

El gen *tpi* como herramienta en los estudios epidemiológicos de la giardiosis

The tpi Gene as a Tool for Epidemiological Studies of Giardiasis

O gene tpi como ferramenta nos estudos epidemiológicos da giardiase

M^a Pilar Goñi¹, María Benito^{1,2}, Joanna Cieloszyk¹, Epifania Arango¹, Daniella LaPlante¹, M^a Antonia Remacha³, Cristina Seral⁴, M^a Teresa Fernández^{1,5}, Laura Lafarga^{1,5}, Encarnación Rubio¹

¹ Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza.

² Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente. Escuela de Ingeniería y Arquitectura. Zaragoza.

³ Servicio de Microbiología, Complejo Asistencial Universitario de León. León.

⁴ Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza.

⁵ Departamento de Fisiatría y Enfermería. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Zaragoza.

Cita: Goñi P, Benito M, Cieloszyk J, Arango E, LaPlante D, Remacha MA, Seral C, Fernández MT, Lafarga L, Rubio E. El gen *tpi* como herramienta en los estudios epidemiológicos de la giardiosis. Rev. salud ambient. 2018; 18(1):78-84.

Recibido: 29 de enero de 2018. **Aceptado:** 16 de abril de 2018. **Publicado:** 15 de junio de 2018.

Autor para correspondencia: María Pilar Goñi Cepero.

Correo e: pgoni@unizar.es

Dpto. Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza. Domingo Miral s/n 50009. Zaragoza.

Financiación: FIS PS09/01585: Instituto de Salud Carlos III. Acción estratégica en salud. UZ2013-FIS-02: Universidad de Zaragoza; DGA-FSE T51_17R: Diputación General de Aragón.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que hayan influido en la realización y la preparación de este trabajo.

Declaraciones de autoría: Todos los autores contribuyeron al diseño del estudio y la redacción del artículo. Asimismo, todos los autores aprobaron la versión final.

Resumen

Giardia duodenalis es un protozoo que causa infección en humanos y animales, que se puede transmitir por vía hídrica, de persona a persona o por contacto con animales, siendo una de las infecciones intestinales más frecuentes en nuestro país, por lo que supone una preocupación de Salud Pública. Su estudio epidemiológico, requiere la caracterización molecular de los parásitos, utilizando genes con gran variabilidad como el que codifica la triosafofosatoisomerasa (*tpi*) y analizando la homología entre aislamientos. El objetivo del trabajo es establecer el criterio de identidad que permita la comparación epidemiológica de los aislamientos de *Giardia*.

Se recogieron 2-3 muestras de heces en días alternos, de 26 pacientes con giardiosis. Tras la extracción de ADN, se amplificaron por técnicas de PCR, un fragmento del gen *tpi* y un fragmento del gen de la beta-giardina (*bg*), que se utilizó como comparación. Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados y las secuencias analizadas con los programas BioEdit y DnaSP v.5.0.

Las secuencias del gen *tpi* mostraron una elevada divergencia, con valores de diversidad Π entre 0 y 0,21219. La aparición de picos múltiples en el cromatograma, indicaron la presencia de varios clones en la misma muestra. Las diferencias entre aislamientos del mismo paciente fueron iguales o mayores que las encontradas para el conjunto de todas las muestras.

La variabilidad del gen *tpi* no permite establecer unos criterios de identidad, necesarios para la identificación de aislamientos. Las infecciones mixtas intragenotipo ocurren de una forma muy frecuente, sugiriendo una implicación de la vía ambiental como principal fuente de transmisión o una variación genética muy elevada.

Palabras clave: *Giardia*; gen *tpi*; genotipificación; variabilidad genética; epidemiología.

Abstract

Giardia duodenalis is a protozoon that causes infection in humans and animals. It can be transmitted by contaminated water, from person to person or by contact with animals; it being the cause one of the most common intestinal infections in our country, so

it is a public health concern. The epidemiological study thereof requires the molecular characterization of parasites, using genes with great variability, such as the one that codes triosephosphate isomerase (*tpi*), and analyzing the homology between isolates. The purpose of this work is to establish the identity criterion for epidemiological comparison of *Giardia* isolates.

