasil, la edad de la primera infección con ambos genotipos de *G. lamblia* fue similar. A diferencia de los resultados obtenidos por esos autores, en esta tesis se encontró diferencias significativas entre la edad de infección y el genotipo del parásito. Los niños de menor edad se infectaron más frecuentemente con el genotipo All que con el B, lo que podría indicar una posible relación con la madurez del sistema inmune, la virulencia de la cepa infectante o el estado nutricional de los niños. Estos resultados refuerzan el concepto que las infecciones parasitarias dependen de factores del huésped como la edad, el estado inmune y las condiciones nutricionales; y de factores parasitarios como la virulencia y la patogenicidad de la cepa infectante.

El predominio del genotipo B fue observado en diversas zonas de Argentina y podría representar la reexposición al genotipo zoonótico B en las comunidades donde es altamente prevalente. Del mismo modo, Kohli y col. (2008) reportaron que los niños presentaban un marcado predominio del genotipo B en las infecciones recurrentes con *Giardia*.

Al analizar las distintas variables epidemiológicas se observó que todas las personas parasitadas con genotipo All o con infecciones mixtas presentaban ciertas características comunes; vivían en zonas urbanas, tenían recolección periódica de residuos y consumían agua potable de red. Con respecto a las zonas urbanas, la utilización de letrina podría estar asociada a la falta de lavado de manos por la lejanía al agua potable.

En las zonas rurales, se observó una asociación entre la eliminación de basura en el peridomicilio y el genotipo B. Además, este genotipo zoonótico fue hallado en perros que conviven con las personas de esos hogares. Si bien, la presencia de basura en el patio no sería una variable fundamental en la transmisión de *Giardia*, podría actuar como indicador de otros hábitos sociales y culturales.

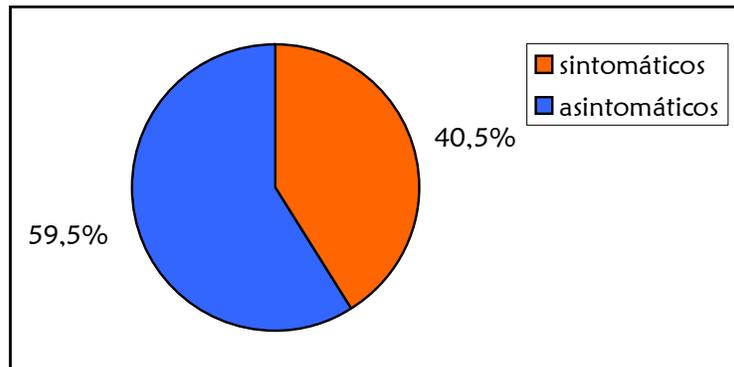
En resumen, en ambos sexos se observó un predominio de infección con genotipo B. Sin embargo, el genotipo All presentó diferencias en cuanto a su distribución ya que se hallaron 10 varones y sólo una mujer, parasitados con este genotipo. Considerando la edad de infección se observó que los niños parasitados con genotipo All fueron significativamente menores que los infectados con B, señalando la eventual asociación con la maduración del sistema inmunológico, con la virulencia de la cepa infectante y/o el estado nutricional de los niños. Sumado a ello, los niños y las niñas menores de 5 años presentaron distinto genotipo de *Giardia*, indicando la posibilidad de fuentes de infección diferentes para cada grupo.

Se encuentra ampliamente reconocido que el parasitismo intestinal está determinado por el acceso de las personas a los recursos materiales, humanos y de saneamiento, así como también las prácticas de alimentación e higiene. En relación al genotipo B de *Giardia* detectado en la zona rural se halló una asociación significativa entre este genotipo y la eliminación de residuos a cielo abierto por los residentes del lugar sugiriendo que esta práctica podría estar asociada a la diseminación de la infección. A diferencia de ello, en las zonas urbanas se encontraron ambos genotipos y se hallaron diferencias significativas entre el genotipo All y la ausencia de cloacas en las viviendas de la zona.

### 5.1 Relación entre la signosintomatología y el genotipo infectante

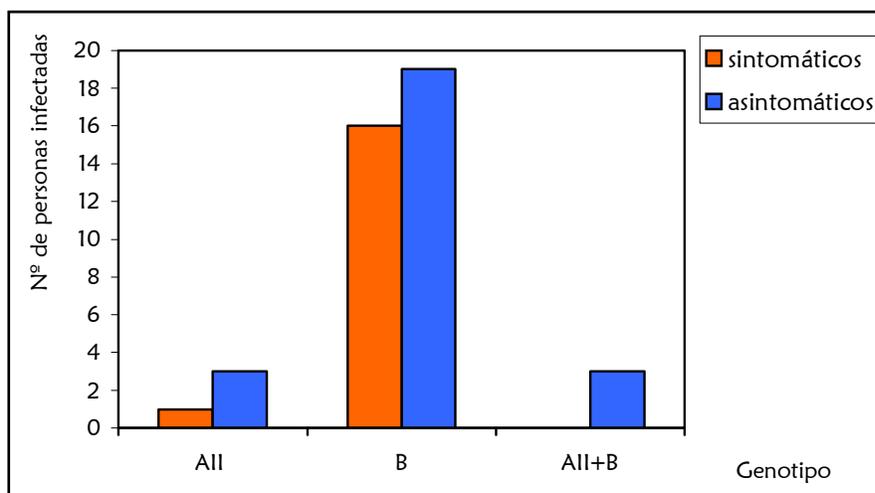
Para el análisis de la signosintomatología se seleccionaron los pacientes parasitados con *G. lamblia* como único parásito patógeno y cuyas heces fueron genotipificadas por PCR-RFLP aplicando las técnicas descritas previamente.

Las personas que cumplieron todos los criterios fueron 42/84 (50%) y de ellas, 17 presentaron algún signo/síntoma, mientras que el resto de las personas fueron asintomáticos (figura 5.1). De los pacientes sintomáticos, 16/17 (94%) tenían infección por genotipo B.



**Figura 5.1:** Distribución de personas con y sin síntomas infectadas solamente con *G. lamblia* (n=42). (Sintomáticos: personas que poseían uno o más signos/síntomas relevados en este estudio; Asintomáticos: personas que no presentaron signos/síntomas).

Cuando se analizaron los signos/síntomas en pacientes infectados con un genotipo en particular (AII o B), no se observaron diferencias significativas entre los sintomáticos y asintomáticos en cada genotipo (test de Chi cuadrado,  $p=0,24$ ) (figura 5.2).



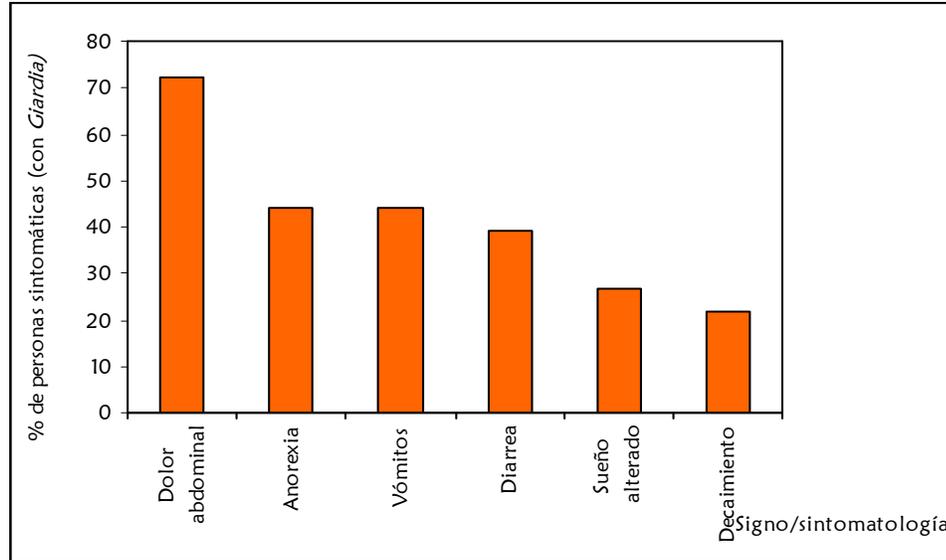
**Figura 5.2:** Distribución de las personas con y sin signos/síntomas en relación al genotipo hallado, n=42. (Sintomáticos: personas que poseían uno o más signos/síntomas relevados; Asintomáticos: personas que no presentaron ningún signo o síntomas).

Posteriormente, se analizó la signosintomatología en relación al genotipo infectante considerando la edad del infectado. Para el genotipo All, no se encontraron niños con signos/síntomas. En cambio, se detectó un adulto sintomático.

En relación al genotipo B, se detectaron 15 niños y 1 adulto con signos/síntomas. Ninguna persona infectada con los 2 genotipos (All+B) de *Giardia* presentó signos/síntomas.

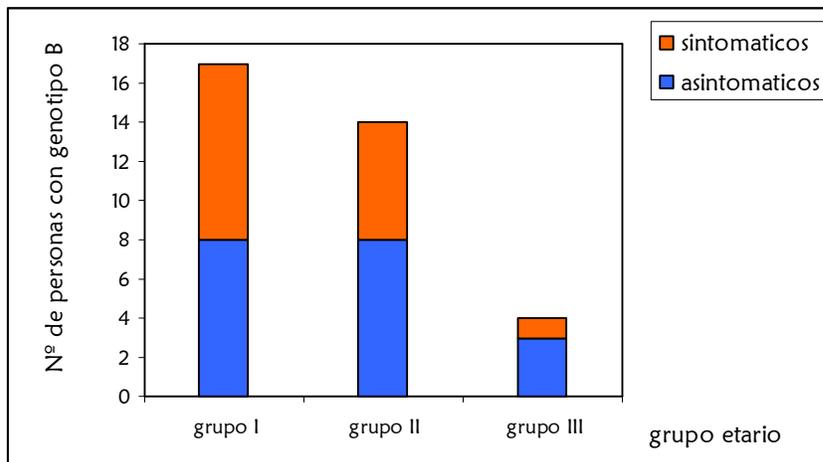
Teniendo en cuenta las 17 personas sintomáticas (1 con All y 16 con B) parasitadas con *G. lamblia*, el síntoma más frecuente fue el dolor abdominal (72%), seguido de anorexia y vómitos (44%); diarrea (39%), sueño alterado (27%) y por último, decaimiento (22%).

Los 15 niños infectados con genotipo B presentaron principalmente dolor abdominal, anorexia y vómitos. Menos de la mitad de los niños presentó diarrea. En menor medida se encontraron algunos niños con decaimiento general y sueño alterado (figura 5.3).



