



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Frecuencia de genotipos zoonóticos de *Giardia intestinalis* en gatos de
Querétaro

TESIS

Que como parte de los requerimientos para obtener el grado de Doctora en
Ciencias Biológicas

PRESENTA

MSPAS. Nerina Patricia Veyna Salazar

DIRIGIDO POR

Dra. Marina Durán Aguilar

ASESORES

Dr. Felipe de Jesús Ruíz López

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Dr. Rodolfo Bernal Reynaga

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Santiago de Querétaro, Qro. 31 de enero de 2024



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Frecuencia de genotipos zoonóticos de *Giardia*
intestinalis en gatos de Querétaro

por

Nerina Patricia Veyna Salazar

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: CNDCC-263993



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Frecuencia de genotipos zoonóticos de *Giardia intestinalis* en gatos de
Querétaro

TESIS

Que como parte de los requerimientos para obtener el grado de Doctora en
Ciencias Biológicas

PRESENTA
MSPAS. Nerina Patricia Veyna Salazar

DIRIGIDO POR
Dra. Marina Durán Aguilar

SINODALES

Dra. Marina Durán Aguilar
Presidente

FIRMA

Dr. Felipe de Jesús Ruíz López
Co-director

FIRMA

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón
Vocal

FIRMA

Dr. Rodolfo Bernal Reynaga
Vocal

FIRMA

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez
Vocal

FIRMA

Dr. José Guadalupe Gómez Soto
Director de la Facultad de Ciencias
Naturales

Dr. Manuel Toledano Ayala
Director de Investigación y Posgrado
UAQ

Santiago de Querétaro, Qro. 31 de enero de 2024.

RESUMEN

Giardia intestinalis es un protozooario que afecta a humanos, así como a una amplia variedad de animales domésticos, su distribución es mundial con una mayor prevalencia en países en vías de desarrollo en donde los hábitos de higiene no son los adecuados, debido a que el gato puede ser portador de este parásito e infectar al humano es de importancia conocer el riesgo de transmisión. Por esta razón el objetivo de este estudio es estimar la prevalencia del parásito en la población de gatos de Santiago de Querétaro, así como determinar si poseen el genotipo zoonótico A, y de esta manera conocer su papel en la salud pública. Se llevó a cabo un estudio transversal en donde se recolectaron 200 muestras fecales de gatos de ambos sexos, diferentes edades y estratos de procedencia. Las muestras se analizaron mediante microscopía, mediante una técnica de flotación, obteniendo una prevalencia general del 25%. El genotipo encontrado en este trabajo fué el genotipo A, lo que sugiere que el gato es un factor de riesgo importante en cuanto a la diseminación del parásito hacia los humanos, ubicándolo como un problema en salud pública.

Palabras clave: *Giardia*, genotipos, gatos, Salud pública.

SUMMARY

Giardia intestinalis is a protozoan that affects humans, as well as a wide variety of domestic animals, its distribution is worldwide with a higher prevalence in developing countries where hygiene habits are not adequate, because the cat can be a carrier of this parasite and infect humans it is important to know the risk of transmission. For this reason, the objective of this study is to estimate the prevalence of the parasite in the cat population of Santiago de Querétaro, as well as to determine if they have the zoonotic genotype A, and in this way to know its role in public health. A cross-sectional study was carried out in which 200 fecal samples were collected from cats of both sexes, different ages and strata of origin. The samples were analyzed by microscopy, using a flotation technique, obtaining an overall prevalence of 25%. The genotype found in this work was genotype A, which suggests that the cat is an important risk factor for the dissemination of the parasite to humans, making it a public health problem.

Keywords: *Giardia*, assemblages, cats, public health.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Universidad Autónoma de Querétaro por darme la oportunidad de hacer un posgrado dentro de la institución.

Agradezco a mi comité tutorial: Dra. Marina Durán Aguilar, Dr. Felipe de Jesús Ruiz, Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón, Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez y Dr. Rodolfo Bernal Reynaga. Por el apoyo y conocimiento que obtuve de ellos a lo largo del posgrado.

Agradezco especialmente al Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón por haberme capacitado y formado en temas de parasitología que hicieron posible este estudio. Agradezco a todas las personas e instituciones que hicieron posible la recolección de muestras para llevar a cabo el trabajo experimental de este proyecto.

Gracias a los maestros que estuvieron presentes durante el doctorado por compartir su conocimiento sobre temas diversos.

Agradezco a FOPER por financiar parte de este estudio y hacer posible las pruebas moleculares que se llevaron a cabo.

Agradezco a CONACYT por haberme dado la oportunidad de obtener una beca para complementar mis estudios de posgrado

DEDICATORIA

A mis padres, por que todos mis logros siempre serán compartidos con ustedes, por siempre apoyarme en cualquier desición que he tomado y siempre estar ahí, por sus consejos y sus palabras, por todo lo que me han dado, los quiero mucho.

A mi tia Paty, mi segunda mamá, por siempre hacerme sentir que nunca estoy sola, que siempre tendré alguien que me apoyará, te agradezco mucho todas las palabras de aliento que me sirvieron para atravesar por este proceso.

A mi Luby, por siempre estar ahí para mi, con sus consejos y sus palabras, por siempre escucharme y darme su opinión, por hacer este doctorado menos pesado.

A mis amigos por acompañarme durante estos 4 años de doctorado a Ilwi por sus consejos y ayuda en mi trabajo y a Ulisses, porque si no fuera por el, su amistad y su guía en custiones académicas este proceso hubiese sido muy difícil.

A mis amigas Yos y Reyna por los consejos y apoyo que me brindaron durante estos 4 años y por haber formado un contingente de apoyo mientras platicabamos de nuestras penas en el doctorado.

A Lilia, porque si no fuera por ella practicamente no hubiese continuado con este proceso, por hacerme entender que puedo enfrentarme a cualquier cosa y que tengo el poder de negarme si la situación no me gusta, por ayudarme a crecer y entenderme de mejor manera, siempre te estare agradecida.

A mi comité por aceptar trabajar conmigo y darme las herramientas necesarias para llevar acabo mi proyecto especialmente a la Dra. Andrea por siempre creer en mi y brindarme su ayuda.

A mi directora de tesis la Dra. Marina por escucharme y apoyarme durante este proceso, además siempre confiar en que yo podía realizar cualquier cosa.

Al Dr.Cantó por su tutela en el aspecto profesional, si no fuera por el no tendría el conocimiento que he adquirido a lo largo de estos años, hizo que me enamorará de la parasitología y por eso siempre le agradeceré, además de que me enseñó más de una lección de vida, por eso Dr. muchas gracias por todo.

Por último a mis perros, mi familia, Fry y Mafalda, porque ellos fueron los que vivieron junto conmigo todo este proceso, cada lagrima y frustración, cada alegría y emoción, por ser ellos el motor que me hacía levantarme algunos días en el que pensaba que todo estaba perdido. Siempre serán parte de mi vida y lo mejor que me pudo haber pasado.

ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatoria	iv
Índice	v
Índice de Cuadros	vi
Índice de Figuras	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Generalidades	3
2.1.1 Antecedentes históricos	3
2.2 Etiología	4
2.2.1 Biología	4
2.2.2 Taxonomía	5
2.3 Epidemiología	6
2.3.1 Genotipos	7
2.3.2 Hospederos	8
2.3.3 Ciclo biológico	10
2.3.4 Transmisión	13
2.3.5 Prevalencia	14
2.4 Patogénesis	15
2.4.1 Mecanismos desencadenados por la infección	15
2.4.2 Alteración de la microbiota ocasionada por <i>Giardia</i>	19
2.4.3 Signos clínicos	21
2.5 Tratamiento	23
2.5.1 Nitroimidazoles	23
2.5.2 Benzimidazoles	25
2.5.3 Resistencia	26

III.	HIPOTESIS	29
IV.	OBJETIVOS	29
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	30
5.1	Lugar y estudio de animales	30
5.2	Técnicas de diagnóstico	30
5.2.1	Técnica de Faust	30
5.2.2	Pool de muestras	31
5.2.2	Técnica de concentración de quistes por medio de colchón de sacarosa	32
5.2.3	Técnica de purificación de quistes	33
5.3	Extracción de ADN	34
5.4	Técnicas moleculares	35
5.4.1	PCR	35
5.4.2	RFLP	35
5.5	Análisis estadístico	36
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1	Análisis coproparasitológico	37
6.2	PCR	39
VII.	CONCLUSIÓN	43
VII.	LITERATURA CITADA	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Ensamblajes de <i>Giardia intestinalis</i> y sus hospederos	8
2	Distribución de las muestras y análisis de asociación estadístico por estrato, edad, consistencia de las heces y género	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Estadios de <i>Giardia intestinalis</i>	5
2	Hospederos y genotipos de <i>Giardia intestinalis</i>	9
3	Ciclo biológico de <i>Giardia intestinalis</i>	12
4	Ploidía de <i>Giardia intestinalis</i>	13
5	Respuesta por parte del hospedero ante una infección de giardiasis	16
6	Señalización inmunitaria de <i>Giardia</i>	18
7	Difusión del metronidazol en el trofozoito	24
8	Acción del albendazol en el trofozoito	26

I INTRODUCCIÓN

La *Giardia intestinalis* protozooario flagelado que se ha reportado en todo el mundo y puede infectar humanos como también a una amplia variedad de animales domésticos especialmente a perros, gatos y numerosas especies de mamíferos silvestres (Minvielle *et al.*, 2008). *Giardia* es considerado un problema de salud pública importante ya que se ha demostrado que solamente con 10 quistes se puede producir una infección en humanos (Rendtorff, 1954), así mismo se considera que el organismo puede ser un patógeno primario. Los síntomas más comunes de giardiasis en humanos y animales incluyen enteritis y diarrea. (Biancardi *et al.*, 2004).

G. intestinalis es uno de los parásitos intestinales más comunes de los humanos, cerca de 200 millones de personas en África, Asia y América Latina presentan infecciones sintomáticas (Yaso & Rivera (2007). *Giardia* tiene un amplio rango de especies a las que afecta. El hecho de que este parásito pueda infectar a humanos y animales, eleva la preocupación en relación al riesgo en salud pública a partir de animales de compañía (Thompson *et al.*, 2008). Estos niveles de riesgo dependerán de la prevalencia y los genotipos presentes. Los gatos son reservorios de estos parásitos causando problemas de salud pública, afectando la salud de humanos y animales (Gerhold & Jessup, 2013).

Giardia es transmitido de manera oro-fecal, principalmente mediante la ingesta de agua o alimentos contaminados con quistes del parásito o de un huésped a otro (Lujan, 2006). Si bien *Giardia* no suele ser fatal, puede ocasionar problemas de salud persistentes, los factores de riesgo asociados con la infección abarcan desde la presencia de infantes en entornos de guardería, trabajadores de guarderías y viajeros provenientes de áreas endémicas del protozooario, hasta la ingestión de agua contaminada, huéspedes con inmunodeficiencia, fibrosis quística y prácticas sexuales que involucran la zona oral y anal (Leung *et al.*, 2019).

El ciclo de vida de *G. intestinalis* es directo, Los quistes son excretados por las heces, iniciando la infección cuando son ingeridos por otro hospedador. El medio ácido del estómago y las sales biliares del intestino delgado son los responsables de la liberación de los trofozoitos contenidos en los quistes, dichos trofozoitos se acoplan a la mucosa del intestino delgado, colonizándolo y empezando su multiplicación por fisión binaria asexual, durante el paso de los trofozoitos por el intestino, se vuelven a enquistar, probablemente debido a cambios bruscos de pH y la acción de enzimas digestivas, pasando a heces y siendo infectivos nuevamente. (Traub et al., 2005; Escobedo et al., 2007). El hecho de que la eliminación de quistes se de de manera intermitente hace que su diagnóstico sea complicado, llegando a confundir con otras enfermedades gastroentéricas.

Giardia posee siete grupos genéticos (A-G), morfológicamente iguales pero genéticamente diferentes, y se encuentran distribuidos en diferentes especies. Al ser morfológicamente indistinguibles, solo pueden ser diferenciados por medio de procedimientos basados en PCR, en conjunto con técnicas enzimáticas (RFLP) de diferentes genes (*gdh*, *tpi*, etc) y secuenciación (Abe et al., 2005; Souza et al., 2007).

Hasta el momento en nuestro país únicamente se habían publicado estudios de prevalencia y presencia de genotipos en perros, ovinos y bovinos (Godinez-Galaz et al., 2018; Eligio-García et al., 2005). Por lo tanto este trabajo pretende investigar la frecuencia con la que se presenta el genotipo más común que afecta a los humanos y determinar si los gatos desempeñan un papel significativo como transmisores de este parásito.

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades

2.1.1 Antecedentes históricos

Giardia intestinalis es un protozoo flagelado encontrado en la mayoría de los vertebrados, que habita en el intestino delgado de sus hospederos. *Giardia* posee dos morfologías diferentes dependiendo de su estadio, el vegetativo conocido como trofozoito y el infectivo conocido como quiste (Hill & Nash., 2011).

Anthony Van Leeuwenhoek describió al organismo observándolo en sus heces diarreicas en 1681, sin embargo, Vilem Lambl fue reconocido por describir el trofozoito en humanos en 1859 quien creyó que dicho organismo pertenecía al género de *Cercomonas* y lo llamó *Cercomonas intestinalis*; años después la especie *G. lamblia* que infecta a humanos fue nombrada en honor a él (Dobell, 1920). Por el contrario, Grassi fue reconocido por describir el quiste en roedores denominándolo *Dimorphus muris*, el cual se incorporó al género de *Giardia* dejando la especie *muris* para referirse a los roedores como hospederos; no obstante, fue Kunstler fue el primero en atribuir el nombre de *Giardia* como género a un organismo que observó en renacuajos (*G. agilis*) en 1882, y no fue sino hasta 1888 en que Blanchard sugirió el nombre de *Lambliia intestinalis*. (Blanchard, 1888).

Kofoid y Christiansen (1915) propusieron el nombre de *Giardia lamblia* durante una conferencia en donde describieron el ciclo completo del protozoo, describiendo morfología que serviría más adelante para la diferenciación de especies y organelos del trofozoito y del quiste, así como la ocurrencia de fisión binaria; este debate acerca de las especies continuó por años hasta que Filice en 1952 publicó a detalle la descripción morfológica de *Giardia* proponiendo tres especies usando la morfología del cuerpo medio: *G. duodenalis* (humanos), *G. muris* (roedores) y *G. agilis* (anfibios). El nombre de *Giardia lamblia* fue altamente

aceptado en 1970 cambiando a *Giardia duodenalis* en 1980 por *Giardia intestinalis* en 1990 usado hasta la actualidad (Kulda & Nohynkova, 1995).

2.2 Etiología

2.2.1 Biología

Giardia es un protozoo flagelado perteneciente al orden Diplomonadidae presentando dos estadios, el infectivo denominado quiste y el vegetativo denominado trofozoito. Los trofozoitos se localizan en la superficie de la mucosa del intestino delgado principalmente en duodeno y yeyuno, en donde se reproducen de forma asexual por medio de fisión binaria; estos se mantienen unidos a las microvellosidades por medio de su disco ventral, mientras que los quistes se encuentran en el medio ambiente siendo estos la forma resistente del parásito sobreviviendo por meses en temperaturas óptimas. (Díaz & Fernández, 2008).