2-3 stool samples were collected in alternate days from 26 patients with giardiasis. After DNA extraction, a fragment of the *tpi* gene and a fragment of the beta-giardin (*bg*) gene—used for comparison purposes—were amplified by means of PCR techniques. The obtained fragments were sequenced and the sequences analyzed with the BioEdit and DnaSP v.5.0 software.

The *tpi* gene sequences showed a high divergence, with values of diversity Π ranging from 0 to 0.21219. The appearance of multiple peaks in the chromatogram points to the presence of various clones in the same sample. The differences between isolates from the same patient were equal or higher than those found for the collection of all samples.

The variability of the *tpi* gene does not allow identity criteria to be established, which are necessary for isolate identification. Mixed intragenotype infections occur very frequently, which suggests the environmental path is the principal path of transmission and/or there is very high genetic variability.

Keywords: *Giardia*; *tpi* gene; genotype; genetic variability; epidemiology.

Resumo

Giardia duodenalis é um protozoário que causa infecção em humanos e animais, que se pode transmitir por via hídrica, de pessoa a pessoa ou por contacto com animais, sendo uma das infecções intestinais mais frequentes no nosso país, representando uma preocupação de Saúde Pública. O seu estudo epidemiológico requer a caracterização molecular dos parasitas utilizando genes com grande variedade como o que codifica a triose-fosfato isomerase (*tpi*) e analisando a homologia entre isolamentos.

O objetivo do trabalho é estabelecer o critério de identidade que permita a comparação epidemiológica dos isolamentos de *Giardia*.

Recolheram-se 2-3 amostras de fezes, em dias alternados, de 26 pacientes com giardíase. Após a extração de ADN, um fragmento do gene *tpi* e um fragmento do gene de beta-giardina (*bg*) foram amplificados por técnicas de PCR, que foram utilizadas como comparação. Os fragmentos obtidos foram sequenciados e as sequências analisadas com os programas BioEdit y DnaSP v.5.0.

As sequências do gene *tpi* mostraram uma elevada divergência, com valores de diversidade Π entre 0 e 0,21219. O aparecimento de múltiplos picos no cromatograma indicaram a presença de vários clones na mesma amostra. As diferenças entre isolamentos do mesmo paciente foram iguais ou maiores que as encontradas para o conjunto de todas as amostras.

A variabilidade do gene *tpi* não permite estabelecer alguns critérios de identidade necessários para a identificação de isolamentos. As infecções mistas intragenótipo ocorrem de uma forma muito frequente, sugerindo uma implicação da via ambiental como principal fonte de transmissão e/ou uma variação genética muito elevada.

Palavras-chave: *Giardia*; gene *tpi*; genotipificação; variabilidade genética; epidemiologia.

INTRODUCCIÓN

Giardia duodenalis es el protozoo flagelado que más frecuentemente se aísla como causa de cuadros de gastroenteritis aguda en el hombre, que se pueden llegar a hacer crónicos si el hospedador sufre una inmunodepresión. Estos cuadros son más frecuentes en niños, siendo también posible que el portador no desarrolle síntomas, quedando en este caso como portador asintomático diseminador de quistes. Otros animales, como animales domésticos (perros, gatos, etc.) o ganado también pueden actuar como hospedadores de *Giardia*.

En la adquisición de la giardiosis los mecanismos de transmisión más importantes son la vía hídrica, vegetales de consumo crudo contaminados con quistes de *Giardia duodenalis*, la transmisión de persona a persona, a través de manos contaminadas o relaciones sexuales oro-anales

y la transmisión zoonótica, que supone la adquisición de la infección por contacto con animales portadores del parásito o sus heces. En este sentido, 8 son los genotipos o “assemblages” de *Giardia* descritos hasta la fecha, que se denominan de la A a la H y que son específicos de un hospedador o un grupo de ellos¹. Los “assemblages” más frecuentemente encontrados en el hombre son el A y el B, aunque en algunas ocasiones se han aislado otros “assemblages”, reflejando la naturaleza zoonótica de esas infecciones².