**Figura 5.3:** distribución de los signos y síntomas de las personas infectadas con los genotipos All y B de *Giardia* (n=17)

A continuación, se analizó la presencia/ausencia de signos y síntomas en relación a la edad del infectado (figura 5.4). Si bien no se hallaron diferencias significativas, se observó una tendencia a presentar menos síntomas a mayor edad del infectado (test de Chi cuadrado,  $p=0,57$ ).



**Figura 5.4:** Relación entre el número de infectados con genotipo B con y sin signosintomatología en relación con el grupo etario. (n=42). (Sintomáticos: personas que poseían uno o más signos/síntomas relevados en este estudio). Grupo I: niños menores de 5 años, grupo II: niños de 6 a 14 años, grupo III: adultos.

## 5.2 Relación entre genotipo infectante y coinfección parasitaria

Para analizar la eventual relación entre el genotipo de *Giardia* y la presencia de otros parásitos, se seleccionaron las muestras provenientes pacientes parasitados con *G. lamblia* y genotipificadas por PCR-RFLP con las técnicas descriptas previamente.

En las personas infectadas con *G. lamblia* (n=84) se investigó la presencia de otros parásitos en heces. Se observó que el 64% de las personas con genotipo All y el 50% de los parasitados con genotipo B se encontraban infectados con uno o más parásitos intestinales. A diferencia de ello, ningún niño parasitado con los 2 genotipos (All+B) presentó otros parásitos en heces (tabla 5.1).

**Tabla 5.1:** Distribución de parásitos intestinales detectados en heces humanas y número de personas parasitadas con genotipos All y B de *G. lamblia*.

Parásitos en heces humanas	Genotipo All	Genotipo B
<i>Giardia lamblia</i>	4	35
<i>Giardia + Blastocystis hominis</i>	4	11
<i>Giardia + Enterobius vermicularis</i>	3	2
<i>Giardia + Ascaris lumbricoides</i>	0	2
<i>Giardia + Strongyloides stercoralis</i>	0	2
<i>Giardia + Hymenolepis sp.</i>	0	3
<i>Giardia + Blastocystis + Entamoeba coli</i>	0	2
<i>Giardia + Blastocystis + Ascaris</i>	0	7
<i>Giardia + Blastocystis + Enterobius</i>	0	2
<i>Giardia + Ascaris + Enterobius</i>	0	4

Se encontraron diferencias significativas entre la presencia de genotipo All de *G. lamblia* y la coinfección con *Enterobius vermicularis* (test de Chi cuadrado,  $p=0,018$ ; OR=12,7)

En este caso, los niños que estaban parasitados con genotipo All y *E. vermicularis* manifestaron los siguientes hábitos higiénicos: 2/3 jugaban descalzos

en el peridomicilio, 2/3 se bañaban al menos una vez por semana y el restante, lo hacía 1 o 2 veces al mes. Todos refirieron que no se lavaban las manos antes de ingerir alimentos y después de defecar debido a la falta de agua potable. Los hogares donde vivían estos niños presentaban hacinamiento ya que dormían más de 3 niños en la misma habitación. Otro dato a destacar es que las madres de estos niños solamente tenían estudios primarios incompletos.

### 5.3 DISCUSION

Los síntomas de la infección por *Giardia* son altamente variables y algunos individuos pueden eliminar quistes infecciosos sin presentar síntomas clínicos mientras que otros sufren una enfermedad diarreica aguda o crónica. Actualmente se ha postulado que intervienen factores del huésped y del parásito, sin embargo, no se conoce con exactitud porqué ciertas personas desarrollan giardiosis clínica mientras que otros permanecen asintomáticos.

Algunos reportes describen una correlación entre la presencia de diarrea persistente y el genotipo B infectante, otros estudios sugieren que el genotipo B es más prevalente en niños asintomáticos. A diferencia de ellos, existen varios investigadores que reportan la ausencia de correlación entre el genotipo y la signosintomatología (Cedillo Rivera y col., 2003; El-Shazly y col., 2004; Read y col., 2002). En concordancia con estos últimos, en las muestras analizadas no se observó ninguna asociación estadística significativa entre la presencia de signosintomatología y el genotipo de *Giardia* infectante.

En las personas sintomáticas parasitadas solamente con *Giardia*, el síntoma más frecuente fue el dolor abdominal seguido de anorexia y vómitos, diarrea, sueño alterado y en menor medida, decaimiento.

Los niños infectados con genotipo B fueron oligosintomáticos, mientras que el niño con A11 fue polisintomático. A diferencia de ello, los niños con infección mixta fueron totalmente asintomáticos. Estos resultados difieren de los

publicados por Almeida y col. (2006) que encontraron que todos los niños parasitados con genotipo B fueron asintomáticos.

En relación a la edad del infectado se observó una tendencia a presentar menos síntomas a mayor edad del infectado. Según Hughes y Nelly (2006), la inmunidad parasitaria se construye gradualmente, detectándose las mayores complicaciones en los niños de menor edad. Al igual que estos autores, Adam (2001) indicó que las infecciones por *Giardia* tienen una mayor incidencia en niños menores de 5 años de edad quizás debido a que su sistema inmune no se encuentra totalmente desarrollado. En concordancia con estos autores, el número de niños sintomáticos con genotipo B disminuye a medida que aumenta la edad del infectado.

Las parasitosis intestinales en niños pequeños prevalecen en zonas donde predominan la pobreza, las inadecuadas condiciones sanitarias y escasas prácticas de higiene. Además, el hacinamiento y la falta de agua potable son factores predisponentes. Aunque con menor frecuencia, se ha establecido que las prácticas de cuidado materno también están relacionadas con la mayor frecuencia de parasitosis intestinal (Alvarado y Vásquez, 2006).

En concordancia con estos autores, los 3 niños infectados con genotipo All y *E. vermicularis* presentaron varios factores predisponentes a la infección. Por ejemplo, la falta de agua potable y el uso de letrinas alejadas de la fuente de agua predisponen a un menor lavado de manos y por consiguiente, se potencia la transmisión fecal-oral de los parásitos. Por lo tanto, la asociación entre ambos parásitos indicaría una infección por contacto humano o por compartir juguetes contaminados por las manos sucias. Esta hipótesis se reforzaría porque no se detectaron animales con genotipo All.

En resumen, se caracterizó el genotipo de *G. lamblia* en personas con giardiosis y no se observó relación entre el genotipo infectante y la signosintomatología. Por otro lado, se halló una asociación significativa en los

parasitados con genotipo All de *Giardia* y el helminto intestinal *Enterobius vermicularis*. Estos niños pudieron contagiarse por compartir ropa o juguetes contaminados con materia fecal o por el estrecho contacto al dormir varias personas en la misma habitación y/o cama, sumado a las pobres prácticas de higiene que presentaban estos infantes.

Se han reportado numerosas técnicas para la obtención de parásitos en muestras fecales, no obstante, todas tienen como finalidad la concentración de elementos parasitarios y la disminución de sustancias que podrían interferir en la genotipificación. En general, los métodos tradicionales utilizan soluciones de alta densidad de sacarosa, cloruro de cesio, nitrato de sodio, bromuro de potasio, sulfato de zinc o percoll. Asimismo, los quistes de protozoos se pueden concentrar en papel de filtro o con partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos específicos (separación inmunomagnética) (Nantavisai y col., 2007; Troll y col., 1997; Zarlenga y Trout, 2004).

Varios autores han reportado la obtención de parásitos mediante la filtración a través de membranas o la floculación. Esta última presenta una buena recuperación de quistes de *Giardia*, pero no resulta aplicable en muestras fecales por la precipitación de gran cantidad de detritos que interfieren con la recuperación del parásito (Carnevale y col., 2000; Zarlenga y Trout, 2004).

Si bien, el gradiente de sacarosa es uno de los métodos más utilizado, pocos autores coinciden en la densidad de sacarosa óptima para concentrar quistes parasitarios. Por otro lado, la excreción de quistes de *Giardia* en las heces se produce en forma intermitente y en cantidades variables.

Sumado a ello, ha sido reportado que el agregado de formol a las heces altera la flotabilidad de los parásitos (Alvarado y Wasserman, 2006; LeChevallier y col., 1995; Massanet-Nicolau, 2003; Ribeiro Moitinho y col. 1999; Sauch, 1984; Xiao y Herd, 1993).

## **6.1 Obtención de quistes de *G. lamblia***

### **6.1.1 Optimización de las condiciones de obtención**

Se realizaron 2 experiencias para investigar la influencia del recuento inicial de quistes en heces y de la densidad de sacarosa en la obtención de quistes de *G. lamblia* en muestras fecales formoladas.

*Experiencia 1:*

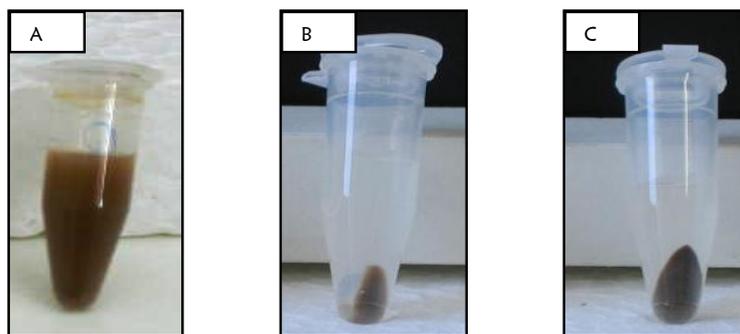
Se partió de una muestra de heces conservada en formol con una concentración de 650 quistes/ $\mu$ l de *Giardia*, detectados por microscopía óptica. Se realizaron 2 diluciones en PBS (1:2 y 1:10) y se contaron los quistes en cámara de Neubauer ( $C_i$ ). Las 3 alícuotas (I/heces sin diluir, II/1:2 y III/1:10) se procesaron simultáneamente con la técnica de colchón de sacarosa (Polverino y col. 2004). Brevemente, las suspensiones fueron centrifugadas a 200g durante 5 min, los quistes se resuspendieron en PBS y se agregó la solución de sacarosa (densidad 1,27); tal que se formaran 2 fases (sacarosa-heces).