El trofozoito (figura 1) también conocido como estadio vegetativo o invasivo posee un tamaño de 12 a 15 μm de largo por 6 a 8 μm de ancho de aspecto piriforme y simétrico, convexo dorsalmente con dos axóstilos ventrales que le dan soporte al parásito y cóncavo ventralmente donde se localiza su disco ventral o disco succionario, órgano más importante de este parásito ya que este le permite adherirse a las microvellosidades del intestino, integrado por microtúbulos espirales, la membrana citoplasmática que recubre a este órgano posee lectinas que ayudan con los mecanismos de adhesión del protozoo. También posee cuatro pares de flagelos en su parte ventral originados de 8 cuerpos parabasales, dos anterolaterales, dos posterolaterales, dos ventrales y dos centrales, un par cuerpos medios cuya estructura es única de este género (Rivera *et al.*, 2002). Estructuralmente el trofozoito es binucleado, ambos núcleos presentan el mismo tamaño, cada uno situado a un lado de la línea media con un cariosoma central. La membrana nuclear se encuentra revestida por cromatina, sin embargo, se encuentra parcialmente cubierta por ribosomas. El tamaño del genoma de *Giardia* es de 10,6-11,9 Mb. (Rivera *et al.*, 2002; Gillin *et al.*, 1996; Owen, 1980)

El quiste (figura1) que es el estadio infeccioso del protozoario mide de 8 a 12 μm de largo por 5 a 8 μm de ancho tiene una forma oval y posee de 2 a 4 núcleos dependiendo de su maduración. Poseen un citoplasma granular fino que a su vez contiene axonemas flagelares, vacuolas, ribosomas y fragmentos del disco ventral, por lo tanto el quiste posee las estructuras observadas en el estadio invasivo pero de manera desordenada; posee una pared externa fibrinosa compuesta de 7 a 20 filamentos y una pared interna membranosa que mide de 0.3 a 0.5 μm , cuando el quiste posee dos núcleos se encuentra de forma inmaduro denominándose pre quiste mientras que los quistes completamente maduros poseen 4 núcleos en total. (Rivera *et al.*, 2002: Gillin *et al.*, 1996: Owen, 1980).

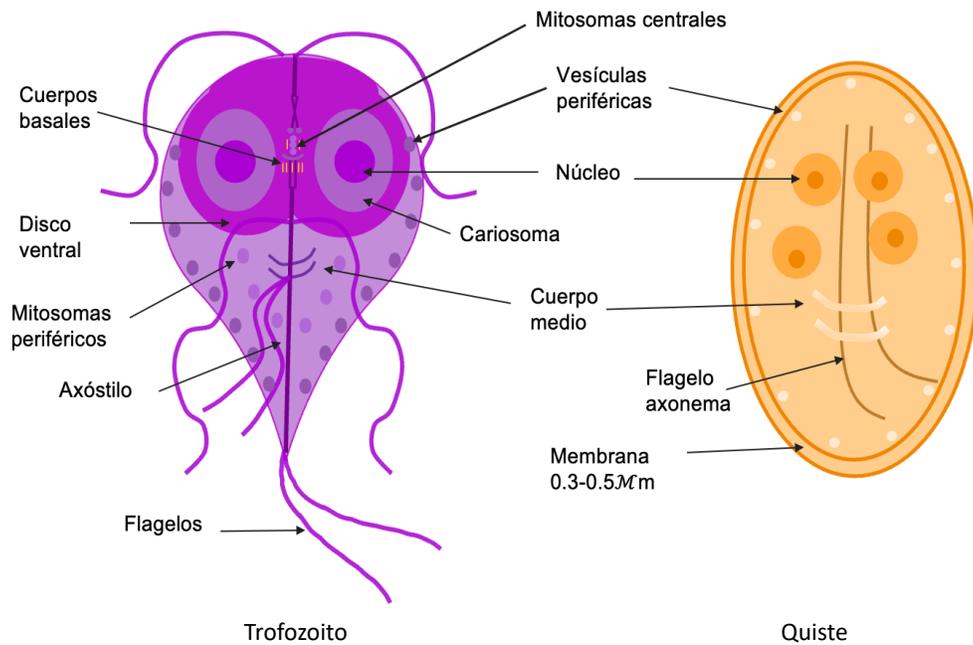


Figura 1. Estadios de *Giardia intestinalis*

2.2.2 Taxonomía

Cuando hablamos de protozoarios, se tienen considerados 7 phyla de importancia, en la actualidad se clasifican a los protozoarios como eucariotes basales reconociendo hasta 13 phyla, los flagelados pertenecen al antiguo phylum *mastigophora*, hasta hace poco *Giardia* se manejaba como un parásito

perteneciente al phylum Sarcomastigofora, subphylum Mastigofora, clase Zoomastigophorea, Orden Diplomonadida, familia Hexamitidae, género *Giardia* (Levine, 1980; Morrison *et al.*, 2007). Hoy en día debido a los avances tecnológicos se está manejando un nuevo orden taxonomico para este protozooario con base en datos genéticos estructurales y bioquímicos, Cavalier-Smith (2003) describe al parásito de la siguiente manera:

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Matamonada

Subphylum: Trichoza

Superclase: Eopharyngea

Clase: Trepomonadea

Subclase: Diplozoa

Orden: Giardiida

Familia Giardiidae

Género: *Giardia*

2.3 Epidemiología

Giardia intestinalis es uno de los protozoarios intestinales más comunes de los humanos. A nivel mundial se han reportado que alrededor de 200 millones de personas presentan al parásito de los cuales solamente 500,000 presentan signos de esta enfermedad (Yason & Rivera, 2007). La frecuencia de *Giardia* en México puede llegar a ser muy variable con cifras que van del 2 al 39%, siendo los niños en edades de preescolar los más propensos a contraer el parásito (Vazquez & Rivera, 2009); en el 2004 la organización mundial de la salud catalogó a la giardiasis como una enfermedad desatendida relacionada a la pobreza perjudicando el desarrollo y la mejoría socioeconómica (Savioli *et al.*, 2006).

Giardia afecta a una amplia variedad de especies y el hecho de que pueda infectar a humanos y animales, eleva la preocupación en relación al riesgo en la

transmisión a partir de animales de compañía (Thompson *et al.*, 2008). Estos niveles de riesgo dependerán de la prevalencia y los genotipos presentes. Los perros y gatos son reservorios de este protozooario, afectando tanto a humanos como a otros animales (Gerhold & Jessup, 2013). La magnitud del riesgo de transmisión de gatos a humanos hasta la fecha no es bien conocida.

La giardiasis, a pesar de haberse descubierto hace 400 años y ser un problema de salud pública mundial, es considerada una enfermedad emergente siendo los genotipos A y B los más prevalentes que afectan a humanos, perros y gatos. No obstante, los quistes en heces se producen de forma intermitente haciendo difícil su diagnóstico y llegándose a confundir con otras enfermedades gastrointestinales. La baja sensibilidad de un solo análisis coproparasitológico hace aún más difícil la detección de la enfermedad, por lo cual se necesitan exámenes repetidos hasta que las formas morfológicas se observen (Nash *et al.*, 1987).

2.3.1 Genotipos

Debido a que *Giardia intestinalis* representa un problema tanto de salud humana como para la salud animal, diversos estudios se han encargado de caracterizar esta especie, obteniendo distintos genotipos a partir de aislados del parásito (Mayrhofer *et al.*, 1995; Minvielle *et al.*, 2008; Monis *et al.*, 1998; Monis *et al.*, 1999). Si bien morfológicamente no se encuentran diferencias, a nivel genético se tiene conocimiento de ocho ensamblajes diferentes, designados de las letras A a la H, los cuales se diferencian de acuerdo con su hospedero (cuadro 1); con base en esto, los genotipos A y B son los que representan un mayor problema, debido a que su gama de hospederos es la más amplia, además de ser los que infectan indiscutiblemente al humano. El grupo A, presenta cuatro subgrupos de, de los cuales AI y AII parasitan tanto a humanos como a animales, y AIII y AIV exclusivamente a animales (Abe *et al.* 2005; Eligio-García 2005); los grupos C y D son encontrados principalmente en perros, E en ganado, F es típico de los gatos, G de ratas y H de pinnípedos (Cacció *et al.* 2008; Monis *et al.*, 1999). Los genes

utilizados para el genotipado de *Giardia intestinalis* incluyen aquellos que codifican para la β -giardina, triosa fosfato isomerasa, la unidad pequeña de RNA ribosomal y la glutamato deshidrogenasa (Cacciò *et al.*, 2018; Heyworth, 2016).

Cuadro 1. Ensamblajes de *Giardia intestinalis* y sus hospederos (Heyworth, 2016).

Ensamblaje	Hospederos
A	Humanos, Perros, Gatos, Ganado, Pequeños rumiantes, Cerdos, Caballos, Aves, Mamíferos silvestres
B	Humanos, Perros, Ganado, caballos, lagomorfos, Mamíferos silvestres
C	Perros, Ganado, Mamíferos silvestres
D	Perros, Ganado, Mamíferos silvestres
E	Ganado, Pequeños rumiantes, Cerdo, Caballos
F	Gatos
G	Ratas ratones
H	Focas

2.3.2 Hospederos

La taxonomía de *Giardia* ha sido controversial por muchos años, actualmente siete especies del protozooario son reconocidas como válidas, *G. agilis* en anfibios, *G. ardeae* y *G. psittaci* en aves, *G. muris* y *G. microti* en roedores, *G. peramelis* en marsupiales y *G. intestinalis* o *G. duodenalis* en mamíferos (Hilman *et al.*, 2016). Aunque la mayoría de las especies de *Giardia* se han adaptado a un solo hospedero, cuando se describe a *G. intestinalis* su rango de hospederos es mayor que las otras especies (figura 4), y cobra relevancia como patógeno ya que infecta humanos y animales de compañía, su papel que puede llegar a representar un problema en la salud pública y animal.

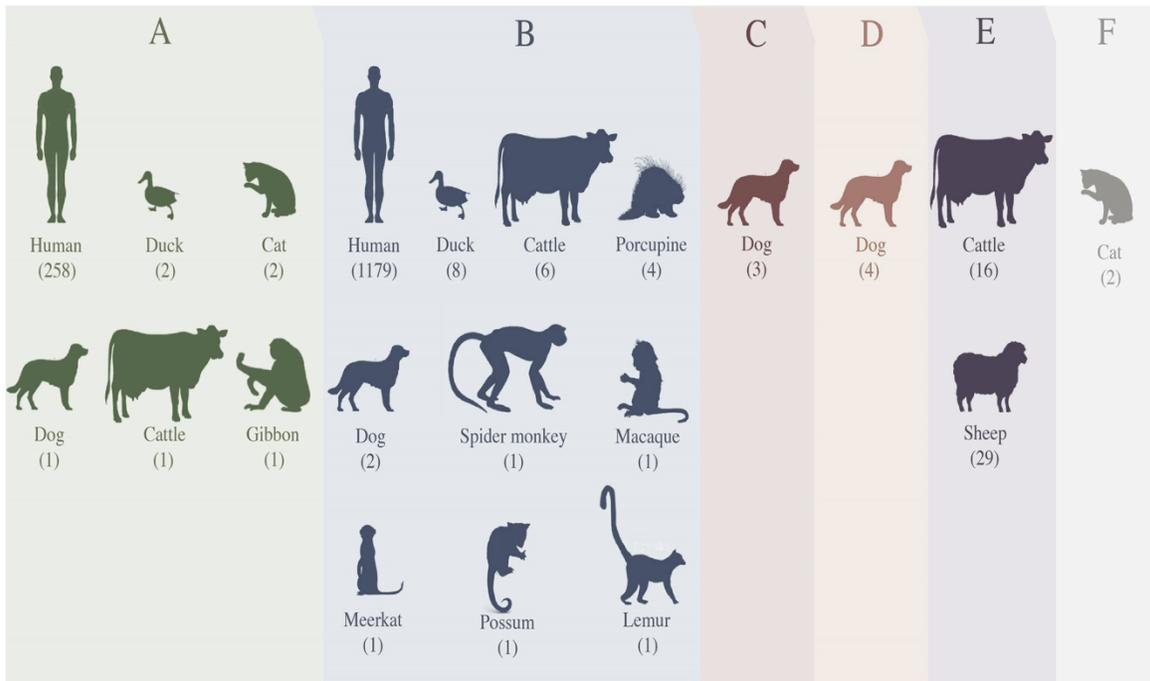


Figura 2. Hospederos y genotipos de *Giardia intestinalis* (Garcia et al., 2017)

El hecho de que este protozoo afecte a mamíferos domésticos especialmente a perros y gatos corresponde a un enorme riesgo para el humano. El potencial zoonótico de este protozoo fue propuesto mucho antes de que se tuviera conocimiento de los ensamblajes genéticos actuales, esto en estudios donde se presentaba una supuesta transmisión cruzada. Sin embargo, los resultados de dichos estudios eran difíciles de interpretar por lo que no fue posible comprobarse hasta que se comenzaron a utilizar técnicas moleculares para diferenciar los genotipos de este parásito (Bugg et al., 1999). En la actualidad infecciones mixtas entre genotipos pertenecientes a los humanos y a los perros y gatos han sido reportadas, por lo que desde un punto de vista epidemiológico, la interpretación de resultados de estos estudios demuestra a un potencial reservorio ambiental de la giardiasis en zonas urbanas (Monis et al., 2009).

La transmisión zoonótica de este parásito se ha complicado en los últimos años debido al incremento de infecciones en fauna silvestre, esto como consecuencia de actividades antropogénicas, cambios ambientales y ruptura de

barreras ecológicas (Feng et al., 2018; Heyworth, 2016) esto último a causa de un aumento de las zonas agrícolas, urbanización, ecoturismo, disponibilidad y distribución de agua, etc. Dichos factores ayudan, a la diseminación de este protozooario en lugares y reservorios en los que anteriormente no se había identificado. Dos de los animales más susceptibles a especies zoonóticas de *Giardia* son los castores y los coyotes, animales que han demostrado ser importantes en la diseminación de este parásito, tanto a otros animales silvestres, como a humanos o fuentes de agua (Kutz et al., 2009).

2.3.3 Ciclo biológico

Giardia intestinalis posee un ciclo de vida directo que no cambia a pesar de su hospedero (Figura 2), este presenta dos fases morfológicamente diferentes, el infectivo denominado quiste, el cuál es responsable de causar la infección y el trofozoito o estadio invasivo el cual es causante de la enfermedad. *Giardia intestinalis* puede sobrevivir en el medio ambiente por meses si sus condiciones son óptimas (4 °C) (Adam, 2001). Antes se consideraba al quiste como una forma criptobiótica, sin embargo, se ha observado que éste tiene una media del 15% del consumo de oxígeno de los trofozoitos y es competente para atravesar el estómago y desenquistar en intestino (Paget et al., 1998).

Después de la ingestión el desenquite ocurre en el duodeno debido a la exposición del quiste con el ácido gástrico durante su paso por estómago y posteriormente exposición a la bilis y enzimas pancreáticas en el duodeno, la preferencia de este parásito por el duodeno y yeyuno medio sugiere que necesita de concentraciones considerables de nutrientes y un pH estable (Bernander et al., 2001). Durante el desenquite, se libera un excizoito el cual se divide y genera dos trofozoitos, estos colonizan las vellosidades del intestino delgado y se adhieren a los enterocitos mediante su disco ventral, característica importante en el parásito con relación a su hospedero. Sin embargo, no son parásitos obligados dado a que su ciclo biológico se lleva a cabo de una manera extracelular, en donde comienzan a replicarse por medio de una reproducción asexual o fisión binaria con un tiempo

de duplicación de 9 a 12 h. Este estadio posee dos núcleos idénticos cuyo contenido genómico varía entre diploide 2N y tetraploide 4N y en consecuencia cicla entre 4N y 8N. Durante esta etapa estacionaria los trofozoitos se detienen en fase G2 del ciclo celular y presentan una ploidia de 4N en cada núcleo (8N) (Bernander *et al.*, 2001; Lebwohl *et al.*, 2003 ; Lopez-Romero *et al.*, 2015). Durante esta fase es cuando los primeros signos de la enfermedad comienzan a manifestarse, dando como resultado el daño en la mucosa intestinal, el acortamiento de las microvellosidades y la deficiencia de disacaridasas; induciendo una respuesta inmune por parte del hospedero que promueve un aumento de permeabilidad intestinal con hipersecreción de aniones y líquido en el intestino. Este cambio en el microambiente intestinal puede actuar como un estimulante de la patogenicidad del parásito, terminando en una disfunción de la barrera intestinal y la apoptosis de enterocitos, posiblemente ocasionado por el daño intestinal debido a las proteasas de cisteína que secreta el trofozoito (Liua *et al.*, 2018).

