

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”  
SUBDIRECCIÓN DE PARASITOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**

**Estudio de factores asociados con la reinfección por  
*Giardia lamblia* en niños de círculos infantiles**

**Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Médicas**

**Autor:** Dr. Fidel Angel Núñez Fernández

**Tutor:** Dr. Carlos M. Finlay Villalvilla, Dr C Biológicas.

**Asesor:** Dr. Jorge Sarracent Pérez, Dr C Biológicas.

**La Habana**

**2004**

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar y reconocer con profundo sentido de gratitud, la ayuda extraordinaria prestada por mis compañeros de trabajo, sin la cual hubiera sido imposible la culminación de esta tesis. En primer lugar y muy especialmente al Dr. Carlos M. Finlay, por haberme inculcado y guiado desde mis comienzos por los amplios y abruptos senderos de la investigación científica. Al Dr. Jorge Sarracent Pérez por su incalculable ayuda en la organización, discusión y redacción final de este trabajo.

A los licenciados Dinorah Torres, Marta Bouza, Jorge Fraga, Ana Margarita de la Cruz, a la Dra. Liliana Pelayo, y al Téc. Raúl Cordoví quienes han trabajado conmigo día a día en muchas de estas investigaciones.

A todos los integrantes del Departamento de Parasitología y muy especialmente a los compañeros de la comisión científica, la Dra. Lázara Rojas, el Dr. Luis Fonte, la Lic. Ana M. Montalvo, y la Lic. Judith Mendiola, por toda la ayuda prestada y el tiempo dedicado en la revisión del texto. De esta misma forma quisiera también agradecer a mis compañeros de trabajo de otras áreas del IPK, por sus prudentes consejos y comentarios críticos, son ellos los Doctores: Pedro Más Bermejo, Antonio Pérez, y Herio Toledo de Epidemiología. A mi amigo de la subdirección de Microbiología el Dr. Raúl Díaz por sus consejos y atenciones. A mis compañeros de la subdirección docente, especialmente la Dra. Nereyda Cantelar, y la Lic. Maribel Chao. No se me puede olvidar la ayuda recibida por otros compañeros de otras áreas del IPK que, aunque no mencione nombres, ellos saben muy bien quienes son.

Por último quisiera destacar el apoyo incondicional que he recibido de mi familia, que sacrificó muchas horas necesarias en el hogar, para que se pudiera cumplir este objetivo. A mi esposa Odalys González por su enorme comprensión, infinita entrega e incalculable ayuda, y sobre todo por su amor sin límites. Especialmente a mi hija por ser una de las razones más importantes de mi vida. A mi madre y hermanos.

A los niños de círculos infantiles por su cooperación, y por ser el tesoro máspreciado de nuestra sociedad, puesto que son como dijera nuestro José Martí, la “esperanza del mundo”.

En fin, para todos los que de una forma u otra han aportado algo en este trabajo, mi más sincero agradecimiento.

Muchas Gracias

Fidel Angel Núñez

Además de su obvia importancia médica, *Giardia* es fascinante por derecho propio...

Jacqui Upcroft y Peter Upcroft

## **DEDICATORIA**

A mi familia y en especial a **mi padre**, el que siempre estará presente en todas y cada una de mis realizaciones, pues sus enseñanzas en la vida siempre me acompañarán.

## SÍNTESIS

El protozoo *Giardia lamblia*, también conocido como *Giardia duodenalis* o *Giardia intestinalis*, es un parásito del intestino delgado que puede causar alta morbilidad tanto en países desarrollados como en los subdesarrollados. La infección por *G. lamblia* es más prevalente en niños de 1 a 5 años de edad, en especial aquellos que asisten a círculos infantiles. Teniendo en cuenta la alta frecuencia que puede alcanzar la infección por este protozoo en estas instituciones educacionales, y con la finalidad de comprender mejor el fenómeno de la reinfección, realizamos un estudio longitudinal sobre giardiasis durante 18 meses en tres círculos infantiles de Ciudad de La Habana. Los resultados de este estudio nos permitieron describir un grupo de niños con una tendencia o "predisposición" a la reinfección por *Giardia lamblia*; ellos se encontraron infectados por *G. lamblia* en tres o más de los 4 cortes transversales realizados cada 6 meses, y se apreció una mayor asociación con síntomas clínicos como las diarreas. Con el fin de conocer los factores de riesgo en estos niños, decidimos realizar un estudio de casos y controles, en el que se halló una mayor asociación con el lavado incorrecto de vegetales e ingestión de agua no hervida en los familiares de los niños re infectados con *G. lamblia* que en los controles. Varios de los aislamientos de *Giardia* tomados de estos niños fueron caracterizados biológicamente en un modelo animal (*Meriones unguiculatus*). Los roedores inoculados con los aislamientos procedentes de niños sintomáticos, los cuales estaban siempre o casi siempre positivos, se infectaron en mayor número, mostraron una mayor duración de la infección y eliminaron un mayor número de quistes/g de heces, que los animales inoculados con los aislamientos procedentes de niños asintomáticos, y menos frecuentemente re infectados. Finalmente, 17 aislamientos de *Giardia* se caracterizaron genéticamente por la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y se encontró una correlación de cada grupo genético con los patrones clínicos y epidemiológicos encontrados previamente en el estudio longitudinal. Se halló, además, un posible marcador genético de patogenicidad con el cebador GI-3, el que identificó bien los aislamientos patogénicos. Estos resultados nos sugieren desde el punto de vista biológico y genético que las características del parásito desempeñan un importante papel en la reinfección y en la compleja relación huésped-parásito.

## **ABREVIATURAS:**

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido Ribonucleico.

**ARNasa:** Nucleasa del ARN (ribonucleasa).

**CI:** Círculos Infantiles.

**DE:** Desviación Estándar.

**dNTP:** Los 4 desoxinucleótidos trifosfato (ATP, CTP, GTP, TTP) en mezcla equimolar.

**EDTA:** ácido etilendiaminetetraacético.

**EEN:** Error Estándar de la Media.

**ELISA:** Ensayo Inmunoenzimático sobre fase sólida.

**FDA:** Siglas de la agencia reguladora de fármacos y alimentos en los Estados Unidos de Norteamérica. Proviene de su nombre en Inglés: *Foods and Drugs Administration*.

**IFI:** Inmunofluorescencia indirecta.

**IgA:** Inmunoglobulina A.

**IgG:** Inmunoglobulina G.

**IgM:** Inmunoglobulina M.

**ND:** No Disponible.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**OR:** Oportunidad Relativa, razón de los productos cruzados, o razón de posibilidades. Este término se deriva del original en idioma Inglés: *Odds Ratio*.

**RAPD:** Análisis del ADN polimórfico amplificado al azar.

**RCP:** Reacción en Cadena de la Polimerasa.

**SDS:** Duodecil Sulfato Sódico.

**TBE:** Tampón Tris Borato- EDTA

**TE:** Tampón Tris- EDTA

**Tris:** tris (hidroximetil) aminometano.

**UPGMA:** siglas que derivan de la frase en Inglés: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*.

**UV:** Ultravioleta

**WHO:** *World Health Organization*.

<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
<b><i>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</i></b>	<b>1</b>
<b>I.1.</b> Antecedentes.	<b>1</b>
<b>I.2.</b> Hipótesis de trabajo.	<b>5</b>
<b>I.3.</b> Objetivos.	<b>5</b>
<b>I.4.</b> Novedad científica	<b>6</b>
<b>I.5.</b> Valor teórico.	<b>6</b>
<b>I.6.</b> Valor práctico.	<b>7</b>
<b><i>CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</i></b>	<b>8</b>
<b>II.1.</b> Recuento histórico de la giardiasis.	<b>8</b>
<b>II.2.</b> Taxonomía del protozoo <i>Giardia lamblia</i> .	<b>9</b>
<b>II.3.</b> Ciclo de Vida.	<b>13</b>
<b>II.4.</b> Epidemiología.	<b>14</b>
<b>II.5.</b> Control y prevención.	<b>17</b>
<b>II.6.</b> Patogenia y fisiopatología.	<b>18</b>
<b>II.7.</b> Inmunología	<b>20</b>
<b>II.8.</b> Características clínicas de la infección en el hombre.	<b>22</b>
<b>II.9.</b> Diagnóstico.	<b>24</b>
<b>II.10.</b> Tratamiento.	<b>25</b>
<b>II.11.</b> Estudios genéticos en <i>G. lamblia</i> .	<b>29</b>
<b>II.12.</b> Técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).	<b>30</b>
<b><i>CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS</i></b>	<b>32</b>
<b>III.1.</b> Estudio longitudinal en tres círculos infantiles de la Ciudad de La Habana.	<b>32</b>
<b>III.1.1.</b> Población estudiada.	<b>32</b>
<b>III.1.2.</b> Análisis de las muestras de heces.	<b>33</b>
<b>III.1.3.</b> Definiciones.	<b>33</b>
<b>III.1.4.</b> Variables estudiadas.	<b>34</b>



<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
<b>III.2.</b> Estudio de factores de riesgo en niños con tendencia a la reinfección con <i>Giardia lamblia</i> y en los controles.	35
<b>III.2.1.</b> Selección de los casos y los controles.	35
<b>III.2.2.</b> Definición de las variables de estudio y técnicas de recolección de la información.	35
<b>III.3.</b> Obtención de los aislamientos de <i>Giardia lamblia</i> en niños con diferentes comportamientos clínico-epidemiológicos y su cultivo axénico.	37
<b>III.4.</b> Caracterización biológica de aislamientos en jerbillos ( <i>Meriones unguiculatus</i> ).	37
<b>III.5.</b> Caracterización del polimorfismo genético de 17 aislamientos de <i>Giardia lamblia</i> .	39
<b>III.5.1.</b> Origen y caracterización de los aislamientos de <i>G. lamblia</i> .	39
<b>III.5.2.</b> Extracción del ADN.	39
<b>III.5.3.</b> Cebadores.	40
<b>III.5.4.</b> Análisis del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).	41
<b>III.5.5.</b> Análisis del polimorfismo genético.	41
<b>III.6.</b> Análisis estadístico.	42
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS</b>	44
<b>IV.1.</b> Estudio longitudinal en tres círculos infantiles de la Ciudad de La Habana.	44
<b>IV.2.</b> Factores de riesgo en niños con tendencia a la reinfección con <i>Giardia lamblia</i> . Estudio de casos y controles.	49
<b>IV.3.</b> Caracterización biológica de varios aislamientos en jerbillos ( <i>Meriones unguiculatus</i> ).	54
<b>IV.4.</b> Caracterización del polimorfismo genético de 17 aislamientos de <i>Giardia lamblia</i> .	57
<b>CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL</b>	63
<b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES</b>	74
<b>CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES</b>	75
<b>CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍAS</b>	76

<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
<b><i>CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR</i></b>	
<b>IX.1.</b> Autobiografía.	<b>95</b>
<b>IX.2.</b> Artículos del autor relacionadas con el tema de tesis.	<b>96</b>
<b>IX.3.</b> Presentación en Eventos.	<b>98</b>
<b>IX.4.</b> Distinciones Científico-técnicas relacionadas con el tema de tesis.	<b>100</b>
<b><i>CAPÍTULO X. ANEXOS</i></b>	

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. Antecedentes.**

Las infecciones por parásitos intestinales constituyen aún un importante problema de salud, por sus altas tasas de prevalencia y amplia distribución mundial, sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales (Savioli *et al.*, 1992; WHO, 1992). Las tasas de prevalencia en la población infantil en todo el orbe no han cambiado mucho en las últimas décadas, a pesar de que han aumentado los recursos terapéuticos eficaces y que muchos países han establecido programas de control para las parasitosis intestinales (Savioli *et al.*, 1992; WHO, 1990; WHO, 1992). Aunque la mortalidad por parasitismo intestinal es baja, cada año ocurren, por citar algunos ejemplos, hasta 100 mil muertes debidas a amebiasis (Savioli *et al.*, 1992; WHO, 1990; WHO, 1992) y cientos de miles por helmintiasis, a escala mundial (WHO, 1990; Chan, 1997).

Los más recientes estimados globales de prevalencia señalan que más de 2 000 millones de personas están afectadas por las helmintiasis a nivel mundial, de los cuales alrededor de 1450 millones de personas están infectadas por *Ascaris lumbricoides*, 1050 millones por *Trichuris trichiura* y 1 300 millones por ancylostomídeos (Chan, 1997; Crompton, 1999; Montresor *et al.*, 2002). La población infantil no es ajena a todo lo anterior, se valora que aporta el mayor número de infectados, según los cálculos de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1990, Savioli *et al.*, 1992; WHO, 2002). Algunos reportes han demostrado que estas infecciones persisten más tiempo y son más intensas en los niños, con efectos deletéreos tanto sobre el crecimiento y desarrollo, como sobre el aprendizaje (Kvalsvig *et al.*, 1991; Nokes *et al.*, 1992; WHO, 2002).

Las infecciones por protozoos no se quedan a la zaga, pues se estima que 480 millones de personas sufren de amebiosis (WHO, 1990) y aumentan los reportes de infecciones por protozoos intestinales, como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp.,

y *Cyclospora cayetanensis*, los que pueden causar diarreas autolimitadas en individuos inmunocompetentes, como niños y viajeros procedentes de zonas endémicas (Okhuysen, 2001; Jong, 2002). Los coccidios intestinales pueden producir, además, alteraciones graves que van desde la diarrea crónica e intensa con malabsorción, hasta los trastornos marcados del equilibrio hidromineral en pacientes inmunocomprometidos, como los afectados por el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), y en niños desnutridos (Jong, 2002; Gendrel *et al.*, 2003). Dentro de este último grupo de parásitos intracelulares, *C. cayetanensis* ha cobrado importancia en múltiples brotes de transmisión alimentaria en países desarrollados como EEUU y Canadá (Eberhard y Arrowood, 2002), mientras que *Cryptosporidium* ha sido identificado en varios grandes brotes de transmisión hídrica, como el ocurrido durante el año 1993 en la ciudad de Milwaukee, en el estado de Wisconsin, que afectó un estimado de 403 mil personas, por la contaminación del acueducto de la ciudad (Chappell y Okhuysen, 2002). Todo esto ha llevado a que se aumente el interés en la epidemiología y la prevención de estas infecciones emergentes (Lane y Lloyd, 2002; Leclerc *et al.*, 2002).

El protozoo *G. lamblia*, también conocido como *Giardia duodenalis* o *Giardia intestinalis*, es un parásito del intestino delgado que puede causar importante morbilidad tanto en países desarrollados como en los subdesarrollados, y que afecta principalmente a niños, sobre todo en las edades de 1 a 5 años (Ali y Hill, 2003).

La infección por *G. lamblia* es transmitida a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados, y de persona a persona, por lo que en instituciones cerradas como los círculos infantiles se puede presentar un riesgo mayor de transmisión. La giardiasis es considerada como la enfermedad intestinal producida por protozoos más frecuente en países desarrollados y afecta un estimado de alrededor de 280 millones de personas a nivel mundial (Lane y Lloyd, 2002; Ali y Hill, 2003).

En la actualidad, se considera a este protozoo como el principal agente patógeno encontrado en los brotes de transmisión hídrica que han ocurrido en algunos países

desarrollados, como Inglaterra y los Estados Unidos. En este último país se calcula que provoca no menos de 5000 admisiones hospitalarias al año (WHO, 1992; Hill, 1993; Marshall, *et al.*, 1997) y las tasas de prevalencia parecen tener una tendencia al aumento (Kappus *et al.*, 1994).

A pesar de que durante los últimos tiempos se ha venido ganando en conciencia sobre la importancia para la Salud Pública de la infección por *Giardia* y de que ha aumentado el interés por las investigaciones sobre este protozoo, existen aún muchas cuestiones que no han sido elucidadas totalmente, como son el riesgo potencial de la transmisión zoonótica, ciertos mecanismos de patogenicidad, algunos procesos de reacción del huésped frente a la infección, y la respuesta inmune. Por otra parte, se continúa la búsqueda de nuevos recursos terapéuticos para combatir y prevenir la infección tanto en el hombre como en los animales (Minenoa y Avery, 2003).

La tasas de reinfección por *G. lamblia* son altas en zonas endémicas, por lo que la infección por este protozoo, a diferencia de otras parasitosis intestinales, resulta muy difícil de controlar (Gilman *et al.*, 1988; Dorea *et al.*, 1996). La variación antigénica ha sido señalada como un mecanismo del parásito para incrementar tanto la oportunidad de infección inicial exitosa como las frecuentes reinfecciones (Nash, 1997). En instituciones como círculos infantiles, se ha llegado a considerar que la erradicación de la infección por *G. lamblia* en todos los niños infectados no es conveniente, no sólo por el costo y los posibles efectos colaterales de los fármacos a emplear; sino también debido a estas constantes tasas de reinfección (Novotny *et al.*, 1990; Furness *et al.*, 2000).

Desde el punto de vista clínico, la mayoría de los individuos infectados con *G. lamblia* son asintomáticos, sin embargo, otros pueden desarrollar manifestaciones clínicas, las que van desde trastornos digestivos ligeros hasta diarrea crónica y malabsorción intestinal (WHO, 1992; Hill, 1993; Marshall, *et al.*, 1997). Los factores involucrados en esta variabilidad clínica no son suficientemente comprendidos y éstos pueden incluir tanto características del hospedero como la virulencia de los aislamientos de *Giardia* (Nash *et al.*, 1987; Faubert, 2000).

Una gran heterogeneidad entre los aislamientos de *G. lamblia* ha sido demostrada por técnicas bioquímicas. Esta variabilidad fenotípica confirmada, pudiera estar asociada a la existencia de una gran heterogeneidad genética entre los aislamientos. Aunque no se ha encontrado una clara correlación entre las variaciones fenotípicas y las formas clínicas de presentación, los estudios de caracterización molecular pueden ser muy útiles para un mejor conocimiento de la patogenicidad y la epidemiología de la giardiasis (Meloni *et al.*, 1995; Guimarães *et al.*, 1999; Adam, 2001).