Luego de la centrifugación de los tubos a 250g durante 10 min, se recolectó la fase sacarosa. Se diluyó con 2 volúmenes de PBS y se centrifugó nuevamente. Los quistes obtenidos se resuspendieron en PBS y se cuantificaron del mismo modo ( $C_f$ )

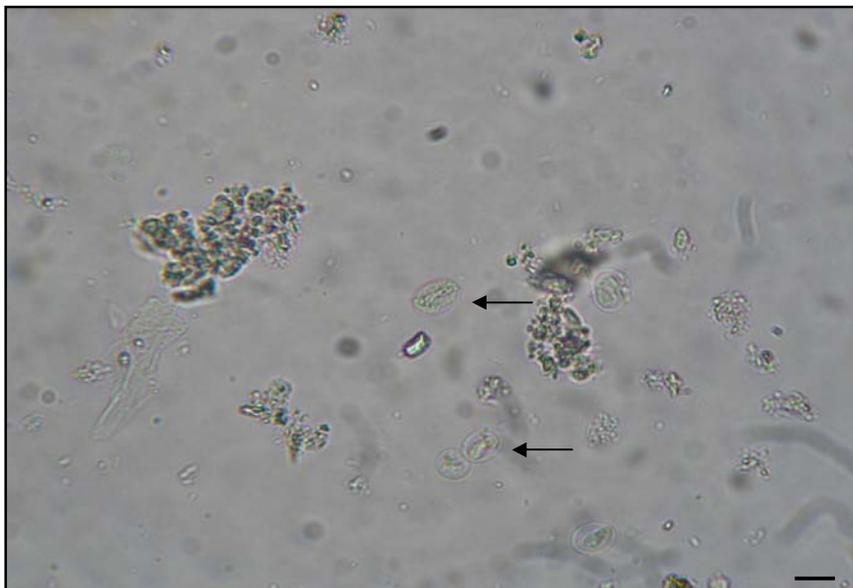
Con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de recuperación de quistes, se midió el volumen de detritos luego de cada procedimiento y se clasificó la turbidez en base al porcentaje de detritos encontrados en 5 campos ópticos, como limpio (L, < 25%), moderadamente turbio (MT, 25-75%) y turbio (T, >75%).

*Experiencia 2:*

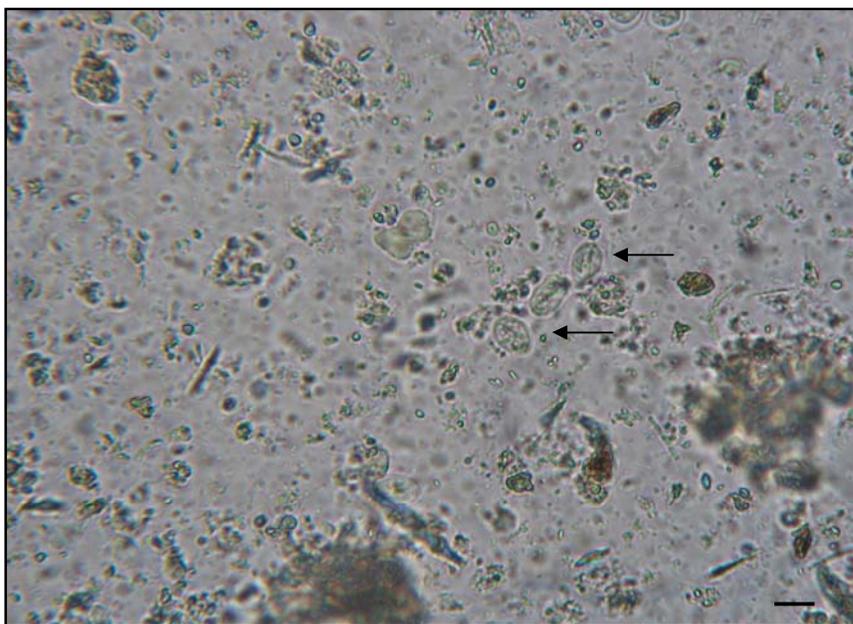
Se repitió el mismo procedimiento anterior pero se utilizó una solución de sacarosa con menor densidad (densidad= 1,18). Los resultados de las experiencias 1 y 2 se muestran en las figuras 6.1, 6.2 y 6.3 y en la tabla 6.1.



**Figura 6.1:** **A:** muestra de heces sin procesar; **B:** sedimento fecal de la alícuota III (1/10) obtenido luego del procesamiento de las heces con solución de sacarosa de densidad 1.27; **C:** ídem anterior con solución de sacarosa de densidad 1.18.



**Figura 6.2:** Quistes de *G. lamblia* en 10  $\mu$ l de sedimento fecal. Fotografía del sedimento fecal obtenido luego del tratamiento con la solución de sacarosa de densidad 1,27. Alícuota III (1/10). (400X). La barra corresponde a 10  $\mu$ m.



**Figura 6.3:** Quistes de *G. lamblia* en materia fecal. Fotografía del sedimento fecal obtenido luego del tratamiento en sacarosa de densidad 1,18. Alícuota III (1/10). (400X). La barra corresponde a 10  $\mu$ m

**Tabla 6.1:** Resultados del procesamiento de una materia fecal formolada con *G. lamblia* por 6 técnicas de purificación de quistes. Cada procedimiento se realizó por triplicado. Se expresan los valores promedios y los desvíos estándar de cada uno.

Densidad sacarosa	Alícuota	C <sub>i</sub> (x ± DS)	C <sub>f</sub> (x ± DS)	% de Recuperación	Vd/Vt	Turbidez
1,275	I	650,6±11.0	264,1±9,2	10,1	0,20-0,50	MT
	II	324,6±12,5	298,0±8.6	23,0	< 0,10	L
	III	65,0±4,6	126,0±4,6	48,5	< 0,10	L
1,180	I	650,6±11.0	NC	---	> 0,80	T
	II	324,6±12,5	NC	---	0,50-0,80	T
	III	65,0±4,6	192,3±7,1	73,9	0,20-0,50	MT

C<sub>i</sub>: concentración inicial de quistes/μl; C<sub>f</sub>: concentración final de quistes/μl

% de recuperación:  $(C_f \times V_f (500 \mu l) / C_i \times V_i (2000 \mu l)) \times 100 =$

Vd/Vt: volumen de detritos / volumen total

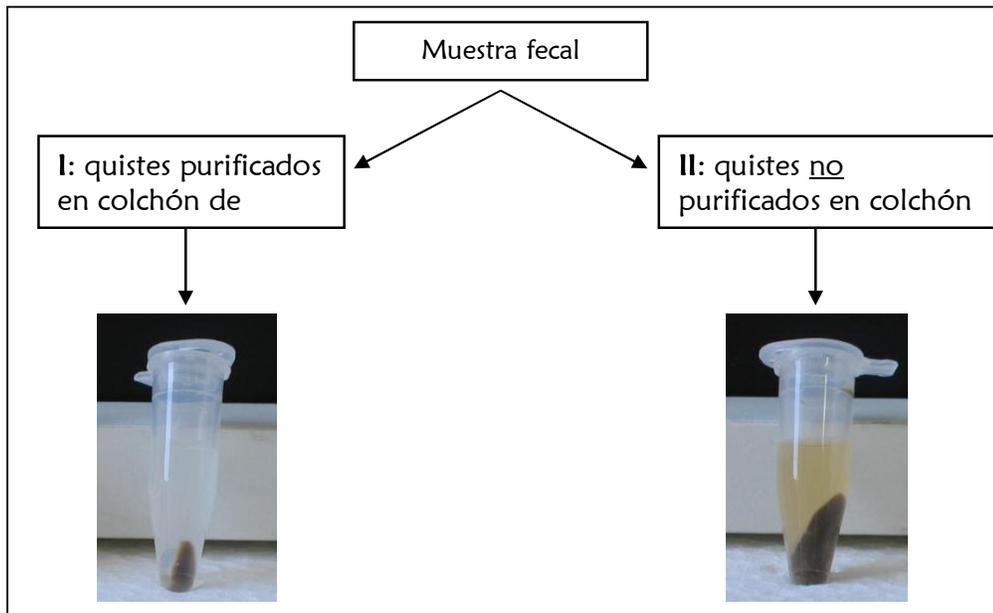
NC: No cuantificable; MT: Moderadamente turbio; L: Límpido, T: Turbio

La solución de sacarosa más densa permitió una buena separación de las fases (sacarosa-heces) con una interfase bien definida, el volumen de detritos fecales fue menor del 50% del total y los sedimentos presentaron menor turbidez. En cambio, la solución de sacarosa menos densa presentó una interfase menos definida, menor separación de las fases, mayor volumen de detritos y algunos sedimentos fecales resultaron tan turbios que no permitieron el recuento (NC).

### **6.1.2 Amplificación de ADN de quistes de *Giardia* obtenidos por colchón de sacarosa.**

El propósito de esta etapa fue evaluar la influencia de la utilización de quistes obtenidos en colchón de sacarosa sobre la amplificación de ADN de *G. lamblia* por PCR en una muestra de heces conservada en formol.

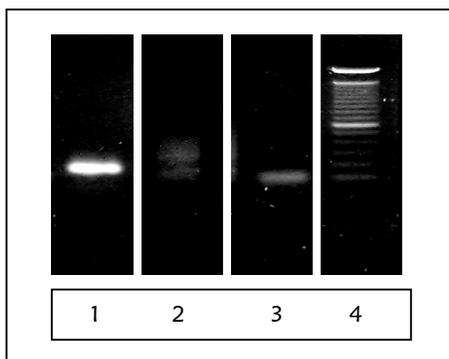
Se partió de una muestra fecal humana positiva para *Giardia* por microscopía óptica. Las heces fueron homogeneizadas, filtradas y centrifugadas en las condiciones mencionadas previamente. Luego se fraccionaron en dos alícuotas (I y II) cuya concentración inicial fue 210 Q/ $\mu$ l. Solamente la alícuota I recibió el tratamiento con colchón de sacarosa. Luego, ambas fracciones se centrifugaron y resuspendieron en el mismo volumen de PBS. La figura 6.4 muestra el resultado de ambos procedimientos.



**Figura 6.4:** Procesamiento de las alícuotas I y II previo a la ruptura de los quistes

La ruptura de los quistes de ambas alícuotas y la extracción de ADN se llevó a cabo utilizando los protocolos descritos previamente.

Posteriormente, se realizó una PCR semianidada (heminested) para la amplificación de un segmento del gen *tpi*, utilizando los primers diseñados por Amar y colaboradores (2002). Estos primers permiten la amplificación de los genotipos A y B de *G. lamblia* (Minvielle, 2005). La alícuota I amplificó con dicho protocolo resultando genotipo B. La alícuota II no pudo ser amplificada con esas condiciones de trabajo (figura 6.5).



**Figura 6.5:** Productos de amplificación de PCRIB: Línea 1: Alícuota I, línea 2: Alícuota II, línea 3: control negativo (AD), línea 4 marcador de peso molecular (100 bp).

## **6.2 Ruptura de quistes de *G. lamblia***

A la fecha se utiliza un protocolo de ruptura puesto a punto por Polverino y colaboradores (2004), el cual es adecuado para la lisis pero demanda varios días de proceso y posee gran número de pasos complejos dificultando el procesamiento de varias muestras en forma simultánea. Con el propósito de reducir los tiempos y simplificar el proceso pero sin perder eficiencia, se evaluaron varias modificaciones a la estrategia original de ruptura de quistes.