El proceso de enquistación ocurre como una respuesta adaptativa del protozoario al momento de salir en heces, esto debido a que los trofozoitos son sensibles a cambios de temperatura, humedad, y presencia de agentes químicos, por lo que no son capaces de sobrevivir fuera del intestino de su hospedero (Thompson & Monis, 2004).

Por causa del tránsito intestinal los trofozoitos descienden por el intestino del hospedero, al encontrarse con ambientes pobres en colesterol, cambios en el pH y un incremento de sales biliares, estos comienzan a enquistarse, el requerimiento de colesterol se debe a la biogénesis de membrana que posee este parásito, sin embargo al no ser capaz de sintetizar el colesterol este lo debe obtener del intestino delgado del huésped (Thomson *et al.*, 1993).

Una vez iniciado este proceso el trofozoito, en fase G1 del ciclo celular, pasa por dos rondas consecutivas de replicación cromosómica sin la intervención de una división celular por lo que no hay presencia de citoquinesis, pero si una división

nuclear y los componentes de la pared quística se comienzan a sintetizar de forma rápida, esto para ordenarse en gránulos secretores característicos. Las vesículas secretoras de la enquistación transportan los componentes de la pared quística a la membrana plasmática, para liberarse posteriormente en el exterior del parásito, este proceso termina una vez obtenida una pared rígida que conforma el exterior del parásito ya enquistado, 8 h después de iniciado el proceso (Erlandsen *et al.*, 1990). Los quistes de *Giardia* contienen 4 núcleos, cada uno con una ploidía de 4N, 16N por quiste por lo tanto el contenido de ADN es el doble que el de los trofozoitos en fase estacionaria (Bernander *et al.*, 2001); estos poseen una pared de hialina y glicoproteína que los protege de temperaturas externas, factores ambientales e incluso a la acción de los desinfectantes (Adam, 2001 ; Lujan, 2006).

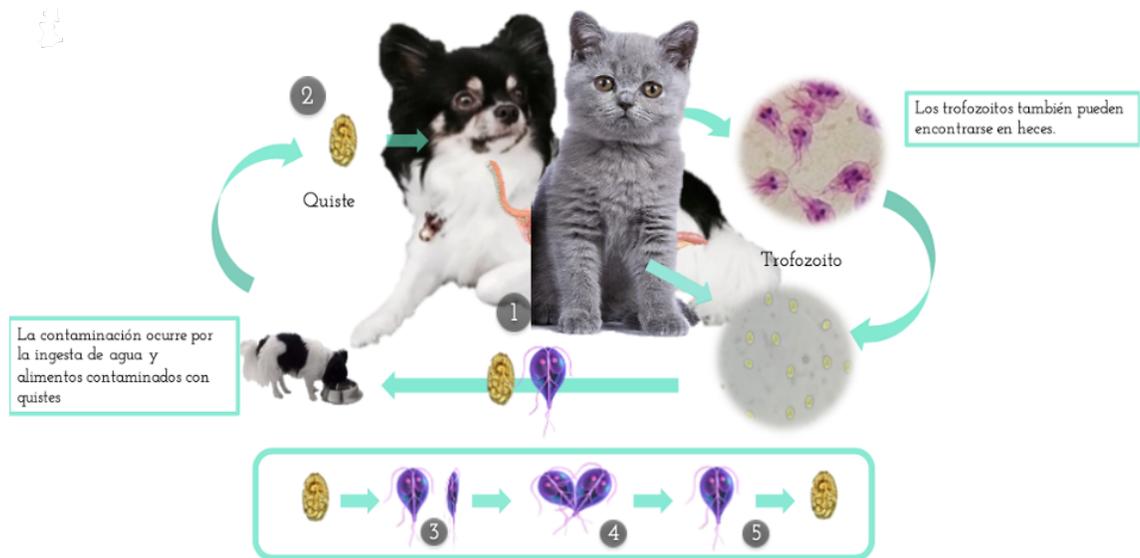


Figura 2. Ciclo Biológico de *Giardia intestinalis*

Gracias a estudios anteriores en cultivos axénicos del aislado WB (cepa de trofozoitos) han permitido conocer el genoma de este parásito, en el de trofozoito se presenta un genoma diploide y tetraploide (figura 3), durante cada ciclo celular el genoma es replicado (fase S) y los cromosomas se distribuyen por igual a células hijas (Fase M) (Svärd *et al.*, 2003; Bernander *et al.*, 2001).

2.3.5 Prevalencia

La prevalencia de los parásitos intestinales depende de diferentes variables incluyendo área geográfica y número de animales compartiendo un mismo espacio. Los estudios epidemiológicos de los parásitos intestinales nos dan una buena idea de los riesgos zoonóticos que conllevan a las personas a convivir con animales (Jiménez-Cardoso *et al.*, 2010).

La prevalencia de *Giardia intestinalis* en perros ha sido reportada anteriormente con una considerable variación, los rangos de la prevalencia en la literatura van del 0.6% al 49.7% (Mundim *et al.* 2007). Un estudio a partir de meta-análisis para determinar la prevalencia de *Giardia* en heces mostró una prevalencia general del 12%; en este mismo estudio, al comparar los métodos de microscopía contra ELISA, PCR e IFA, se determinó una prevalencia de 11.8% para microscopía y 19.8% para el promedio de los otros (Bouzid *et al.*, 2014). A través de microscopía, estudios en heces de gato han mostrado prevalencias que van del 1% al 43%, en países como EE.UU., Japón, Brasil y Rumania (Itoh *et al.*, 2005; De Santis-Kerr *et al.*, 2006; Coman *et al.*, 2009; Coello *et al.*, 2009; Dall'Ágnol *et al.*, 2010). Asimismo, estudios utilizando PCR, muestran prevalencias entre el 8% al 56% en Italia, Reino Unido y EE.UU. (Manciati *et al.*, 2014; Paris *et al.*, 2014; Polak *et al.*, 2014).

Los estudios de *Giardia intestinalis* en gatos de los Estados Unidos oscilan entre 0.58 al 13% (Vasilopoulos *et al.*, 2007). Si bien se tiene información que el genotipo F específico en gatos suele presentarse con mayor frecuencia, existen estudios que los genotipos potencialmente zoonóticos como A y B han sido identificados en gatos de Nueva York, Mississippi, Alabama en EE.UU, y Ontario en Canadá (Lefebvre *et al.*, 2006; McDowall *et al.*, 2011; Van Keulen *et al.*, 2002; Vasilopoulos *et al.*, 2007).

Mosallanejad *et al.*, (2010) Hicieron un estudio en el sureste de Irán y determinaron una prevalencia del 3% mediante detección de antígenos de *Giardia* en gatos provenientes de clínicas particulares, mientras que la prevalencia del 2% se obtuvo mediante la observación de quistes en heces.

En humanos que viven en los EE. UU., se determinó que los casos de giardiasis van de 7.4 a 7.6 casos por 100,000 habitantes y que la giardiasis crónica en niños puede llevar a malabsorción y falla en el desarrollo (Cotton *et al.*, 2011).

En México solo existen estudios de la prevalencia y presencia de genotipos zoonóticos en perros (Godínez *et al.*, 2019); sin embargo, no se han descrito prevalencias o genotipos de *G. intestinalis* en gatos.

2.4 Patogénesis

La patogénesis de la giardiasis es un resultado de la ruptura de la barrera epitelial y las respuestas inflamatorias e inmunológicas del hospedero (Meloni *et al.*, 1995). El principal efecto patogénico resulta de la interacción entre productos parasitarios, como proteinasas y microvellosidades, además de la deficiencia de enzimas encontradas en el borde en cepillo. De igual manera se ha descrito un aumento en la permeabilidad epitelial derivado de la apoptosis de los enterocitos y de la reorganización del citoesqueleto, producida por productos tóxicos de los trofozoitos. Estos factores combinados dan lugar a un síndrome de mala absorción que a su vez desencadena diarreas profusas y un menor aumento de peso. La reducción de lipasas y el aumento de la producción de mucina por parte de células caliciformes explican la esteatorrea que se puede llegar a presentar en hospederos infectados con *Giardia*, sin embargo el cómo se presente la infección dependerá principalmente de la relación del parásito con su hospedero. El hecho de que la giardiasis sintomática ocurra en pacientes inmunocomprometidos, malnutridos o jóvenes es una indicación de que los factores del huésped juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad y la manifestación de signos clínicos (Thompson *et al.*, 1990; Buret *et al.*, 2002).

2.4.1 Mecanismos desencadenados por la infección

Durante la fase de trofozoito los primeros signos de la enfermedad comienzan a manifestarse, como resultado de daño en la mucosa intestinal, el acortamiento de las microvellosidades y la deficiencia de disacaridasas, dando como resultado la

inducción de una respuesta inmune por parte del hospedero; que resulta en un aumento de permeabilidad intestinal con hipersecreción de aniones y líquido en el intestino. Este cambio en el microambiente puede actuar como un estimulante de la patogenicidad del parásito, terminando en una disfunción de la barrera intestinal (figura 5) (Liua *et al.*, 2018). Las infecciones causadas por este protozooario pueden llegar a provocar cambios a largo plazo en la fisiología del intestino, por lo que pueden presentarse secuelas post infecciosas; además de una predisposición a trastornos gastrointestinales crónicos, incluyendo el síndrome del intestino irritable y alergias alimentarias que pueden llegar a durar 10 años posterior a la eliminación del parásito (Bartelt & Sartor, 2015).

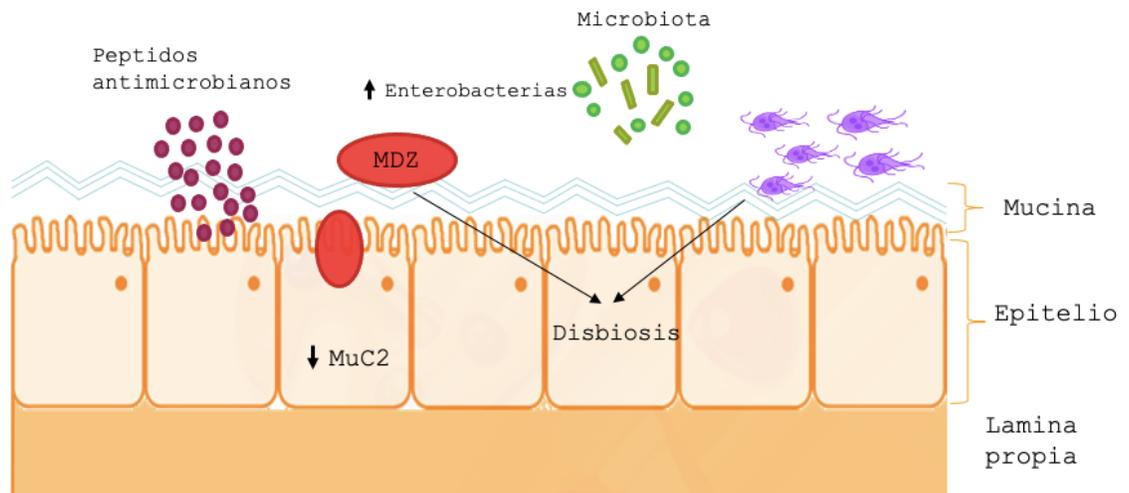


Figura 5. Respuesta por parte del hospedero ante una infección de giardiasis modificado de (Knoop *et al.*, 2016; Woerther *et al.*, 2013; Marie & Petri, 2011).

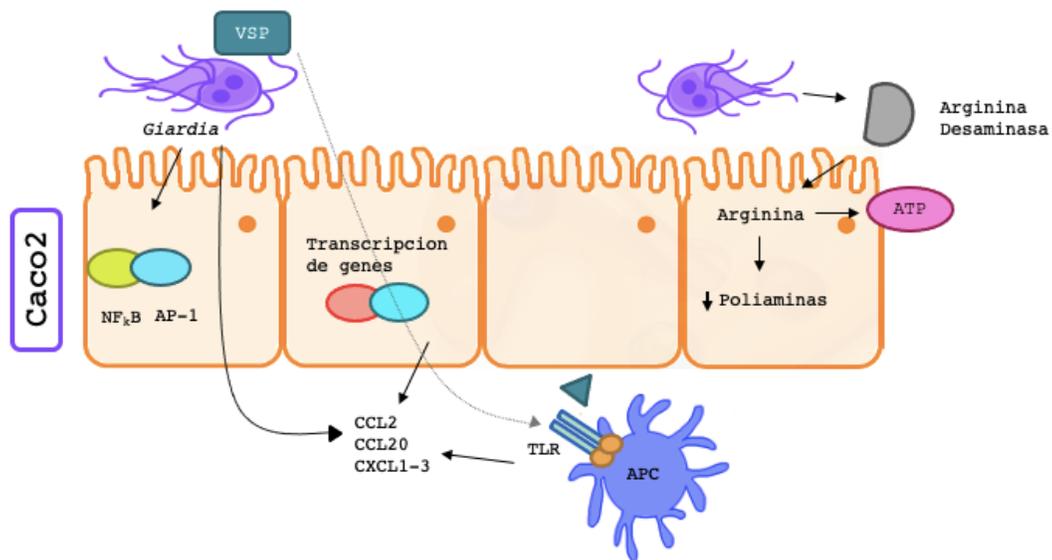
Varios mecanismos de defensa innata juegan un papel importante en la defensa contra este protozooario, tales como el incremento en la producción de óxido nítrico, las lactoferrinas, las α -defensinas, los fagocitos, los mastocitos, las células dendríticas y la hipermotilidad (Aley *et al.*, 1994); sin embargo *Giardia* es capaz de evadir algunas de estas respuestas y evitar ser eliminado del intestino. Por lo general se sugiere que la giardiasis puede ser autolimitada y que los hospederos son capaces de eliminar la infección, por medio de la inmunidad adquirida contra

este protozoario. Se ha propuesto que la respuesta por parte de las células B es importante para su eliminación, sin embargo aun no se tiene claro el papel que desenvuelven los anticuerpos para lograr frenar la enfermedad, por lo que también se propone que el microbioma puede conferir cierta protección al parásito (Fink & Singer, 2017).

Por otro lado, se han desarrollado modelos *in vitro* de las interacciones entre el huésped y el parásito durante la giardiasis utilizando células epiteliales intestinales cultivadas en co-incubaciones con parásitos axénicos de *Giardia*. Las dos líneas celulares más utilizadas en los proyectos de investigación sobre el tracto intestinal humano son las células Caco-2 y HT-29 ambas derivadas de adenocarcinomas de colon. (Natoli *et al.*, 2010). Roxström-Lindquist *et al.*, (2005) llevaron a cabo por primera vez, en donde identificaron genes regulados de forma diferencial en células Caco2 en presencia de trofozoitos de *Giardia*, observando cambios en la expresión de genes asociados a la inmunidad (figura 6), incluyendo las quimiocinas (CCL2, CCL20 y CXCL1-3), genes implicados en la regulación transcripcional (NFkappaB inhibidor alfa, FOS, JUNB, TCF8) y genes asociados en la regulación de la estabilidad del ARNm (ZFP36 o tristetraprolina, TTP) (Guo *et al.*, 2017). Un aumento en el nivel de ARN también se observó en la proliferación de las células Caco-2 para la mayoría de las quimiocinas, por lo que se sugiere que esta diferencia es importante durante las interacciones hospedero-parásito e influye en la expresión génica de las células epiteliales del colon; además de influir directamente en la señalización inmunitaria (O'Sullivan *et al.*, 2017). De igual forma se observó que los factores de transcripción de NFkB y AP-1 se activan al entrar en contacto con *Giardia* y las células epiteliales.