En lo que respecta a la prevalencia de la giardiosis en España, esta se encuentra sin duda infravalorada dado que hasta 2015, año en que se añadió a la lista de enfermedades de declaración obligatoria³, los casos no eran notificados más que de forma voluntaria. Por otra parte, dada la magnitud de su diseminación y la importancia de los cuadros de malabsorción que se presentan sobre todo cuando afecta a niños desnutridos

de zonas desfavorecidas, la giardiosis fue incluida en el año 2004, junto con la cryptosporidiosis en la iniciativa de enfermedades olvidadas⁴.

Algunos datos, recopilados sobre todo de comunicaciones a Congresos y estudios aislados muestran altas prevalencias en España. Así se habla de un 21,5 % en población pediátrica en Teruel en 2013⁵, del 8,4 % en Santiago de Compostela en 1994⁶, un 7,5 % en Salamanca, en 1988⁷, un 4,4 % en Ávila, en 1994⁶, siendo las prevalencias más altas comunicadas, la de Zaragoza, con un 51,8 % en el período 2007-2008⁸, la de Cuenca, con un 37,4 % en 1996⁹ y la de Albacete, con un 35,7 % en 2004¹⁰. La falta de disposición de datos más actuales, junto con la variabilidad según las zonas y la metodología utilizada en los estudios, recomienda su actualización y la determinación de estas cifras siguiendo criterios epidemiológicos más estrictos y utilizando herramientas más modernas que permitan la genotipificación y la diferenciación de aislamientos.

En cualquier caso, el seguimiento y control de las vías de transmisión preferentes en una zona geográfica es fundamental para el control de la giardiosis. Para ello, se han desarrollado varias técnicas moleculares que permiten su clasificación en "ensamblajes". Estas técnicas suponen la realización de reacciones de amplificación por PCR, con los genes de la triosa fosfato isomerasa (*tpi*), el ADN que codifica para el RNA, la beta-Giardina (*bg*) y la glutamato deshidrogenasa (*gdh*), como dianas más habitualmente utilizadas en todos los estudios, con posterior secuenciación y comparación de las secuencias obtenidas. Sin embargo, cuando este procedimiento se lleva a cabo surgen problemas técnicos, sobre todo si se utilizan varios genes, cuando dos genes diferentes clasifican a un mismo aislamiento en dos "ensamblajes" diferentes y cuando se obtienen secuencias con picos dobles o múltiples en el cromatograma¹¹. Todos estos resultados podrían indicar la presencia de infecciones mixtas inter o intragenotipo. En cualquier caso, aunque se obtuviera una única secuencia, la comparación de las secuencias obtenidas para los aislamientos medioambientales y clínicos o de animales, no es posible sin un criterio que marque entre qué rangos de diferencias se sitúan las distintas relaciones epidemiológicas.

Dado que el protocolo de diagnóstico de la giardiosis aconseja recoger entre dos y tres muestras de cada paciente, en días alternos, se planteó la hipótesis de que estas muestras podrían contener el mismo "ensamblaje", el mismo subtipo y el mismo aislamiento de *Giardia* para cada paciente o un pequeño número de ellos, se tomó como gen diana el gen *tpi*, ya que es el que se ha definido como más variable, lo que lo hace óptimo para estudios

epidemiológicos¹² y se planteó como objetivo del trabajo la determinación de los criterios que definan las relaciones epidemiológicas entre aislamientos de *Giardia duodenalis* para el gen *tpi*, comparando su variabilidad con la que se obtiene para el gen *bg*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron un total de 63 muestras de heces, correspondientes a 26 pacientes diagnosticados de giardiosis y recogidas en días alternos. Las muestras de 19 de ellos fueron recogidas en el Servicio de Microbiología y Parasitología en el Complejo Asistencial de León durante los años 2010-2011 y las de los 7 pacientes restantes en el Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" de Zaragoza, en el año 2010. Se incluyeron en el estudio aquellas muestras en las que existiera, al menos, otra muestra tomada en un plazo mínimo de un día y máximo de tres. De esta forma once pacientes aportaron tres muestras y quince aportaron dos.