Ese procedimiento original (protocolo O) incluía la realización de 6 ciclos térmicos de una hora de duración cada uno (-80°C, 30 min/+80°C, 30 min) y 15 min a 100°C. Luego se incubaba a 37°C con buffer de lisis “D” (Tris-HCl 150mM, EDTA 100 mM, SDS 0.5%, NaCl 150 mM) durante 24 h. Se realizaba una trituración mecánica con lana de vidrio estéril y luego, una segunda incubación a 60°C con proteinasa K por 24 h. Tomando como base este protocolo se realizaron varias modificaciones que se resumen en la tabla 6.2.

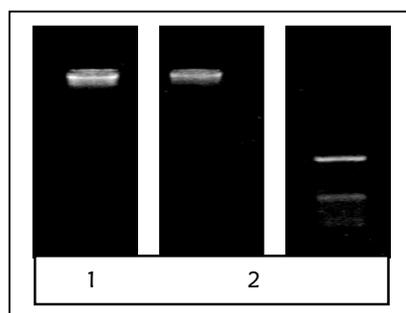
*Protocolo I:* 6 ciclos térmicos (-/+80°C, 30 min) y 15 min a 100°C. Incubación con buffer de lisis “E” (Tris-HCl 100 mM, EDTA 100 mM, SDS 2%, NaCl 0,2 M, Mercaptoetanol 1 mM, proteinasa K 1 mg/ml) (1:1) 18 h a 60°C.

*Protocolos II, III y IV:* 3, 4 o 5 ciclos térmicos (-/+80°C, 30 min) respectivamente y 15 min a 100°C. Incubación con buffer de lisis “E” (1:1) 18 h a 60°C.

**Tabla 6.2:** Condiciones de lisis de quistes de *Giardia* correspondientes a los 5 protocolos ensayados en esta tesis. O: Protocolo Polverino y col. (2004). I, II, III, IV: Protocolos ensayados.

Protocolo Utilizado	Número de ciclos térmicos	Buffer de lisis	Tiempo de Incubación (h)
O	6	D	48
I	6	E	18
II	3	E	18
III	4	E	18
IV	5	E	18

Luego de aplicar los distintos protocolos, el ADN de cada alícuota fue extraído según técnica previamente descrita. La obtención de ADN se verificó mediante su visualización en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Con todos los protocolos ensayados se observaron bandas fluorescentes de ADN (figura 6.6).



**Figura 6.6:** ADN obtenido con los protocolos de lisis I y II. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Línea 1: ADN, protocolo I, línea 2: ADN, protocolo II (3 ciclos térmicos); línea 3: marcador de peso molecular (100 bp)

Con el propósito de verificar si el ADN obtenido con el protocolo II de ruptura es adecuado para aplicaciones moleculares, se realizó la amplificación por PCR con el ADN de una materia fecal formolada positiva para *G. lamblia*.

Los quistes se purificaron mediante la técnica de colchón de sacarosa descrito y se contaron en cámara de Neubauer. Luego, se realizaron 6 diluciones en PBS y todas las alícuotas se procesaron simultáneamente con 2 protocolos de ruptura (O y II). Cada experimento se realizó por triplicado. El ADN de todas las alícuotas fue extraído con el protocolo descrito.

Posteriormente, se realizó una PCR semianidada con los primers publicados por Amar y col. (2002), utilizando el protocolo de amplificación descrito por Minvielle (2005). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.3.

**Tabla 6.3:** Resultados de amplificación por PCR de ADN de *G. lamblia* obtenido por los protocolos de lisis O y II, variando el número de quistes iniciales. (El signo + significa que al menos 1 de las reacciones triplicadas dio positiva).

Métodos de lisis	de	Resultados de PCR / Quistes <i>Giardia</i> $\mu$ l					
		240	120	60	30	15	10
O		+	+	+	+	-	-
II		+	+	+	+	+	-

O: Protocolo publicado por Polverino y col. (2004)

II: Protocolo puesto a punto en esta tesis

Como se observa en la tabla 6.3, con el protocolo II de ruptura se logró la amplificación de ADN desde 15 Q/ $\mu$ l, o sea el equivalente a 4,5 pg/ $\mu$ l de ADN de *Giardia* (Erlandsen y Rasch, 1994), superando al protocolo O, reportado por Polverino y col. (2004).

### **6.3 Amplificación de ADN de *Giardia* mediante Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR)**

En nuestro medio la recolección de las heces para el análisis parasitológico se realiza frecuentemente en forma seriada y con el agregado de conservantes tales como PAF (fenol-alcohol-formol), SAF (acetato de sodio-formol) o formol al 10%. Estas sustancias pueden alterar el ADN y desnaturalizar las proteínas, por lo tanto, la presencia de conservantes en las heces puede inhibir a las polimerasas y reaccionar con el ADN dificultando su posterior amplificación (Dowd y col., 1998; Carnevale y col., 2000; Lawson y col., 1997; Troll y col., 1997). Si bien, la refrigeración es el método de conservación de las heces más adecuado para estudios moleculares, la infraestructura necesaria para su utilización y la aplicación en hogares de distinto nivel socioeconómico, lo hacen poco práctico. Teniendo en cuenta que las muestras de heces fueron conservadas en formol, se realizaron varias experiencias con el objetivo de aumentar el porcentaje de amplificación del protocolo de PCR utilizado previamente para la genotipificación de *G. lamblia* en materia fecal formolada.

#### *Experiencia 1:*

Se seleccionaron 10 muestras fecales formoladas con distinto número de quistes de *Giardia* (30 a 210 Q/ $\mu$ l). La obtención y ruptura de los quistes, y la preparación de ADN se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos descritos previamente. Con los 10 ADN obtenidos se ensayaron 5 modificaciones al protocolo original publicado por Minvielle (2005). Cada modificación se realizó por separado y se evaluó mediante observación de los productos de amplificación de las PCR II en geles de agarosa. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 6.4.

**Tabla 6.4:** Resultados de amplificación de PCR con las distintas modificaciones ensayadas.

Protocolo de PCR y modificaciones	Muestras fecales amplificadas	Control + (A)	Control + (B)
Protocolo Minvielle 2005	7/10	1/1	1/1
I: Menor cantidad de ADN (PCR I)	8/10	0/1	1/1
II: Menor cantidad de primers (PCR I)	7/10	1/1	1/1
III: Aumento de T <sup>o</sup> alineamiento/ mayor N <sup>o</sup> ciclos (PCR II)	9/10	0/1	1/1
IV: Menor cantidad de amplificación (PCR II)	8/10	1/1	1/1
V: I + II + III + IV	9/10	1/1	1/1

Muestras fecales: Heces formoladas con quistes de *Giardia* detectados por microscopía  
 Control + (A): ADN de referencia genotipo A  
 Control + (B): ADN de referencia genotipo B

El ADN de la muestra no amplificada con el protocolo V, recibió un tratamiento de purificación posterior, reportado por Lawson y colaboradores (1997). Brevemente, el ADN fue incubado con polivinilpirrolidona (PVP) y precipitado con Acetato de amonio e isopropanol. La PCR realizada con este ADN resultó positiva.

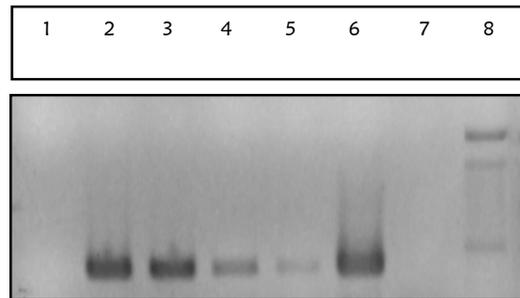
En secciones anteriores se mencionó que las heces contienen gran cantidad de sustancias potencialmente inhibidoras de PCR y que las distintas metodologías de obtención de ADN pueden no extraer todos estos inhibidores. (Al-Soud y Rådström, 1998, 2000; Lawson y col., 1997; McLauchlin y col., 1999). Entonces, se investigó la presencia de sustancias inhibidoras que pudieran estar presentes en un ADN obtenido con las metodologías descritas anteriormente. Para este análisis se seleccionó un ADN de *Giardia* extraído de heces humanas que no pudo ser amplificado y se realizaron dos experiencias:

*Experiencia 1: dilución del ADN no amplificado*

Una alícuota del ADN se diluyó 1/100 y nuevamente se realizó la PCR con el mismo protocolo del ensayo previo. En esta experiencia no se obtuvo producto de amplificación.

*Experiencia 2: mezcla de ADN no amplificado con ADN de referencia*

Ocho alícuotas del ADN se mezclaron con diluciones del ADN de referencia de *G. lamblia*. Brevemente, se realizaron 4 diluciones del ADN de referencia (1 ng/ $\mu$ l a 1 pg/ $\mu$ l) de cada genotipo (A y B). Cada dilución se mezcló 1:1 con el ADN que no amplificó por PCR (NA). Luego, cada mezcla se utilizó como molde para realizar la PCR con el mismo protocolo del ensayo previo. En esta experiencia se obtuvo producto de amplificación en todas las diluciones ensayadas para ambos genotipos (figura 6.7).



**Figura 6.7:** Amplificación de ADN de referencia genotipo A en MF (NA); gel de agarosa: Línea 1: ADN de materia fecal que no amplificó por PCR, Líneas 2-5: ADN de materia fecal que no amplificó más ADN de referencia genotipo A en diferentes concentraciones (1 ng/ $\mu$ l, 0.1 ng/ $\mu$ l, 10 pg/ $\mu$ l, 1 pg/ $\mu$ l), Línea 6: control positivo, Línea 7: control negativo, Línea 8: marcador de peso molecular (100 bp).

#### **6.4 Estimación del porcentaje de amplificación**

Con el propósito de estimar el porcentaje de amplificación de ADN de *G. lamblia* en un número mayor de muestras fecales, se analizaron 30 muestras de heces humanas positivas para *Giardia* conservadas en formol. Cada muestra fecal se procesó con los protocolos descritos previamente.

En esta experiencia se obtuvo la genotipificación de 24/30 (80%) muestras fecales y de todos los controles utilizados. Todas las muestras amplificadas presentaron genotipo B.

### **6.5 Estimación de la sensibilidad y especificidad de la aproximación experimental utilizada**

Para estimar la sensibilidad de la PCR se realizaron reacciones de amplificación con diluciones seriadas de ADN de referencia y de ADN de *G. lamblia* de heces formoladas (240 Q/ $\mu$ l) utilizando los protocolos descritos previamente.

Al utilizar ADN de referencia se obtuvo amplificación hasta una concentración de 1 pg/ $\mu$ l de ADN de *Giardia*. En cambio, con el ADN obtenido de las heces se logró amplificar a partir de 3 pg/ $\mu$ l de ADN de *Giardia*. Estos resultados estuvieron en concordancia con los reportados por Ghosh y colegas (2000) que lograron amplificar desde 2 pg/ $\mu$ l de ADN puro. Sin embargo, cuando colocaron los parásitos en heces requirieron mayor cantidad para obtener los mismos resultados.