Por otra parte, *Giardia* es capaz de utilizar el aminoácido arginina para generar ATP a través de la vía arginina desaminasa, lo cual causa un agotamiento de la arginina y una competencia metabólica directa con las células del hospedero (Stadelmann *et al.*, 2013). Así mismo, se ha comprobado que los trofozoitos inducen la detención del ciclo celular en las células Caco-2 a través de este consumo de arginina, lo que provoca la decaída de las poliaminas y la inducción de genes de

detención en el ciclo celular. Esta expresión génica diferencial demuestra que el daño al ADN está relacionado directamente con la interacción del parásito con su hospedero (Ma'ayeh *et al.*, 2018; Roxström-Lindquist *et al.*, 2005). El arresto del ciclo celular también podría suponer una inducción a la apoptosis en células epiteliales (Troeger *et al.*, 2007), en la actualidad no se sabe con exactitud como es que *Giardia* puede inducir dicha apoptosis, sin embargo se cree que puede ser a través de la vía extrínseca mediante proteasas de cisteína secretadas (Ortega-pierres *et al.*, 2018) justo después de haberse presentado la inanición de glucosa o arginina, el estrés oxidativo y la alteración de la barrera epitelial (Ma'ayeh *et al.*, 2018).



Señalización inmunitaria *Giardia* modificado de (Emery-Corbin *et al.*, 2020; Cotton *et al.*, 2015; Potoka *et al.*, 2013).

Los mecanismos que posee este protozoo para causar diarrea aun no se conocen con exactitud, se sugiere que los trofozoitos actúan como una barrera mecánica para la absorción, o que compiten con los nutrientes del hospedero. Los trofozoitos colonizan el intestino delgado de su hospedero en donde interactúan principalmente con células epiteliales durante su adherencia, es aquí donde interrumpen y distorsionan las microvellosidades en el lugar en donde el disco ventral se interconecta con la membrana de las microvellosidades, existe evidencia

que sugiere que este protozoario produce y posiblemente libera sustancias citopáticas en el lumen intestinal (Lindmark, 1988). *Giardia* posee una serie de tior proteinasas que puede atacar a las glicoproteínas de superficie y alterar las microvellosidades, de igual manera la lectina superficial de unión a manosa puede contribuir al daño epitelial (Farthing *et al.*, 1986).

2.4.2 Alteración de la microbiota ocasionada por *Giardia*

Giardia es uno de los principales patógenos relacionados con cuadros diarreicos en el mundo (Hanevik *et al.*, 2009), además de ser un agente precursor del síndrome de intestino irritable post-infeccioso (Halliez & Buret, 2013). Durante su fase aguda este protozoario puede provocar cambios funcionales en la microbiota comensal de su hospedero, así como cambios en la estructura de la biopelícula bacteriana intestinal, contribuyendo a las manifestaciones clínicas y post infecciosas de la giardiasis. Por lo tanto, esta alteración desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad, influyendo directamente en la resistencia a la colonización por trofozoitos (Fekete *et al.*, 2021).

Giardia interactúa directamente con el microbioma y a través de estas interacciones puede modular el metabolismo de su hospedero, la respuesta inmunitaria y la barrera mucosa, efectos que incluso persisten una vez que el parásito ha sido eliminado (Fekete *et al.*, 2021). Gerbaba y colaboradores demostraron que este protozoario es capaz de causar una disbiosis en cultivos con biopelículas de mucosa humana, aumentando la virulencia de la microbiota comensal hacia células epiteliales humanas (Gerbaba *et al.*, 2015), estas biopelículas alteradas eran capaces de inducir inmunopatologías provocadas por proteasas secretoras del parásito (Bartelt *et al.*, 2017).

En un estudio evaluado en ratones de diferentes procedencias, se describió que el microbioma era distinto en cada una de las poblaciones de roedores, encontrando diferentes susceptibilidades en la infección por *Giardia*, comprobando a su vez que la resistencia hacia este protozoario era transferible a los ratones

normalmente susceptibles, si estos eran puestos en un mismo entorno con ratones resistentes. El tratamiento con antibióticos en infecciones causadas por *Giardia* en ratones ha sido utilizado frecuentemente, sugiriendo que el microbioma puede desempeñar un papel importante en el establecimiento y la persistencia de la infección, sin embargo, se describe que el mismo tratamiento puede inducir la disbiosis (Singer & Nash, 2000).

De igual manera Barash & Maloney (2017), evaluaron el impacto de la infección por giardiasis en la microbiota del hospedero, demostrando que durante la colonización en el intestino delgado se produce una disbiosis sistémica de bacterias comensales aeróbicas y anaeróbicas, específicamente describen que durante esta etapa existe aumento de proteobacterias aerobias y una disminución de firmicutes y melainobacterias, hipotetizando que la disbiosis presente podría estar asociada directamente al metabolismo anaerobio del parásito.

Se plantea que la persistencia de la disbiosis en la microbiota intestinal esta relacionada con el establecimiento de la enfermedad a largo plazo así como con el tratamiento administrado, siendo esta disbiosis la responsable de los trastornos gastrointestinales posteriores a la infección (Beatty *et al.*, 2017). Las alteraciones en la microbiota, además de aumentar el riesgo inmediato de infección, también pueden afectar a la homeostasis inmunitaria básica con repercusiones en todo el organismo y a largo plazo (Francino, 2016). Las enfermedades atópicas, inflamatorias y autoinmunes se han relacionado con la disbiosis de la microbiota intestinal y, en algunos casos, se han establecido asociaciones significativas entre estas enfermedades y la ingesta de antibióticos (Francino, 2014). Sin embargo, a pesar de que existe evidencia que la gravedad de la enfermedad está relacionada con el microbioma del hospedero, aun no se conocen con exactitud las consecuencias que los tratamientos pueden causar en la microbiota intestinal (Riches *et al.*, 2020), por lo que es importante el comprender cómo algunos fármacos pueden llegar a afectarla.

2.4.3 Signos clínicos

Las manifestaciones clínicas de este protozoo varían entre infecciones sintomáticas y asintomáticas, siendo la diarrea aguda e intermitente de los signos más comunes. Estudios indican que la presentación de esta enfermedad está ampliamente relacionada a los genotipos presentes en la misma, siendo el genotipo A el que está asociado con la enfermedad aguda y presencia de diarrea explosiva y el genotipo B el asociado a la enfermedad crónica con presencia de diarrea intermitente y en ocasiones asintomática (Jerez *et al.*, 2015; Nousse *et al.*, 2016; Thompson *et al.*, 2000). Con base en diversos estudios, autores concuerdan en que los signos clínicos comunes de la giardiasis se encuentran en la mayoría de las especies, incluyendo diarrea como antes mencionado, vómito, abdomen distendido, anorexia, flatulencia y urticaria (Dib *et al.*, 2008; Geurden *et al.*, 2008; Hardin *et al.*, 1997).

Los signos y síntomas de este protozoo también se ven influidos por la especie de hospedero, especie o genotipo del protozoo, la edad, la competencia inmunitaria y las infecciones concurrentes que se puedan presentar, la giardiasis aguda y crónica se presentan como dos enfermedades diferentes, en la primera los episodios de diarrea aguda están asociados directamente con la infección, mientras que en la segunda la diarrea no es una característica específica sino que está más asociada a un retraso en el desarrollo del hospedero y la mayor parte del tiempo se agrava por mala nutrición y poliparasitismo (Thompson, 2008). De igual manera, se ha comprobado que las infecciones por *Giardia* pueden inducir a síntomas gastrointestinales post infecciosos como el síndrome del intestino irritable (Hanevik *et al.*, 2009).

En algunos pacientes se presentan fenómenos como la malabsorción de grasas, glucosa, lactosa, xilosa, vitamina A, vitamina B12, vitamina E, hierro y ácido fólico (Cordingley & Crawford, 1986). La deficiencia de lactasa se da en un 20 a 40% de los casos, de igual forma, diversos pacientes que presentaron cuadros diarreicos, desarrollaron intolerancia post infección a este disacárido posterior a su tratamiento;

por lo cual se recomienda no consumir productos que contengan lactosa durante un mes posterior al término de su tratamiento (Hill, 2014).

Tras un periodo de incubación de una o dos semanas puede aparecer diarrea explosiva, acuosa o mal oliente, esto derivado de la presencia de la grasa que se encuentra en las heces por lo tanto las evacuaciones en algunas especies pueden llegar a ser de un color amarillento o claro, en raras ocasiones con presencia de moco o sangre, esto acompañado de vómito, anorexia, sonidos abdominales, dolor abdominal y fiebre moderada. En otras ocasiones tras una fase aguda mal definida puede presentarse una fase crónica durante varios meses caracterizada por diarreas intermitentes y periodos de estreñimiento, pérdida de peso, distensión abdominal anorexia y flatulencia (Diaz & Fernandez, 1996).

Aunque las infecciones con *Giardia* son comunes, la mayoría de los perros y gatos permanecen asintomáticos, si la enfermedad se manifiesta es usual que esté asociada con animales jóvenes y animales que se encuentran confinados, donde los efectos del confinamiento y la debilidad nutricional causan estrés y pueden acelerar los efectos de la infección. El signo clínico más común en la giardiasis es la diarrea, la cual puede ser aguda o crónica y limitada intermitente o continúa (Thompson, 2008). Si bien la susceptibilidad a la enfermedad aun no se conoce totalmente, se plantea que los protozoarios poseen la habilidad de modular la respuesta inflamatoria de su hospedero y de esta forma regula sus factores de virulencia (Cotton *et al.*, 2015). Asimismo se tiene evidencia que la patogenicidad del protozooario esta asociada a la microbiota de su hospedero, la cual posee un rol importante en la manifestación de la enfermedad clínica, por lo que si el animal se encuentra en condiciones óptimas es capaz de regular la infección sin presentar los signos comunes de la giardiasis (Fink & Singer, 2017; Torres *et al.*, 2000), De igual manera se asocian los casos asintomáticos a previas infecciones. Si bien en los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la fisiopatogenia de la giardiasis, hasta el momento los factores exactos que determinan la variabilidad de las manifestaciones clínicas no esta completamente esclarecidos. Diversos autores plantean que las manifestaciones clínicas podrían estar relacionadas al genotipo

detectado, sin embargo los resultados han sido contradictorios (Cacciò *et al.*, 2005; Eligio-García *et al.*, 2005; Haque *et al.*, 2005)

2.5 Tratamiento

Existe una amplia variedad de fármacos para el tratamiento contra la giardiasis destacándose los nitroimidazoles, tales como el metronidazol, el tinidazol y la furazolidona, y los benzimidazoles de los cuales el albendazol es de los más usados. Así mismo, existen otros fármacos como la quinacrina y la nitazoxanida que han tenido un uso terapéutico en contra de este parásito (Thompson, 2008).

2.5.1 Nitroimidazoles

Los nitroimidazoles (benzoilmetronidazol, nimorazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol), especialmente el metronidazol, son los fármacos de elección contra este parásito. Los cuales fueron descubiertos en 1955 y se demostró su efectividad contra otro protozooario *Trichomonas vaginalis* y no fue sino hasta 1961 que se observó su efectividad contra la giardiasis. Sin embargo, se ha descrito que este fármaco no tiene ninguna acción en contra de los quistes de *Giardia* (Escobedo & Cimerman, 2007; Paget *et al.*, 1989). El metronidazol forma metabolitos activos cuando se reduce la enzima piruvato ferredoxin oxidorreductasa (PFOR) en un microambiente anaeróbico, por lo tanto, dicha acción se limita a protozoos y bacterias anaeróbicas. La reducción del PFOR crea gradientes de concentración que permite la acumulación del medicamento dentro del trofozoito (figura 5), este tiene un potencial redox más bajo (-460 mV) que la ferredoxina (-320 mV), por lo que actúa como un sumidero de electrones, extrayendo electrones de ferredoxina para convertirlos en aniones de radicales nitro o nitroso; lo cual causa daño de biomoléculas funcionalmente importantes, como la rotura de la hebra y el entrecruzamiento del ADN inhibiendo la segregación de ADN o bien modifica los genes implicados en el proceso final de la mitosis, deteniendo el ciclo celular en la fase G2+M (Hoyne *et al.*, 1989). Además el metronidazol inhibe el consumo de oxígeno del trofozoito, actuando como un aceptor de electrones alternativo (Raether & Hänel, 2003; Paget *et al.*, 1989).

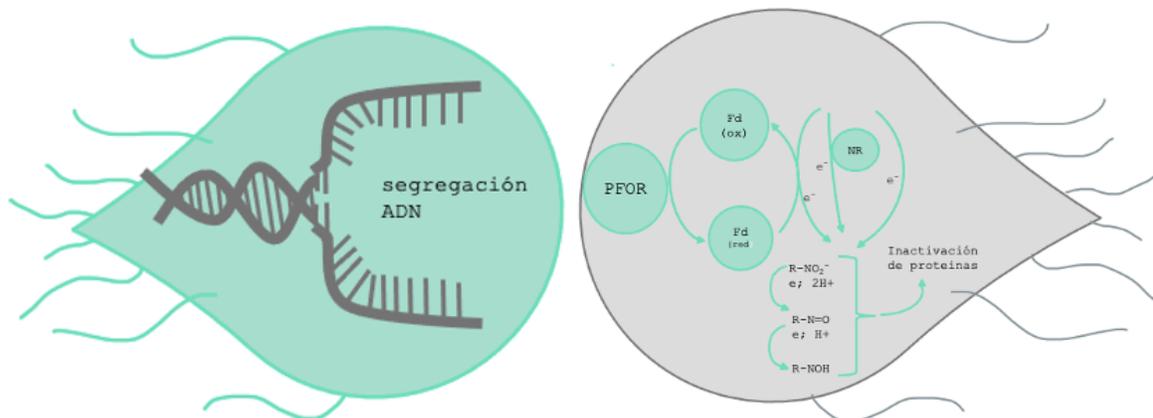


Figura 5. Difusión del metronidazol en el trofozoito. Modificado de Watkis & Eckan, 2014.

La administración oral del metronidazol resulta en una buena absorción, así como una buena distribución en los tejidos y secreciones corporales, incluida la leche materna, la vida media en plasma es de 7h aproximadamente. Su metabolismo en el huésped es principalmente hepático y es metabolizado por un proceso oxidativo. El daño que este medicamento induce, da lugar a un grave estrés oxidativo, de igual modo se ha observado que el metronidazol provoca degradación del factor de elongación 1 γ (EF1- γ), una enzima que participa en la traducción de proteínas (Leitsch *et al.*, 2012).

Las principales causas del fallo en el tratamiento se deben a la deficiente absorción intestinal; la disminución del PFOR, lo que resulta en un mecanismo deficiente de barrido de oxígeno; no obstante en algunos casos de giardiasis se ha observado que si bien las concentraciones de PFOR eran 17 veces menores a una cepa resistente la capacidad de absorción de oxígeno no era significativamente diferente en cepas sensibles y resistentes (Ellis *et al.*, 1993). En algunas cepas resistentes se observó un aumento en la actividad de la NADPH oxidasa, además en estudios *in vitro* con cepas resistentes inducidas en laboratorio, dicha resistencia se correlacionó con una disminución de los niveles de peroxidasa y reductasa dependientes del tiol (Harris, 2001).