Las muestras fueron sometidas a un pretratamiento, consistente en una flotación en gradiente de sacarosa¹³. Los quistes obtenidos se sometieron a 5 ciclos de congelación (30 minutos a -80 °C) descongelación (10 minutos a 100 °C) y a digestión con proteinasa K (100 µg/mL). En las muestras en las que no se observaron quistes al realizar la flotación en sacarosa, se sometió la muestra fresca a pretratamiento y se continuó con ella el procedimiento. La extracción de ADN se llevó a cabo posteriormente utilizando un kit comercial (Stool DNA Isolation Kit, NorgenBiotek Corp., Ontario, Canadá), siguiendo las instrucciones del fabricante y conservándolo a -20 °C.

Para la determinación del "ensamblaje", se utilizaron las reacciones de PCR descritas en Sulaiman et ál.¹⁴ y Lalle et ál.¹⁵, que amplifican un fragmento del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa y la beta Giardina respectivamente. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados con un kit comercial (GFXTM-PCR-DNA Gel Band Purification Kit; GE Healthcare) y secuenciados por secuenciación directa en ambas direcciones. Las secuencias fueron analizadas con el programa BioEdit v.7.2.6.1. (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit/html>) y registradas en el GenBank con los números de acceso KX668287-KX668320 y KX668342- KX668362. Los análisis de diversidad genética de las secuencias fue analizada con el programa DnaSP5 (<http://www.ub.edu/dnasp/>; Universidad de Barcelona, Barcelona, España). En este análisis se estudian y comparan el número de sitios segregantes o polimórficos (Ss), el número medio de diferencias por sitio tomadas por pares (Π), el número medio de mutaciones del conjunto de secuencias (K) y

el parámetro de neutralidad (Θ), como indicador de la deriva genética.

RESULTADOS

Para las 63 muestras correspondientes a 26 pacientes, se obtuvieron 35 secuencias (correspondientes a 23 pacientes) para el gen que codifica la triosa fosfato isomerasa (*tpi*), y 28 secuencias (correspondientes a 13 pacientes), para el gen de la beta Giardina (*bg*). No todas las muestras resultaron positivas para los dos genes estudiados, encontrando veinte pacientes con alguna muestra negativa para la amplificación del gen *tpi*, y 13 con alguna muestra negativa para el gen *bg*. Cuando una muestra resultó negativa para los dos genes estudiados, se consideraron negativas, con 19 pacientes que aportaron alguna muestra negativa. Las secuencias que presentaron una longitud insuficiente o las que no se pudieron secuenciar por amplificación débil, fueron excluidas del estudio.

Finalmente, el estudio se llevó a cabo sobre 35 secuencias correspondientes a 23 pacientes para el gen *tpi* y 20 secuencias del gen *bg* correspondientes a 13 pacientes. Solamente para 18 muestras, correspondientes a 10 pacientes, se obtuvieron las secuencias de los dos genes estudiados por lo que la diversidad de ambos genes solo se pudo comparar para estas muestras. De los pacientes cuyas muestras dieron positivo en la PCR del gen *tpi*, 21 resultaron estar infectados por *Giardia* assemblage B y los 2 restantes por *Giardia* assemblage A. De forma similar, según el análisis del gen *bg*, las muestras de 6 pacientes contenían *Giardia* assemblage B, las de 5 *Giardia* assemblage A y 2 pacientes presentaban una infección mixta por *Giardia* assemblage A y assemblage B. Para el estudio de diversidad, se seleccionaron las 23 secuencias del gen *tpi* correspondientes a 11 pacientes para las que se obtuvo una longitud de secuencia adecuada, de al menos 450 pb (figura 1).

Es preciso señalar que la mayor parte de las muestras presentaron un cromatograma con picos dobles o múltiples, con mayor multiplicidad para el gen *tpi* que para el *bg*. Destaca el caso de una secuencia, que al ser analizado el fragmento del gen *tpi*, se incluyó en el assemblage B, y cuando se analizó la secuencia del fragmento del gen de la Beta-Giardina, el aislamiento se incluyó en el "assemblage" A. Además, para uno de los pacientes sus muestras presentan *Giardia* "assemblage" B, con dos aislamientos que tienen entre sí un 80 % de homología y 105 sustituciones nucleotídicas puntuales.