Posteriormente, se analizó la especificidad de la PCR, utilizando ADN de parásitos fecales frecuentes en la población estudiada. No se obtuvieron productos de amplificación al usar ADN de *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Hymenolepis nana*, *Blastocystis hominis*, *Chilomastix mesnili* y *Entamoeba coli*. Además, el ADN de referencia de genotipo A sólo amplificó con los primers “A” y no con los primers “B”. Del mismo modo, el ADN de referencia de genotipo B sólo amplificó con los primers “B” y no con los “A”.

## 6.6 DISCUSIÓN

En la primera etapa de este objetivo se realizaron diversas experiencias para analizar las variables que pudieran influenciar la recuperación de quistes de *Giardia* presentes en heces formoladas.

En estas experiencias se observó que al utilizar heces más diluidas se recuperó mayor cantidad relativa de quistes y los pellets resultaron más limpios, tuvieron menor volumen de detritos y menor turbidez. Los resultados de estos ensayos coinciden con los publicados con Walker y col. (1998) donde el mayor porcentaje de recuperación (50%) se produjo con el inóculo inicial más bajo.

Los porcentajes de recuperación no tuvieron una relación directa con el número de quistes iniciales; pero se obtuvo mayor recuperación cuando el número inicial fue menor. Según Sauch (1984), las heces modifican el gradiente de sacarosa, interfieren en la formación de la interfase y retienen los elementos parasitarios. Entonces, el menor rendimiento de quistes en las alícuotas que contenían mayor cantidad de heces podría deberse a la adherencia de los elementos parasitarios a los detritos fecales dificultando su separación.

Según Zarlenga y Trout (2004), las condiciones de velocidad, volumen y tiempos de centrifugación deben ser empíricamente determinadas para cada tipo de muestra y de parásito. Entonces, con el fin de aumentar el porcentaje de recuperación de quistes, se modificaron otras variables como el tiempo o la velocidad de centrifugación. En ambos casos se observó un aumento de los detritos. El mismo resultado se obtuvo cuando se recolectaron los quistes de la interfase sacarosa-heces luego de realizado el gradiente.

La finalidad de esta etapa fue la optimización de una metodología para la obtención de quistes de *Giardia* provenientes de heces formoladas que tuviera una buena tasa de recuperación y que eliminara la mayor cantidad de detritos fecales y sustancias que pudieran interferir en la genotipificación de este protozoo. Si bien, ninguna de estas técnicas separó completamente los quistes de

las heces, se logró una metodología que produjo buena recuperación de quistes con baja cantidad de detritos fecales.

Cada tipo de muestra presenta desafíos únicos para el aislamiento, concentración y detección de los parásitos. Las heces contienen materia orgánica, moco, lípidos, células del huésped, bacterias, hongos, polen y alimentos parcialmente digeridos. Según Zarlenga y Trout (2004), estos componentes pueden atrapar a los parásitos impidiendo su separación, interferir en la formación del gradiente de sacarosa o inhibir la PCR.

La obtención de quistes en colchón de sacarosa favoreció la amplificación por PCR de ADN de *Giardia* proveniente de materia fecal formolada. Este ensayo tuvo resultados concordantes con el trabajo reportado por Harmon y col. (2007) que purificaron huevos de parásitos intestinales con una solución de sacarosa de la misma densidad utilizada en esta tesis y encontraron que la técnica aplicada reduce el efecto inhibitorio sobre la PCR porque diluye los preservantes y otras sustancias potencialmente inhibitorias.

A diferencia de las bacterias, los quistes parasitarios poseen cubiertas altamente resistentes a las condiciones ambientales y de laboratorio. Los quistes de *G. lamblia* poseen una pared filamentosa compuesta de proteínas e hidratos de carbono. Estos quistes sobreviven en agua fría durante semanas y resisten condiciones de lisis con ácido clorhídrico, enzimas proteolíticas, sonicación o ruptura mecánica (Eligio-García y col. 2002; Jiang y col., 2005; Minvielle, 2005). Existe abundante información sobre estrategias de lisis parasitaria, diferentes buffers, ruptura mecánica, ciclos térmicos, tratamientos de calor y álcali, lisozima, proteinasa K o calentamiento en soluciones hipo o hiperosmolares, pero el método de ruptura debe ponerse a punto con cada tipo de muestra y cada tipo de parásito (Goldschmidt y col., 2008; Jiang y col., 2005; Menghi y col., 2006; Morgan y col., 1998; Nantavisai y col. 2007). Entonces, con el propósito de reducir los tiempos y simplificar el proceso de lisis parasitaria, sin perder eficiencia, se evaluaron varias modificaciones a la estrategia original de ruptura de quistes. Si bien, con todos los procedimientos ensayados se

obtuvo ADN, se seleccionó el protocolo II que produjo ADN con menor número de pasos y menor tiempo experimental.

Con el propósito de verificar si el ADN obtenido con el protocolo de ruptura es adecuado para aplicaciones moleculares, se realizó la amplificación por PCR con el ADN obtenido. En este ensayo se obtuvo amplificación hasta de ADN desde 15 Q/ $\mu$ l, o sea el equivalente a 4,5 pg/ $\mu$ l de ADN de *Giardia*. En la literatura consultada, valores similares fueron obtenidos por otros investigadores (Bertrand y col. 2005; Rochelle y col., 1997). Los resultados de esta experiencia fueron mayores que los reportados por Nantavisai y col. (2007), que obtuvieron una sensibilidad de amplificación de 3 a 4 Q/ $\mu$ l. Sin embargo, a diferencia de esos investigadores, las heces procesadas en esta tesis estaban conservadas en formol, sustancia que puede interferir con la amplificación por PCR (Dowd y col., 1998; Troll y col., 1997).

Diversos autores han demostrado que la genotipificación de parásitos por PCR a partir de materia fecal depende de la calidad y cantidad del ADN purificado y de la eliminación de una gran variedad de inhibidores presentes en las heces. Los inhibidores de PCR más comunes incluyen hemoglobina, bilirrubina, urea, calcio, metales pesados, compuestos fenólicos y orgánicos, enzimas, microorganismos, detergentes, talco, grasas, polisacáridos, celulosa, antibióticos y conservantes, entre otros. (Al-Soud y Rådström, 1998, 2000; Lawson y col., 1997; McLauchlin y col., 1999). Se realizaron 2 ensayos para evaluar la presencia de sustancias inhibitoras. En la primera experiencia, la ausencia de amplificación pudo estar asociada a sustancias interferentes que no revirtieron su efecto por la dilución del ADN o que la utilización de formol como conservante produjo la degradación de los ácidos nucleicos. Nechvatal y col. (2008) han comparado la amplificación por PCR utilizando ADN diluido y sin diluir. Ellos consideraron que un resultado positivo en muestras diluidas que no habían amplificado previamente podría indicar la presencia de inhibidores de PCR y que un resultado negativo estaría asociado a la alteración del ADN que impediría su amplificación.

En la segunda experiencia, se obtuvo amplificación cuando se mezcló ADN de referencia con el ADN obtenido de heces formoladas. Según diversos autores, la adición de ADN de mejor calidad o en mayor cantidad, podría reducir el efecto de las sustancias interferentes en la reacción y permitir la amplificación en muestras que no podían ser amplificadas. (Al-Soud y Rådström, 1998, 2000; Wilson, 1997).

En suma, los efectos inhibitorios involucran múltiples causas e interacciones complejas difíciles de distinguir, sin embargo, pueden ser minimizados optimizando las condiciones de ciclado y asegurando cantidades adecuadas de todos los reactantes de la mezcla de reacción.

Con el fin de aumentar el número de muestras amplificadas, se realizaron diversas modificaciones al protocolo de PCR utilizado que permitió la amplificación de la mayoría de las muestras y de todos los controles. Por último, el tratamiento con PVP permitió la genotipificación de todas las muestras y de los controles ensayados.

Los porcentajes de amplificación de ADN de *Giardia* publicados muestran grandes variaciones, desde 10 hasta 100% de genotipificación en heces positivas. Este valor depende de innumerables factores, el tipo de muestra, el ensayo de PCR utilizado, el agregado de conservantes, el gen seleccionado y el parásito que se desea genotipificar, entre otros. (Pelayo y col. 2008; Pérez Córdón y col., 2008; Traub y col., 2004; van der Giessen y col., 2006; Volotao y col., 2007).

La mayoría de los estudios de genotipificación publicados han utilizado heces frescas sin preservantes. Fotedar y colaboradores (2007) indicaron un porcentaje de amplificación del 81% en muestras fecales frescas con *Entamoeba* spp. Del mismo modo, Amar y col. (2002) reportaron una amplificación del 88% de ADN de *Giardia* en muestras fecales. Otros autores lograron amplificar más del 90% del ADN parasitario aunque las muestras fecales no contenían conservantes (Eligio-García y col., 2008; Ghosh y col., 2000).

En cambio, otros autores obtuvieron porcentajes de amplificación menores. Un estudio reciente en niños cubanos reportó la amplificación del 22% de las muestras positivas (Pelayo y col., 2008). Asimismo, Pérez Cordón y colaboradores (2008) sólo pudieron amplificar 16 de las 210 heces frescas positivas para *Giardia*; al igual que Bertrand y col., (2005) que lograron amplificar 12 de 18 heces con quistes de *Giardia* y Hamzah y col. (2006) que reportaron la amplificación del 33% de las muestras con varias especies de *Entamoeba*. Sin embargo, Menghi y col (2006) reportaron que no pudieron amplificar ADN de *Dientamoeba fragilis* proveniente de heces con SAF.

En esta tesis se logró la amplificación del 80% de las heces formoladas con *Giardia*. Este porcentaje de amplificación está en concordancia con lo publicado por otros autores que procesaron heces con distintos fijadores. Ejemplos de ello, Gelanew y col. (2007) procesaron 80 muestras fecales con dicromato de potasio y genotipificaron el 74% de las heces con *Giardia*. Troll y colegas (1997) procesaron muestras fecales con SAF y lograron amplificar el 66% de las heces positivas.

La amplificación de ADN en muestras biológicas complejas presenta menor sensibilidad que al utilizar ADN puro, fundamentalmente asociado a la presencia de numerosos inhibidores o conservantes que reaccionan con el ADN dificultando su posterior amplificación (Al-Soud y Rådström, 2000; Carnevale y col., 2000; Dowd y col., 1998; Lawson y col., 1997; Troll y col., 1997; Wilson, 1997). En este caso, la menor sensibilidad de la reacción con ADN proveniente de las heces pudo estar asociada a la menor calidad del ADN, a la utilización del formol como conservante o a la presencia de numerosas sustancias interferentes que dificultaron la amplificación del ADN parasitario.