2.5.2 Benzimidazoles

Los benzimidazoles son fármacos utilizados mayormente para contrarrestar infecciones causadas por helmintos, en la actualidad se conoce que su amplio espectro incluye una actividad importante contra ciertos protozoarios. Dentro de este grupo de medicamentos, el albendazol y el mebendazol son los que han demostrado su efecto contra *Giardia*. Estudios *in vitro* han demostrado que ejercen efecto tóxico al unirse con el citoesqueleto de β -tubulina del protozoario, causan inhibición de la polimerización del citoesqueleto (figura 6) y una alteración en la recepción de la glucosa (Boreham *et al.*, 1985). Estos fármacos se absorben mínimamente en el intestino sin embargo, el albendazol puede alcanzar una concentración plasmática entre 15 y 49 veces superior a la del mebendazol. El efecto sistémico del albendazol se debe a su metabolito primario, el sulfoxido de albendazol, que se forma rápidamente en el hígado tras su absorción, estudios *in vitro* demostraron que su actividad era de 30 a 50 veces mayor que la del metronidazol y de 4 a 40 veces mayor que la de la quinacrina, además se ha comprobado que el albendazol puede afectar la morfología, la adherencia y la viabilidad del trofozoito de una forma más eficiente que los nitroimidazoles (Meloni *et al.*, 1990). Existen discrepancias entre los resultados *in vitro* y las pruebas *in vivo* de estos medicamentos. Se conoce que con una dosis de 400 mg es suficiente para conseguir una efectividad igual que el metronidazol, pero a comparación de este último los efectos secundarios de los benzimidazoles son pocos debido a su mala absorción en el intestino (Hall & Nahar, 1993).

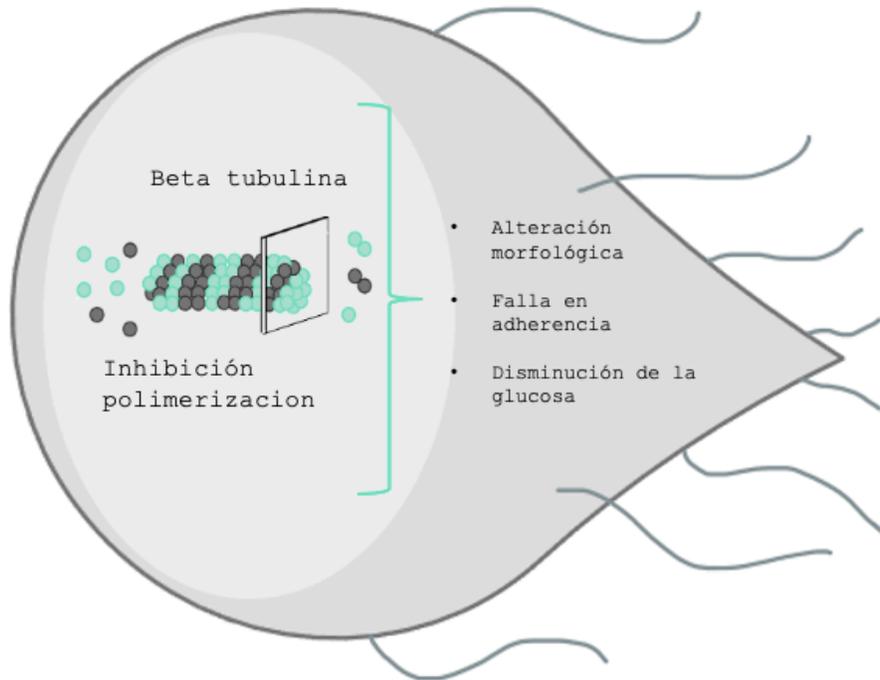


Figura 6. Acción del albendazol en el trofozoito (Con información de Boreham et al., 1985; Meloni et al., 1990)

2.5.3 Resistencia

Comúnmente los tratamientos a base de metronidazol y albendazol suelen ser eficaces contra *Giardia*, teniendo una eficacia promedio del 90%, no obstante se tiene documentado que existen fallos terapéuticos con estos fármacos (Leitsch, 2015). Las principales causas para que se presenten fallos en el tratamiento son por un lado el incumplimiento con el tratamiento y por otro, que presente variabilidad entre cepas de *Giardia*. La persistencia de la enfermedad puede ser ocasionada por la resistencia del parásito a estos fármacos, en este sentido se han reportado estudios clínicos y de laboratorio sobre la resistencia de este parásito ante sus desparasitantes más comunes, mostrando una ineffectividad del 20% algunos casos (Tejman-Yarden & Eckmann, 2011).

A pesar de que Farthing (1986) menciona que tanto los benzimidazoles como los nitroimidazoles muestran una buena eficacia en el tratamiento de *Giardia*, se

han observado fracasos terapéuticos debido a la presencia de resistencia del parásito hacia estos compuestos. Se ha descrito una resistencia clínica del 20% utilizando el metronidazol con tasas de recurrencia del 90%, así como la creciente resistencia hacia el albendazol debido al mal uso del fármaco en tratamientos, dosis bajas o dosis únicas en programas comunitarios para el tratamiento contra parásitos (Flisser, 2015).

Cuando los trofozoitos se cultivan en concentraciones sub letales con metronidazol o albendazol para generar resistencia, se puede llegar a presentar una expresión diferencial o mutaciones en los genes que codifican para las moléculas de destino de los medicamentos, como en el caso de la resistencia de *Giardia* hacia el metronidazol; esto no solo se asocia a una disminución de la actividad de la piruvato oxidoreductasa, si no también a una menor expresión de proteínas como la ferredoxina de 7-kDa (Townson *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2000). En el caso de la exposición al albendazol los cambios se podrían asociar en la secuencia de la β -tubulina además de demostrar cambios en la estructura del citoesqueleto y cuerpo medio. (Müller *et al.*, 2007).

Aunque la resistencia hacia los nitroimidazoles en *Giardia* ha sido estudiada ampliamente durante las últimas décadas (Ellis *et al.*, 1993; Harris, 2001), dicha resistencia ha ido en aumento los últimos años. Nabarro y colaboradores (2015) demostraron que de un 15.1% reportado en el 2008, incrementó a un 40.2% en el 2014. Adicionalmente, se han descrito diversos mecanismos de resistencia, esta suele estar mediada por cambios en las vías de activación del fármaco y por mecanismos para mitigar la toxicidad de los radicales nitro del mismo (Ang *et al.*, 2017; Ansell *et al.*, 2015), **además de** la disminución de los niveles de piruvato ferredoxin oxidoreductasa, y nitroreductasa 1 (Nillius *et al.*, 2011) y el incremento de los niveles de nitroreductasa 2 (Müller *et al.*, 2018), los cuales tienen la capacidad de reducir el grupo nitro de los nitroimidazoles a una amina no tóxica, característica asociada a la resistencia. No obstante, es importante señalar que la resistencia de adherirse a la mucosa intestinal, lo cual puede limitar la aplicación de los fármacos en estudios *in vitro* e *in vivo* (Tejman-Yarden & Eckmann, 2011), tal como se observó

en un estudio llevado a cabo por Pélissier y colaboradores (2010) en donde observaron que la alteración causada por el metronidazol en la microbiota tiende a aumentar la población de bifidobacterias y enterobacterias, demostrando a su vez que esta disbiosis provoque un incremento en la secreción de mucinas.

III HIPOTESIS

La frecuencia de *Giardia intestinalis* en gatos será mayor al 25% en la ciudad de Santiago de Querétaro y se encontrará el genotipo A , siendo el genotipo A el más prevalente en la población estudiada.

IV OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la frecuencia de *G. intestinalis* y el genotipo zoonótico presente en gatos de la ciudad de Santiago de Querétaro.

Objetivos específicos

1. Estimar la frecuencia de *Giardia intestinalis* en gatos
2. Determinar la presencia de genotipos zoonóticos en gatos
3. Identificar los subgenotipos presentes en gatos

V MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Lugar y estudio de animales

El presente estudio se realizó en la ciudad de Querétaro, Querétaro, se obtuvieron un total de 200 muestras fecales de gatos con propietario y sin propietario procedentes de clínicas privadas y de la unidad de control animal municipal (UCAM), respectivamente. Las muestras fueron identificadas y se obtuvieron los siguientes datos: edad, género y consistencia de las heces. Las muestras Estas últimas fueron depositadas en bolsas herméticas y rotuladas con la información del animal, posteriormente fueron trasladadas al laboratorio de parasitología de la Universidad Autónoma de Querétaro donde fueron almacenadas a 4°C para su posterior análisis.

5.2 Técnicas de diagnóstico

Las muestras fecales recolectadas fueron analizadas mediante la técnica de flotación por sulfato de zinc (técnica de Faust), para confirmar la presencia o ausencia del protozoario.

5.2.1 Técnica de Faust

De cada muestra fecal se recolectaron 2 gr, los cuales fueron puestos en un colador, con ayuda de una piseta con agua destilada y un abatelenguas se homogenizó la muestra para después recolectarse en un pequeño recipiente, una vez homogenizada la muestra se recolectaron 10 ml de la suspensión en un tubo Falcon de 15 mL. Posteriormente se centrifugó la muestra a 1500 rpm por un lapso de 5 min y se decantó el sobrenadante, se vertió agua destilada hasta alcanzar los 10 ml en el tubo Falcon y se homogenizó la solución con ayuda de un vórtex, este procedimiento se repitió al menos tres veces hasta que el líquido sobrenadante se tornó lo más claro posible, se decantó por última vez el sobrenadante reemplazándolo con una solución con sulfato de zinc la cual fue homogenizada por

última vez con ayuda de un vórtex y se centrifugó a 1000 rpm por 1 min. Una vez terminado el proceso se colocó en una rejilla el tubo de ensayo de forma vertical con la menor manipulación posible y con ayuda de una pipeta se tomó una gota de la superficie de la muestra la quecual fue colocada en una laminilla con una gota de lugol para posteriormente colocar un cubreobjetos y analizarla en el microscopio (Dreyden *et al.*, 2006).



Figura 7. Quistes de Giardia 40x, técnica de Faust.

5.2.2 Pool de muestras

Una vez identificadas las muestras positivas por microscopía, se hicieron siete pools, cada pool constaba de cuatro muestras con el fin de obtener un mínimo de 5 g de heces, que son necesarios para la concentración de quistes con el método de gradiente de sacarosa (Minvielle *et al.*, 2008), esta técnica fue necesaria debido a la necesidad de obtener un número suficiente de quistes con el fin de realizar una extracción óptima de ADN (Babaei *et al.*, 2011)

5.2.3 Técnica de concentración de quistes por medio de colchón de sacarosa

Esta técnica nos posibilita obtener una concentración mayor de quistes debido a la densidad de la solución de sacarosa. Se homogenizó la materia fecal con ayuda de una piseta con agua destilada y se filtró a través de un colador, de la muestra filtrada se recolectó 1 ml en un tubo Falcon de 15 mL y se agregarán 9 mL de PBS para posteriormente centrifugar a 200 g por 5 minutos. Se; se descartó el sobrenadante y se repitió el procedimiento una vez más. Se agregaron 4 ml de PBS y se homogenizó en vórtex por 15 s, para después se agregaron 4 ml de la solución de azúcar saturada por las paredes del tubo hasta formar dos fases, centrifugar la solución a 200 g por 5 minutos y recolectar la fase de sacarosa en un nuevo tubo Falcon de 15 ml, con ayuda de una pipeta Pasteur. Se agregaron 2 volúmenes de PBS y; posteriormente se centrifugó a 250 g por 10 minutos, para finalmente descartarse descartó el sobrenadante para re-suspender el pellet en 500 μ l de PBS estéril. Esta; esta concentración se conservó a 4° para la posterior extracción de ADN (Minvielle *et al.*, 2008).



Figura 8. Quistes de *Giardia* 40x, colchón de sacarosa.)

5.2.3 Técnica de purificación de quistes (Técnica de ShaeterSheater)

Se homogenizaron 5 gr de materia fecal con ayuda de una piseta con agua destilada y se filtró a través de un colador, posteriormente en un tubo nuevo de 15 ml se añadieron 4 ml de la solución I (amortiguador de fosfatos); posteriormente con ayuda de una jeringa se añadieron 2 ml de la solución II (sheater) por las paredes del tubo cuidando de no mezclar ambas fases, se añadió 1 ml de la muestra previamente filtrada al tubo con las dos fases cuidando de no mezclar los gradientes para después centrifugar a 2500 rpm por 25 minutos. Se recolectó la fase media en un nuevo tubo con una pipeta Pasteur y se llenó el tubo con agua destilada homogenizando la solución en vortex durante 15 s, seguido de esto se centrifugó a 2500 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante, repitiendo este proceso dos veces más, finalmente el pellet se resuspendió en 1 ml de PBS estéril y se conservó la purificación para su posterior uso.

Todas las muestras se usaron en su totalidad, los sobrenadantes que quedaron de las muestras fueron inactivados con cloro por 24 hrs para posteriormente ser desechados.



Figura 8. Quistes de *Giardia* 100x, Técnica de purificación de quistes.

5.3 Extracción de ADN

Partiendo de los quistes obtenidos en la concentración por colchón de sacarosa se sometieron a lisis siguiendo la metodología propuesta por Babaei *et al* (2011). Con algunas modificaciones descritas a continuación. De cada muestra concentrada, 200 μ l se introdujeron en viales de 2 ml con perlas de vidrio (0.1mm de diámetro) y 500 μ l del buffer de lisis (100 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, 100 mM EDTA, 1% SDS, pH 7.4) los viales fueron homogenizados con ayuda del Powerlyzer 24 (Mo Bio Laboratories, Inc.) durante 5 ciclos de 2 minutos a 700 g y un periodo de descanso de 30 segundos entre ciclos, seguido de esto las muestras fueron expuestas a un choque térmico que consistió en 5 ciclos de congelación y ebullición con nitrógeno líquido y agua hirviendo. Adicionalmente, se añadió a la mezcla 40 μ l de proteinasa K y 10 μ l de SDS (1M). Posteriormente, esta solución fue incubada a 55° por 4 horas. Finalmente, la extracción de DNA se llevó a cabo por el método fenol-cloroformo-isoamílico descrita por Almeida *et al.* (2013) con las modificaciones que a continuación se describen. A cada muestra se le agregó 400 μ l de TE 1Xbuffer (100 mM tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA), 50 μ l de lisozima y 10 μ l de proteinasa K, después la solución se homogenizó y se incubó por 30 minutos a 65°C. Posteriormente se le fueron añadidos 100 μ l de NaCl (5M) y 40 μ l de CTAB (10%) previamente incubado y la mezcla se homogenizó en un vórtex hasta adquirir un aspecto blanquecino. se incubó por 30 minutos a 65°C, para después se le añadió añadirle 400 μ l de fenol- cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1) seguido se homogenizó en vórtex durante 10 segundos y se centrifugó a 13200 g por 10 minutos, se recuperaron 500 μ l del sobrenadante que fue depositado en un nuevo tubo y se le añadió 500 μ l de cloroformo-isolamílico (24:1), este fue homogenizado y centrifugado de la misma manera, nuevamente se obtuvieron 500 μ l del sobrenadante que serán transferidos a un nuevo tubo añadiendo 600 μ l de alcohol isopropílico absoluto. El DNA se dejó precipitando por 2 h a -20° para posteriormente ser centrifugado a 13200 g por 15 min. El sobrenadante se decantó y la pastilla de DNA se lavó en 500 μ l de etanol (70%) y se centrifugó a 13200g por 20 segundos, posteriormente se decantó el sobrenadante y se dejó secar por 1 hora a temperatura

ambiente, finalmente la pastilla fue re-suspendida y resuspendió en 50 µl de agua ultrapura (milli-Q) y fue almacenada y guardó a -20°C hasta su posterior análisis.