Entre los métodos moleculares, empleados para la caracterización de aislamientos de *G. lamblia*, el del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) ha demostrado ser un instrumento valioso para estudios epidemiológicos (Deng y Cliver, 1999; Paintia *et al.*, 1999). Este procedimiento es considerado una herramienta rápida para el estudio molecular, y puede brindar información sobre la naturaleza y la extensión de la diversidad genética de una población parasitaria en una localización determinada (Van Belkum *et al.*, 1993). Por otra parte, para el desarrollo de esta técnica, a diferencias de otros métodos de caracterización genómica, no se requiere del conocimiento previo de la secuencia del ADN de un gen determinado; pues sólo necesita el uso de oligonucleótidos relativamente cortos con secuencias elegidas al azar (Van Belkum *et al.*, 1993; Singh, 1997; Guimarães *et al.*, 1999).

Los estudios realizados para la caracterización de aislamientos de *G. lamblia* con la técnica de RAPD, han demostrado una gran heterogeneidad entre los aislamientos (Van Belkum *et al.*, 1993; Sedinova *et al.*, 2003; Mohamed *et al.*, 2004). Hasta el momento, sólo un estudio de RAPD ha tratado de buscar infructuosamente alguna relación entre la sintomatología clínica y las agrupaciones genéticas (Rocha *et al.*, 2003).

En Cuba se ha demostrado que la infección por *G. lamblia* es muy prevalente en niños de 1 a 5 años de edad, en especial aquellos que asisten a círculos infantiles, en los que las tasas de infección por este protozoo pueden variar entre un 20 y 55 % (Gómez *et al.*, 1999; Suárez *et al.*, 1999; Mendoza *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta la alta frecuencia que puede alcanzar la infección por este protozoo en estas instituciones educacionales, y con la

finalidad de comprender mejor el fenómeno de la reinfección por este protozoo en niños de círculos infantiles realizamos el presente trabajo, para el cual nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

## **I.2. Hipótesis de trabajo.**

*“El comportamiento biológico y las características genéticas de los aislamientos de **Giardia lamblia**, así como factores de riesgo para la transmisión, están asociados con el fenómeno de la reinfección en niños de círculos infantiles”.*

Para demostrar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

## **I.3. Objetivos.**

### ***General:***

Contribuir al conocimiento de las características fenotípicas y genotípicas de aislamientos de *Giardia lamblia* obtenidos de niños en círculos infantiles, así como el estudio de los factores de riesgo asociados a la reinfección con este parásito.

### ***Específicos:***

- 1.** Determinar las características clínico-epidemiológicas de la reinfección con *G. lamblia* en un grupo de niños de círculos infantiles.
- 2.** Medir la asociación de factores socioeconómicos e higiénicos con la transmisión de la giardiasis en niños con tendencia a la reinfección por *G. lamblia*.
- 3.** Conocer el comportamiento biológico en jerbillos (*Meriones unguiculatus*) de aislamientos de *G. lamblia*, obtenidos de niños con varios patrones clínicos y epidemiológicos.
- 4.** Caracterizar desde el punto de vista molecular los aislamientos de *G. lamblia* obtenidos de niños con varios patrones clínicos y epidemiológicos.

#### **I.4. NOVEDAD CIENTÍFICA**

Se caracterizó por primera vez en Cuba, desde el punto de vista clínico y epidemiológico, el fenómeno de la “predisposición” o la tendencia a la reinfección por *G. lamblia* en un grupo de niños de círculos infantiles.

Se realizó un estudio de casos y controles sobre factores de riesgo (socioeconómicos y hábitos higiénicos), lo que permitió conocer por primera vez en nuestro país, la importancia y contribución de los mismos en el fenómeno de la reinfección con *G. lamblia*.

Se correlacionó por primera vez a nivel internacional, hallazgos clínicos y epidemiológicos con el comportamiento biológico de los aislamientos en un modelo animal (*Meriones unguiculatus*); lo que permitió mostrar el papel del parásito en la producción de la reinfección en nuestro grupo de estudio.

Se realizó un estudio por RAPD del polimorfismo genético de los aislamientos de *G. lamblia*, y se relacionó por primera vez en el ámbito internacional estos resultados con los patrones clínicos y epidemiológicos encontrados previamente en los niños del estudio longitudinal.

Se encontró un posible marcador genético de patogenicidad en los aislamientos de *G. lamblia* cuyo reporte se hace por primera vez en la literatura internacional.

#### **I.5. VALOR TEÓRICO**

El presente estudio permitió un mejor conocimiento de los factores relacionados con el fenómeno de la reinfección por *G. lamblia* en niños que asisten a círculos infantiles. Además, se obtuvieron varios aislamientos a partir de estos niños con características clínicas y epidemiológicas definidas, lo que fue por primera vez correlacionado con el comportamiento biológico y las características moleculares del parásito.



## **L6. VALOR PRÁCTICO**

Todos los trabajos experimentales y de terreno de esta tesis fueron realizados en el Laboratorio de Parasitismo Intestinal del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), y han servido para la introducción de nuevas tecnologías útiles tanto para la caracterización por primera vez en nuestro país, de los aislamientos de *G. lamblia*, como otros protozoos intestinales. Parte de estos trabajos han servido para temas de tesis de médicos especialistas de primer grado en Microbiología, y la Maestría en Parasitología. Los resultados incluidos en esta tesis se presentaron en 10 eventos científicos nacionales e internacionales y han sido publicados en un capítulo de libro, una revista nacional, y 4 revistas extranjeras indexadas; de las cuales, tres son de alto impacto en el campo de la Parasitología y la Medicina Tropical. Además, una parte de estos trabajos contribuyeron a dos resultados relevantes institucionales, un premio nacional de las Brigadas Técnicas Juveniles (BTJ), un premio en el concurso nacional de trabajos científicos de SLIPE (Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica), y fue considerado como destacado del Fórum Provincial de Ciencia y Técnica. Por otra parte, los resultados de este trabajo refuerzan y permiten mantener sobre sólidas bases científicas, la recomendación de no suspender la asistencia a los círculos infantiles de los niños infectados con *G. lamblia*, evitando al mismo tiempo las ausencias innecesarias al trabajo de los padres o tutores de los mismos, lo que impide las consabidas pérdidas económicas, tanto para la economía familiar como la del país.

## CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### II.1. Recuento histórico de la giardiasis.

Los estudios más recientes han demostrado que este parasitismo afecta al hombre desde tiempos prehistóricos (Ortega y Bonavia, 2003). Aunque durante mucho tiempo se pensó que era un comensal humano, no es hasta los años 60 que se comienza a conocer claramente que puede producir diarreas y malabsorción en el hombre (Cox, 2002 a). *Giardia lamblia*, también conocido como *G. duodenalis* o *G. intestinalis*, fue el primer protozoo humano, visto en 1681 por el científico holandés Antonie Van Leeuwenhoek, quien lo observó precisamente en sus propias heces diarreicas. Sin embargo, las ilustraciones de Leeuwenhoek no fueron tan claras como las del profesor Vilém Lambl.

Este flagelado fue denominado inicialmente como *Cercomonas intestinalis* por Lambl en 1859; sin embargo, el parásito recibió poca atención hasta 1902, cuando el parasitólogo norteamericano Charles Wardell Stiles comenzó a sospechar una relación causal entre la infección por este flagelado y las diarreas (Cox, 2002 a). La observación de una posible relación causal del flagelado con enfermedad clínica, no se volvió a tener en cuenta, hasta el período de la Primera Guerra Mundial entre 1914 y 1918, cuando se verificó que los quistes obtenidos de las heces de soldados con diarrea provocaban similares síntomas cuando se les suministraban a animales de laboratorio. En 1921, Clifford Dobell sugirió que *Giardia* podría ser un patógeno y en 1926, Reginald Miller, un médico que trabajaba en Londres, demostró que algunos niños infectados con el parásito sufrían de malabsorción mientras que otros eran portadores no afectados. Sin embargo, no fue hasta 1954 que los estudios detallados del médico norteamericano Robert Rendtorff demostraron evidencias

firmer sobre la relación entre este parasitismo y enfermedad clínica. En los 300 años transcurridos desde que fue descubierto por primera vez, este protozoo ha comenzado a reconocerse con fuerza, como un parásito común y un patógeno potencial a escala mundial; sin embargo, aún existen muchos aspectos desconocidos como el número de especies que infectan a los humanos, y cual es el papel, si existiese, que juegan los huéspedes reservorios en la epidemiología de la infección (Cox, 2002 a).

## **II.2. Taxonomía del protozoo *Giardia lamblia*.**

La clasificación taxonómica del protozoo *Giardia* ha sido un tema muy polémico en los últimos años debido entre otras a las siguientes razones:

1. Muchas de las primeras descripciones taxonómicas de *Giardia* spp., asumieron una diferente especie, para cada huésped infectado y consecuentemente se sobreestimó el número de especies.
2. Subsecuentemente se ha comprobado que las descripciones de especie basadas sólo en las diferencias morfológicas detectadas por simple microscopía óptica, subestiman las diferencias entre aislamientos, cepas, o especies.
3. Los experimentos de transmisión cruzada de un huésped a otro han producido resultados inconsistentes.
4. Las herramientas disponibles para distinguir los aislamientos de *Giardia* han sido insuficientes, hasta la reciente introducción de técnicas de Biología Molecular y Microscopía Electrónica para clasificar a *Giardia* spp.

Existen dos fases morfológicas o estadios de este protozoo: el trofozoito (forma vegetativa) cuyo hábitat es el intestino delgado, y el quiste (forma de resistencia) responsable de la transmisión del parásito. Los quistes son entre redondos u ovals y miden de 8 a 14 por 7 a 10  $\mu\text{m}$ . Cada uno de ellos tiene cuatro núcleos y contiene estructuras como axonemas y

cuerpos medianos. Los flagelos, al igual que los axonemas, están enrollados (Beaver, 1984; Adam, 2001).

Los trofozoitos tienen simetría bilateral, miden de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de largo por 5 a 15  $\mu\text{m}$  de ancho, y tienen la forma de “una gota lagrimal” cuando son vistos en sentido dorsal o ventral. Son convexos en sentido dorsal y presentan un disco adhesivo, cóncavo en su porción ventral. Poseen cuatro pares de flagelos dispuestos simétricamente. De ellos, dos son anterolaterales, y dos posterolaterales, dos ventrales y un par caudal, los que tienen su origen en ocho cuerpos parabasales colocados simétricamente en la línea media, a la altura del borde superior de los núcleos. Además presentan dos axonemas y dos cuerpos medianos. Los trofozoitos tienen dos núcleos que son idénticos, ambos ovoides y con el endosoma central bien diferenciado (Beaver, 1984; Adam, 2001).

Estos protozoos contienen cinco cromosomas y son poliploides. Algunas estructuras, tales como las mitocondrias, el retículo endoplásmico rugoso y los nucléolos no han sido identificadas, lo que conforma la hipótesis de que este organismo es un eucariota primitivo (Adam, 2001; Upcroft y Upcroft, 1998). Su metabolismo anaerobio similar al de los procariotas hace que sea sensible a algunos fármacos antibacterianos especialmente los nitroimidazoles, los que son activados para formar radicales tóxicos (Upcroft y Upcroft, 1998).

Este flagelado fue denominado inicialmente como *Cercomonas intestinalis* por Lambl en 1859; sin embargo, fue el parasitólogo norteamericano Charles Wardell Stiles, quien propuso en 1915 una denominación nueva, *Giardia lamblia*, en honor del profesor A. Giard de Paris, y del doctor F. Lambl de Praga (Beaver, 1984; Adam, 2001). Durante varios años se fueron describiendo alrededor de 40 especies teniendo en cuenta solamente el tipo de huésped donde se encontraba. No fue hasta 1952, en que Filice publicó una detallada descripción morfológica y propuso en realidad tres especies de *Giardia* basado en las diferencias de los cuerpos medianos, que eran identificables por el microscopio óptico.

Estas especies, según Filice, son: *Giardia agilis* que presenta los cuerpos medianos en forma de lágrimas y que es procedente de anfibios; *Giardia muris*, con los cuerpos medianos pequeños y redondeados, la que se encuentra en los roedores, aves y reptiles; y *Giardia duodenalis* (también llamada *G. intestinalis* o *G. lamblia*), la que posee los cuerpos medianos con una forma similar a las orejas de un martillo, que son más frecuentemente encontrados dobles que simples, y que se aísla principalmente en los mamíferos (Adam, 2001).

Existen dos especies adicionales que son indistinguibles de *G. lamblia* por el microscopio de luz: *G. ardeae* (de garzas) y *G. psittaci* (de pericos), las que han sido identificadas a partir de las diferencias morfológicas en el examen por el microscopio electrónico. Otra especie, *G. microti*, ha sido descrita sobre las bases de la especificidad de hospederos en ciertas especies de roedores (*Microtus* spp. y *Ondatra zibethicus*), las diferencias entre los quistes por microscopía electrónica (Adam, 2001), y en las secuencias de la pequeña subunidad ribosomal 18S cuando se comparó con *G. lamblia* de origen humano (Van Keulen *et al.*, 1998).

El nombre de especie *G. lamblia* fue ampliamente aceptado hasta los años 70, en los 80 se comenzó a extender el uso del término de *G. duodenalis* y en los 90 el de *G. intestinalis*. En los momentos actuales no existe una razón convincente para abandonar el uso del nombre de *G. lamblia*, el cual ha sido ampliamente aceptado en la literatura biomédica. A pesar de eso, la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica está revisando aún esta cuestión (Adam, 2001).

*G. lamblia* es un protozoo flagelado que ha sido ubicado taxonómicamente según la clasificación ampliamente aceptada de Levine *et al.* (1980), como se refiere a continuación:

**1. Reino: *Protista*.**

**2. Subreino: *Protozoa*.**

**3. Phylum: *Sarcomastigophora*.**

Protozoos que presentan un solo tipo de núcleo, reproducción asexual, cuando existe, esencialmente singámica. Poseen flagelos, pseudópodos, o ambos tipos de organelas locomotrices. .

**4. Subphylum: *Mastigophora*.**

Trofozoitos que poseen típicamente uno o más flagelos, reproducción asexual, la que básicamente se produce por fisión binaria longitudinal; en algunos grupos presentan reproducción sexual.

**5. Clase: *Zoomastigophorea*.**

Cloroplastos ausentes, uno o varios flagelos presentes, formas ameboides con o sin flagelos en algunos grupos.

**6. Orden: *Diplomonadida*.**

Con uno o dos cariomastigotes, cada uno, con uno o cuatro flagelos; al menos, uno de esos flagelos es recurrente; con dos núcleos, sin mitocondrias o aparato de Golgi. Con quistes. Pueden ser parasitarias o de vidas libres.

**7. Familia : *Hexamitidae*.**

De 6 a 8 flagelos, dos núcleos y algunas veces axostilos y cuerpos medianos o parabasales; presentan simetría bilateral.

**8. Género: *Giardia*.**

Difieren de otros miembros de la familia *Hexamitidae* porque poseen un disco adhesivo, el que sirve como una organela para la fijación, en la superficie ventral del trofozoito.

**9. Especie: *lamblia*.**

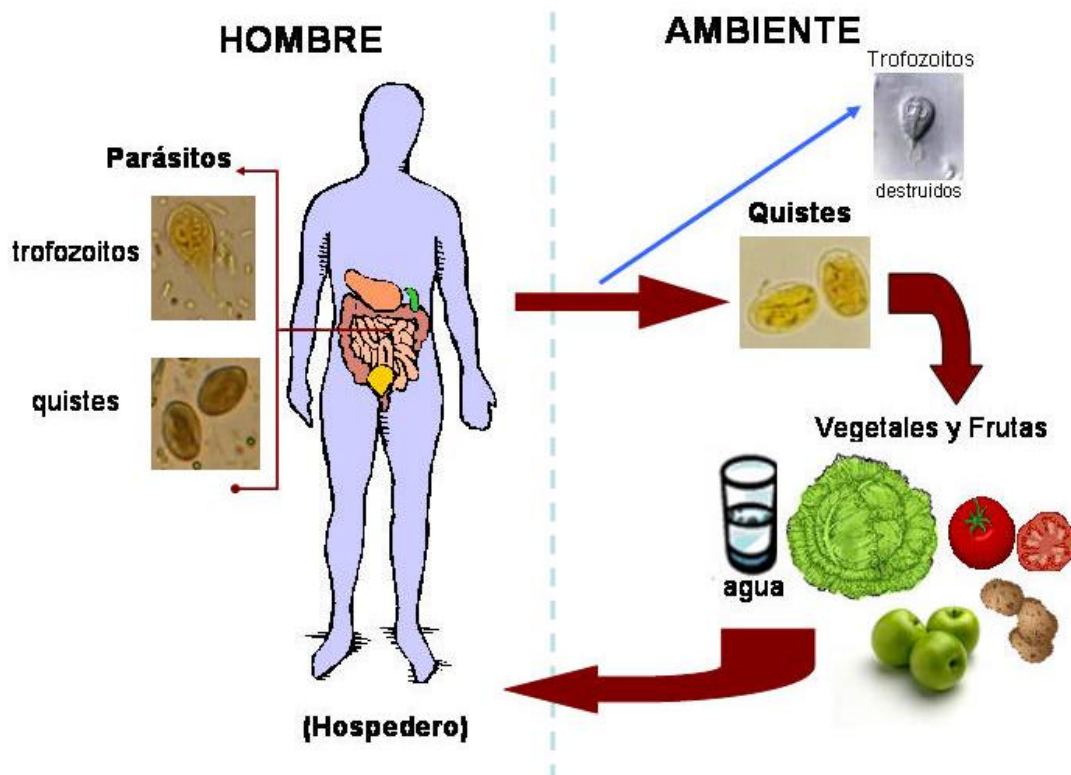
Es la única especie del género que ha sido descrita en humanos.