En la tabla 1 se muestran los valores obtenidos para la homología entre secuencias comparando en conjunto

las pertenecientes a cada "assemblage" sin diferenciar entre pacientes. Siete secuencias, correspondientes a tres pacientes diferentes mostraron un 100 % de homología para el gen *tpi*. Para el gen *bg*, siete secuencias correspondientes a tres pacientes diferentes mostraron el 100 % de homología.

Figura 1. Estrategia y resultados de genotipificación

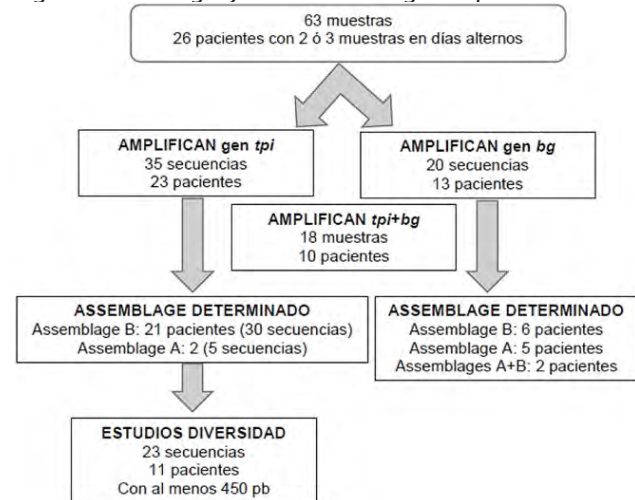


Tabla 1. Homología presentada por las secuencias de los genes estudiados para los diferentes "assemblages" en las muestras estudiadas

Gen	Assemblage	Homología (%)
<i>Tpi</i> (443 pb)	A	99,5 - 100
	B	89,1 - 100
<i>bg</i> (447pb)	A	99,5
	B	99,5 - 100

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos al estudiar la diversidad genética entre las secuencias de los genes *tpi* y *bg*, tomadas en conjunto. En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos al estudiar la diversidad genética entre las secuencias del gen *tpi* pertenecientes a cada uno de los "assemblages".

Tabla 2. Diversidad genética de las secuencias obtenidas para los dos genes estudiados

Locus	Nº sec ¹	Nº haplotipos ²	Ss ³	Π ⁴	K ⁵	Θ ⁶
<i>tpi</i>	35	23	106	0,06174	24,88	0,0687
<i>bg</i>	20	11	34	0,03401	14,59	0,0223

¹ Nº sec: Número de secuencias identificadas dentro del genotipo.

² Nº Haplotipos en que se agrupan las secuencias.

³ Ss: Sitios segregantes.

⁴ Π : Número medio de diferencias por sitio tomadas por pares.

⁵ K: nº medio de mutaciones del conjunto de secuencias.

⁶ Θ : Parámetro de neutralidad.

Tabla 3. Diversidad genética en las secuencias del gen *tpi* para los diferentes ensamblajes encontrados

<i>tpi</i>	Nº sec ¹	Nº haplotipos ²	Ss ³	Π ⁴	K ⁵	Θ ⁶
Assemblage A	5	3	3	0,00271	1,200	0,00325
Assemblage B	30	21	38	0,01236	4,981	0,02443

¹ Nº sec: Número de secuencias identificadas dentro del genotipo.

² Nº Haplotipos en que se agrupan las secuencias.

³ Ss: Sitios segregantes.

⁴ Π : Número medio de diferencias por sitio tomadas por pares.

⁵ K: nº medio de mutaciones del conjunto de secuencias.

⁶ Θ : Parámetro de neutralidad.