5.4 Técnicas moleculares

5.4.1 PCR

El gen *β-giardina* fue amplificado por medio de un PCR semianidado obteniendo un fragmento de 753 pb utilizando como primer forward G7 AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC y el primer reverse G759 GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC y un fragmento de 384 pb utilizando el primer forward 376 CATAACGAC- GCCATCGCGGCTCTCAGGAA y el primer reverse G759, siguiendo los ciclos descritos por Cacciò *et al.*, (2002).

De la misma manera se llevó a cabo un PCR semianidado para amplificar el gen *tpi* obteniéndose un fragmento de 605 pb para el primer PCR utilizando los primers AL3543 AAATIATGCCTGCTCGTCG y AL3546 CAAACCTTITCCGCAAACC y un segundo producto de PCR obteniendo 530 pb utilizando los primers AL3544 CCCTTCATCGGIGGTA ACTT y AL3545 GTGGCCACCACICCCGTGCC siguiendo los ciclos descritos por Sulaiman *et al.* (2003), esto con el fin de secuenciar el producto de PCR y obtener la genotipificación de aislados por medio de este método.

5.4.2 RFLP

Una vez amplificado en gen *β-giardina* se realizó una restricción enzimática (Caccio *et al.*, 2002) con el fin de obtener los genotipos del parásito, para este proceso se hizo uso del primer producto de PCR (753 pb) y se utilizó la enzima Hae III (ref. 0108S, New England, BioLabs). Para la primera ronda de digestión se realizó en un volumen de 10 µl, el cual contiene 0,25 µl de enzima, 1µl de buffer Cutsmart, 4.74 µl de agua libre de nucleasas y 4 µl del primer producto de PCR obtenido, posteriormente se incubó en baño maría a 37°C durante 1 hora. El perfil de las

bandas (pb) observables para la diferenciación de genotipos es el siguiente: para A se observan tres bandas: 200, 150 y 130; con B cinco: 200, 180, 150, 120 y 80; para C igual cinco bandas: 290, 150, 130, 100 y 70; y en el caso de D se observan tres: 350, 290 y 120 (Rodríguez et al., 2014).

Una segunda digestión se realizó con el fin de determinar los subgenotipos haciendo uso del segundo producto de PCR (380 pb) utilizando la enzima HhaI; la reacción se realizó en un volumen total de 10.25 μ l que contiene 10 μ l del segundo producto de PCR y 0.25 μ l de enzima, posteriormente se incubó a baño maría a 37°C durante 2 h.

5.5 Análisis estadístico

Para determinar la asociación entre la presencia del protozoario y las variables utilizadas en este estudio (edad, sexo, estrato, consistencia de las heces), se utilizó una prueba de χ^2 , para llevar a cabo este se trabajó con el programa SPSS Statistics, versión 25.0 (IBM Corp Armonk, NY). Se consideraron asociaciones estadísticamente significativas si $P < 0.05$.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Análisis coproparasitológico

Del total de 200 muestras fecales de gato se obtuvo la siguiente distribución: por estrato se obtuvieron 103 con propietario y 97 sin propietario; por edad, 72 menores a 6 meses y 128 mayores a 6 meses; por género, 109 hembras y 91 machos; por consistencia de las heces, 139 firmes y 61 pastosas.

Con base en la técnica de flotación por sulfato de zinc, se detectaron quistes por microscopía en 50 muestras de las 200 recolectadas, obteniendo una prevalencia general del 25% (Cuadro 2), estos resultados fueron similares a los obtenidos por estudios llevados a cabo en gatos de Serbia y Colombia (Nikolic *et al.*, 2002; López-Arias *et al.*, 2019). Sin embargo, la prevalencia presentada fue mayor que la reportada a nivel mundial, 12% (Bouzid *et al.*, 2015), y menor a la obtenida por Dall'Agnol y colaboradores (2010), en Brasil, 32%. Es importante mencionar que la prevalencia obtenida en este estudio podría estar subestimada debido a que la excreción de quistes se puede dar de manera intermitente (Decock *et al.*, 2003) y para el presente trabajo solo se analizó una muestra, por lo que, de haberse analizado las 3 muestras recomendadas, la prevalencia podría haber sido mayor (Burke, 1977).

En cuanto a su procedencia la detección de *G. intestinalis* fue similar en gatos con propietario, que en gatos sin propietario ($P > 0.05$), los gatos con propietario presentaron una prevalencia mayor (28%) a la de los gatos sin propietario (21%). Lo anterior podría deberse a que en el país los gatos no se encuentran confinados en las casas y tienden a salir de ellas, lo que puede aumentar el riesgo de transmisión del parásito al humano (Chalkowski *et al.*, 2019).

Con relación a la edad, los gatos jóvenes presentaron una mayor prevalencia del protozooario (30%) que los adultos (21%; $p < 0.05$); estos resultados coinciden con los publicados por Nikolic y colaboradores (2008) en donde los gatos jóvenes

presentaron una frecuencia del 30.4% y los adultos del 19%, por lo que la edad de los animales podría representar un riesgo para la presencia del protozooario (OR 1.96) debido a que los cachorros aun no desarrollan una inmunidad adaptativa en contra de este y son considerados como una amplia fuente de infección por las altas cantidades de quistes excretados en heces por gramo (Nicolic et al., 2008; Nydam et al., 2001; Singer et al., 2000).

En cuanto al sexo del animal los resultados obtenidos en el presente estudio no fueron significativos ($P>0.05$) obteniendo una frecuencia del 24% para machos y del 25% para hembras, coincidiendo con estudios previamente publicados (Mircean *et al.*, 2011; Mosallanejad *et al.*, 2010) en donde el sexo no tiene relación con la presencia del protozooario.

La consistencia de las heces es importante en la presencia del protozooario debido a que uno de los principales signos de la giardiasis es la diarrea o las heces pastosas con esteatorrea (Adam, 2001), los resultados obtenidos en el presente estudio fueron significativos ($P<0.05$). estos resultados son similares a estudios en donde los animales que presentaron heces diarreicas tuvieron mayor prevalencia del parásito (Sursal et al., 2020; Mosallanejad et al., 2010; Mekaru et al., 2007). Sin embargo, el hecho de que se presentaran animales positivos al protozooario en heces de consistencia firme nos indica que aunque la presencia de *Giardia* es importante en la consistencia de las heces, la presencia de diarrea o heces de consistencia pastosa no es exclusiva del protozooario y que son otras muchas causas las que la ocasionan.

Cuadro 2. Distribución de las muestras y análisis de asociación estadístico por estrato.

		Positivo	Negativo	Prevalencia (%)	Valor de P	OR
Total		50	150	25%		
Estrato	Con propietario	29	74	28%	0.28827	1.41
	Sin propietario	21	76	21%		
Edad	< 6 meses	24	48	33%	0.041227	1.96
	> 6 meses	26	102	20%		
Consistencia de las heces	Pastosa	27	34	44%	0.000031	4.00
	Firme	23	116	16%		
Sexo	Machos	22	69	24%	0.805723	0.92
	Hembras	28	81	25%		

6.2 PCR

Respecto al análisis molecular, se realizaron 7 pools de las muestras positivas a microscopía directa, cada pool contenía 4 muestras, con el fin de obtener la mayor cantidad posible de muestra para la extracción de ADN y garantizar su rendimiento, estos pools contenían un alto número de quistes (al menos 10 quistes por campo, objetivo de 40X), esta estrategia ha demostrado ser rentable y efectiva arrojando resultados precisos (Pedersen *et al.*, 2014), además de ser utilizada en el ámbito de la medicina veterinaria para una estimación rápida y segura en estudios de prevalencia basados en resultados de microscopía (Eysker *et al.*, 2008; Papaiakevou *et al.*, 2019). En relación al PCR se realizó una amplificación de cada pool (Figura 9) utilizando únicamente el gen β -giardin, esto debido a que el gen ha demostrado ser de los más eficaces para la detección del protozooario, además de

ser altamente sensible para la caracterización morfológica del mismo (Godinez-Galaz et al., 2019; Covacin et al., 2011; Caccio et al., 2002).

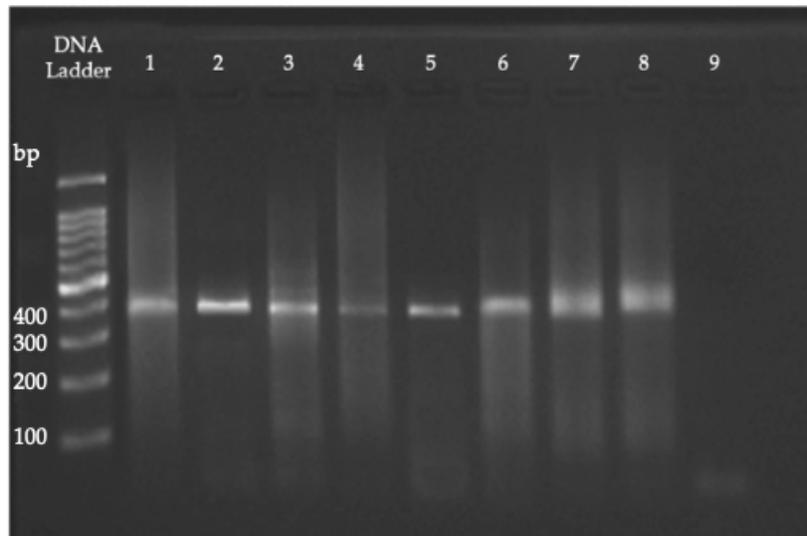


Figura 9. Gel de agarosa 1.5%, amplificación del gen β -giardina, amplicón de 384 pb de la segunda reacción de PCR (*G. intestinalis*). Carril 1 corresponde al grupo control; carriles 2-8 corresponden a los pools analizados; carril 9 corresponde al control negativo.

Con el fin de verificar si el gen amplificado correspondía al protozoario, dos secuencias se recuperaron a partir de los resultados de secuenciación Sanger, una del cebador G759 y otra del G376 (Apéndice). Los resultados de BLAST mostraron una identidad del 99% con las secuencias de referencia del gen β -giardina en el GenBank

En cuanto a la caracterización genotípica se realizó una restricción enzimática a los aislados previamente amplificados correspondientes al segundo producto de PCR (384 pb), donde obtuvo únicamente el ensamblaje A (Figura 10), lo que indica que el gato podría ser un transmisor importante de este protozoario hacia los humanos (Vasilopoulos et al., 2007), la presencia de este genotipo aumenta la preocupación en cuanto a la transmisión debido a su asociación con la presencia de signos clínicos (Noussa et al., 2016). Si bien estudios mencionan que el genotipo específico en el gato es el F el cual se encuentra con más frecuencia (Li et al., 2019; Suziku et al., 2011; Palmer et al., 2008), existen otros estudios en donde los

genotipos zoonóticos predominaron en su población (Procesi *et al.*, 2022; Zanzani *et al.*, 2014; Papini *et al.*, 2007; Vasilopoulos *et al.*, 2007).

Se realizó una subgenotipificación para identificar si el tipo de sub ensamblaje representa un riesgo para la salud pública (Figura 10), demostrando que el sub genotipo All estuvo presente con una mayor proporción en este estudio (57%) sobre el genotipo AI (42%), coincidiendo con lo publicado por Procesi y colaboradores (2022). Debido a que el sub genotipo All se encuentra presente de manera predominante en humanos y está asociado a factores de virulencia que pueden desencadenar en manifestaciones clínicas eleva la preocupación de una posible transmisión zoonótica (Ballweber *et al.*, 2010; Sahagun *et al.*, 2008).

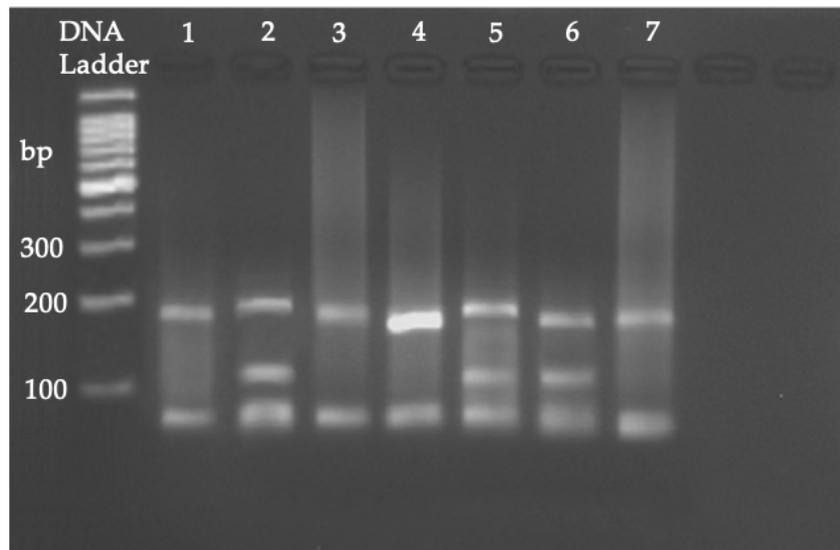


Figura 10. Reestricción enzimática del fragmento de 384 pb del gen β -giardin (*G. duodenalis*). carril 2, 5 y 6 corresponden al sub genotipo AI (190, 100 and 70 bp) y carriles 1, 3, 4 y 7 corresponden al sub genotipo All (210 and 70 bp).

Estudios llevados a cabo en Norte América nos indican que el gato puede presentar 3 genotipos A (AI y All), B y F (Zanzani *et al.*, 2014; Papini *et al.*, 2007). Lo que coincide con el presente trabajo. De acuerdo con cifras nacionales la población de gatos en el país es de aproximadamente 16.2 millones (INEGI, 2020), debido al aspecto social y cultural del país, los gatos que se tienen por mascotas no son enteramente de casa ya que pueden salir sin supervisión de los dueños, esto

ha suscitado a que su población incremente al no estar esterilizados y poseer una capacidad reproductiva alta. Al vagar libremente, los gatos pueden interactuar con más animales y llevar el parásito a sus hogares generando problemas de salud en los seres humanos, además de fungir como una fuente importante de transmisión a sus congéneres y a otras especies.

VII. CONCLUSIÓN

El estrecho contacto entre los humanos y los gatos, debe tomarse en consideración debido la alta prevalencia y genotipos observados. Desde esta perspectiva es importante recalcar la importancia de desarrollar estrategias efectivas para el control de estas enfermedades zoonóticas, concientizar a la población acerca de la tenencia responsable de los gatos y su forma adecuada de manejo, con el fin de reducir el riesgo de contagio.