En los últimos tiempos la taxonomía de los protozoos parásitos del hombre ha sufrido importantes modificaciones pues los flagelados que antes caían en un sólo *phyllum*: Sarcomastigophora, ahora se dividieron en cuatro *phylla*: Parabasalia, Percolozoa, Euglenozoa y Metamonoda. La especie *Giardia lamblia* cae precisamente en este último *phyllum* (Cox, 2002 b).

### **II.3. Ciclo de vida.**

El ciclo de vida está compuesto de dos estados fundamentales: el quiste y el trofozoito. El quiste es la forma infecciosa de este protozoo, relativamente inerte y resistente a los cambios ambientales, aunque puede ser destruido por la desecación y el calor. Sin embargo, es viable en agua fría hasta por 16 días, y es resistente a las concentraciones de cloro utilizadas habitualmente en los sistemas de acueductos (Beaver, 1984; Adam, 1991).

Después de la ingestión, ocurre la exquistación que comienza en el estómago y se completa en el duodeno, como resultado de la exposición al pH ácido del estómago y a las enzimas pancreáticas quimiotripsina y tripsina, se producen dos trofozoitos (estado vegetativo) de cada quiste. Los trofozoitos se replican en las criptas del duodeno y en la porción superior del yeyuno, y se reproducen asexualmente por fisión binaria o bipartición. Algunos de los trofozoitos pueden enquistarse en el íleon, posiblemente como resultado de la exposición a sales biliares o a la ausencia de elementos nutritivos como el colesterol (Beaver, 1984; Adam, 1991).



**Figura 1.** Esquema del ciclo de vida de *Giardia lamblia*.

Las infecciones experimentales han demostrado que la infección puede establecerse con inóculos tan pequeños como un trofozoito ó 10 quistes. Los quistes han aparecido en las heces entre 5 y 41 días posteriores a la infección experimental, y entre 2 y 3 semanas en viajeros que retornan de áreas endémicas (Adam, 2001).

#### II.4. Epidemiología.

Este es uno de los protozoos más comunes del hombre a nivel mundial. Estudios realizados en algunos países subdesarrollados han verificado que a la edad de 3 años todos los niños han sido infectados en esas poblaciones (Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997; Procop, 2001).



La infección con este protozoo, está emergiendo como una de las principales causas de diarrea infecciosa no viral, en niños que asisten a círculos infantiles, lo que ha llevado a considerarlo como una enfermedad infecciosa reemergente (Thompson, 2000). Las condiciones en este tipo de instituciones son ideales para la transmisión por este parásito, al existir una cantidad de niños susceptibles concentrados en un área donde es difícil mantener condiciones adecuadas de higiene (Thompson, 2000).

En países desarrollados, aunque la infección ocurre menos frecuentemente, constituye un importante problema para la salud pública. En los Estados Unidos, por ejemplo, donde la prevalencia de infección parece estar incrementándose, ésta es la principal causa de brotes de enfermedad diarreica asociados con agua potable y es responsable de un estimado mínimo de 5 000 admisiones hospitalarias al año (Kappus *et al.*, 1994; Furness *et al.*, 2000).

En Cuba, la prevalencia de la infección por *G. lamblia* se ha estimado en un 7,2 %, según la encuesta nacional de 1984, aplicada en una muestra representativa de la población cubana (Sanjurjo *et al.*, 1984). Otro estudio posterior desarrollado en los Estados Unidos, demostró en ese país una idéntica tasa de prevalencia (Kappus *et al.*, 1994). En el estudio cubano de 1984, se encontró una prevalencia superior en las edades de 1 a 5 años con un 22,6 % (Sanjurjo *et al.*, 1984), muy similar a los resultados encontrados en varias encuestas de población realizadas en otros países (Kappus *et al.*, 1994; Furness *et al.*, 2000). Diferentes investigaciones desarrolladas en Cuba han señalado que casi un 20 % de los niños cubanos que asisten a círculos infantiles están infectados por *G. lamblia* (Suárez *et al.*, 1999, Gómez *et al.*, 1999).

En países subdesarrollados, los factores de riesgo para adquirir la infección no están siempre bien definidos. Las infecciones ocurren más frecuentemente en niños que en adultos, con especial énfasis en los preescolares, aunque no está claro aún si esto es debido a una mayor exposición a la parasitosis en la niñez temprana o al desarrollo de inmunidad en la niñez más tardía, después de repetidas exposiciones. (WHO, 1990; Procop, 2001).

En los países desarrollados los factores de riesgo para la infección incluyen el pertenecer al grupo de 1 a 4 años de edad, asistir a guarderías infantiles, ingerir agua no filtrada, viajar a países donde la infección es altamente endémica, las prácticas de sexo oral-anal, y la presencia de ciertos trastornos inmunitarios, como la hipogammaglobulinemia (Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997; Okhuysen, 2001). Los lactantes parecen estar más protegidos, y esto pudiera deberse al efecto de la lactancia materna o a una menor probabilidad de ingerir quistes en estas edades (Farthing, 1996; Faubert, 2000; Tellez *et al.*, 2003).

La infección por *Giardia* puede ser transmitida por el agua o los alimentos, y la vía fecal-oral se puede complementar de persona a persona. Las frutas, vegetales (Robertson y Gjerde, 2001) y el agua (Marshall *et al.*, 1997) son los vehículos principales de la transmisión. Sin embargo, poco se conoce acerca de la importancia relativa de las diferentes rutas de la infección (Ortega y Adam, 1997). Se ha señalado la importancia de algunos fómites entre los que se incluyen hasta los juguetes (Smalheiser, 2004) y algunos vectores mecánicos como las moscas, los que pueden tener particular importancia en los mecanismos de diseminación de los quistes (Graczyk *et al.*, 2003).

Organismos similares a *Giardia* se encuentran en una gran variedad de animales. En estudios experimentales, varias especies de animales han sido infectadas con aislamientos de este protozoo obtenidos de humanos y otras especies de animales. Este protozoo se encuentra en animales domésticos como gatos y perros, así como en una variedad de animales silvestres como los castores, que han sido implicados en brotes de transmisión hídrica; sin embargo, no está claro si los humanos pueden ser infectados con aislamientos de *Giardia* procedentes de animales. Aunque el potencial zoonótico de la giardiasis ha sido sostenido por estudios de transmisión cruzada entre los humanos y animales, un análisis más minucioso de estos estudios revela varias limitaciones en las metodologías utilizadas. Por otra parte estudios genético-moleculares más recientes han demostrado una considerable diversidad genética entre los aislamientos de la misma especie de *Giardia*

sugiriendo que estas especies son de hecho complejos de especies y que algunos de estas nuevas especies pueden ser huésped-específicas (Monis y Thompson, 2003). La identificación de animales reservorios puede tener importantes implicaciones para el control de la transmisión de *Giardia* (Thompson, 2000; Procop, 2001; Traub *et al.*, 2002).

## **II.5. Control y prevención.**

Los esfuerzos de la salud pública para controlar la infección por *Giardia* se han visto obstaculizados por la existencia de lagunas en los conocimientos acerca de la biología, la historia natural, la ecología y la transmisión del microorganismo; así como los factores de riesgo en diferentes condiciones, y las respuestas clínicas e inmunitarias de la infección en el hospedero humano (WHO, 1990; Procop, 2001).

Es probable que el empleo de una sola medida de control no sea completamente efectivo en la prevención y el control de la infección. La estrategia básica para el control de la transmisión de *Giardia* se basa en prevenir o reducir la exposición a las heces infectivas. Los métodos para llevar esto a cabo pueden ser sofisticados o simples, y deben ser adaptados a las situaciones locales. En algunos países desarrollados, la infección y la enfermedad han sido asociados a brotes de transmisión hídrica, en grupos de riesgo relativamente bien descritos. Sin embargo, aun en estos países, la mayoría de las infecciones son más bien esporádicas que asociadas a brotes, y casi siempre el origen de la infección es desconocido. Las infecciones por *Giardia* asociadas con los acueductos pueden ser prevenidas por el empleo de sistemas apropiados de filtración y tratamiento, y con una buena protección de los sitios de colección y depósito (Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997; Procop, 2001).

El lavado de las manos, la buena higiene personal, el uso de letrinas y de sistemas adecuados para el depósito de las excretas son algunas de las principales medidas

recomendadas. Hay que tener en cuenta que en zonas endémicas, el papel de la transmisión persona a persona puede ser muy importante y las medidas de control deben ir dirigidas a interrumpir este ciclo de transmisión. Son muy importantes la educación sanitaria para promover la higiene personal, el suministro de agua potable segura y la efectiva deposición de excretas. La importancia de los animales reservorios no está clara aún y se necesitan todavía más investigaciones al respecto (Ortega y Adam, 1997; Procop, 2001).

Existen algunas evidencias clínicas y epidemiológicas que muestran la existencia de inmunidad adquirida, y se han encontrado algunas fracciones antigénicas en las proteínas superficiales de *Giardia*, asociadas con el desarrollo de inmunidad (Faubert, 2000; Larocque *et al.*, 2003). Por lo tanto, será necesario un mejor conocimiento de la inmunidad intestinal en general, y de la inmunidad específica contra *Giardia* antes de poder encontrar una posible inmunización eficaz (Faubert, 2000).

## **II.6. Patogenia y fisiopatología.**

En los casos sintomáticos, se ha observado aplanamiento de las microvellosidades, infiltración linfocítica y malabsorción. En ocasiones, este acortamiento de las microvellosidades recuerda al de la enfermedad celíaca, sobre todo en individuos con hipogammaglobulinemia; sin embargo, no se ha observado invasión hística y a veces se ve un gran número de trofozoitos en las criptas duodenales sin evidencias de trastornos patológicos (Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997; Procop, 2001).

La presencia de una toxina no ha sido bien y consistentemente demostrada hasta la fecha, y son pocos los mecanismos potenciales identificados a través de los cuales el protozoo pueda causar diarrea. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado la presencia de sustancias citopáticas en los productos de excreción y secreción del parásito (Shant *et al.*, 2002); dentro de las cuales se han identificado glicoproteínas (Kaur *et al.*, 2001)

proteinasas (Jimenez *et al.*, 2000) y lectinas (Souza *et al.*, 2001; Weiland *et al.*, 2003), las que pueden causar daño directo sobre la mucosa intestinal.

Otros mecanismos propuestos incluyen disrupción del borde en cepillo y procesos inmunopatológicos, además de que se plantea la interferencia mecánica por efecto de tapizado, que pueden producir los trofozoitos adheridos al duodeno, acompañados de la inflamación consecuente (Hill, 1993; Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997; Procop, 2001). Se ha demostrado la presencia de una glicoproteína localizada en la superficie de los trofozoitos de *G. lamblia*, así como que la misma induce experimentalmente la acumulación de fluido en las asas ileales ligadas de conejos (Kaur *et al.*, 2001). La giardiasis provoca una malabsorción de electrolitos y fluidos asociada con una afectación del borde en cepillo y una disminución del área de absorción, por lo que la diarrea asociada con esta parasitosis causa más bien, una malabsorción en vez de una secreción activa (Buret *et al.*, 1992). El daño del borde en cepillo de las microvellosidades y la disminución de la actividad de las disacaridasas pueden llevar a incrementar las cantidades de disacáridos en la luz intestinal y causar diarrea osmótica (Nain *et al.*, 1991).

El papel protector de la microflora puede estar relacionado con la competencia por sustratos nutricionales, la competencia específica por sitios receptores en la mucosa intestinal, la producción de compuestos antimicrobianos y metabólicos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, y la amplificación de la respuesta inmune (Perez *et al.*, 2001). Las diferencias en la flora normal del huésped pudieran explicar parcialmente la capacidad del parásito para provocar cuadros clínicos variables en los hospederos (Singer y Nash, 2000 b; Torres *et al.*, 2000).

## **II.7. Inmunología.**

La respuesta inmunitaria desempeña un importante papel para el control de la infección por *G. lamblia* (Langford *et al.*, 2002). Al menos, 20 polipéptidos con un rango de peso molecular que va de 14 a 125 kDa han sido identificados a partir de extractos crudos de trofozoitos. Varios estudios han reportado que el polipéptido de 82 kDa es el antígeno mayor de superficie en los trofozoitos (Faubert, 2000). Algunos factores parecen predisponer a la infección por *G. lamblia*, dentro de ellos podemos citar la hipogammaglobulinemia, pues los pacientes afectados por estos trastornos inmunitarios parecen tener una más alta incidencia de giardiasis y secuelas más severas, particularmente aquellos con déficit en la producción de IgA (Langford *et al.*, 2002; Faubert, 2000).

Los aislamientos de diferentes áreas geográficas tienen semejanzas antigénicas. Los antígenos de quistes detectados en heces humanas tienen pesos moleculares que varían entre 21 y 49 kDa. Otras moléculas producidas por el protozoo son las proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*), las lectinas, las giardinas, las tubulinas y las quitinas (Faubert, 2000; Souza *et al.*, 2001).

La variación antigénica ocurre en la giardiosis y ha sido reportada tanto *in vivo* como *in vitro*. Los antígenos variables de superficie han sido localizados en la membrana superficial de los trofozoitos; la mayoría de ellos tienen una estructura con abundantes residuos de cisteína (Faubert, 2000).

En la inmunidad adquirida, ambas vertientes del sistema inmunológico, la humoral y la celular, tienen una destacada función para el control de la infección. Los anticuerpos IgM, IgA e IgG específicos cumplen un papel tan destacado como el de las células T (Singer y Nash, 2000 a), los macrófagos y los neutrófilos. Los componentes accesorios del sistema inmunológico, tales como el complemento, son de gran utilidad (Faubert, 2000). Diferentes

estudios clínicos experimentales indican la importancia en general de la inmunidad dependiente de las células B; se ha demostrado que las inmunoglobulinas del tipo de la IgA son muy importantes para el control y eliminación de la infección (Eckmann y Gillin, 2001; Langford *et al.*, 2002), dentro de este último grupo la inmunoglobulina IgA secretora, tiene un papel central en la defensa contra *Giardia* (Eckmann, 2003).

Aunque los mecanismos dependientes de las células T también existen y pueden contribuir a la erradicación del parásito, su importancia fisiológica aun no es satisfactoriamente comprendida (Eckmann, 2003). Pocos estudios se han desarrollado para averiguar el papel de las citoquinas; sin embargo, trabajos experimentales muy recientes han demostrado el importante papel de la interleuquina-6 para el control de la giardiasis en modelos experimentales (Scott *et al.*, 2000; Ali y Hill, 2003; Bienz *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003). Se ha sugerido que los antígenos de excreción-secreción de *Giardia* estimulan una respuesta preferencial de tipo Th2, la cual está probablemente envuelta en algunas de las alteraciones intestinales asociadas con la giardiasis y en los mecanismos de control de la infección a nivel de mucosas (Jimenez *et al.*, 2004).

La resistencia adquirida frente a la giardiasis ha sido bien documentada sólo en modelos animales. Se ha reportado que *Giardia* puede deprimir el sistema inmunológico de los hospederos infectados. La infección es más severa en las personas afectadas por hipogammaglobulinemia. Sin embargo, la infección no es más severa en los pacientes afectados por otros agentes infecciosos que pueden deprimir el sistema inmunológico, como los afectados por el SIDA (Faubert, 2000).

La sensibilidad de los ensayos serológicos para detectar anticuerpos contra *Giardia* es baja, aún cuando se utiliza el suero de pacientes con casos clínicos probados (Faubert, 2000).

## **II.8. Características clínicas de la infección en el hombre.**

La infección en el hombre tiene una evolución clínica variable, que va desde la infección asintomática, la mayoría de las veces, hasta la diarrea severa. Esto parece estar relacionado tanto con factores del hospedero como del agente biológico. El período de incubación después de la ingestión de quistes es variable y puede ser tan corto como una o dos semanas. (Hill, 1993; Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997; Procop, 2001).

Los signos y síntomas de la enfermedad son difíciles de distinguir de los de otras enfermedades gastrointestinales. La infección no siempre produce diarrea. De hecho, otros síntomas digestivos como los dolores abdominales y los cólicos pueden ocurrir más frecuentemente que la diarrea (Beaver *et al.*, 1984; Adam, 1991, Aparicio Tijeras *et al.*, 2004).

*Giardia* es reconocida como una causa de rápida pérdida de peso y malabsorción de grasas, y puede presentarse lo mismo en forma crónica, que en forma aguda. Se ha descrito incluso que la afección de las funciones pancreáticas pudiera ser una causa de severa malabsorción en giardiasis (Carroccio *et al.*, 1997). Diferentes estudios han encontrado los niveles de algunos oligoelementos como el hierro sérico, el zinc (Ertan *et al.*, 2002; Demirci *et al.*, 2003) y el magnesio (Olivares *et al.*, 2003; Kilic *et al.*, 2004) significativamente más bajos en pacientes infectados con *Giardia* que en controles, lo que pudiera deberse a la malabsorción que se produce en la giardiasis (Demirci *et al.*, 2003; Olivares *et al.*, 2003).

Entre los síntomas digestivos más comunes están la diarrea, los cólicos o dolores abdominales, náuseas, meteorismo y disminución del apetito. En los pacientes con hipogammaglobulinemia, la enfermedad puede ser más grave, con tendencia marcada a la cronicidad y a la malabsorción. Esto es más evidente en las personas con deficiencias de la IgA secretora. También se ha señalado la deficiencia subclínica de lactasa que puede llevar a una intolerancia de la lactosa, que pudiera persistir aún un tiempo después de la erradicación del parásito (Hill, 1993; Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997; Procop, 2001).



Se ha reportado la asociación con enfermedad de Whipple lo que pudiera ser posible en estos casos por un defecto común del sistema inmune, o que la infección con un tipo de microorganismo pueda predisponer a la infección con el otro (Fenollar *et al.*, 2003). También se ha señalado, pero con baja frecuencia, la enfermedad biliar (Hill, 1993; Farthing, 1996).