Debido a la complejidad de las muestras fecales y la presencia de numerosas sustancias inhibidoras de las reacciones de amplificación molecular, la finalidad de estos procedimientos fue la puesta a punto de la metodología. Este

capítulo se enfocó en la optimización de las técnicas de trabajo para la obtención y ruptura de quistes de *Giardia* y la amplificación de ADN de *Giardia* proveniente de heces conservadas en formol. Con respecto a la obtención de quistes, se logró un método con buena recuperación de parásitos y baja cantidad de detritos fecales. En relación a la ruptura de elementos parasitarios de *Giardia*, se obtuvo un procedimiento más simple que permitió procesar un mayor número de muestras en forma simultánea y que permitió la lisis quística sin perder eficiencia. Por último, se optimizó un protocolo de PCR que presentó mayor sensibilidad y que permitió aumentar el número de muestras fecales genotipificadas.

- Se detectó el genotipo B en 83% de las personas parasitadas con *G. lamblia* y el genotipo All en 13%. Se detectó por primera vez en Argentina la infección mixta con los genotipos All y B en 3 niños mendocinos. El genotipo B fue encontrado en todas las localidades estudiadas, tanto urbanas como rurales, mientras que el genotipo All sólo se halló en zonas urbanizadas.
- Se halló el genotipo B en 64% de los perros y 86% de los terneros infectados con *Giardia*. Este último resultado pone en evidencia por primera vez en Argentina la infección de terneros con genotipo B.
- Se encontraron 2 hogares de zonas rurales en los que al menos un niño estaba parasitado con el mismo genotipo (B) de *Giardia* que los perros y terneros del lugar reforzando la hipótesis de transmisión zoonótica.
- Se halló un predominio de genotipo B de *Giardia* en el sexo femenino. Los niños parasitados con genotipo All presentaron una edad significativamente menor que los infectados con B. Esto podría indicar una predisposición a la infección con genotipo All de niños debido a la inmadurez inmunológica y/o a la virulencia de la cepa infectante.
- Se halló una asociación significativa entre la presencia de *Giardia* genotipo B y la eliminación de residuos a cielo abierto en zonas rurales. En las zonas urbanas, donde existían ambos genotipos, se observaron diferencias significativas entre la infección por *Giardia* genotipo All y la ausencia de cloacas en las viviendas de la zona.
- No se observaron diferencias significativas entre la presencia de signos/síntomas y el genotipo infectante. Se observó una tendencia a presentar menor signosintomatología a mayor edad del infectado.
- Se optimizó la metodología de obtención de quistes de *Giardia* logrando una recuperación cercana al 50% de los quistes presentes en heces formoladas con un volumen de detritos fecales contaminantes menor que 10%. Se demostró que la utilización de la metodología de colchón de sacarosa favoreció la amplificación de ADN de *Giardia* por PCR.
- Se redujo en 60% los tiempos de ruptura de quistes y se eliminaron varios pasos respecto de los procedimientos publicados, obteniendo un método más

simple y rápido que permitió procesar mayor número de muestras en forma simultánea. Con el protocolo utilizado se lograron reacciones positivas para *Giardia* a partir del ADN de aproximadamente 15 quistes por mezcla de reacción superando sustancialmente los protocolos anteriormente aplicados.

- Se logró un aumento en el porcentaje de genotipificación, cercano al 80% de las muestras fecales formoladas con quistes de *G. lamblia* detectados por microscopía.

Teniendo en cuenta que la giardiosis se presenta de manera endémica en varias zonas de Argentina y que se transmite por contacto interpersonal, ingestión de agua o alimentos contaminados, los resultados presentados en este trabajo de tesis contribuirán al conocimiento de los genotipos que afectan a los pobladores de las distintas zonas estudiadas, las posibles vías de transmisión zoonótica, la determinación de las posibles fuentes de infección y la asociación con factores clínico-epidemiológicos.

- Abdul-Wahid A, Faubert GM.** 2004. Similarity in cyst wall protein (CWP) trafficking between encysting *Giardia duodenalis* trophozoites and CWP-expressing human embryonic kidney-293 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 1069-1080.
- Adam RD, Nash TE, Wellemis TE.** 1988. The *Giardia lamblia* trophozoite contains sets of closely related chromosomes. *Nucleic Acids Res* 16: 4555-4567.
- Adam RD.** 2000. The *Giardia lamblia* genome. *Int J Parasitol* 20: 475-484.
- Adam RD.** 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14: 447-475.
- Adams PJ, Monis PT, Elliot AD, Thompson RCA.** 2004. Cyst morphology and sequence analysis of the small subunit rDNA and efl identifies a novel *Giardia* genotype in a quenda (*Isodon obesulus*) from Western Australia. *Infect Genet Evol* 4: 365-370.
- Ali SA, Hill DR.** 2003. *Giardia intestinalis*. *Curr Op Infect Dis* 16: 453-460.
- Almeida AA, Delgado ML, Soares SC, Castro AO, Moreira MJ, Mendonça CM, Canadá NB, Da Costa JM.** 2006. Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. *J Eukaryot Microbiol* 53, Supl 1:177-178.
- Al-Soud WA, Rådström P.** 1998. Capacity of Nine Thermostable Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples. *Appl Environ Microbiol* 64: 3748-3753.
- Al-Soud WA, Rådström P.** 2000. Effects of Amplification Facilitators on Diagnostic PCR in the Presence of Blood, Feces and Meat. *J Clin Microbiol* 38: 4463-4470.
- Alvarado BE, Vásquez LR.** 2006. Determinantes sociales, prácticas de alimentación y consecuencias nutricionales del parasitismo intestinal en niños de 7 a 18 meses de edad en Guapi, Cauca. *Biomédica* 26: 82-94.
- Alvarado ME, Wasserman M.** 2006. Quick and efficient purification of *Giardia intestinalis* cysts from fecal samples. *Parasitol Res* 99: 300-302.
- Amar CFL, Dear PH, Pedraza-Díaz S, Looker N, Linnane E, McLaughlin J.** 2002. Sensitive PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay

for Detection and Genotyping of *Giardia duodenalis* in Human Feces. J Clin Microbiol 40: 446-452.

**Amaya JC, Barrionuevo L, Díaz Ariza M, Cuffia V, Guerra N, Juncos L, Córdoba P.** 2006. Parásitos entéricos de mascotas en la ciudad de La Rioja y su relación con las enteroparasitosis de niños. Act Bioquím Clín Latinoam suppl 3: 237.

**Appelbee AJ, Frederick LM, Heitman TL, Olson ME.** 2003. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. Vet Parasitol 112: 289-294.

**Aydin AF, Besirbellioglu BA, Avci IY, Tanyuksel M, Araz E, Pahsa A.** 2004. Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into Groups A and B using restriction fragment length polymorphism. Diagn Microbiol Infect Dis 50: 147-151.

**Baruch AC, Isaac-Renton J, Adam RD.** 1996. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. J Infect Dis 174: 233-236.

**Barutzki D, Thompson RCA, Wielinga C, Parka U, Schaper R.** 2007. Observations on *Giardia* Infection in Dogs from Veterinary Clinics in Germany. Parasitol Res 101: S153-S156.

**Becher KA, Robertson ID, Fraser DM, Palmer DG, Thompson RCA.** 2004. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. Vet Parasitol 123:1-9.

**Benchimol M.** 2004. The release of secretory vesicle in encysting *Giardia lamblia*. FEMS Microbiol Lett 235: 81-87.

**Benchimol M, Piva B, Campanati L, de Souza W.** 2004. Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy-new insights. J Struct Biol 147: 102-115.

**Bernarder R, Palm JED, Svard SG.** 2001. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. Cell Microbiol 3: 55-62.

**Berrilli F, Di Cave D, De Liberato C, Franco A, Scaramozzino P, Orecchia P.** 2004. Genotype characterisation of *Giardia duodenalis* isolates from

- domestic and farm animals by SSU-rRNA gene sequencing. *Vet Parasitol* 122: 193-199.
- Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J.** 2005. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Microbiol* 43: 5940-5944.
- Boletín EPA 823-R-002.** *Giardia*: risk for infants and children. Disponible en <http://www.epa.gov>. Consultado en mayo de 2007.
- Buret A, Hollander N, Wallis PM, Befus D, Olson ME.** 1990. Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. *J Infect Dis* 162: 231-237.
- Buret AG.** 1994. Pathogenesis – how does *Giardia* cause disease?. En: Thompson RCA, Reynoldson JA, Lymbery AJ, Editores, *Giardia: From Molecules to Disease*, CAB, Wallingford, 293–315.
- Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E.** 2002. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a PCR–RFLP assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol* 32:1023-1030.
- Cacciò SM, Thompson RCA, McLauchlin J, Smith HV.** 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* 21: 430-437.
- Cacciò SM, Ryan U.** 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol* 160: 75-80.
- Carnevale S, Velásquez J, Labbé JH, Chertcoff A, Cabrera MG, Rodríguez MI.** 2000. Diagnostic of *Enterocytozoon bieneusi* by PCR in Stool Samples Eluted from Filter Paper Disks. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 504-506.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention.** Consultado en marzo de 2006. Disponible en <http://www.dpd.cdc.gov.dpd>
- Cedillo-Rivera R, Darby JM, Enciso-Moreno JA, Ortega-Pierres G, Ey PL.** 2003. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. *Parasitol Res* 90: 119-123.

- Coklin T, Farber J, Parrington L, Dixon B.** 2007. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol* 150: 297-305.
- Cueto Rua A, Feldman R.** 2006. Capítulo: Giardiosis. En: *Microbiología Biomédica*. Basualdo JA, Coto C, de Torres RA. Segunda Edición. Ed. Atlante, Buenos Aires, Argentina.
- Dowd SE, Gerba CP, Enriquez FJ, Peper IL.** 1998. PCR Amplification and Species Determination of Microsporidia in Formalin-Fixed Feces after Immunomagnetic Separation. *Appl Environ Microbiol* 64: 333-336.
- Eckmann L, Gillin FD.** 2001. Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial- Mucosal Interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Am J Pathol* 280: 1-6.
- Eligio García L, Galván SC, Jiménez Cardoso E.** 2002. Distancia filogenética de aislados de *Giardia intestinalis* de niños sintomáticos y asintomáticos. *Rev Invest Clin* 54: 113-118.
- Eligio García L, Cortes-Campos A, Jiménez Cardozo E.** 2005. Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasitol Res* 97: 1-6.
- Eligio-García L, Cortes-Campos A, Cota-Guajardo S, Gaxiola S, Jiménez-Cardoso E.** 2008. Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using beta-giardin restriction gene. *Vet Parasitol* 156: 205-209.
- El-Shazly AM, Mowafy N, Soliman M, El-Bendary M, Morsy AT, Ramadan NI, Arafa WA.** 2004. Egyptian genotyping of *Giardia lamblia*. *J Egypt Soc Parasitol* 34: 265-280.
- Erlandsen SL, Rasch EM.** 1994. The DNA content of trophozoites and cysts of *Giardia lamblia* by microdensitometric quantitation of Feulgen staining and examination by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 42: 1413-1416.