VIII LITERATURA CITADA

- Abe, N., Kimata, I., Tokoro, M. (2005). Genotyping of *Giardia* Isolates from Humans in Japan Using the Small Subunit Ribosomal RNA and Glutamate Dehydrogenase Gene Sequences. *Jpn J Infect Dis* 58: 57–58
- Adam, R. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 447.
- Aley, S., Zimmerman, M., Hetsko, M., Selsted, M., Gillin, F. (1994). Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. *Infect Immun* 62(12), 5397–5403
- Ang, C., Jarrad, A., Cooper, M., Blaskovich, M. (2017). Nitroimidazoles: Molecular Fireworks That Combat a Broad Spectrum of Infectious Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(18), 7636–7657
- Ansell, B., McConville, M., Ma'ayeh, S., Dagley, M., Gasser, R., Svärd, S., Jex, A. (2015). Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnology Advances*, 33(6), 888–901
- Babaei, Z., Oormazdi, H., Rezaie, S., Rezaeian, M., Razmjou, E. (2011). *Giardia intestinalis*: DNA extraction approach to improve PCR results. *Exp Parasitol* 128: 159-162.
- Bartelt, L., Sartor, R. (2015). Advances in understanding *Giardia*: Determinants and mechanisms of chronic sequelae. *Prime Reports*, 7: 1–14
- Beatty, J., Akierman, S., Motta, J., Muise, S., Workentine, M., Harrison, J., Bhargava, A., Beck, P., Rioux, K., McKnight, G., Wallace, J., Buret, A. (2017). *Giardia duodenalis* induces pathogenic dysbiosis of human intestinal microbiota biofilms. *International Journal for Parasitology*, 47(6), 311–326
- Bernander, R., Palm, J. E. D., & Svärd, S. G. (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cellular Microbiology*, 3(1), 55–62.
- Bernander, R., Palm, J., Svärd, G. (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cellular Microbiology*, 3(1), 55–62.
- Blanchard, R. (1888). Remarques sur le megastome intestinal. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 13:18.
- Boreham, L., Phillips, R., Shepherd, R. (1985). A comparison of the in-vitro activity of some 5-nitroimidazoles and other compounds against *Giardia intestinalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 16(5), 589–595.
- Bouزيد, M., Halai, K., Jeffreys, D., Hunter, P. (2015) The Prevalence of *Giardia* Infection in Dogs and Cats, a Systematic Review and Meta-Analysis of Prevalence Studies from Stool Samples. *Vet Parasitol* 2015, 207, 181–202

Bouzid, M., Halai, K., Jeffreys, D., Hunter, P.R. (2015). The prevalence of Giardia infections in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Vet Parasitol.* 207:181-202.

Bugg, R., Robertson, I. D., Elliot, A., Thompson, A. (1999). Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. *Veterinary Journal*, 157(3): 295–301

Buret, G., Mitchell, K., Muench, D., Scott, K. (2002). *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology* 125: 11–19

Burke, J.A. (1977). The Clinical and Laboratory Diagnosis of Giardiasis. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 7

Cacciò, S. M., De Giacomo, M., Ipozio, E. (2002). Sequence analysis of β -Giardin gene and development of polimerasa chain reaction restriction fragment length polimorfims essay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Inter. J.Parasitol.* 32 (8): 1023-1030.

Caccio, S., Lalle, M., Svärd, S. (2018). Hsot specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. *Infect Genet Evol.* 66: 335-345

Caccio, S., Ryan, U. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol* 160: 75-80

Cavalier-Smith, T. (2003). Protist phylogenyand the high-level classification of protozoa. *Europ J Protistol* 39: 338-348.

Chalkowski, K., Wilson, A., Lepczyk, C., Zohdy, S. (2019). Who Let the Cats out? A Global Meta-Analysis on Risk of Parasitic Infection in Indoor versus Outdoor Domestic Cats (*Felis Catus*). *Biol Lett*, 15.

Coello, W.M.D., do Amarante, A.T.F., de Soutello, R.G.V., Meireles, M.V., Bresciani, K.D.S. (2009). Ocorrencia de parasitos gastrintestinalis em amostras fecais de felinos no municipio de Andradina, Sau Paulo. *Rev Bras Parasitol Vet.* 18:46-49.

Coman, S., Dida, I.C., Bacescu, B. (2009). Incidence and treatment of diahorreic síndrome with parasite aetiology in dogs and cats. *Rev Sci Parasitol.* 10:106-111.

Cordingley, F., Crawford, G. (1986). *Giardia* infection causes vitamin b12 deficiency. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, 16(1): 78–79.

Cotton, J., Amat, C., & Buret, A. (2015). Disruptions of host immunity and inflammation by *Giardia duodenalis*: Potential consequences for co-infections in the gastro-intestinal tract. *Pathogens*, 4(4), 764–792.

- Cotton, J.A., Beatty, J.K. Buret, A.G. (2011). Host parasite interactions and pathophysiology in Giardia infections. *Int J Parasitol.* 41:925-933
- Covacin, C., Aucoin, D., Elliot, A., Thompson, A. (2011). Genotypic Characterisation of Giardia from Domestic Dogs in the USA. *Vet Parasitol* 177: 28–32
- Dall’agnol, L., Otto, M., da Silva, A., Gonzalez, S. (2010). *Gastrointestinal Parasites in Naturally Infected Cats in the Municipality of Santa Maria in Rio Grande Do Sul, Brazil*
- de Almeida, I., Da, W., Carvalho, S., Rossetti, M.L., Dalla Costa, R., Spindola De Miranda, S. (2013). Evaluation of Six Different DNA Extraction Methods for Detection of Mycobacterium Tuberculosis by Means of PCR-IS6110: Preliminary Study. *Res Notes* 6: 561
- De Santis-Kerr, A.C., Taghava, M., Glickman N.W., Caldanaro, R.J., Moore, G.E., Lewis, H.B., Schantz, P.M., Glickman, L.T. (2006). Prevalence and risk factor for Giardia and coccidia species of pet cats in 2003-2004. *J Feline Med Surg.* 8:292-301.
- Decock, C., Cadiergues, M., Larcher, M., Vermot, S., Franc, M. (2003). Comparison of Two Techniques for Diagnosis of Giardiasis in Dogs. *Parasite*, 10, 69–72,
- Díaz, J., Fernandez, M. (1996). Giardiasis: Una breve revisión. Perspectivas diagnósticas en el laboratorio clínico. *An Esp Pediatr* 44: 87-91
- Dib, H., Lu, Q., Wen, S. (2008). Prevalence of *Giardia lamblia* with or without diarrhea in South East, South East Asia and the Far East. *Parasitol Res* 103 (2): 239-251.
- Dobell, C. (1920). The discovery of intestinal protozoa of man. *Proc. R. Soc.* 1-15
- Dryden, M., Payne, P., Smith, V. (2006) Accurate Diagnosis of Giardia Spp and Proper Fecal Examination Procedures. *Vet Ther*, 7: 4–14.
- Duodenalis Infection in Household Cats of Ahvaz District, South-West of Iran. *Iran J*
- Eligio-Garcia, L., Cortes-Campos, A., Jimenez-Cardoso, E. (2005). Genotype of Giardia Intestinalis Isolates from Children and Dogs and Its Relationship to Host Origin. *Parasitol Res*, 97: 1–6
- Ellis, J., Wingfield, J., Cole, D., Boreham, P., Lloyd, D. (1993). Oxygen affinities of metronidazole-resistant and sensitive stocks of Giardia intestinalis. *International Journal for Parasitology*, 23(1), 35–39.
- Emery-Corbin, S., Grüttner, J., Svärd, S. (2020). Transcriptomic and proteomic analyses of Giardia intestinalis: Intestinal epithelial cell interactions. *Advances in Parasitology*, 107, 139–171.

Erlandsen, L., Sherlock, A., Bemrick, J. (1990). The detection of *Giardia muris* and *Giardia lamblia* cysts by immunofluorescence in animal tissues and fecal samples subjected to cycles of freezing and thawing. *J Parasitol* 76(2), 267–271

Escobedo, A., & Cimerman, S. (2007). Giardiasis: A pharmacotherapy review. *Expert Opin on Pharmacother*, 8(12): 1885–1902.

Eysker, M., Bakker, J., van den Berg, M., van Doorn, D., Ploeger, H. (2008). The Use of Age-Clustered Pooled Faecal Samples for Monitoring Worm Control in Horses. *Vet Parasitol* 151: 249–255

Farthing, M., Pereira, M., & Keusch, G. (1986). Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity*, 51(2)

Fekete, E., Allain, T., Siddiq, A., Sosnowski, O., Buret, A. (2021). *Giardia* spp. and the Gut Microbiota: Dangerous Liaisons. *Frontiers in Microbiology*, 11

Feng, Y., Ryan, M., Xiao, L. (2018). Genetic Diversity and Population Structure of *Cryptosporidium*. *Trends in Parasitology*, 34(11), 997–1011

Filice, P. (1952). Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *University of California* 57: 53–146.

Fink, M., Singer, S. (2017). The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis. *Trends in Parasitology*, 33(11), 901–913

Flisser, A., Valdespino, J., Garcia, L., Guzman, C., Aguirre, M., Manon, M., Gonzalez, G., Gyorkos, T. (2008). Using national health weeks to deliver deworming to children: lessons from Mexico. *J. Epidemiol. Commun.* 62: 314-317

Francino, M. P. (2016). Antibiotics and the human gut microbiome: Dysbioses and accumulation of resistances. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1–11

Garcia, J., French, N., Pita, A., Velathanthiri, N., Shrestha, R., Hayman, D. (2017). Local and global genetic diversity of protozoan parasites: Spatial distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes. *PLoS Negl* 11(5)

Gastrointestinal Endoscopy, 57(7), 906–913.

genetic groupings of giardia infecting mammals. *Parasitology Today*, 16(5), 210

Gerhold, R., Jessup, D. (2013). Zoonotic diseases associated with free roaming cats. *Zoon Pub Health*. 60:189-195.

Geurden, T., Geldhof, P., Levecke, B. (2006). Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. *Int J Parasitol* 38: 259–264

Gillin, F., Reiner, D., McCaffery, J. (1996). Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol* 50: 679-705.

Gillis, J., and Wiseman, L. (1996). Secnidazole. A review of its anti- microbial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in the management of protozoal infections and bacterial vaginosis. *Drugs* 51:621– 638

Godínez-Galaz, E., Veyna-Salazar, N., Olvera-Ramírez, A., Milián-Suazo, F., Perea-Razo, C., Bernal-Reynaga, R., Cantó-Alarcón, G. (2019). zoonotic potential of *Giardia intestinalis* in dogs of the central región in Mexico. *Animals*. 9(325): 1-13

Guo, J., Qu, H., Chen, Y., Xia, J. (2017). The role of RNA-binding protein tristetraprolin in cancer and immunity. *Medical Oncology*, 34(12): 1–12

Hall, A., Nahar, Q. (1993). Albendazole as a treatment for infections with *giardia duodenalis* in children in bangladesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(1), 84–86.

Halliez, M. C. M., & Buret, A. G. (2013). Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World Journal of Gastroenterology*, 19(47), 8974–8985.

Hanevik, K., Dizdar, V., Langeland, N., Hausken, T. (2009). Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. *BMC Gastroenterology*, 9, 1–5

Haque, R., Roy, S., Kabir, M., Stroup, S., Mondal, D., Houpt, E. (2005). *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis*, 2144: 2171–2174

Hardin, J., Buret, A., Kimm, M., Olson, M., Gall, D. (1997). Increase macromolecular transport and mast cell hyperplasia in giardiasis. *J Parasitol* 83: 908–912

Harris, M. (2001). Antigiardial drugs. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 614–619.

Heyworth, M. F. (2016). *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite*. 23: 13

Hill, D. (2014). Giardiasis. *Issues in Diagnosis and Management. Infectuous disease*

Hill, D., Nash, t. (2011) Intestinal flagellate and ciliate infections. *Tropical and infectuous diseases. Principles, Pathogens and Practice*. 3rd edition. 623–632.

Hillman, A., Ash, A., Elliot, A., lymbery, A., Perez, C., Thompson, R. (2016). Confirmation of a unique species of *Giardia*, parasitic in the quenda (*Isodon obesulus*) int *J Parasitol parasites wildl*. 5(1): 110-115

Hoyne, G., Boreham, P., Parsons, P., Ward, C., Biggs, B. (1989). The effect of drugs on the cell cycle of *Giardia intestinalis*. *Parasitology*, 99(3), 333–339.

INEGI *Primera Encuesta Nacional de Bienestar Autorreportado*; 2020.

intestinalis during Differentiation *J Parasitol* 84(2), 222–226.

Itoh, N., Muraoka, N., Saeki, H., Aoki, M., Itagaki, T. (2005). Prevalence of *Giardia intestinalis* infection in dogs of breeding kennels in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 67(7): 717-718.

Jerez Puebla, L., Núñez, F., Martínez Silva, I., Rojas Rivero, L., Martínez González, M., Méndez Sutil, Y., Ayllón Valdés, L., Atencio Millán, I., Müller, N. (2015). Molecular characterization and risk factors of *Giardia duodenalis* among school children from La Habana, Cuba. *J Parasitol Res*

Jimenez-Cardoso, E., Elogio-Garcia, L., Cortés-Campos, A., Cano, A., Pino-Sagahón, M., Noguera-Estrada, C. (2010). The frequency of intestinal parasites in puppies from Mexican kennels. *Health*. 2(11): 1316-1319.

Knoop, K., McDonald, K., Kulkarni, D., Newberry, D. (2016). Antibiotics Promote Inflammation Through the Translocation of Native Commensal Colonic Bacteria. *Gut Pathogens*, 65(7): 1100–1109

Kofoed, C., Christiansen, E. (1915). On the life history of *Giardia*. Zoological laboratory. University of California. United States

Kulda, J., Nohynkova, E. (1996). *Giardia* in humans and animals. En: Kreier JP (ed.) *Parasitic protozoa* 2a ed. San Diego: Academic Press 10: 225-242.

Kutz, S., Thompson, A., Polley, L. (2009) wildlife with *Giardia*: villain, or victim and vector. In Ortega-Pierres, G. et al., (ed) (2009) “*Giardia* and *Cryptosporidium*: from molecules to disease” pp. 94-106 ISBN 978-1-84593-391-3

Lebwohl, B., Deckelbaum, R. J., & Green, P. H. R. (2003). Giardiasis.

Lefebvre, S., Waltner-Toews, D., Peregrine, A., Reid-Smith, R., Hodge, L., Arroyo, L., Weese, J. (2006). Prevalence of zoonotic agents in dogs visiting hospitalized people in Ontario: Implications for infection control. *Journal of Hospital Infection*, 62(4), 458–466.

Leitsch, D. (2015). Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Curr Trop Med Rep* 2(3): 128–135.

Leitsch, D., Schlosser, S., Burgess, A., Duchêne, M. (2012). Nitroimidazole drugs vary in their mode of action in the human parasite *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 166–170

Levine, N., Corliss, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B., Leedale, G., Loeblich, A., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E., Page, F., Poliansky, G., Sprague, V.,

Vavra, J., Wallace, F. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27: 37-58.

Li, J., Dan, X., Zhu, K., Li, N., Guo, Y., Zheng, Z., Feng, Y., Xiao, L. (2019). Genetic Characterization of *Cryptosporidium* Spp. And *Giardia Duodenalis* in Dogs and Cats in Guangdong, China. *Parasit Vectors* 12

Lindmark, D. (1988). *Giardia lamblia*: Localization of hydrolase activities in lysosome-like organelles of trophozoites. *Experimental Parasitology*, 65(1), 141–147.

Liu, S., Brown, D., O'Donoghue, P., Upcroft, P., Upcroft, J. (2000). Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108 (1): 137–140

Liua, J., Ma'ayeha, S., Peirasmakia, D., Lundström-Stadelmannb, B., Hellmana, L., Svärda, G. (2018). Secreted *giardia intestinalis* cysteine proteases disrupt intestinal epithelial cell junctional complexes and degrade chemokines. *Virulence*, 9(1), 879–894

López-Arias, A., Villar, D., López-Osorio, S., Calle-Vélez, D., Chaparro-Gutiérrez, J. (2019). *Giardia* Is the Most Prevalent Parasitic Infection in Dogs and Cats with Diarrhea in the City of Medellín, Colombia. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 18,

Lopez-Romero, G., Quintero, J., Astiazarán-García, H., Velazquez, C. (2015). Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunology*, 37(8), 394–406

Lujan, H. (2006). *Giardia* y giardiasis. Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra. *INIMEC-CONICET. Medicina* 66: 70-74.