Cuando se analizaron las secuencias del fragmento del gen *tpi* de los aislamientos de *Giardia* procedentes de muestras de un mismo paciente, se aprecia identidad entre sí para las secuencias de *Giardia* del mismo paciente solamente en tres casos. En el resto de los casos, se aprecian sitios segregantes en un número que oscila entre 1- 8. El número medio de diferencias por sitio entre secuencias tomadas a pares (Π) para las secuencias del gen *tpi* es prácticamente el doble que para el *bg*. Aparece como caso particular, un paciente que presenta un aislamiento perteneciente al "assemblage" B y que a las 48 horas excreta un aislamiento de *Giardia* perteneciente al "assemblage" A, con 94 sustituciones nucleotídicas puntuales de diferencia entre ellas y un valor de Π de 0,21219. El valor de Π para el resto de las secuencias, examinándolas para cada paciente oscilan entre 0 para aquellas secuencias en que no aparecen sitios segregantes y 0,04819 para las secuencias del paciente que presentan 8 sitios segregantes.

DISCUSIÓN

Las técnicas de biología molecular han mostrado su utilidad para el diagnóstico y para la genotipificación de aislamientos de *Giardia duodenalis*, permitiendo así la realización de estudios epidemiológicos¹⁶. Sin embargo, cuando la aparición de cepas resistentes ha propiciado el seguimiento de aislamientos en el tiempo, tras el tratamiento, surge la necesidad de establecer unos criterios de identidad que definan una asociación entre diferencias genéticas y relación epidemiológica de los aislamientos. Solo así se puede diferenciar entre resistencia de los aislamientos y reinfección del paciente. Lo mismo ocurre cuando se intenta localizar el origen de un brote o hacer el seguimiento de aislamientos para el control de la enfermedad. En este trabajo se ha intentado definir estos criterios partiendo de la hipótesis de que los quistes de *Giardia* excretados por un mismo hospedador en días alternos son idénticos o epidemiológicamente muy relacionados.

Al aplicar los métodos de genotipificación más frecuentemente utilizados a un total de 63 muestras, solamente se obtuvieron 35 secuencias para el gen *tpi* y 20 para el gen *bg*. Esto es consecuencia de que en algunos casos no se produjo excreción de quistes todos los días en que se ha tomado muestra. En otros casos, se ha apreciado la presencia de quistes en el pretratamiento, pero no se ha conseguido una amplificación positiva, sugiriendo una gran variabilidad en el lugar en que deben de hibridar los oligonucleótidos que se utilizan en la reacción de PCR.

También se da una mayor homología entre las secuencias del gen *bg* y del *tpi* para el “assemblage” A, siendo mucho más variables las secuencias del “assemblage” B, con el gen *tpi*. La mayor variabilidad del gen *tpi* ya se había observado con anterioridad y esto situaba a este gen como una posible diana que permitiera la identificación de *Giardia* a nivel de aislamiento^{14,17}. Sin embargo, la aparición de picos dobles o múltiples en los cromatogramas que se obtienen al secuenciar, plantea la posibilidad de que en la mayor parte de las infecciones existan varios clones de *Giardia*, es decir que se trataría de infecciones mixtas intragenotipo¹⁸. También en consonancia con la mayor variabilidad del gen *tpi*, dichos picos múltiples aparecen con menos frecuencia para el gen *bg*. Todo ello tiene sentido si se piensa en la ingestión por parte del hospedador de un número limitado de quistes para dar lugar a la infección, como ocurre en las infecciones de transmisión hídrica¹¹.

Los resultados mostraron una elevada divergencia entre las secuencias del gen *tpi*, mucho mayor que para el gen *bg*, con unos valores de Π y un mayor número de haplotipos para el “assemblage” B. Parte de esta divergencia puede ser consecuencia de la presencia de esos picos múltiples de los que ya se había hablado con anterioridad, dado que la secuencia que se compara es en realidad una secuencia consenso, resultado de la interpretación del analista de esos picos dobles o múltiples. Además, la divergencia entre aislamientos del mismo paciente es igual o mayor que la encontrada para el conjunto de los aislamientos y a ello hay que añadir la obtención de secuencias con un 100 % de homología para aislamientos de diferentes pacientes, que no tienen esta identidad con las secuencias de las otras muestras del paciente.