Este parasitismo se ha visto muy relacionado con trastornos del crecimiento y desarrollo en los niños; algunos estudios han mostrado que la infección por *G. lamblia* tiene un impacto adverso sobre el crecimiento de los niños (Farthing *et al.*, 1986; Valencia *et al.*, 1995; Muniz-Junqueira y Queiróz, 2002; Sackey *et al.*, 2003) mientras que otro no mostraron relación entre la infección por *G. lamblia* y trastornos nutricionales (Adam, 1991; Lunn *et al.*, 1999; Moya-Camarena, 2002). Algunos autores postulan que las infecciones asociadas con malnutrición en las edades tempranas de la vida pudieran traer como consecuencia, alteraciones en la esfera cognoscitiva en etapas más tardías de la niñez (Berkman *et al.*, 2002; Niehaus *et al.*, 2002). De todas formas, numerosas investigaciones se acometen para elucidar estos últimos aspectos, debido a que en ocasiones se hace muy difícil evaluar los efectos de la infección por este flagelado sobre el crecimiento, el estado nutricional y su influencia en la esfera cognoscitiva en niños, a causa de la existencia de varios factores, como la presencia de múltiples patógenos que pudieran explicar estas diferencias en el crecimiento.

Algunas manifestaciones extraintestinales inusuales han sido descritas y se han involucrado mecanismos inmunoalérgicos para explicar su patogénesis. Dentro de éstas se señalan la urticaria, la artritis reactiva, y hasta raros casos de bronquitis y retinitis alérgica (Tupchong *et al.*, 1999; Faubert, 2000; Procop, 2001; Hill Gaston 2003). Otros cuadros más raros como son la miopatía por hipocaliemia también han sido asociados a la infección por *G. lamblia* (Cervelló y Alfaro, 1993).

## **II.9. Diagnóstico.**

Aunque el examen microscópico de las heces es el método más práctico y efectivo para establecer la presencia de la infección en el hombre, la eliminación de quistes puede ser intermitente, lo que pudiera llevar a falsos negativos. Por esta razón, es importante la realización de exámenes seriados con el fin de aumentar la sensibilidad (Hill, 1993; Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997; Procop, 2001).

El examen microscópico de las heces consume tiempo y requiere muchas veces de buena calificación y experiencia del personal que realiza el diagnóstico; los quistes y trofozoitos de *Giardia* se pueden observar en frotis húmedos directos o con coloraciones permanentes. En ocasiones se ha descrito la presencia de quistes retraídos que pierden su estructura normal y toman una coloración anormalmente azulosa o grisácea hialina con la coloración de Lugol. El empleo de métodos parasitológicos de concentración como el método de Ritchie (formol-éter/acetato de etilo) o el de Faust (sulfato de zinc) aumenta considerablemente la sensibilidad del examen parasitológico; sin embargo, el uso de procedimientos de preservación de las heces con formalina pudiera afectar la flotabilidad de los quistes en algunas técnicas parasitológicas como la de concentración por sacarosa (Moitinho *et al.*, 1999). La ingestión de algunas sustancias tales como bario, antiácidos, laxantes oleosos y enemas, pueden dificultar los exámenes de heces (Hill, 1993; Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997; Procop, 2001).

En casos de alta sospecha clínica, en los que los exámenes seriados sean negativos, se puede examinar el contenido duodenal por sondaje o intubación directa, por visualización endoscópica, por biopsias o por el empleo menos invasivo de la cápsula del Entero-Test® (cuerda de Beal). Algunas técnicas de anticuerpos fluorescentes y ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida han sido desarrollados para la detección de antígenos de *Giardia* en heces, como el que emplea anticuerpos contra el antígeno GSA-65 de *G. lamblia* (Azis *et al.*, 2001). Estos han demostrado una sensibilidad y especificidad

comparables a los exámenes microscópicos de alta calidad, y consumen menos tiempo cuando un gran número de muestras tienen que ser analizadas. Es bueno aclarar que hasta el momento, estos ensayos comerciales son caros y los reactivos son difíciles de conseguir, sobre todo en países subdesarrollados (Hill, 1993; Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997; Procop, 2001).

Una gran variedad de nuevas tecnologías han mostrado ser prometedoras en evaluaciones recientes. Por ejemplo, se han desarrollado varios métodos para la extracción de los ácidos nucleicos de los quistes, y varias pruebas de reacción en cadena de la polimerasa con el uso de adecuados cebadores, los que permiten detectar la infección y determinar el biotipo de *Giardia* tanto en heces como en agua (Guy *et al.*, 2003). Sin embargo, el uso habitual de estas técnicas ha sido generalmente limitado en algunos países desarrollados para la detección del protozoo en estudios de parasitología ambiental, y en específico para la búsqueda del parásito en aguas de consumo (Mank y Zaat, 2001).

## **II.10. Tratamiento.**

Un gran número de fármacos han sido empleados para los pacientes sintomáticos, por su acción directa contra el parásito. Los 5-nitroimidazoles son las drogas de elección. Algunos productos de este grupo tales como el tinidazol y el secnidazol se han utilizado en dosis única, pero en ciertos países como en los EE.UU., estos medicamentos no se consiguen, por no haber sido aprobado aún su uso por las agencias reguladoras (Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997).

Algunos compuestos antihelmínticos del grupo de los benzoimidazoles, como el mebendazol, fueron ensayados con resultados prometedores al principio, pero los estudios posteriores demostraron una baja eficacia (Gardner y Hill, 2001). Otros estudios preliminares señalaron una buena eficacia *in vitro* del antihelmíntico albendazol, pero en

ensayos clínicos posteriores se llegó a la conclusión de que su eficacia es inferior a la de las drogas anti-giardiasis clásicas (Gardner y Hill, 2001). Análogos del albendazol y el mebendazol han sido sintetizados y probados *in vitro* contra *G. lamblia* y los resultados indican que algunos de estos compuestos son tan activos como el metronidazol contra *G. lamblia*. (Navarrete-Vazquez *et al.*, 2003). Otros compuestos de este grupo, como el fenbendazol, ha tenido buenos resultados en ensayos preliminares con modelos animales (O'Handley *et al.*, 1997; Zajac *et al.*, 1998; Keith *et al.*, 2003); sin embargo, su eficacia en humanos no ha sido aún bien evaluada.

La quinacrina, que fue uno de los primeros fármacos efectivos para el tratamiento, se ha dejado de usar en algunos países por las reacciones secundarias que puede producir en determinados pacientes (Gardner y Hill, 2001). El tratamiento de los niños asintomáticos es controversial. Aunque generalmente se recomienda no tratar estos casos, en ciertas ocasiones se recomienda basado en consideraciones de salud pública, como pudiera ser el control de brotes de giardiasis en guarderías infantiles, cuando otras medidas preventivas no son efectivas, o para prevenir la infección en los convivientes con un alto riesgo de enfermedad severa.

En la siguiente tabla se reflejan algunos de los principales fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiasis, así como sus dosis más recomendadas tanto en pacientes adultos como en niños.

Tabla1. Fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiosis, y dosis más recomendadas.

Fármaco	Dosis del Adulto	Dosis pediátrica
Metronidazol	250 mg 3 v/día X 5 días	15 mg/kg. en 3 dosis X 5 días
Clorhidrato de quinacrina	100 mg 3 v/día X 5 días	6 mg/kg. en 3 dosis X 5 días
Tinidazol	2 gr. una vez	50 mg/kg. Una vez (máx. 2 gr.)
Furazolidona	100 mg 4 v/día X 7-10 días	6 mg/kg. 4 dosis X 7-10 días
Paromomicina	25-30 mg/kg./día X 7 días	25-30 mg/kg./día X 7 días
Secnidazol	2 gr. dosis única oral.	30 mg/kg./día. Una dosis oral.
Albendazol	400 mg/día X 5 días	15 mg/Kg/día (sin pasar de 400 mg) X 5 días

Otros productos como la cloroquina, pirimetamina, mefloquina, rifampicina, azitromicina, algunas tetraciclinas como la doxiciclina, la menadiona y compuestos derivados de los fenil-carbamatos han sido ensayados *in vitro* y han demostrado algún grado de actividad (Gardner y Hill, 2001; Jimenez-Cardoso *et al.*, 2003; Paget *et al.*, 2004). Según nuestra experiencia en un ensayo clínico reciente, la cloroquina mostró una actividad similar al tinidazol y superior al albendazol (Escobedo *et al.*, 2003).

En los últimos tiempos se ha aprobado el registro para uso en humanos de otros nuevos fármacos, dentro de los cuales resalta la nitazoxanida, un derivado nitrotiazólico, que ha mostrado una buena efectividad *in vitro* (Adagu *et al.*, 2002), y ha sido utilizado con éxito en varios ensayos clínicos (Rossignol, *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 2003). Este fármaco fue aprobado recientemente en los Estados Unidos de Norteamérica por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), para ser utilizado en niños con diarreas infectados con *Giardia* o *Cryptosporidium* (Anónimo, 2003 a; Anónimo, 2003 b).

Además del tratamiento con fármacos sintéticos que tienen una mostrada efectividad contra la infección por este flagelado, existen otras opciones terapéuticas potenciales las que incluyen una combinación de intervenciones nutricionales y fitoterapia (Hawrelak, 2003). Este enfoque es considerado útil por algunos autores, sobre todo si se tiene en cuenta el riesgo de efectos colaterales de algunos medicamentos, y la posible emergencia de cepas resistentes a diferentes fármacos, como el metronidazol (Upcroft y Upcroft, 2001).

Los principales objetivos de una intervención nutricional serían reducir la sintomatología aguda de la enfermedad, promover las defensas del hospedero humano, e inhibir el crecimiento y la replicación del parásito. Esto pudiera lograrse mediante el consumo de germen de trigo (Grant *et al.*, 2001) y una dieta de alimentos ricos en fibras (Hawrelak, 2003), pero bajos en grasas y en carbohidratos simples. La ingestión adicional de probióticos pudiera ayudar en la eliminación de la infección, al interferir en el crecimiento de la infección por *Giardia* a través de diferentes mecanismos que incluyen la competencia por los sitios limitados de adherencia (Fuller y Gibson, 1997) y con nutrientes como la glucosa (Vanderhoof y Young 1998), los que pudieran ser utilizados por otros patógenos (Vanderhoof y Young, 1998); además de la estimulación de la respuesta inmune (Heller y Duchmann, 2003; Schultz *et al.*, 2003). Finalmente el consumo de algunos productos fitoterapéuticos pudiera ser muy útil, sobre todos los que no tienen importantes efectos nocivos o tóxicos, y los que han sido usadas tradicionalmente para mejorar los síntomas y eliminar la infección (Hawrelak, 2003).

En la actualidad continúan los estudios, tanto con productos de origen vegetal como sintéticos con el fin de buscar medicamentos cada vez más eficaces, con pocas reacciones colaterales y que puedan, si es posible, ser efectivos en dosis únicas (Harris *et al.*, 2001; Jarroll y Sener, 2003). Los nuevos avances tecnológicos que se aplican en este campo incluyen el diseño computadorizado de nuevos productos sintéticos combinado con el desarrollo de la síntesis química de los mismos; y el empleo de técnicas masivas para la

evaluación preclínica, lo que acelerará tanto la investigación futura para la búsqueda de nuevos y mejores productos anti-giardíacos, como el conocimiento de la enfermedad (Minenoa y Avery, 2003).

### **II.11. Estudios genéticos en *G. lamblia*.**

Las herramientas de clasificación molecular han sido de gran valor en el estudio de la infección por *G. lamblia*, al permitir un mejor conocimiento del potencial zoonótico, estudiando un amplio rango de aislamientos de *Giardia* obtenidos en seres humanos y una gran variedad de otros mamíferos (Adam, 2001); por otra parte los estudios realizados y los que se desarrollen en el futuro, ayudarán a la mejor comprensión de los mecanismos de la patógenesis para este tipo de infección parasitaria (Adam, 2001).

Los estudios primeros que se realizaron en *G. lamblia*, con el análisis de los zimodemos, demostraron diferencias entre los aislamientos, lo que podría estar reflejando diferencias en las secuencias de los genes que codificaban esas enzimas. El primer estudio, de biología molecular en *G. lamblia* se realizó en 1985, con el análisis del polimorfismo de los fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción en 15 aislamientos del protozoo (Nash *et al.*, 1985). Posteriormente se han desarrollado otros estudios de clasificación molecular usando el análisis del polimorfismo de los fragmentos obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción (De Jonckheere *et al.*, 1990; Ey *et al.*, 1992; Ey *et al.*, 1993 a; Ey *et al.*, 1993 b; Ey *et al.*, 1996; Homan *et al.*, 1992).

La electroforesis de ADN en gel de campo pulsado (PFGE) y los patrones cromosómicos también han sido estudiados (Adam *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 1990; Isaac-Renton *et al.*, 1993; Korman *et al.*, 1992; Sarafis e Isaac-Renton, 1993), pero son de limitado valor para la clasificación por la frecuente ocurrencia de reajustes en la disposición de los cromosomas (Le Blancq *et al.*, 1991; Adam, 1992). Para permitir una comparación más cuantitativa de los aislamientos de *Giardia*, en varios estudios se han comparado la secuencia de los genes de la pequeña subunidad 18S del ARN ribosomal, las enzima

triosafosfato isomerasa (*tim*), y la glutamato deshidrogenasa (GDH) (Baruch *et al.*, 1996; Ey *et al.*, 1997; Monis *et al.*, 1996; Monis *et al.*, 1998; Monis *et al.*, 1999). Esto ha permitido la clasificación de los aislamientos en diferentes genotipos cuya clasificación ha ido cambiando de acuerdo a los diferentes autores (Mayrhofer *et al.*, 1995; Hopkins *et al.*, 1997; Homan *et al.*, 1998; Adam, 2001).

## **II.12. Técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).**

La técnica de RAPD fue desarrollada por primera vez en el año 1990 (Williams *et al.*, 1990). Constituye una herramienta rápida para el estudio molecular que puede brindar información sobre la naturaleza y la extensión de la diversidad genética de una población parasitaria en una localización determinada (Van Belkum *et al.*, 1993).

Esta técnica tiene la ventaja sobre otros métodos moleculares, generalmente empleadas para la caracterización genómica, que no requiere conocimiento previo de la secuencia del ADN, y sólo requiere el uso de oligonucleótidos relativamente cortos con secuencias elegidas al azar; mientras que los otros métodos se basan en el conocimiento previo de una secuencia de un gen determinado, el cual será amplificado (Van Belkum *et al.*, 1993). Por otra parte la técnica de RAPD requiere pocas cantidades de ADN, y no necesita de clonación, secuenciación o hibridación, lo que la coloca en ventaja con respecto a otras técnicas moleculares de caracterización genómica; es decir que en el método del RAPD el polimorfismo es detectado a partir de patrones de amplificación del ADN, que no son más que marcadores anónimos (Singh, 1997; Guimarães *et al.*, 1999).

Entre los métodos moleculares usados para caracterizar los aislamientos de *Giardia* el RAPD ha demostrado ser una herramienta valiosa para estudios epidemiológicos (Singh, 1997; Deng y Cliver, 1999; Paintia *et al.*, 1999). Todos los estudios previos realizados para la caracterización de aislamientos de *G. lamblia* por la técnica de RAPD, detectan una amplia diversidad genética o heterogeneidad, entre las cepas o aislamientos (Van Belkum *et*



*al.*, 1993; Morgan *et al.*, 1996; McRoberts *et al.*, 1996; Mohamed *et al.*, 2004; Sedinova *et al.*, 2004).

Uno de los estudios de RAPD realizados con aislamientos de *Giardia*, se desarrolló con el objetivo fundamental de buscar métodos más eficaces de extracción del ADN a partir de los trofozoitos del parásito (Deng y Cliver, 1999); sin embargo, la mayoría de los estudios se han hecho con el fin de buscar marcadores genéticos que puedan ser útiles para definir cepas, o para estudios genealógicos (Mohamed *et al.*, 2004; Sedinova *et al.*, 2004). Hasta el momento muy pocos estudios han tratado de buscar infructuosamente alguna relación entre la sintomatología clínica y las agrupaciones genéticas (Rocha *et al.*, 2003).

## **CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III.1. Estudio longitudinal en tres círculos infantiles de la Ciudad de La Habana.**

#### **III.1.1. Población estudiada**

En este estudio descriptivo fueron seleccionados al azar tres círculos infantiles (CI) de los 380 existentes en la Ciudad de La Habana. Los círculos seleccionados fueron “Amiguitos de Polonia” y “Barquito de Papel” ambos ubicados en el municipio Plaza, y el círculo infantil “Amiguitos de Piong Yang”, perteneciente al municipio de La Lisa.

Para este estudio sólo se incluyeron aquellos niños cuyos padres o tutores aceptaron participar voluntariamente. Una autorización escrita fue obtenida de las madres, padres o tutores de los niños y de los directores de cada CI, antes de comenzar el estudio. Para eso se confeccionó un modelo de consentimiento informado (Anexo 1). Al finalizar el estudio se le aplicó una encuesta a cada niño, la que fue llenada por los médicos de los círculos y dos miembros del equipo de investigadores (Anexo 2).

Los niños que tenían 4 años de edad o menos, fueron seguidos durante un período de 18 meses, completando el estudio un total de 365. Aquellos niños que por varias razones fallaron en suministrar todas las muestras de heces requeridas fueron excluidos del estudio, ellos fueron menos de un 10 % de los enrolados inicialmente en la investigación.

Los principales síntomas recogidos en los últimos 6 meses fueron obtenidos de las historias clínicas de los CI. El estado nutricional de cada niño fue determinado empleando los parámetros de edad, peso y talla, de acuerdo con las tablas nacionales para crecimiento y desarrollo en los niños cubanos (Jordán, 1988). El protocolo fue revisado y aprobado por la comisión científica especializada y fue justificado desde el punto de vista ético al cumplir

con los criterios de la Declaración de Helsinki (*World Medical Association*, 2000) y los expuestos en las guías operacionales para los Comités de Ética que revisan investigación biomédica (WHO, 2000).