Mancianti, F., Nardoni, S., Mugnaini, L., Zambernardi, L., Guerrini, A., Gazzola, V., Papini, A. (2014). A retrospective molecular study of select intestinal protozoa in healthy pet cats from Italy. *J Feline Med Surg* 17(2): 163-167

Mayrhofer, G., Andrews, R., Ey, P., Chilton, N. (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(1): 11-17.

McDowall, R., Peregrine, A., Leonard, E., Lacombe, C., Lake, M., Rebelo, A., Cai, H. (2011). Evaluation of the zoonotic potential of *Giardia duodenalis* in fecal samples from dogs and cats in Ontario. *Can Vet J*, 52(12), 1329–1333.

Mekaru, S., Marks, S., Felley, A., Chouicha, N., Kass, P. (2007) Comparison of Direct Immunofluorescence, Immunoassays, and Fecal Flotation for Detection of *Cryptosporidium* Spp. and *Giardia* Spp. in Naturally Exposed Cats in 4 Northern California Animal Shelters. *J Vet Intern Med* 21(5): 959-65

Meloni, B., Lymbery, A., Thompson, A. (1995). Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: Implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. *Journal of Parasitology*, 81(3)

Meloni, P., Thompson, A., Reynoldson, A., Seville, P. (1990). Albendazole: A more effective anti-giardial agent in vitro than metronidazole or tinidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(3), 375–379.

Minvielle, C., Molina, N., Polverino, D., Basualdo, J. (2008). First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 98-103.

Minvielle, C., Molina, N., Polverino, D., Basualdo, J. (2008). First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 98-103.

Mircean, V., Györke, A., Jarca, A., Cozma, V. (2011). Prevalence of *Giardia* Species in Stool Samples by ELISA in Household Cats from Romania and Risk Factors. *J Feline Med Surg*, 13, 479–482

Monis, P., Andrews, R., Mayrhofer, G., Ey, P. (1999). Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol*. 16: 1135-1144

Monis, P., Andrews, R., Mayrhofer, G., Kulda, J., Isaac-Renton, J., Ey, P. (1998). Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology* 116: 7-19.

Monis, P., Caccio, S., Thompson, A. (2009). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol*. 25(2): 93-100

Morrison, H. G., McArthur, A. G., Gillin, F. D., Aley, S. B., Adam, R. D., Olsen, G., Best, A., Cande, Z., Cheng, F., Cipriano, M., Davids, B., Dawson, S., Elmendorf, H., Hehl, A., Holder, M., Huse, S., Kim, U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., Nixon, J., Palm, D., Passamanek, N., Prabhu, A., Reich, A., Reiner, D., Samuelson, J., Svard, S., Sogin, M. (2007). Genomic Minimalism in the Early Diverging Intestinal Parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 317:1921–1926.

Mosallanejad, B., Avizeh, R., Jalali, M., Alborzi, A. (2010). Prevalence of *Giardia duodenalis* infection in household cats of Ahvaz district, south-west of Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 5(3), 27–34.

Mosallanejad, B., Avizeh, R., Jalali, M., Alborzi, A. (2010). Prevalence of *Giardia Duodenalis* Infection in Household Cats of Ahvaz District, South-West of Iran. *Iran J Parasitol* 5: 27–34.

Mosallanejad, B., Avizeh, R., Jalali, M., Alborzi, A., (2010). Prevalence of *Giardia*

- Müller, J., Hemphill, A., Müller, N. (2018). Physiological aspects of nitro drug resistance in *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8(2), 271–277.
- Müller, J., Sterk, M., Hemphill, A., Müller, N. (2007). Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. *J. Antimicrob. Chemother.* 60 (2): 280–287
- Mundinm, M., Rosa, L., Hortencio, S., Faria, E., Rodrigues, R., Cury, M. (2007). Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. *Vet. Parasitol.* 144: 356-359
- Nabarro, L., Lever, R., Armstrong, M., Chiodini, P. (2015). Increased incidence of nitroimidazole-refractory giardiasis at the Hospital for Tropical Diseases, London: 2008-2013. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(8), 791–796
- Nash, T.E., Herrington, D.A., Losonsky, G.A., Levine, M.M. (1987). Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* 156: 974-985
- Natoli, M., Leoni, B., Agnano, I., Onofrio, M., Brandi, R., Arisi, I., Zucco, F., Felsani, A. (2010). Cell Growing Density Affects the Structural and Functional Properties of Caco-2 Differentiated Monolayer. *J Cell Physiol* 226(6): 1531–1543
- Nikolic, A., Dimitrijevic, S., Djurkovic-Djarkovic, O., Bobic, B., Maksimovic-Mihajlovic, O. (2002) Giardiasis in Dogs and Cats in the Belgrade Area. *Acta Vet Brno* 2002, 52, 43–48.
- Nillius, D., Müller, J., Müller, N. (2011). Nitroreductase (GINR1) increases susceptibility of *Giardia lamblia* and *Escherichia coli* to nitro drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(5), 1029–1035.
- Noussa, B., Zaki, M., Hassanin, O., Rehan, M., Omran, D. (2016). *Giardia* Assemblages A and B in Diarrheic Patients: A Comparative Study in Egyptian Children and Adults. *The Journal of Parasitology*, 102(1), 69–74.
- O’Sullivan, F., Keenan, J., Aherne, S., O’Neill, F., Clarke, C., Henry, M., Meleady, P., Breen, L., Barron, N., Clynes, M., Horgan, K., Doolan, P., & Murphy, R. (2017). Parallel mRNA, proteomics and miRNA expression analysis in cell line models of the intestine. *World Journal of Gastroenterology*, 23(41), 7369–7386
- O’Sullivan, F., Keenan, J., Aherne, S., O’Neill, F., Clarke, C., Henry, M., Meleady, P., Breen, L., Barron, N., Clynes, M., Horgan, K., Doolan, P., & Murphy, R. (2017). Parallel mRNA, proteomics and miRNA expression analysis in cell line models of the intestine. *World Journal of Gastroenterology*, 23(41), 7369–7386.
- Ortega-Pierres, M., Jex, A., Ansell, B., Svärd, S. (2018). Recent advances in the genomic and molecular biology of *Giardia*. *Acta Tropica*, 184, 67–72.

Owen, R. (1980). The ultrastructural basis of Giardia Function. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 4

Paget, A., Jarroll, L., Manning, P., Lindmark, D., Lloyd, D. (1989). Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. *Journal of General Microbiology*, 135(1): 145–154.

Paget, A., Macechko, T., Jarroll, E. (1998). Metabolic Changes in *Giardia* of North America 7(3): 503-525

Palmer, C., Traub, R., Robertson, I., Devlin, G., Rees, R., Thompson, A. (2008). Determining the Zoonotic Significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian Dogs and Cats. *Vet Parasitol* 154: 142–147

Papaiakovou, M., Wright, J., Pilotte, N., Chooneea, D., Schär, F., Truscott, J. Dunn, J., Gardiner, I., Walson, J., Williams, S. (2019). Pooling as a Strategy for the Timely Diagnosis of Soil-Transmitted Helminths in Stool: Value and Reproducibility. *Parasit Vectors*, 12

Papini, R., Cardini, G., Paoletti, B., Giangaspero, A. (2007). Detection of *Giardia* Assemblage a in Cats in Florence, Italy. *Parasitol Res* 100: 653–656
Parasitol 2010, 5, 27–34.

Paris, J., Wills, S., Balzer, H., Shaw, D., Gunn-Moore, D. (2014). Enteropathogen co-infection in UK cats with diarrhoea. *BMC Vet Res* 10:13

Pedersen, K., Johansen, M., Jorsal, S., Nielsen, J., Bækbo, P., Angen, Ø. (2014). Pooling of Porcine Fecal Samples for Quantification of *Lawsonia Intracellularis* by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J Vet Diagn Invest*, 26: 342–345

Pélessier, M., Vasquez, N., Balamurugan, R., Pereira, E., Dossou-Yovo, F., Suau, A., Pochart, P., Magne, F. (2010). Metronidazole effects on microbiota and mucus layer thickness in the rat gut. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(3), 601–610.

Polak, K., Levy, J., Crawford, P., Leutenegger, C., Moriello, K. (2014). Infectious diseases in large-scale cat hoarding investigations. *Vet. J.* 201: 189–195.

Raether, W., Hänel, H. (2003). Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology Research*, 90, 19–39.

Rivera, M., de la Parte, M., Hurtado, Magaldi, L., Collazo, M. (2002). Giardiasis intestinal. Mini revisión. *Invest Clin* 43: 2

Rodriguez, V., Espinosa, O., Carranza, J. Duque, S., Arevalo, A., Clavijo, J., Urrea, D., Vallejo, G. (2014). Genotipos de *Giardia intestinalis* en muestras de niños de las

guarderías del instituto colombiano de bienestar familiar y de perros en Ibagé, Colombia. *Biomedica* 34: 271-81

Roxström-Lindquist, K., Ringqvist, E., Palm, D., Svärd, S. (2005). Giardia lamblia Induced Changes in Gene Expression in Differentiated Caco-2 Human Intestinal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 73(12): 8204–8208

Savioli, L., Smith, H., Thompson, A. (2006). Giardia and Cryptosporidium join “the neglected diseases initiative” *Trends Parasitol* 22

Sursal, N., Simsek, E., Yildiz, K. (2020). Feline giardiasis in turkey: prevalence and genetic and haplotype diversity of Giardia duodenalis based on the β -giardin gene sequence in symptomatic cats. *J Parasitol* 106(5): 699-706

Suzuki, J., Murata, R., Kobayashi, S., Sadamasu, K., Kai, A., Takeuchi, T. (2011). Risk of Human Infection with Giardia Duodenalis from Cats in Japan and Genotyping of the Isolates to Assess the Route of Infection in Cats. *Parasitology* 138: 493–500.
Svärd, G., Hagblom, P., Palm, D. (2003). Giardia lamblia a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiology Letters*, 218(1), 3–7.

Tangtrongsup, S., Scorza, V., Reif, J., Ballweber, L., Lappin, M., Salman, M. (2013). Prevalence and Multilocus Genotyping Analysis of Cryptosporidium and Giardia Isolates from Dogs in Chiang Mai, Thailand. *Vet Sci*. 4: 26

Tejman-Yarden, N., Eckmann, L. (2011). New approaches to the treatment of giardiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24(5), 451–456.

Thompson, A. (2008). Giardiasis: Modern concepts in control and management. *Ann Nestlé* 66: 22-29

Thompson, A., Monis, T. (2004). Variation in Giardia: Implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol* 58(04), 69–137.

Thompson, A., Hopkins, M., & Homan, L. (2000). Nomenclature and

Thompson, A., Palmer, S., O’Handley, R. (2008). The public health and clinical significance of Giardia and Cryptosporidium in domestic animals. *Vet J*. 177:18-25

Thompson, R., Lymbery, A., Meloni, B. (1990). Genetic variation in Giardia Kunstler, 1882: taxonomic and epidemiological significance. *Protozool Abs* 14: 1–28

Thomson, A., Schoeller, C., Keelan, M., Smith, L., Clandinin, M. (1993). Lipid absorption: Passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond. *Can J Physiol Pharmacol* 71(8), 531–555.

Torres, M., Uetanabaro, A., Costa, A., Alves, C., Farias, L., Bambirra, A., Penna, J., Vieira, E., Nicoli, J. (2000). Influence of bacteria from the duodenal microbiota of patients with symptomatic giardiasis on the pathogenicity of *Giardia duodenalis* in gnotoxenic mice. *Journal of Medical Microbiology*, 49(3), 209–215.

Townson, S., Upcroft, J., Upcroft, P. (1996). Characterisation and purification of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 79 (2): 183–193.

Troeger, H., Epple, H., Schneider, T., Wahnschaffe, U., Ullrich, R., Burchard, D., Jelinek, T., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J., & Franklin, C. B. (2007). *Effect of chronic Giardia lamblia infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum.*

Van Keulen, H., Macechko, P., Wade, S., Schaaf, S., Wallis, P., Erlandsen, S. (2002). Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet Parasitol*, 108(2): 97–107.

Vasilopoulos, R., Rickard, L., Mackin, A., Pharr, G., Huston, C. (2007). Genotypic Analysis of *Giardia Duodenalis* in Domestic Cats . *J Vet Intern Med* 21: 352–355

Vasilopoulos, R., Rickard, L., Mackin, A., Pharr, G., Huston, L. (2007). Genotypic Analysis of *Giardia Duodenalis* in Domestic Cats. *J Vet Intern Med*, 21, 352–355

Vazquez, O., Rivera, T. (2009). Giardiasis. la parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Rev del centro de Inv.* 8: 31

Watkins, R., Eckmann, L. (2014). Treatment of giardiasis: current and future directions. *Curr Infect Dis Rep* 16(2): 396

Woerther, P., Burdet, C., Chachaty, E., Andremont, A. (2013). Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: Toward the globalization of CTX-M. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4): 744–758

Yason, J., Rivera, W. (2007). Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. *Parasitol. Res.* 101:681-687

Zanzani, S., Gazzonis, A., Scarpa, P., Berrilli, F., Manfredi, M. (2014). Intestinal Parasites of Owned Dogs and Cats from Metropolitan and Micropolitan Areas: Prevalence, Zoonotic Risks, and Pet Owner Awareness in Northern Italy. *Biomed Res Int* 2014

IX APÉNDICE

Solución de Sacarosa shaeter

Reactivo	Cantidad
Sacarosa	500g
Fenol	5g
Agua destilada	320 g

En un vaso de precipitado se colocó el agua destilada, posteriormente se le adicionó el fenol, se agregó la sacarosa (azúcar morena) lentamente y se homogenizó con agitación continua (agitador magnético) hasta que la mezcla estuviera saturada. La solución se refrigeró a 4° para su posterior uso.

Amortiguador de Fosfatos (0.025M)

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

En un vaso de precipitado se colocó el agua destilada, adicionando los fosfatos, para después agitar continuamente. Se ajustó el pH a 7.0 y se aforó a la solución a 500 ml. La solución se guardó en un frasco y se conservó a 4° para su posterior uso.

Amortiguador de Fosfatos (0.025M) y Tween 80 (1%)

Reactivo	Cantidad
Tween 80	1 ml
Amortiguador de Fosfatos	99 ml

Se mezclaron las soluciones con cuidado de no hacer espuma. La solución se conservó en un frasco a 4° para su posterior uso.

Solución I	Cantidad	Solución II	Cantidad
Shaeter	50 ml	Shaeter	50 ml
Amortiguador de Fosfatos con tween	100 ml	Amortiguador de Fosfatos con tween	200 ml

PBS 1X

Reactivo	Cantidad
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Agua destilada	1000 ml

En un vaso de precipitado se colocó el agua destilada, adicionando los reactivos, para después agitar continuamente con ayuda de una mosca. Se almacenó la solución en un lugar fresco a temperatura ambiente

Sulfato de Zinc

Reactivo	Cantidad
ZnSO ₄	350 g
Agua destilada	500 ml

Solución de Sacarosa (concentración)

Reactivo	Cantidad
Sacarosa	691 g
Agua destilada	500 ml

Buffer de lisis

Reactivo	Cantidad
Tris Hcl	691 g
EDTA	500 ml
SDS	2%
NaCl	2%
Mercaptoetanol	1 mM

Todo se aforó a 100 ml

Buffer de lisis

Reactivo	Cantidad
Tris Hcl	1.2 g
EDTA	2.92 g
SDS	2 g
NaCl	1.16 g
Mercaptoetanol	7 ul