Con todo ello, se puede concluir que la variabilidad del gen *tpi* no permite establecer unos criterios de identidad, necesarios para la identificación de brotes y de vías de transmisión. Futuros estudios son necesarios para elucidar si las infecciones con esta variabilidad tan grande tendrían un origen ambiental, con numerosos

quistes de diferentes clones estableciendo la infección, o si se trata de una elevada variabilidad intergeneracional, debida al azar o a una posible fase de reproducción sexual que no se ha descrito para *Giardia*, pero que sí que se ha postulado en algunas ocasiones¹⁹. Los resultados obtenidos, también ponen de manifiesto la necesidad de encontrar nuevas herramientas que permitan el seguimiento epidemiológico de *Giardia*.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo ha sido financiado por los proyectos: FIS PS09/01585; UZ2013-FIS-02; DGA-FSE T51_17R.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cacciò SM, Lalle M, Svärd SG. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. Infect. Genet. Evol. 2017 Dec 7; pii: S1567-1348(17)30418-5. En Prensa.
2. Ortega-Pierres MG, Jex AR, Ansell BRE, Svärd SG. Recent advances in the genomic and molecular biology of *Giardia*. Acta Trop. 2017. pii: S0001-706X(17)30857-4. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.09.004. En Prensa.
3. Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligatoria. BOE núm 65, del 17 de marzo de 2015.
4. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. Trends. Parasitol. 2006; 22:203-8.
5. Chavarrías-Izquierdo L. Prevalencia de *Giardia* *Lambli*a en edad pediátrica del Sector Sanitario de Teruel. Trabajo de Fin de Grado. Escuela Universitaria de Enfermería. Teruel: Universidad de Zaragoza. 2015.
6. Antonia PD, Miguel A. RL, Begoña SS. Infestación por *Giardia lamblia* en la población infantil de la Zona Básica de Salud de Ávila rural Este. Rev. San. Hig. Pública 1994; 68:399-404.
7. García Rodríguez JA, Martín AM, Canut A, et ál. Giardiasis: Análisis de 618 casos durante el período 1979-I 986. Enf. Infecc. Microb. Clin. 1988; 6:50-3.
8. García-Bujalance S, García-Gil V, Baquero-Artigao F. Diagnóstico microbiológico de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* intestinalis en pediatría. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2013; 31(3):191-4.
9. María Teresa JG. Sero prevalencia de Giardiasis en escolares de una comunidad rural de la provincia de Cuenca. Tesis Doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 1996. [citado 21 de enero 2018] Disponible en: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19911996/D/0/D0081901.pdf>.
10. Marin A, Heredero E, Sainz de Baranda C, et ál. Sesión 28 Enfermedades parasitarias: 583 Parásitos intestinales en el área sanitaria de Albacete. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2004; 22(Supl 1):206-14.

11. Ankarklev J, Svärd SG, Lebbad M. Allelic sequence heterozygosity in single *Giardia* parasites. *BMC Microbiol.* 2012; 12:65.
12. Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2010; 213(5):321-33.
13. Graham Clark CG, Diamond LS. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. *Clinical Microbiology Rev.* 2002; 15(3):329-41.
14. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, et ál. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9:1444-52.
15. Lalle M, Jimenez-Cardosa E, Caccio SM, Pozio E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. *J. Parasitol.* 2005; 91:203-5.
16. Adeyemo FE, Singh G, Reddy P, Stenström TA. Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. *Acta Trop.* 2018; pii: S0001-706X(17)30429-1. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.01.011.
17. Faria CP, Zanini GM, Dias GS, et ál. New multilocus genotypes of *Giardia lamblia* human isolates. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 54:128-37.
18. Minetti C, Lamden K, Durband C, et ál. Determination of *Giardia duodenalis* assemblages and multi-locus genotypes in patients with sporadic giardiasis from England. *Parasites & Vectors* 2015; 8:444.
19. Aguiar JM, Silva SO, Santos VA, et ál. Multilocus amplification of genomic DNA from single cysts of *Giardia duodenalis* separated using micromanipulation technique. *Exp. Parasitol.* 2015; 157:84-7.