- Ey PL, Khanna K, Andrews RH, Manning PA, Mayrhofer G.** 1992. Distinct genetic groups of *Giardia intestinalis* distinguished by restriction fragment length polymorphisms. *J Gen Microbiol* 138: 2629-2637.
- Ey PL, Mansouri M, Kulda J, Nohynkova E, Monis PT, Andrews R, Mayrhofer G.** 1997. Genetic analysis of *Giardia* from hoot farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J Euk Microbiol* 44: 626-635.
- Farthing MJ.** 1997. The molecular pathogenesis of giardiasis. *J Ped Gastroenterol Nutr* 24: 79-88.
- Faubert G.** 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev* 13: 35-54.
- Feldman R, Guardis M.** 1990. Diagnóstico coproparasitológico. Fundamentos, normas, metodología, control de calidad. Nueva Guía Práctica. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires, La Plata. Argentina
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J.** 2007. PCR Detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in Stool Samples from Sydney, Australia. *J Clin Microbiol* 45: 1035-1037.
- Gamboa MI, Basualdo JA, Córdoba MA, Pezzani BC, Minvielle MC, Lahitte HB.** 2003. Distribution of intestinal parasitosis in relation to environmental and sociocultural parameters in La Plata, Argentina. *J Helminthol* 77: 15-20.
- Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò S.** 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop* 102: 92-99.
- Ghosh S, Debnath A, Sil A, De S, Chattopadhyay DJ, Das P.** 2000. PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. *Mol Cell Probes* 14: 181-189.
- Giangaspero A, Berrilli F, Brandonisio O.** 2007. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitol Res* 101: 1169-1182.

- Goldschmidt P, Degorge S, Saint-Jean C, Year H, Zekhnini F, Batellier F, Laroche L, Chaumeil C.** 2008. Resistance of *Acanthamoeba* to classic DNA extraction methods used for the diagnosis of corneal Infections. *Br J Ophthalmol* 92: 112-115.
- Guy RA, Xiao C, Horgen PA.** 2004. Real-Time PCR Assay for Detection and Genotype Differentiation of *Giardia lamblia* in Stool Specimens. *J Clin Microbiol* 42: 3317-3320
- Hamzah Z, Petmitr S, Mungthin M, Leelayoova S, Chavalitsheewinkoon-Petmitr P.** 2006. Differential Detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* by a Single-Round PCR Assay. *J Clin Microbiol* 44: 3196-3200.
- Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER.** 2005. *Giardia* Assemblage A Infection and Diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis* 192: 2171-2173.
- Harmon A, Williams Z, Holler L, Hildreth M.** 2007. Comparison of three different preservatives for morphological and real-time PCR analyses of *Haemonchus contortus* eggs. *Vet Parasitol* 145: 361-365.
- Hawrelak J.** 2003. Giardiasis: pathophysiology and management. *Altern Med Rev* 8: 129-142.
- Hehl A.** 2007. Consultado en junio de 2007. Disponible en [http://www.izb.unibe.ch/res/roditi/Lehr/2007/07\\_Giardia.pdf](http://www.izb.unibe.ch/res/roditi/Lehr/2007/07_Giardia.pdf)
- Hehl AB, Marti M.** 2004. Secretory protein trafficking in *Giardia intestinalis*. *Mol Microbiol* 53: 19-28.
- Hehl AB, Regos A, Schraner E, Schneider A.** 2007. Bax Function in the Absence of Mitochondria in the Primitive Protozoan *Giardia lamblia*. *PLoS ONE* 2: e488.
- Homan WL, Mank TG.** 2001. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol* 31: 822-826.
- Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC.** 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol* 83:44-51.

- Hopkins RM, Constantine CC, Groth DA, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RCA.** 1999. PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. *Parasitology* 118: 531-539.
- Hughes S, Kelly P.** 2006. Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. *Parasite Immunol* 28: 577-588.
- Humen MA, De Antoni GL, Benyacoub J, Costas ME, Cardozo MI, Kozubsky L, Saudan K, Boenzli-Bruand A, blue S, Schiffrin EJ, Pérez PF.** 2005. *Lactobacillus johnsonii* La1 Antagonizes *Giardia intestinalis* In Vivo. *Infect Immun* 73: 1265-1269.
- Innis MA, Gelfand DH.** 1990. Optimization of PCRs. Part one. Basic Methodology. En: PCR Protocols. A guide to Methods and Applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press. Toronto.
- Inpankaew T, Traub RJ, Thompson RC, Sukthana Y.** 2007. Canine parasitic zoonoses in Bangkok temples. *South Asian J Trop Med Public Health* 38: 247-255.
- Jiang J, Alderisio KA, Singh A, Xiao L.** 2005. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Appl Environ Microbiol* 71: 1135-1141.
- Kedzierski L, Montgomery J, Curtis J, Handman E.** 2004. Leucine-rich repeats in host-pathogen interactions. *Arch Immunol Ther Exp* 52: 104-112.
- Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, Lima AM, Guerrant RL.** 2008. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 718-725.
- Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò M.** 2005. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 35: 207-213.

- Langkjær RB, Vigre H, Enemark HL, Maddox-Hyttel C.** 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology* 134: 339-350.
- Lawson AJ, Linton D, Stanley J, Owen RJ.** 1997. Polymerase chain reaction and speciation of *Campylobacter upsaliensis* and *C. helveticus* in human feces and comparison with culture techniques. *J Appl Microbiol* 83: 375-380.
- Le Blancq SM, Adam RD.** 1998. Structural basis for karyotype heterogeneity in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 97: 199-208.
- Lebbad M, Ankarklev J, Tellez A, Leiva B, Andersson JO, Svard S.** 2008. Dominance of *Giardia* assemblage B in León, Nicaragua. *Acta Trop* 106: 44-53.
- LeChevallier MW, Norton WD, Siegel JE, Abbaszadegan M.** 1995. Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Appl Environ Microbiol* 61: 690-697.
- Leonhard S, Pfister K, Beelitz P, Wielinga C, Thompson RCA.** 2007. *The molecular characterization of Giardia from dogs in southern Germany. Vet Parasitol* 150: 33-38.
- López Santorno MS, Garraza M, Gamboa MI, Zonta ML, Navone GT.** 2006. Enteroparasitosis en la población infantil de Fuerte Esperanza, Chaco, Argentina. *Act Bioquim Clin Latinoam suppl* 3: 235.
- Luchtel DL, Lawrence WP, DeWalle FB.** 1980. Electron Microscopy of *Giardia lamblia* Cysts. *Appl Environ Microbiol* 40: 821-832.
- Lujan HD, Mowatt MR, Conrad JT, Bowers B, Nash TE.** 1995. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *J Biol Chem* 270: 29307-29313.
- Lujan HD, Mowatt MR, Byrd LG, Nash TE.** 1996. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7628-7633.

- Lujan HD, Mowatt MR, Nash TE.** 1997. Mechanism of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 294-304.
- Lujan HD, Mowatt MR, Nash TE.** 1998. The molecular mechanisms of *Giardia* encystation. *Parasitol Today* 14: 446-450.
- Luján HD, Touz MC.** 2003. Protein trafficking in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol* 5: 427-434.
- Mahbubani MH, Bej AK, Perlin MH, Schaefer FW, Jakubowski W, Atlas RM.** 1992. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *J Clin Microbiol* 30: 74-78.
- Marti M, Hehl AB.** 2003. Encystation-specific vesicles in *Giardia*: a primordial Golgi or just another secretory compartment? *Trends Parasitol* 19: 440-446.
- Massanet-Nicolau J.** 2003. New Method Using Sedimentation and Immunomagnetic Separation for Isolation and Enumeration of *Cryptosporidium parvum* Oocysts and *Giardia lamblia* cysts. *Appl Environ Microbiol* 69: 6758-6761.
- 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: 11-17.
- McIntyre L, Hoang L, Ong CSL, Lee P, Isaac-Renton JL.** 2000. Evaluation of molecular techniques to biotype *Giardia duodenalis* collected during an outbreak. *J Parasitol* 86: 172-7.
- McLauchlin J, Pedraza-Díaz S, Amar-Hoetzeneder C, Nichols GL.** 1999. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *J Clin Microbiol* 37: 3153-3158.
- Meloni BP, Lymbery AJ, Thompson RCA.** 1995. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. *J Parasitol* 81: 368-383.

- Menghi CI, Gatta CI, Makiya R, Méndez OC.** 2006. Detección molecular de *Dientamoeba fragilis* en heces: eliminación de los inhibidores de la DNA polimerasa. *Parasitol Latinoam* 61: 146-151.
- Minvielle MC, Pezzani BC, Córdoba MA, De Luca, MM, Apezteguía MC, Basualdo JA.** 2004. Epidemiological survey of *Giardia* spp. and *Blastocystis hominis* in an Argentinian rural community. *Korean J Parasitol* 42: 121-127.
- Minvielle M.** 2005. Tesis de Maestría en Microbiología Molecular. UNSAM.
- Moncada DM, Kammanadiminti SJ, Chadee K.** 2003. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends Parasitol* 19: 305-311.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL.** 1999. Molecular Systematics of the Parasitic Protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol* 16: 1135-1144.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL.** 2003. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol* 3: 29-38.
- Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RCA.** 1998. Comparison of PCR and Microscopy for Detection of *Cryptosporidium parvum* in Human Fecal Specimens: Clinical Trial. *J Clin Microbiol* 36: 995-998.
- Muller N, von Allmen N.** 2005. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol* 35: 1339-1347
- Nantavisai K, Mungthin M, Tan-ariya P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S.** 2007. Evaluation of the Sensitivities of DNA Extraction and PCR Methods for detection of *Giardia duodenalis* in Stool Specimens. *J Clin Microbiol* 45: 581-583.
- Nash TE, Mowatt MR.** 1992. Characterization of a *Giardia lamblia* variant-specific surface protein (VSP) gene from isolate GS/M and estimation of the VSP gene repertoire size. *Mol Biochem Parasitol* 51: 219-227.