### **III.1.2. Análisis de las muestras de heces**

Durante los 18 meses de duración de la investigación los niños fueron estudiados parasitológicamente cada 6 meses mediante la toma de tres muestras de heces, en tres días alternos, durante una semana, hasta completar cada uno de los cuatro cortes transversales.

Las muestras se recogieron en frascos plásticos etiquetados, sin preservantes, y transportadas al laboratorio dentro de las cuatro horas después de recogidas; ellas fueron examinadas por los métodos de examen directo con eosina y lugol, y la técnica de concentración de formalina-éter para la búsqueda de quistes o trofozoitos de *G. lamblia* (García y Bruckner, 1993). Todos los niños que se encontraron infectados fueron tratados por los médicos de asistencia en cada CI. El metronidazol (Khaw y Panosian, 1995) fue usado para tratar la infección por *G. lamblia*, a la dosis de 15-22,5 mg/kg peso corporal por día, dividido en tres subdosis, durante 10 días (Gardner y Hill, 2001). En todos los casos se colectaron tres muestras de heces posteriores al tratamiento para verificar la curación durante la primera semana después de concluido el tratamiento.

### **III.1.3. Definiciones**

En cada corte transversal del estudio, la prevalencia y la incidencia fueron expresadas como porcentajes y definidas de acuerdo con Margolis *et al.* (1982) revisado por Bush *et al.* (1997). La prevalencia fue definida como el número de niños infectados con *Giardia* dividido por el número de niños examinados en cada corte transversal. La incidencia fue definida como el número de nuevos casos de niños que se encuentran infectados con *Giardia* en cada corte transversal dividido por el número de niños no infectados (negativos a la infección por *Giardia*) en el corte transversal previo. La tasa de reinfección fue definida como el porcentaje de aquellos niños infectados con *Giardia* en el corte transversal

previo, que aunque tratados, fueron encontrados nuevamente infectados en el siguiente corte transversal.

La diarrea fue definida como la eliminación de tres o más deposiciones líquidas en 24 horas. Para esto también se tuvo en cuenta los criterios de los padres y tutores o del personal que atendía los niños en cada círculo infantil. Un episodio diarreico se definió convencionalmente como aquel que comenzó con un período de 24 horas en que reunió los criterios de diarrea y que finalizó el último día con diarrea, seguido por un período de al menos dos días consecutivos sin cumplir con la definición de diarrea; el primer día subsiguiente con diarrea fue considerado como un nuevo episodio de diarrea. En cada CI, el médico de atención fue informado cuando un niño no asistió al círculo por algún episodio de diarrea, y el doctor visitó las casas de esos niños, para determinar las posibles razones de su ausencia por enfermedad. En cada caso el episodio de diarrea fue recogido, en la historia clínica de cada niño.

#### **III.1.4. Variables estudiadas.**

Las variables relacionadas con síntomas y signos, fueron concebidas sobre la base del cuadro clínico referido por la literatura médica como posible para giardiasis (Hill, 1993; Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997; Procop, 2001). Los síntomas principales recogidos fueron: diarreas, dolor abdominal y reacciones alérgicas; dentro de estas últimas se consideró la presencia de urticaria y rinitis alérgica. Para aceptar dichas variables en la investigación se revisaron las historias clínicas durante los últimos 6 meses del estudio, como complemento del cuestionario realizado. La definición de los síntomas y signos se hizo de acuerdo a la definición de los criterios semiológicos clásicos (Llanio *et al.*, 1991). La otra variable considerada fue la cantidad de cortes transversales en que cada niño fue encontrado positivo a la infección por *G. lamblia*. Para eso se tuvo en cuenta que en cada momento el niño fuera positivo, en alguno de los tres exámenes seriados recogidos.

### **III.2. Estudio de factores de riesgo en niños con tendencia a la reinfección con *Giardia lamblia* y en los controles.**

Teniendo en cuenta los resultados previamente obtenidos en el estudio longitudinal de 18 meses de duración, donde encontramos un grupo de niños con tendencia o predisposición a la reinfección con *G. lamblia*, los que presentaron una mayor asociación con síntomas clínicos como las diarreas, decidimos estudiar las características sociales y factores ambientales que pudieran estar asociados con esa mayor susceptibilidad a la giardiasis en estos niños. Para cumplir los objetivos propuestos se realizó en la población estudiada, otro estudio observacional, retrospectivo y analítico de casos y controles.

#### **III.2.1. Selección de los casos y los controles**

Se consideró como caso, cada niño que se encontró infectado con *G. lamblia* en 3 o más cortes transversales del estudio longitudinal. Por cada caso se estudiaron como controles todos los niños del mismo círculo infantil, grado, y sexo, que hubieran sido negativos a la infección durante todo el estudio. En la mayoría de los casos se seleccionaron 2 controles por cada caso. Un modelo de consentimiento informado para la aceptación de los padres o tutores de cada niño, fue llenado antes de la inclusión en el estudio, tanto para los casos como los controles (Anexo 3). La relación casos controles encontrada fue de 1:1,8.

#### **III.2.2. Definición de las variables de estudio y técnicas de recolección de la información**

En las encuestas realizadas a casos y controles se manejaron distintos tipos de categorías tales como nombre y apellidos de los niños seleccionados, así como su dirección particular, para que sirvieran de elementos localizadores de los mismos. Otras categorías fueron concebidas como variables para procesamiento y análisis estadístico. Éstas constituyeron dos grupos; factores socioeconómicos y la presencia de determinados hábitos higiénicos considerados como posibles favorecedores del riesgo de exposición, los que fueron estudiados tanto en las familias de los casos como en los controles.

Dentro de las características socioeconómicas se estudió el grado de hacinamiento en las viviendas, considerando en esta variable sólo los casos en que dormían más de dos personas por dormitorio; y el índice de personas por cama, donde se consideró sólo cuando dormía más de una persona por cama, siempre y cuando no fuera una unión conyugal. La carencia de ciertos equipos electrodomésticos, tales como refrigerador, radio, televisor y al menos 2 ventiladores, fueron otras de las variables estudiadas. Finalmente, se estudió el grado de escolaridad del padre y de la madre, así como el ingreso promedio por persona en el núcleo familiar de cada vivienda expresado en pesos cubanos.

Entre los hábitos higiénicos que estudiamos tanto en las familias de los niños predispuestos a la giardiasis como en sus controles, seleccionamos el lavado de manos antes de comer y después de defecar, el lavado de vegetales, así como el hábito de hervir el agua de beber. Se consideró el lavado de los vegetales correcto, cuando se lavaban las verduras por hojas y no por mazos, y se utilizó el lavado debajo de un chorro de agua, en vez de su introducción en recipientes. Se indagó sobre el hábito de hervir el agua tanto por cuestionario como verificando la presencia de incrustaciones de sales de magnesia en el recipiente que se usaba habitualmente para hervir el agua.

Para la obtención de la información relacionada con las variables estudiadas se diseñó un modelo de cuestionario previamente empleado por nuestro grupo en otras investigaciones similares (López *et al.*, 1993) el cual fue sometido a la opinión de expertos, los que emitieron criterios sobre su claridad, sensibilidad para posibles modificaciones, factibilidad de recoger datos, la presencia de componentes claramente definidos y suposiciones básicas justificables e intuitivamente razonables. Una vez que se efectuaron las modificaciones pertinentes se procedió a su aplicación a una muestra de la familia de 15 niños de círculos infantiles no incluidos en la población objetivo para valorar la comprensión de los ítems. En la casa de cada niño, se encuestó a la familia, preferiblemente madres o abuelas, y se completó una ficha familiar de saneamiento (Anexo 4). Las encuestas fueron llenadas activamente por dos miembros del equipo de investigadores, los que también aplicaron técnicas de observación en el terreno para corroborar los datos obtenidos en los encuestados.

### **III.3. Obtención de los aislamientos de *Giardia lamblia* en niños con diferentes comportamientos clínico-epidemiológicos y su cultivo axénico.**

Con el objetivo de obtener una colección de aislamientos para realizar la caracterización biológica y molecular al final del estudio longitudinal, se realizó el aislamiento de los parásitos mediante la desenquistación con la utilización del jerbillo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) como modelo animal, siguiendo la metodología descrita por Wallis y Wallis (1986). Los roedores fueron infectados con cantidades entre 1 y  $2 \times 10^5$  quistes/animal y como medio de cultivo se utilizó el de TYI-S-33 suplementado con bilis (Keister, 1983) (Anexo 5). Se logró el aislamiento y el cultivo axénico del parásito en 17 casos. Después de lograr el cultivo axénico los aislamientos fueron criopreservados en dimetil sulfoxido (DMSO) al 10 % en agua destilada, y mantenidos en nitrógeno líquido (Diamond, 1995) hasta su estudio posterior (Anexo 5).

Los aislamientos fueron nombrados como C y número de acuerdo con los intentos de obtención. Todos fueron obtenidos de los niños en el estudio longitudinal desarrollado previamente en los 3 círculos infantiles de Ciudad de La Habana. Se tomaron algunas características clínicas y epidemiológicas en los pacientes de los que procedían los aislamientos (Anexo 6).

### **III.4. Caracterización biológica de aislamientos en jerbillos (*Meriones unguiculatus*).**

Con el objetivo de conocer el comportamiento biológico de algunos de los aislamientos y correlacionarlo con los hallazgos clínicos y epidemiológicos previos, desarrollamos un estudio para caracterizar la infección en jerbillos de Mongolia (*M. unguiculatus*) como modelo experimental. Los animales usados en los experimentos fueron ejemplares machos aparentemente sanos, de 6 a 10 semanas de nacido, obtenidos en el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) en La Habana, Cuba. Para asegurarse de que los animales estuvieran libres de toda infección por protozoos, fueron tratados por vía oral con 60 mg de metronidazol 10 días antes del experimento y fueron chequeados por el

método de centrifugación con formalina-éter (García y Bruckner, 1993). Ellos fueron colocados en cajas individuales con alimentos y agua suministrados *ad libitum*.

Para la cuantificación de los quistes eliminados los animales fueron colocados en cajas limpias individuales por 2 horas para recolectar las heces y procesarlas en búsqueda de quistes de *G. lamblia* por la técnica de flotación con sacarosa (Belosevic y Faubert, 1983). El número de quistes/g de heces eliminados por cada animal, fue calculado diariamente por conteo en cámara de Newbauer durante todos los días que duró el experimento.

Se escogieron siete aislamientos de trofozoitos de *G. lamblia*, los que fueron seleccionados de acuerdo a las características clínicas y epidemiológicas registradas en los niños en los cuales se aislaron. Todos estos aislamientos habían sido criopreservados previamente en dimetil sulfóxido al 10 %. Los tubos con los parásitos criopreservados fueron descongelados y se realizó sólo un pase de los cultivos axénicos para impedir selección artificial *in vitro* (Andrews *et al.*, 1992). De los 7 aislamientos que se usaron para este experimento, dos procedían de niños que fueron siempre positivos (++++), otro de un niño que fue positivo 3 veces (+++), otros tres de niños que fueron positivos dos veces (++) y uno había sido positivo sólo una vez (+).

El experimento fue diseñado para estudiar los patrones de infección en los jerbillos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) inoculados con 7 aislamientos humanos de *Giardia*. Para ello se seleccionaron siete grupos de jerbillos (10-15 machos en cada grupo) de 6 a 10 semanas de edad, más 3 animales como controles por cada grupo. Los jerbillos recibieron por vía oral una dosis de  $2 \times 10^6$  trofozoitos en 0,3 ml de solución tampón.

Los animales fueron monitoreados diariamente para conocer y contabilizar la presencia de quistes en sus heces desde el primer día posterior de la infección (PI) hasta una semana después del último día en que fueron encontrados negativos. Todos los jerbillos fueron sacrificados después del día 40 PI, y los primeros 10 cm. del intestino delgado fueron examinados en búsqueda de trofozoitos por raspado.



### **III.5. Caracterización del polimorfismo genético de 17 aislamientos de *Giardia lamblia*.**

#### **III.5.1. Origen y caracterización de los aislamientos de *G. lamblia*.**

Para el presente estudio se usaron los diecisiete aislamientos de *G. lamblia* que habían sido recolectados en niños de círculos infantiles; ocho de ellos fueron obtenidos de niños sintomáticos que habían sido positivos para la infección por *G. lamblia* en 3 ó 4 cortes transversales (+++ ó ++++), cuatro fueron obtenidos de niños asintomáticos que se infectaron en dos cortes transversales (++) , y otros cinco se aislaron de niños asintomáticos que se encontraron infectados por *G. lamblia* en sólo un corte transversal (+). Los tubos con los aislamientos previamente criopreservados fueron descongelados y los parásitos mantenidos en el medio de cultivo axénico TYI-S-33 (Keister, 1983).

#### **III.5.2. Extracción del ADN.**

Para la extracción del ADN se utilizó la metodología establecida previamente (Deng y Cliver, 1999). Los trofozoitos de *G. lamblia* obtenidos tan pronto se obtuvo el cultivo en fase exponencial del crecimiento, con una cantidad de aproximadamente  $2 \times 10^6$ , fueron lavados en solución tampón. Después fueron centrifugados a 8000 g por 10 min a 4 °C. El sedimento fue resuspendido en 300 µL de solución tampón de lisis (tris-HCl 20mM, pH 8,25; EDTA 25 mM, NaCl 25 mM, SDS al 1%) y esa suspensión fue incubada con 100 µg/mL de proteinasa K (Boehringer Mannheim, Germany) por 2 h a 56°C. Los ácidos nucleicos fueron extraídos con igual volumen de una mezcla de fenolcloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1) y con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) con sus respectivas centrifugaciones a 8000 g por 10 min a 4 °C. El ADN fue precipitado al añadir dos volúmenes de etanol absoluto conteniendo acetato de sodio 3 M y colocado a -20°C por 30 min. El ADN genómico precipitado fue centrifugado a 10 000 g por 20 min. El sedimento de ADN fue lavado en etanol al 70%. Después de secado al aire, el ADN fue disuelto en 50 µL de tampón TE (tris-HCl 1 mM, pH 8,0; EDTA 1mM, pH 8,0). El ARN remanente fue eliminado con ARNasa H (Boehringer Mannheim, Germany) y la suspensión fue incubada

por 1 hora a 37°C. Después se realizó la extracción con igual volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), la fase acuosa fue conservada a -20°C.

La concentración del ADN fue estimada por espectrofotometría al leer la absorbancia a 260 nm y la pureza de la muestra fue examinada por electroforesis con gel de agarosa al 0,8 % en solución tampón TBE 0,5X (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1mM; pH 8,3) conteniendo bromuro de etidio (Sigma) a 0,5 mg/mL. Finalmente se realizó la visualización usando un transiluminador UV (Macrovue 2011, LKB).

### **III.5.3. Cebadores.**

Para el diseño y confección de los cebadores se tuvo en cuenta que tuvieran un contenido de G y C mayor al 60 % y que sus secuencias no fueran palíndromas. Los 7 cebadores oligonucleótidos usados en la técnica de RAPD fueron diseñados en nuestro laboratorio y sintetizados por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Ciudad de La Habana, Cuba). Sus secuencias fueron las siguientes:

GI-1 (5'-CAGCTCAACGAG-3')

GI-2 (5'-ACGACGGCCAGT-3')

GI-3 (5'-GAAGGGCACGTG-3')

GI-4 (5'-GTCGATGAGCTG-3')

GI-5 (5'-GGGCGGCCTAAG-3')

GI-6 (5'-GTAGCTGCTCCA-3')

GI-7 (5'-GTCAAGGAGGAG-3')

#### **III.5.4. Análisis del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).**

Los reactivos para el RAPD y sus concentraciones fueron optimizados en experimentos previos en los que se probaron diferentes concentraciones de cebador sintético, del molde de ADN y de Taq ADN polimerasa, a la vez que se mantenía constante la cantidad de mezcla de dNTPs, el tampón de amplificación y las condiciones en el termociclador. La amplificación del ADN fue desarrollada en un volumen final de 25  $\mu$ L conteniendo 2,5  $\mu$ L de tampón de la RCP (10x) (tris-HCl 100mM pH 8,3; MgCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 500mM, gelatina al 0,01%) (Boehringer Mannheim, Germany), 200  $\mu$ M de cada uno de los dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) (Boehringer Mannheim, Germany), 25 pmol del cebador oligonucleótido, 2,5 U de Taq ADN polimerasa (Boehringer Mannheim, Germany) y 10 ng del molde de ADN. Por cada uno de los 7 cebadores se usaron controles negativos, que contenían todos los componentes mencionados previamente, excepto el molde de ADN que fue sustituido por agua bidestilada estéril. El perfil de amplificación fue ajustado en el termo-ciclador (Perking-Elmer Cetus) y consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 40 repeticiones de 1 min a 94°C para la desnaturalización, 1 min a 35 °C para la hibridación y 2 min a 72 °C para la extensión. En el ciclo final; el paso de extensión fue de 15 min. Los productos de la RCP fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en solución tampón TBE conteniendo bromuro de etidio (SIGMA) a 0,5 mg/mL. Finalmente, fueron visualizados bajo iluminación de luz ultravioleta en un transiluminador UV. Las reacciones del RAPD fueron realizadas al menos, 3 veces por cada cebador en días diferentes, para verificar la reproducibilidad de la técnica (Deng y Cliver, 1999).

#### **III.5.5. Análisis del polimorfismo genético.**

Las bandas individuales fueron registradas como presentes o ausentes (1 ó 0) para cada aislamiento y el inverso del coeficiente de similitud de Jacard ( $S_j$ , modificado por Sneath, 1957) fue usado como sigue:  $S_j = 1 - a / (a + b + c)$  donde  $a$  representa el número de bandas

compartidas,  $b$  representa el número de bandas presentes y  $c$  representa el número de bandas ausentes.

Los dendogramas y la matriz de distancia fueron generados usando como criterio de agregación el método de agrupamiento por grupos pares con medias no ponderadas (método UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973), usando el paquete de programas SYNTAX versión 5.0 (Ponadi, 1993).

### **III.6. Análisis estadístico.**

Los datos fueron almacenados y procesados en el paquete de programas EPIINFO. Los análisis estadísticos fueron realizados usando pruebas de proporciones para comparar los porcentajes; sin embargo, la prueba exacta de Fisher fue usada para comparar los porcentajes cuando el número de casos analizados fue escaso. Se crearon tablas de contingencia con el fin de hacer el análisis de regresión logística para cada uno de los síntomas, teniendo como referencia el grupo de niños que nunca se infectó, el que fue comparado con cada uno de los demás grupos. Para la comparación entre los casos y los controles se empleó también el cálculo de la oportunidad relativa (Martín-Moreno y Banegas, 1997) o razón de los productos cruzados (OR). En las variables cuantitativas se determinaron los parámetros estadísticos descriptivos para cada variable (valor máximo, mínimo, media, error estándar de la media y desviación estándar (DE). Para cada una de las variables se expresó su valor como la media  $\pm$  DE. Después fue usado el ensayo de normalidad descrito por Shapiro-Wilk (Bryman, 2001).

Para comparar las medias entre dos grupos se empleó la prueba no paramétrica de Mann Whitney. En el experimento de infección con jerbillos se calcularon las medias y los errores estándares de la media de los quistes eliminados diariamente para cada grupo de animales infectados; para comparar esas medias entre dos grupos se usó la prueba de Mann Whitney. En cambio, cuando se compararon las medias entre tres o más grupos se utilizaron las pruebas de Kruskal Wallis y Newman Keuls. En todos los casos las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de  $P$  fue menor que 0,05. Todos los análisis fueron desarrollados empleando los paquetes de programas para análisis estadísticos *GraphPad Prism* versión 3.03 para *Windows* (Motulsky, 1999), *SPSS* versión 10.0.1 para *Windows* (Bryman, 2001) y *EPIINFO*, versión 6.04 (Dean *et al.*, 1994).

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS

### IV.1. Estudio longitudinal en tres círculos infantiles de la Ciudad de La Habana.

En la tabla 2 se muestra la distribución por sexo, y edad de los 365 niños que completaron el estudio. No se encontraron diferencias en la distribución por sexos (Prueba de comparación de proporciones,  $P=0,064230$ ) ni en la distribución por grupos de edad (Prueba de comparación de proporciones,  $P=0,211274$ ) en esta población. Es de destacar que en este estudio todos los niños se encontraron bien nutridos en la valoración antropométrica nutricional, de acuerdo con las tablas nacionales de crecimiento y desarrollo (Jordán, 1988).

Tabla 2. Distribución por sexo y edad de los niños al final del periodo de estudio

	Sexo		Edad (años)			
	Masculino	Femenino	1	2	3	4
No.	195	170	77	94	101	93
(%)	(53,4)	(46,6)	(21,1)	(25,7)	(27,7)	(25,5)

(n=365)

De acuerdo con la tabla 3, *G. lamblia* fue el parásito más frecuentemente encontrado. Muy pocos niños se detectaron infectados por otros parásitos con las técnicas parasitológicas empleadas en esta investigación.

Tabla 3. Tasas de prevalencia de las diferentes especies de parásitos y comensales en los niños de los círculos infantiles.

Especies	Cortes transversales (meses)			
	0	6	12	18
	No. ( % )	No. ( % )	No. ( % )	No. ( % )
<b>Protozoos</b>				
<i>Giardia lamblia</i>	79 (21,6)	75 (20,5)	83 (22,7)	73 (20,0)
<i>Entamoeba histolytica/E. dispar</i>	7 ( 1,9)	3 ( 0,8)	2 ( 0,5)	0 ( 0 )
<i>Entamoeba coli</i> *	6 ( 1,6)	5 ( 1,4)	5 ( 1,4)	4 ( 1,1)
<i>Endolimax nana</i> *	28 ( 7,7)	23 ( 6,3)	21 ( 5,7)	20 ( 5,5)
<i>Chilomastix mesnili</i> *	2 ( 0,5)	1 ( 0,3)	0 ( 0 )	0 ( 0 )
<i>Blastocystis hominis</i> †	38 (10,4)	36 ( 9,9)	11 ( 3,0)	8 ( 2,2)
<b>Helmintos</b>				
<i>Trichuris trichiura</i>	3 ( 0,8)	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2 ( 0,5)	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )
<i>Enterobius vermicularis</i>	6 ( 1,6)	5 ( 1,4)	5 ( 1,4)	3 ( 0,8)

(n=365)

\* Comensales. † Protozoo de patogenicidad controversial.

De acuerdo con la cinética de la infección por *G. lamblia* recogida en nuestra población estudiada, podemos separar claramente los niños en tres grupos principales (Tabla 4).

Tabla 4. Positividad de los exámenes de heces en cada corte transversal durante el período de observación de 18 meses.

Resultado de cada corte transversal				Niños	
Meses				No.	( % )
0	6	12	18		
-	-	-	-	187	(51,2)
+	-	-	-	27	(7,3)
-	+	-	-	25	(6,8)
-	-	+	-	17	(4,6)
-	-	-	+	18	(4,9)
+	+	-	-	11	(3,0)
-	+	+	-	11	(3,0)
+	-	+	-	5	(1,3)
-	+	-	+	5	(1,3)
+	-	-	+	7	(1,9)
-	-	+	+	18	(4,9)
+	-	+	+	11	(3,0)
+	+	+	-	9	(2,4)
-	+	+	+	5	(1,3)
+	+	-	+	2	(0,5)
+	+	+	+	7	(1,9)

(n=365)

+ Positivo a trofozoitos o quistes de *Giardia lamblia* en al menos una muestra de heces en cada corte.

- Negativo en todas las muestras que se hicieron para ese corte.



El grupo mayor estuvo formado por los niños que nunca fueron encontrados infectados (51,2 %). En un segundo grupo la infección por *G. lamblia* fue detectada en sólo un corte transversal (23,8 %), en un tercer grupo la infección se diagnosticó en dos de los exámenes semestrales (15,6 %), y en el cuarto, que fue el grupo más pequeño, se encontraron sólo 34 niños infectados en tres o cuatro periodos de estudio (9,3 %).

La población de estudio estuvo constituida por niños aparentemente sanos que asistían regularmente a los círculos infantiles. La única manifestación clínica registrada en los últimos 6 meses de todo el estudio longitudinal (tabla 5) y que mostró una fuerte relación con el número de veces en que se encontraron los niños infectados por *Giardia* fue la diarrea, pues la probabilidad de presentar diarreas fue significativamente mayor en el grupo de niños que se infectaron 3 o más cortes transversales, que en los que se mantuvieron negativos a lo largo de todo el estudio longitudinal (OR=9,26; IC=2,83-30,80) ( $P=0,000002$ ).

Tabla 5. Frecuencia de los síntomas registrados en los últimos 6 meses en los niños con giardiasis y su relación con el número de cortes transversales positivos a *Giardia lamblia*

Cortes transversales positivos a <i>Giardia Lamblia</i>	Manifestaciones Clínicas								
	Reacción Alérgica *			Dolor Abdominal			Diarreas		
	No. ( % )	OR ( IC 95%)	Valor de P	No. ( % )	OR ( IC 95%)	Valor de P	No. ( % )	OR ( IC 95%)	Valor de P
<b>Ninguno</b> (n=187)	11 ( 5,8)	Grupo de Referencia		2 (1,0)	Grupo de Referencia		7 ( 3,7)	Grupo de Referencia	
<b>Uno</b> (n=87)	4 ( 4,6)	2,18 ( 0,53-7,93)	P=0,18	0 ( 0 )	0 ( 0-8,81)	P=0,46	7 ( 8,0)	2,25 (0,68-7,43)	P=0,13214
<b>Dos</b> (n=57)	5 ( 8,7)	1,54 ( 0,44-5,09)	P=0,44	2 ( 3,5)	3,36 (0,33-34,35)	P=0,23	6 (10,5)	3,03 (0,85-10,06)	P=0,05
<b>Tres ó Cuatro</b> (n=34)	4 (11,7)	0,77 ( 0,20-2,72)	P=0,45	2 ( 5,8)	5,78 (0,56-60,16)	P=0,11	9 (26,5)	9,26 (2,83-30,8)	P=0,000002 †

\* Urticaria o rinitis alérgica † Diferencia significativa al comparar este grupo con el de referencia.

Durante el período de estudio la tasa de prevalencia de la giardiasis permaneció constante a través del todo el estudio, casi un 20 % ( $P=0,809355$ ). La incidencia disminuyó del segundo (17%) al tercer corte (11%) (Prueba de comparación de proporciones,  $P=0,034177$ ), mientras que la tasa de reinfección se mantuvo estable (Prueba de comparación de proporciones,  $P=0,263899$ ) (Tabla 6).

Tabla 6. Tasas de incidencia, prevalencia, y reinfección por *Giardia* en cada corte transversal.

Periodo de Estudio (Meses)	TASAS DE					
	Incidencia ( % )		Prevalencia ( % )		Reinfección ( % )	
0	-----		79/365	(21,6)	-----	
6	46/286	(16,1)	75/365	(20,5)	29/79	(36,7)
12	51/290	(17,6)	83/365	(22,7)	32/75	(42,7)
18	32/282	(11,3)	73/365	(20,0)	41/83	(49,4)

#### IV.2. Factores de riesgo en niños con tendencia a la reinfección con *Giardia lamblia*. Estudio de casos y controles.

En la tabla 7, se muestran algunas de las principales características de los grupos de estudio, formado por 43 casos de niños re infectados con *G. lamblia* y el grupo de control compuesto por 76 niños, con una relación entre casos y controles igual a 1:1,8. En la tabla se demuestra que no hubo diferencias entre los porcentajes de niños estudiados en ambos grupos para cada uno de los tres círculos infantiles (Prueba de comparación de proporciones,  $P>0,05$ ); y en la distribución por sexos (Prueba de comparación de proporciones,  $P>0,05$ ). Además ambos grupos tuvieron similares intervalos de edad, y no se encontraron diferencias significativas en las medias de las edades entre ellos (Prueba de Mann Whitney,  $P>0,05$ ), lo que los hace comparables por su homogeneidad.

Tabla 7. Principales Características de los Grupos de Estudio.

Característica	Casos (n=43)		Controles (n=76)		Valor de P
	No.	( % )	No.	( % )	
<b>Círculos</b>					
Amiguitos de Polonia	18	(41,86)	29	(38,15)	$P=0,6914^*$
Barquito de Papel	18	(41,86)	33	(43,42)	$P=0,8687^*$
Amiguitos de Piong Yang	7	(16,27)	14	(18,42)	$P=0,7684^*$
<b>Sexo</b>					
Masculino	17	(39,53)	30	(39,47)	$P=0,9947^*$
Femenino	26	(60,46)	46	(60,52)	$P=0,9947^*$
<b>Edad (Años)</b>					
Intervalo	3-7		3-7		
Media ( $\pm$ DS)	4,53 ( $\pm$ 1,202)		4,83 ( $\pm$ 1,204)		$P=0,9947^\dagger$

\* Análisis de Proporciones.

† Prueba de Mann Whitney.

En la tabla 8 se compara el comportamiento de algunos indicadores socioeconómicos entre los casos y los controles. No se encontraron diferencias entre ambos grupos en la asociación con hacinamiento (OR=2,01; IC=0,87-4,63), el índice de personas por cama (OR=0,74; IC= 0,29-1,87), ni en la carencia de determinados equipos eléctricos como refrigerador (OR=3,66; 0,32-41,58), radio (OR=5,63; IC=0,57-55,85), televisor (OR=3,66; IC=0,32-41,58) y ventilador (OR=1,26; IC=0,58-2,73). Además no se encontraron diferencias en el nivel escolar de las madres entre ambos grupos (OR=1,39; IC=0,57-6,28), ni en el promedio del ingreso familiar per cápita entre ambos grupos (Prueba *U* de Mann Whitney,  $P>0,05$ ). Sin embargo, predominó una tasa mayor de padres con nivel escolar menor de 12 grado en los casos que en los controles (OR=2,55; IC=1,00-6,55).

Tabla 8. Factores Socioeconómicos estudiados en los casos y los controles.

Indicadores	Casos (n=43) No. ( % )	Grupo de Control (n=76) No. ( % )	OR ( IC )	Valor de P
<b>Hacinamiento</b>				
(Más de 2 personas por dormitorio)	15 (34,88)	16 (21,05)	2,01 (0,87-4,63)	P=0,098660
<b>Índice de personas por cama</b>				
(Más de 1 persona por cama)	8 (18,60)	18 (23,68)	0,74 (0,29-1,87)	P=0,519454
<b>Carencia de Equipos</b>				
Refrigerador	2 ( 4,65)	1 ( 1,31)	3,66 (0,32-41,58)	P=0,264856
Radio	3 ( 6,97)	1 ( 1,31)	5,63 (0,57-55,85)	P=0,099767
Televisor	2 ( 4,65)	1 ( 1,31)	3,66 (0,32-41,58)	P=0,264856
Ventilador (más de 1)	17 (39,53)	26 (34,25)	1,26 (0,58-2,73)	P=0,561363
<b>Escolaridad de la Madre</b>				
< 12 grado	6 (13,95)	6 ( 7,89)		
≥ 12 grado	37 (86,04)	70 (92,10)	1,89 (0,57-6,28)	P=0,291689
<b>Escolaridad del Padre</b>				
< 12 grado	12 (27,91)	10 (13,16)		
≥ 12 grado	31 (72,09)	66 (86,84)	2,55 (1,00-6,55) *	P=0,0464475
<b>Ingreso per cápita Familiar</b>				
(Pesos Cubanos)				
Media (±DS)	147,16 (±61,17)	127,80 (±52,66)		P=0,0820 †

**OR:** Razón de los productos cruzados.

**I.C.** Intervalo de Confianza con un 95% de confiabilidad.

\* Significativo.

† Prueba U de Mann Whitney.

En la tabla 9 se realiza la comparación entre los casos y los controles de la frecuencia con que fueron encontrados algunos malos hábitos higiénicos que pudieran favorecer la transmisión de la giardiasis. No se encontraron diferencias en la ausencia de lavado de manos antes de comer (OR=0,84; IC=0,36-1,97), y después de defecar (OR=0,96; IC=0,42-2,01) ( $P>0,05$ ), pero encontramos una mayor asociación de lavado incorrecto de vegetales en las familias de los niños re infectados que en los controles (OR=12,66; IC=1,41-104,76) ( $P<0,05$ ) y que no se hervía el agua de beber, con una frecuencia mayor en los casos que en los controles (OR=3,76; IC=1,70-8,30) ( $P<0,05$ ).

Tabla 9. Hábitos higiénicos estudiados en los casos y los controles.

Indicadores	Casos (n=43)		Grupo de Control (n=76)		OR ( I.C. )	Valor de P
	No.	( % )	No.	( % )		
Lavado de Manos						
antes de Comer						
Ausente	11	(25,58)	22	(28,94)	0,84 (0,36-1,97)	P=0,693566
Presente	32	(74,42)	54	(71,05)		
Lavado de Manos						
después de defecar						
Ausente	15	(34,88)	28	(36,84)	0,92 (0,42-2,01)	P=0,830832
Presente	28	(65,11)	48	(63,16)		
Lavado de Vegetales						
Incorrecto	6	(13,95)	1	( 1,31)	12,16 (1,41-104,76) †	P=0,004883
Correcto	37	(86,05)	75	(98,68)		
Hierva el Agua *						
NO	29	(67,44)	27	(35,52)	3,76 (1,70-8,30) †	P=0,000806
SI	14	(32,56)	49	(64,47)		

**OR:** Razón de los productos cruzados.

**I.C.** Intervalo de Confianza con un 95% de confiabilidad.

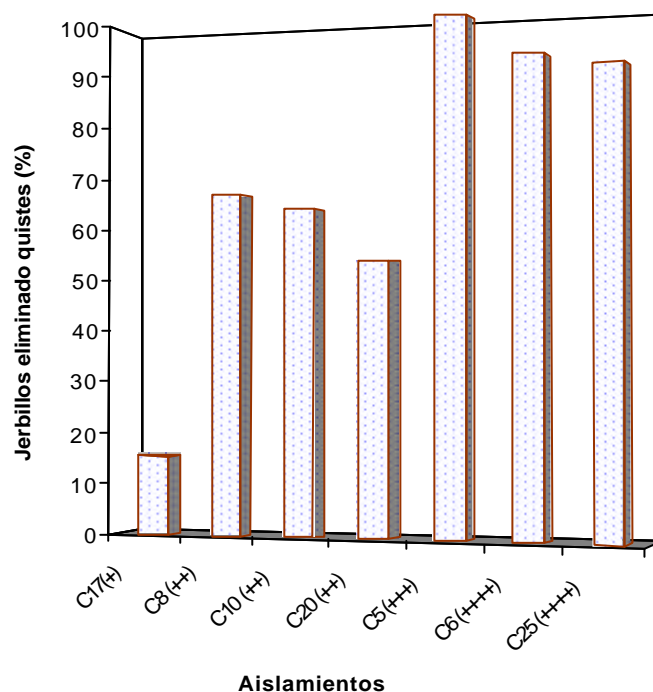
\* Se comprobó por las incrustaciones con sales de magnesia en el recipiente usualmente empleado para hervir.

† Significativo.

### IV.3. Caracterización biológica de varios aislamientos en jerbillos (*Meriones unguiculatus*).

Los jerbillos infectados con los 7 aislamientos tuvieron un periodo prepatente de 5-7 días, con un intervalo de eliminación intermitente de quistes en las heces, igual o mayor a un día, y el curso de la infección fue diferente entre los aislamientos.