- Nash TE, Luján HD, Mowatt MR, Conrad JT.** 2001. Variant-Specific Surface Protein Switching in *Giardia lamblia*. *Infect immun* 69: 1922-1923.
- Nash TE.** 2002. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol* 45: 585-590.
- Nechvatal JM, Ram JL, Basson MD, Namprachan P, Niec SR, Badsha KZ, Matherly LH, Majumdar APN, Kato-Ikuko P.** 2008. Fecal collection, ambient preservation, and DNA extraction for PCR amplification of bacterial and human markers from human feces. *J Microbiol Methods* 72: 124-132.
- Noemí I, Atías A.** 1993. *Parasitología clínica*. Cuarta Edición. Ed. Mediterráneo.
- O'Handley RM, Olson ME, Fraser D, Adams P, Thompson RCA.** 2000. Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. *Vet Parasitol* 90: 193-200.
- Ortega YR, Adam RD.** 1997. *Giardia*: Overview and Update. *Clin Infect Dis* 25: 545-550.
- Paintlia AS, Mahajan RC, Chakraborti A, Sehgal R, Ganguly NK.** 1999. Characterization of *Giardia lamblia* groups A and B from North India by isoenzyme and random amplified polymorphic DNA analysis. *Parasitol Res* 85: 510-512.
- Palmer CS, Traub RJ, Robertson ID, Devlin G, Rees R, Thompson RCA.** 2008. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. [Vet Parasitol](#) 154: 142-147.
- Pelayo L, Nuñez FA, Rojas L, Furuseth Hansen E, Gjerde B, Wilke H, Mulder B, Robertson L.** 2008. *Giardia* infections in Cuban children: the genotypes circulating in a rural population. [Ann Trop Med Parasitol](#) 102: 585-595.
- Peréz-Cordón G, Cordova Paz Soldan O, Vargas Vásquez F, Velasco Soto J, Sempere Bordes LI, Sánchez Moreno M, Rosales M.** 2008. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. *Parasitol Res* 2008, 103: 459-465.

- Perez PF, Minnaard J, Rouvet M, Knabenhans C, Brassart D, De Antoni GL, Schiffrin EJ.** 2001. Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from Lactobacilli: an in vitro study. *Appl Environ Microbiol* 67: 5037-5042.
- Pierangeli NB, Giayetto AL, Manacorda AM, Barbieri LM, Soriano SV, Veronesi A, Pezzani BC, Minvielle MC, Basualdo JA.** 2003. Estacionalidad de parásitos intestinales en suelos periurbanos de la ciudad de Neuquén, Patagonia, Argentina. *Trop Med Int Health* 8: 259-263.
- Polverino D, Molina NB, Minvielle MC, Lozano ME, Basualdo JA.** 2004. Técnicas de purificación y ruptura de *Giardia* spp. *Rev Arg Microbiol* 36: 97-100.
- Ponce-Macotela M, Martínez-Gordillo MN, Bermúdez-Cruz RM, Salazar-Schettino PM, Ortega-Pierres G, Ey PL.** 2002. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. [Int J Parasitol](#) 32: 1201-1202.
- Ratanapo S, Mungthin M, Soontrapa S, Faithed C, Siripattanapipong S, Rangsin R, Naaglor T, Piyaraj P, Taamasri P, Leelayoova S.** 2008. Multiple Modes of Transmission of Giardiasis in Primary Schoolchildren of a Rural Community, Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 78: 611-615.
- Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RCA.** 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and Diarrhoea. *Int J Parasitol* 32: 229-231.
- 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: 125-130.
- Ribeiro Moitinho ML, Bértoli M, Guedes TA, Ferreira CS.** 1999. Influence of Refrigeration and Formalin on the Floatability of *Giardia duodenalis* Cysts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 571-574.
- Rimhanen-Finne R, Ronkainen P, Hänninen ML.** 2001. Simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* in sewage sludge by IC-PCR. *J Appl Microbiol* 91: 1030-1035.

- Rimhanen-Finne R, Hörman A, Ronkainen P, Hänninen ML.** 2002. An IC-PCR method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural surface waters in Finland. *J Microbiol Methods* 50: 299-303.
- Rochelle PA, De León R, Stewart MH, Wolfe RL.** 1997. Comparison of Primers and Optimization of PCR Conditions for Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in Water. *Appl Environ Microbiol* 63: 106-114.
- Roxström-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svärd SG.** 2006. *Giardia* immunity--an update. *Trends Parasitol* 22: 26-31.
- Sagolla MS, Dawson SC, Mancuso JJ, Cande WZ.** 2006. Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *J Cell Sci* 119: 4889-4900.
- Sahagún J, Clavel A, Goñi P, Seral C, Llorente MT, Castillo FJ, Capilla S, Arias A, Gómez-Lus R.** 2008. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27: 81-83.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Tercera Edición. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sauch J.** 1984. Purification of *Giardia muris* Cysts by Velocity Sedimentation. *Appl Environ Microbiol* 48: 454-455.
- Singer SM, Nash TE.** 2000. The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *J Infect Dis* 181: 1510-1512.
- Singer SM, Elmendorf HG, Conrad JT, Nash TE.** 2001. Biological selection of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia*. *J Infect Dis* 183: 119-124.
- Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L.** 2003. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis* 9: 1444-1452.
- Sulaiman IM, Jiang J, Singh A, Xiao L.** 2004. Distribution of *Giardia duodenalis* Genotypes and Subgenotypes in Raw Urban Wastewater in Milwaukee, Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 70: 3776-3780.

- Sun C, McCaffery JM, Reiner DS, Gillin FD. 2003. Mining the *Giardia lamblia* Genome for New Cyst Wall Proteins. *J Biol Chem* 278: 21701-21708.
- Thompson RCA, Hopkins RM, Homan WL. 2000. Nomenclature and Genetic Groupings of *Giardia* Infecting Mammals. *Parasitol Today* 16: 210-213.
- Thompson RCA. 2003. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *J Parasitol* 89: S134-S140.
- Thompson RCA. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol* 126: 15-35.
- Thompson RCA, Monis PT. 2004. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol* 58: 69-137.
- Thompson RCA, Palmer CS, O'Handley R. 2008. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The Veterinary Journal* 177: 18-25.
- Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RCA. 2004. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology* 128: 253-262.
- Troll H, Hanspeter M, Weiss N. 1997. Simple Differential Detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Fresh Stool Specimens by Sodium Acetate-Acetic Acid-Formalin Concentration and PCR. *J Clin Microbiol* 35: 1701-1705.
- 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: 217-222.
- Trout J, Santín M, Fayer R. 2007. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in adult dairy cows. *Vet Parasitol* 147: 205-209.
- Uehlinger FD, Barkema HW, Dixon BR, Coklin T, O'Handley RM. 2006. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in a veterinary college bovine teaching herd. *Vet Parasitol* 142: 231-237.

- Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T.** 2004. RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol* 6: 509-519.
- Ullu E, Lujan HD, Tschudi C.** 2005. Small Sense and Antisense RNAs Derived from a Telomeric Retroposon Family in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell* 4: 1155-1157.
- Upcroft JA, Upcroft P, Boreham PF.** 1990. Drug resistance in *Giardia intestinalis*. *Int J Parasitol* 20: 489-496.
- Upcroft P, Upcroft JA.** 1994. Two distinct varieties of *Giardia* in a mixed infection from a single human patient. *J Eukaryot Microbiol* 41: 189-194.
- van der Giessen JWB, de Vries A, Roos M, Wielinga P, Kortbeek LM, Mank TG.** 2006. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: A phylogenetic analysis of human and animal isolates. *Int J Parasitol* 36: 849-858.
- van Keulen H, Feely DE, Macechko PT, Jarroll EL, Erlandsen SL.** 1998. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *G. microti*. *J Parasitol* 84, 294-300.
- van Keulen H, Macechko PT, Wade S, Schaaf S, Wallis PM, Erlandsen SL.** 2002. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet Parasitol* 108: 97-107.
- Volotao AC, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O.** 2007. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: A phylogenetic analysis. *Acta Trop* 102: 10-19.
- Walker MJ, Montemagno C, Ghiorse WC, Bryant JE.** 1998. Method Detection Limits for *Cryptosporidium* in Soil using Polymerase Chain Reaction and Immunofluorescence Assay. *Appl Environ Microbiol* 64: 2281-2283.
- Wallis PM, Erlandsen SL, Isaac-Renton JL, Olson ME, Robertson WJ, van Keulen H.** 1996. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. isolated from drinking water in Canada. *Appl Environ Microbiol* 62: 2789-2797.

- Wilson IG.** 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl Environ Microbiol* 63: 3741-3751.
- Xiao L, Herd RP.** 1993. Quantitation of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Fecal Samples by Direct Immunofluorescence Assay. *J Clin Microbiol* 31: 2944-2946.
- Yason JA, Rivera WL.** 2007. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. *Parasitol Res* 101: 681-687.
- Yong TS, Park SJ, Hwang UW, Yang HW, Lee KW, Min DY, Rim HJ, Wang Y, Zheng F.** 2000. Genotyping of *Giardia lamblia* isolates from humans in China and Korea using ribosomal DNA sequences. *J Parasitol* 86: 887-891.
- Yu LZ, Birky CW, Adam RD.** 2002. The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. *Eukaryot Cell* 1:191-199.
- Zarlenga DS, Trout JM.** 2004. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Vet Parasitol* 126: 195-217.

## Publicaciones y Presentaciones relacionadas al presente trabajo de Tesis

Capítulo de libro

MOLINA NB, BASUALDO J. **Giardiosis**. 2008. En “Temas de Zoonosis IV”. Editado por la Asociación Argentina de Zoonosis. Capítulo 37. 1º edición. 448 páginas. Argentina. ISBN: 987-97038-3-0

MOLINA NB, BASUALDO J, MINVIELLE M. 2008. “**Genotipo zoonótico de *Giardia lamblia* en Atalaya, provincia de Buenos Aires, Argentina**”. Libro de Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Zoonosis.

MOLINA N, POLVERINO D, MINVIELLE M, BASUALDO J. 2007. “**PCR amplification of triosephosphate isomerase gene of *Giardia lamblia* in formalin-fixed feces**”. Revista Latinoamericana de Microbiología. 49: 6-11. ISSN 0187-4640.

MOLINA, NB; SALOMON, C; BASUALDO, JA; MINVIELLE, MC. 2007. “**Caracterización genética de aislamientos de *Giardia lamblia* en niños de un barrio urbano de Mendoza (Argentina)**”. Revista Argentina de Microbiología, 39 Supl 1: 97. ISSN 0325-7541

MOLINA NB, POLVERINO D, MINVIELLE MC, APEZTEGUÍA M, AGUILAR M, BASUALDO JA. 2006. “**Comparison of lysis methods and DNA extraction of *Giardia lamblia* trophozoites**”. Parasitología Latinoamericana. 61: 133-137. ISSN 0717-7712.

MOLINA NB; POLVERINO D; BASUALDO JA; MINVIELLE MC. 2006. “**Homogeneidad genética de aislamientos de *Giardia lamblia* en una comunidad rural de Argentina**”. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, Supl 3: 245. ISSN 0325-2957.