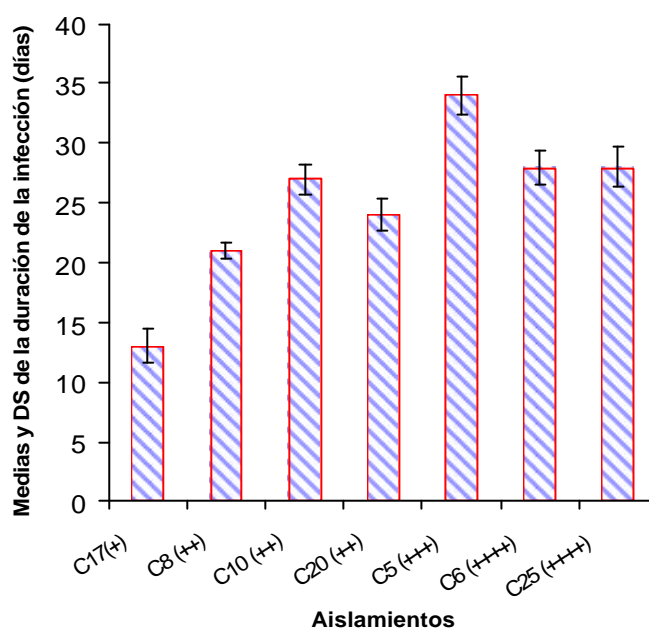
El grupo inoculado con el aislamiento C17 (+) mostró el más bajo porcentaje de jerbillos eliminando quistes (15,4 %) lo que difirió significativamente con el resto de los aislamientos ( $P<0,01$ ). No se encontraron diferencias estadísticas entre los aislamientos C8(++), C10(++), y C20(++), (66,6%, 63,6% y 53,3%, respectivamente,  $P>0,05$ ) pero ellos mostraron porcentajes significativamente menores que el resto ( $P<0,01$ ). El más alto porcentaje fue encontrado para los aislamientos C5(+++), C6(++++) y C25(++++) (100%, 92,3% y 90%, respectivamente) ( $P<0,01$ ), sin diferencias significativas entre ellos ( $P>0,05$ ) (Figura 2).



**Figura 2.** Porcentaje de jerbillos que eliminaron quistes en cada uno de los grupos inoculados con los aislamientos. Entre 10 y 15 animales fueron inoculados en cada grupo.

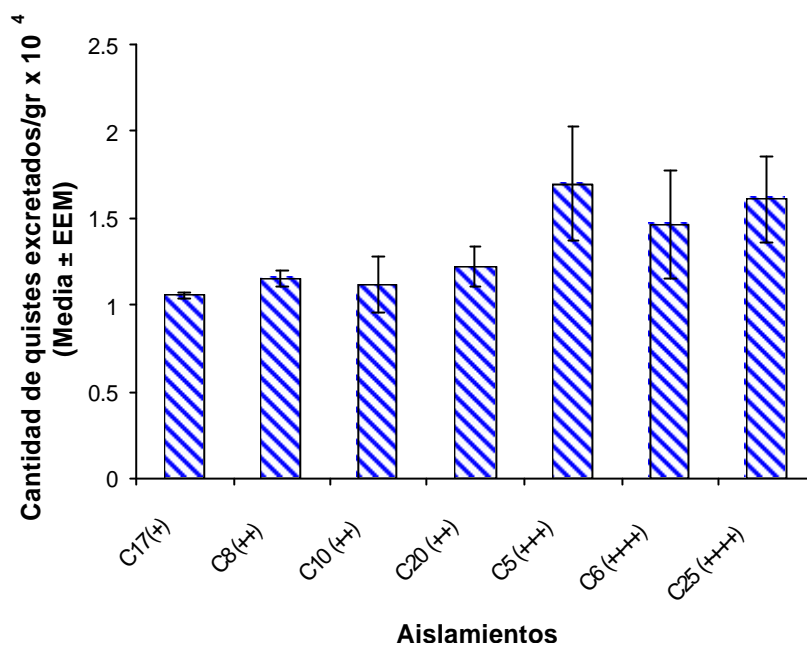


La duración de la infección fue diferente entre todos los aislamientos ( $P < 0,05$ ). Los jerbillos inoculados con el aislamiento C17(+) eliminaron quistes en sus heces hasta el día 13 PI. Los animales inoculados con el aislamiento C5(+++) se mantuvieron eliminando quistes hasta el día 34 PI. La eliminación de los quistes en los otros grupos se detuvo entre los días 21 y 28. No hubo diferencias en las medias aritméticas de los días de duración de la infección, entre los aislamientos C5(+++), C6(++++) y C25(++++) obtenidos de niños sintomáticos ( $P > 0,05$ ). Una similar duración fue encontrada también entre los aislamientos C8(++), C10(++) y C20(++) procedentes de niños asintomáticos ( $P > 0,05$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Media aritmética y desviación estándar de los días de duración de la infección para cada grupo de animales inoculados con los aislamientos.

Otra característica analizada fue la intensidad de la eliminación de quistes. No se encontraron diferencias estadísticas ( $P > 0,05$ ) en la media de los quistes/g de heces eliminados entre los grupos inoculados con los aislamientos C5(+++), C6(++++) y C25(+++). Una similar intensidad fue detectada también entre los aislamientos C17(+), C8(++), C10(++) y C20(++) ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, este último grupo tuvo un número menor de quistes cuando se comparó con el anterior ( $P < 0,01$ ) (Figura 4).



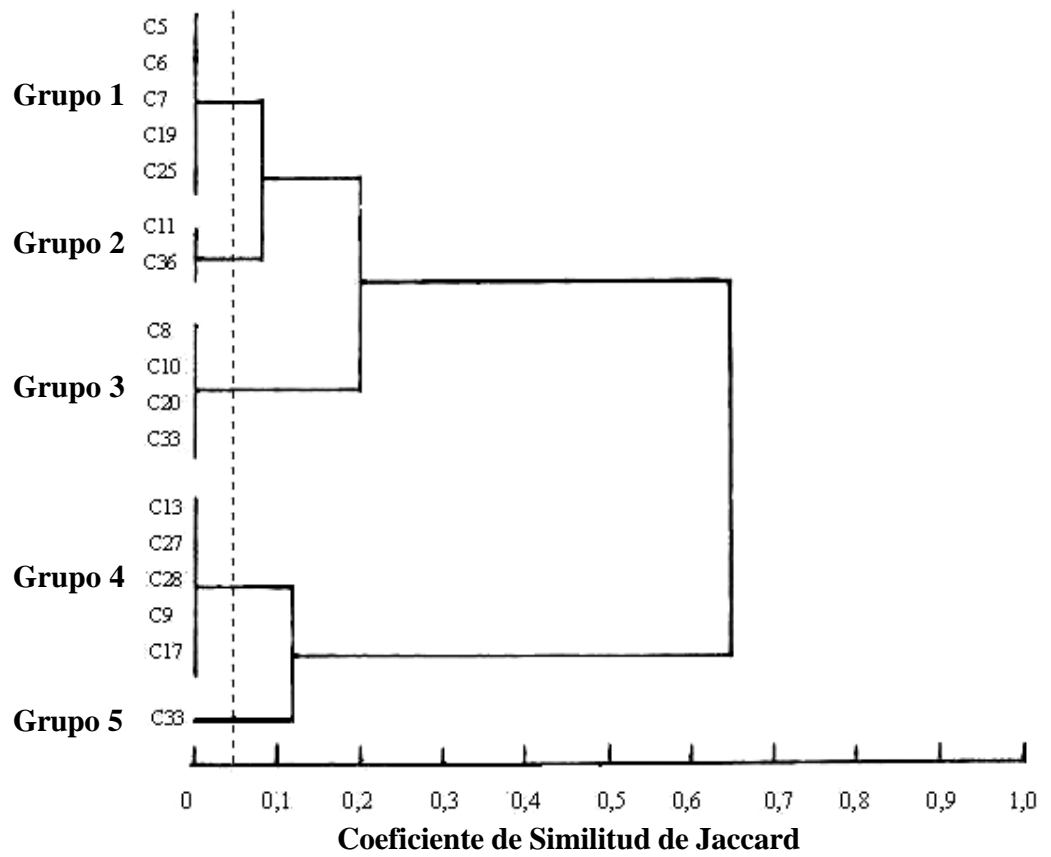
**Figura 4.** Media aritmética y error estándar de la media, del número de quistes eliminados por cada grupo de animales inoculados con los aislamientos.

Todos los jerbillos fueron sacrificados después del día 40 PI. En los grupos de animales infectados con los aislamientos C6(+++), C8(++), y C10(++), se encontraron respectivamente 4, 1, y 10 animales que tenían trofozoitos en el intestino delgado. Mientras que en los animales inoculados con el resto de los aislamientos, sólo se encontró uno, del grupo C25 (++++), con trofozoitos de *G. lamblia* a nivel del duodeno.

Ninguno de los animales del grupo de control se encontró infectado durante todo el experimento. Finalmente encontramos entre aquellos animales que nunca eliminaron quistes, dos que eran pertenecientes a los grupos de los aislamientos C8 (++) y C10 (++) , tenían trofozoitos en el intestino delgado cuando fueron sacrificados (40 días PI).

#### **IV.4. Caracterización del polimorfismo genético de 17 aislamientos de *Giardia lamblia*.**

La amplificación del ADN en los 17 aislamientos de *Giardia* con los 7 cebadores seleccionados al azar, produjo 52 bandas, 13 de las cuales fueron encontradas en los 17 aislamientos. De acuerdo a las escalas de distancias de Jaccard, los aislamientos se agruparon en 5 clases o grupos (*clusters*). El dendograma (Figura 5) muestra el agrupamiento de los 17 aislamientos de acuerdo a la distancia genética calculada entre ellos.



**Figura 5.** Dendrograma obtenido por el análisis de las bandas obtenidas en los perfiles de RAPD de los 17 aislamientos, los que quedaron congregados en 5 grupos. Línea discontinua: valor de corte.

La tabla 10 muestra los principales hallazgos clínicos y epidemiológicos encontrados en los niños de donde se obtuvieron esos aislamientos, los que se agrupan en la tabla de acuerdo a los resultados obtenidos por el análisis de los grupos genéticos y los resultados de los análisis de heces realizados cada 6 meses en el estudio longitudinal previo.

Como se observa en la tabla, de los 8 aislamientos obtenidos de niños sintomáticos que fueron positivos para la infección por *G. lamblia* en 3 ó 4 cortes transversales (+++ ó ++++) del estudio longitudinal, se encontraron 7 relacionados genéticamente entre sí, los que se agruparon en los grupos 1, y 2. Los 4 aislamientos obtenidos de niños asintomáticos que se infectaron en dos cortes trasversales (++) formaron el grupo 3, mientras que los 5 aislamientos obtenidos de los niños asintomáticos que se encontraron infectados por *G. lamblia* en sólo un corte transversal (+) formaron el grupo 4. Finalmente, el aislamiento C3, fue obtenido de un niño sintomático que se encontró infectado en los cuatro cortes transversales (++++), y se encontró aislado del resto para formar el grupo 5.

De acuerdo con los resultados de la tabla 10, se encontró una clara relación entre cada uno de los grupos genéticos con las características clínicas y epidemiológicas encontradas previamente en los niños de los que fueron obtenidos los aislamientos.

Tabla 10. Caracterización genética de los aislamientos de acuerdo con los hallazgos clínicos y epidemiológicos previos.

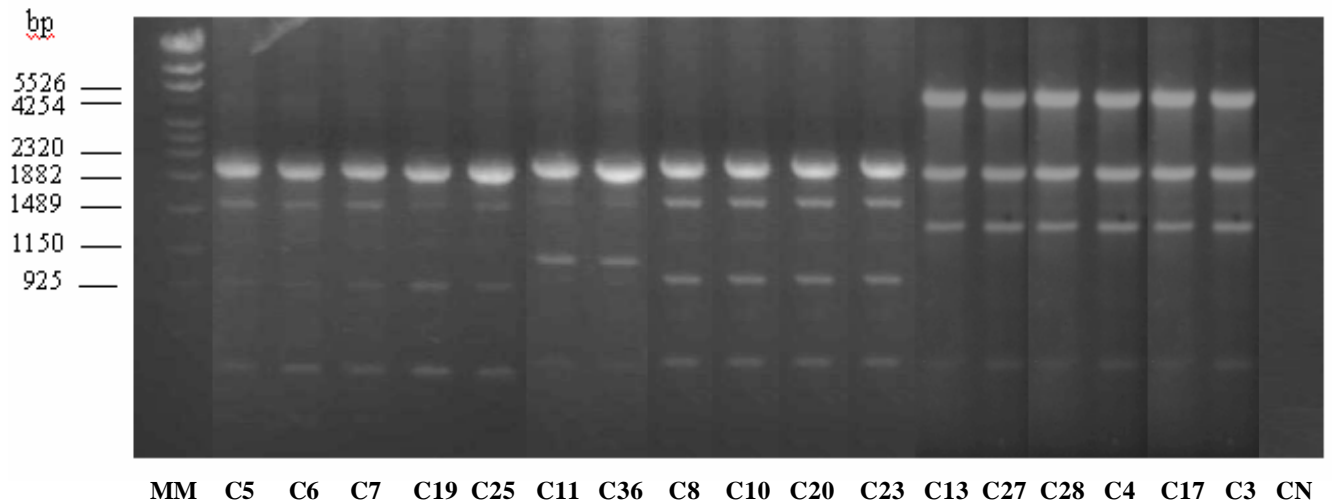
GRUPOS	Aislamientos	Resultados de la positividad a infección por <i>G. lamblia</i> en cada corte transversal				Hallazgos Clínicos
		Semestre				
		1ro.	2do.	3ro.	4to.	
GRUPO 1	C5	+	-	+	+	Diarrea
	C6	+	+	+	+	Diarrea
	C7	+	+	+	+	Diarrea
	C19	+	+	-	+	Diarrea
	C25	+	+	+	+	Trastornos alérgicos *
GRUPO 2	C11	+	+	-	+	Diarrea
	C36	+	+	-	+	Diarrea
GRUPO 3	C8	-	-	+	+	Asintomático
	C10	-	+	-	+	Asintomático
	C20	-	+	-	+	Asintomático
	C33	-	-	+	+	Asintomático
GRUPO 4	C13	-	-	+	-	Asintomático
	C27	-	-	-	+	Asintomático
	C28	-	-	-	+	Asintomático
	C4	-	-	+	-	Asintomático
	C17	-	-	-	+	ND
GRUPO 5	C3	+	+	+	+	Trastornos alérgicos *

**ND:** Datos no disponibles.

\* Episodios de urticaria.

Una buena reproducibilidad de los perfiles fue obtenida con los 7 cebadores; sin embargo, los cebadores G1-1 y G1-3 ilustraron mejor las diferencias y similitudes entre los 5 grupos genéticos obtenidos. La Figura 6 muestra las bandas obtenidas con el cebador G1-1. Una banda con el mismo peso molecular de 925 pb fue obtenida de los aislamientos C5, C6, C7, C19, y C25 del grupo 1 (+++ ó ++++), y otra banda de 1120 pb en los aislamientos C11 y C36 del grupo 2 (+++). En la misma figura una banda de 1023 pb es claramente vista en los

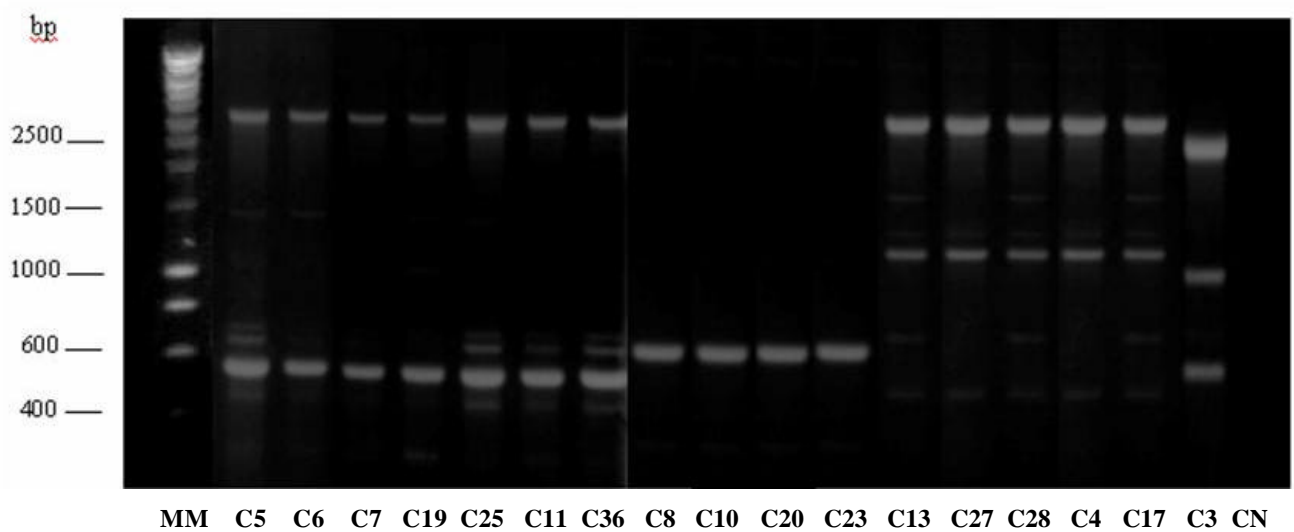
aislamientos C8, C10, C20, C33 del grupo 3 (++) , mientras que tres bandas de 4723, 1882, y 1319 pb están presentes en los aislamientos C13, C27, C28, C4 y C17 del grupo 4 (+) y el aislamiento C3 del grupo 5 (++++).



**Figura 6.** Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se muestran los patrones de RAPD obtenidos con el cebador GI-1 en los 17 aislamientos de *Giardia lamblia*. Los marcadores moleculares están situados en el extremo izquierdo. CN: Control Negativo.

La figura 7 muestra los productos de la RCP obtenidos con el cebador GI-3. Los aislamientos C5, C6, C7, C19 y C25 del grupo 1 (+++ ó ++++), mostraron claras bandas a 3025 y 520 pb. No se encontraron diferencias con este cebador entre los grupos 1 y 2 (+++), mostrando que ellos están genéticamente muy relacionados. Los aislamientos C8, C10, C20, y C33 del grupo 3 (++) mostraron sólo una banda de 600 pb. Los aislamientos C13, C27, C28, C4 y C17 del grupo 4 (+), mostraron bandas a 3025 y 1200 pb, mientras que el aislamiento C3 (++++) tuvo tres bandas de 2500, 900 y 520 pb.

Con el cebador GI-3, se encontró una mayor distancia genética entre los grupos 3 y 4 que con el anterior, demostrando con esta técnica que cada cebador puede mostrar diferentes resultados como una expresión del polimorfismo genético. Finalmente, una característica banda de menor peso molecular, con alrededor de 520 pb, se encontró sólo en todos los aislamientos patogénicos, obtenidos de niños sintomáticos reinfectados en tres o cuatro cortes transversales (+++ ó ++++), a pesar de la distancia genética entre ellos.



**Figura 7.** Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se muestran los patrones de RAPD obtenidos con el cebador GI-3 en los 17 aislamientos de *Giardia lamblia*. Los marcadores moleculares están situados en el extremo izquierdo. CN: Control Negativo.



## **CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL**

La giardiosis, constituye una parasitosis de gran importancia epidemiológica por su alta prevalencia, fundamentalmente entre la población infantil. Nuestros resultados confirman que este protozoo flagelado, constituye el parásito intestinal más frecuente en niños de círculos infantiles, en los que puede desarrollarse, tanto de forma endémica con frecuentes reinfecciones, o en forma epidémica si se producen brotes que afectan este tipo de comunidades cerradas. El ambiente en este tipo de instituciones es ideal para la transmisión, al existir una cantidad de huéspedes susceptibles, concentrados en un área donde es difícil mantener las condiciones adecuadas de higiene (Thompson, 2000; Guimarães y Sogayar, 2002; Miller *et al.*, 2003).

En este estudio desarrollado en tres círculos infantiles de Ciudad de La Habana, la posibilidad de fallas en la detección de otras infecciones por parásitos intestinales fue baja, sobre todo si se tiene en cuenta que analizamos, con técnicas de concentración, las heces de los niños un total de 12 veces durante los 18 meses del estudio. Algunos niños infectados con otros protozoos o comensales y muy pocos infectados con helmintos fueron menos frecuentemente diagnosticados con las técnicas parasitológicas que empleamos; lo que demuestra que en niños de círculos infantiles la frecuencia de infección por *G. lamblia* es superior al resto de los parásitos intestinales (Gómez *et al.*, 1999; Suárez *et al.*, 1999; Mendoza *et al.*, 2001).

La mayoría de los estudios longitudinales previos sobre giardiasis se han desarrollado con los objetivos principales de estudiar la prevalencia y la reinfección (Mason y Patterson, 1987; Rauch *et al.*, 1990; Chunge *et al.*, 1992; Newman *et al.*, 2001). Sin embargo, ellos no han identificado claramente todos los posibles patrones de infección en la población estudiada, ni la contribución relativa de la incidencia y la reinfección en la prevalencia de la giardiasis. Esto pudiera deberse al hecho que se estudiaron comunidades con muy altas tasas de prevalencia (Gilman *et al.*, 1988; Sullivan *et al.*, 1988), a que no se examinaron a los niños regularmente

durante el periodo de estudio, a cambios en el personal que atendían estos círculos infantiles, o un inadecuado cumplimiento de los protocolos de investigación.

En nuestra investigación la mitad de los niños se encontraron siempre libres de infección por *G. lamblia*, a través de todo el estudio longitudinal. Es bien conocido que el diagnóstico parasitológico de la infección por *Giardia* en las heces puede dar resultados negativos, particularmente si se tiene en cuenta que la eliminación de los quistes de *G. lamblia* es intermitente (Heymans *et al.*, 1987; Mank y Zaat, 2001). Por tanto, seguimos el criterio de otros investigadores que han recomendado un diagnóstico más certero y adecuado mediante el examen, de al menos, tres muestras recogidas en días diferentes durante una semana (Adam, 1991; Torres *et al.*, 1991; Mank y Zaat, 2001).

Una pequeña fracción de los niños estudiados se encontraron infectados en tres (7%) o cuatro (2%) períodos de estudio, a pesar del tratamiento impuesto en cada corte transversal cada vez que se detectaron positivos a la infección por *G. lamblia*. Este último grupo de niños fue obviamente más infectado con *G. lamblia* que el resto de los niños, con una mayor propensión a desarrollar síntomas clínicos como las diarreas. Este patrón de infección se asemeja al descrito en la predisposición de los niños a las helmintiasis intestinales (Anderson, 1986; Haswell-Elkins *et al.*, 1987).

La predisposición de los seres humanos a las infecciones helmínticas intestinales ha sido bien descrita en diferentes trabajos (Anderson, 1986; Haswell-Elkins *et al.*, 1987; Morales *et al.*, 1999). Estos autores señalan que en las comunidades humanas existen unos pocos individuos que albergan las cargas helmínticas más elevadas, por lo que constituyen un grupo de suma importancia debido a su papel como contaminadores del ambiente. Estos individuos los definen tres características fundamentales: constituyen una pequeña fracción dentro de la población estudiada, son los máximos exponentes de la morbilidad en la comunidad, y se reinfectan después de tratamiento, alcanzando otra vez una alta carga parasitaria (Anderson, 1986; Haswell-Elkins *et al.*, 1987; Morales *et al.*, 1999). Nosotros hemos demostrado que en las infecciones por *G. lamblia* en niños de círculos infantiles existe un grupo de individuos en los que parecen cumplirse todos estos postulados, excepto el último en su extensión, debido a la

imposibilidad de conocer los niveles de intensidad de la parasitosis en las infecciones intestinales humanas por protozoos. La identificación definitiva de los niños con predisposición a la giardiasis sólo pudiera ser posible si contáramos con procedimientos diagnósticos, capaces de cuantificar con certeza la carga o la intensidad de la infección por *G. lamblia* en humanos; sin embargo, esto ha sido imposible hasta ahora.

La única manifestación clínica asociada con una mayor tendencia a la reinfección con *G. lamblia* fue una alta frecuencia de episodios de diarreas registrados durante los últimos 6 meses del período de estudio, lo que demuestra que este es uno de los principales síntomas asociados con esta parasitosis (Ortega y Adam, 1997; Procop, 2001). Por otra parte, nos llama la atención la más fuerte asociación con las diarreas en aquellos niños, en los que se demostró la infección en un mayor número de cortes transversales, lo que no encontramos en la literatura revisada.

La prevalencia de giardiasis permaneció casi al mismo nivel a través del periodo de estudio, a pesar del tratamiento de todos los niños infectados en cada corte transversal, la incidencia disminuyó y la tasa de reinfección se mantuvo casi estable. Es bien conocido que la prevalencia de la giardiasis alcanza los valores máximos entre los 2 y los 3 años de edad, para descender después (Ali y Hill, 2003). Estos resultados sugieren, que en la prevalencia de la infección por *G. lamblia* en los CI, los niños con una mayor tendencia a la reinfección con este protozoo desempeñan un importante papel para perpetuar la infección y mantener la prevalencia a través del estudio.

Existen varias interrogantes con respecto a los determinantes de susceptibilidad que necesitan ser respondidas. Una de las más importantes es conocer si determinados factores ambientales o del huésped, y hasta el propio parásito están involucrados en la génesis de este fenómeno.

Teniendo en cuenta la importancia de conocer los factores ambientales que estuvieran relacionados con esto, decidimos estudiar algunos de ellos, tanto en los niños reinfectados como en sus controles, y encontramos similares condiciones socioeconómicas entre ambos grupos, excepto en el nivel escolar de los padres. En otro estudio previo de parasitismo intestinal, donde se encontró a *G. lamblia* como el parásito más frecuente entre los niños parasitados, no se

encontró una relación precisa con algunos indicadores socioeconómicos como el ingreso familiar quincenal, número de habitantes en la vivienda y ausencia de artículos básicos para la familia (Rodríguez-Guzmán *et al.*, 2000). Sin embargo, otros autores han encontrado algunas de estas variables asociadas a la infección por *G. lamblia* tanto en población total (Norhayati *et al.*, 1998), como en niños de círculos infantiles (Novotny *et al.*, 1990). En otras investigaciones se ha demostrado el efecto del manejo del agua de consumo y de algunas medidas higiénicas sobre la transmisión de otras enfermedades de transmisión digestiva (Wright *et al.*, 1991).

Es de destacar que aunque se encontró una mayor asociación de niveles inferiores a 12 grado en los padres de los casos que en los de los controles, no ocurrió lo mismo al analizar el nivel cultural de la madre entre ambos grupos. En reportes previos se ha planteado que el nivel educacional de la madre influye en la inducción de prácticas higiénicas correctas en sus hijos (Esrey y Habicht, 1988; Curtale *et al.*, 1998), lo que produce más bajos niveles de infección por parásitos intestinales (Esrey y Habicht, 1988; De Silva *et al.*, 1996; Curtale *et al.*, 1998); sin embargo, esto último no ha sido tan consistentemente señalado para el caso de los padres en la literatura.

En algunos estudios no se ha demostrado el papel de la madre (Curtale *et al.*, 1999; Norhayati *et al.*, 1998; Rodríguez-Guzmán *et al.*, 2000) y al menos en un estudio realizado en México, también se encontró una relación precisa del parasitismo intestinal, con el antecedente de escolaridad menor de secundaria del padre, lo que no ocurrió al analizar el nivel escolar de la madre (Rodríguez-Guzmán *et al.*, 2000). Algunas investigaciones desarrolladas en Europa y en los Estados Unidos han demostrado que los padres tienen significativas influencias directas o indirectas sobre sus hijos desde edades muy tempranas, y que las mismas son independientes de las de las madres (Pruett, 1988). Todo esto nos lleva a sugerir que el papel del padre en la educación familiar debería ser mejor valorado debido a la posición diferente que pudiera ocupar en determinados contextos socioeconómicos y culturales.

Al analizar el comportamiento de determinados malos hábitos higiénicos, tanto en los casos como en los controles, no encontramos diferencias entre los mismos con respecto a la ausencia del lavado de las manos antes de comer y después de defecar referido. En cambio, se encontró una mayor tasa de familias que no hervían el agua de beber, ni lavaban correctamente los vegetales en los casos que en los controles. Otros estudios sobre parasitismo intestinal han encontrado resultados similares, demostrando la asociación de éstos malos hábitos con el parasitismo intestinal (Curtale *et al.*, 1999; Rodríguez-Guzmán *et al.*, 2000) y la giardiasis (Esrey *et al.*, 1989; Dennis *et al.*, 1993; Norhayati *et al.*, 1998; Rose y Slifko, 1999; Hoque *et al.*, 2002; Hoque *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2003; Cifuentes *et al.*, 2004). El procedimiento de verificar la formación de incrustaciones de sales de magnesio en el recipiente de hervir el agua para comprobar si se hervía el agua de beber, demostró ser eficaz y objetivo para comprobar este hábito, lo que nos hace proponerlo para otros estudios epidemiológicos.

En otros estudios sobre factores de riesgo para la giardiasis (Dennis *et al.*, 1993; Norhayati *et al.*, 1998; Rose y Slifko, 1999; Hoque *et al.*, 2002; Hoque *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2003; Cifuentes *et al.*, 2004), sólo se ha tenido en cuenta para el criterio de selección de los casos, la existencia de infección reciente por *G. lamblia*. Sin embargo, nosotros seleccionamos como casos, sólo aquellos niños, que tenían una mayor tendencia a la reinfección. Por otra parte, a diferencia de trabajos previos, seleccionamos como controles sólo aquellos niños que se encontraron negativos a la infección por *G. lamblia* en los cuatro cortes transversales.

Estos resultados corroboran el importante papel que puede tener el agua como vehículo de transmisión en la giardiasis y explica la importancia de algunos factores epidemiológicos involucrados en el fenómeno de la reinfección a la giardiasis. Sin embargo, pensamos que otros estudios dirigidos a conocer aspectos íntimos de la relación huésped-parásito serán necesarios para una comprensión más completa de la génesis de este fenómeno en niños que asisten a CI.

Después de realizados los aislamientos de *G. lamblia*, desarrollamos la caracterización biológica de 7 de ellos, los que fueron obtenidos de niños con diferentes patrones clínicos y epidemiológicos para conocer si existía alguna relación entre éstos y el comportamiento de la infección en jerbillos como modelo experimental. El periodo prepatente obtenido en los grupos de animales inoculados fue similar al descrito por otros autores usando aislamientos humanos en este modelo animal (Faubert *et al.*, 1983; Belosevic *et al.*, 1984; Lewis *et al.*, 1987), lo que indica que este modo intermitente de eliminación de los quistes es característico del parásito (Faubert *et al.*, 1983).

Nosotros observamos que en los humanos y en los jerbillos los patrones de infección mostraron similares características, puesto que los animales inoculados con los aislamientos de *G. lamblia*, obtenidos de niños sintomáticos, y re infectados mayor número de veces (+++ o ++++), se infectaron en un mayor porcentaje, mostraron una más larga duración de la infección y eliminaron una mayor cantidad de quistes que los animales inoculados con los aislamientos obtenidos de niños asintomáticos que se encontraron infectados con menor frecuencia (++ o +). Es importante enfatizar el papel del parásito en la naturaleza crónica de la infección y hasta en la variabilidad clínica de la enfermedad.

En una investigación realizada hace varios años, dos grupos de voluntarios humanos sanos fueron inoculados por vía digestiva con trofozoitos de dos aislamientos humanos de *G. lamblia*; los resultados de este experimento demostraron una gran variación entre los dos aislamientos de *G. lamblia* en cuanto a la patogenicidad de la infección para hospederos humanos (Nash *et al.*, 1987).

Muy pocos experimentos realizados con modelos animales han confirmado esta relación. Un estudio realizado para comparar la virulencia de tres aislamientos de *G. lamblia* en ratones neonatos, demostró diferentes grados de daño funcional en la mucosa intestinal entre los tres grupos de ratones recién nacidos e inoculados con cada uno de los aislamientos (Cevallos *et al.*, 1995). En otro experimento, realizado también con ratones recién nacidos, se compararon las respuestas del huésped frente a dos aislamientos de *G. lamblia*, encontrándose marcadas diferencias en la dinámica de la infección y las respuestas histopatológicas. Uno de los

aislamientos, de origen animal, produjo infecciones más intensas y de más larga duración, que el otro, de origen humano. Por otra parte el aislamiento animal fue más patogénico y causó mayores alteraciones fisiológicas, en la mucosa intestinal, las que incluyeron un aumento en la atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las células caliciformes y la presencia de células epiteliales vacuoladas (Williamson *et al.*, 2000).

En nuestro conocimiento, éste es el primer trabajo en Cuba y a nivel internacional donde se correlacionan al mismo tiempo las características clínicas y epidemiológicas de los aislamientos humanos, con las características biológicas en modelos animales, como los jerbillos. Sólo existe, un trabajo recientemente publicado, en el que se comparan los efectos de la infección con *G. lamblia in vivo* entre varios aislamientos obtenidos de pacientes sintomáticos y portadores (Astiazarán-García *et al.*, 2000); sin embargo, lo hacen con sólo 4 aislamientos, dos considerados patogénicos y dos no patogénicos, mientras que nosotros estudiamos mayor número de aislamientos, 7 en vez de 4, y le adicionamos criterios epidemiológicos al considerar el número de reinfecciones en el estudio longitudinal previo. Por otra parte, ellos midieron sólo un parámetro, la capacidad de colonización, expresada en el número de animales que se infectan, mientras que nosotros investigamos 3 parámetros, el mismo que ellos, más la duración de la infección y la intensidad de la eliminación, expresada en el número de quistes contados por gramo de heces. Finalmente, ellos estudian por cada aislamiento 3 animales, mientras que nuestros grupos de animales fueron mayores, pues inoculamos entre 10 y 15 animales por cada aislamiento lo que nos permitió una mayor posibilidad de infección para cada aislamiento, y resultados estadísticos más confiables en nuestros experimentos.

El experimento desarrollado en este modelo animal mostró importantes diferencias en el comportamiento biológico de los siete aislamientos humanos de *G. lamblia* y sus resultados en el modelo animal, se correlacionaron con los hallazgos clínicos y epidemiológicos previos obtenidos en los niños de donde se tomaron los aislamientos, lo que pone de manifiesto el papel del parásito en la relación huésped-parásito. Sin embargo, sugerimos que otros estudios serán necesarios para determinar si estas diferencias en la patogenicidad y en la persistencia de la infección en estos niños están relacionadas con otros factores del parásito, como las características genéticas.

Finalmente, los animales fueron sacrificados después de los 40 días PI para verificar la ausencia de trofozoitos después que ellos fueron negativos para la eliminación de los quistes. Algunos jerbillos fueron incapaces de eliminar la infección después del día 40 PI. Los dos jerbillos inoculados que fueron siempre negativos, pero que mostraron trofozoitos al ser sacrificados, fueron típicos casos de falsos negativos. Este cuadro es frecuentemente visto en los servicios de Parasitología Clínica cuando los pacientes muestran signos y síntomas de la enfermedad pero son negativos para la búsqueda de quistes en sus heces.

Para conocer las características genéticas y relacionarlas con los hallazgos clínicos y epidemiológicos, se realizó el análisis del polimorfismo de los fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD). Para eso se tuvo en cuenta que esta técnica es muy útil para el estudio del ADN, pues involucra la amplificación de segmentos del ADN genómico, por la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), usando iniciadores cortos simples de secuencia azarosa. Esta técnica requiere pocas cantidades de ADN, no se necesita clonación, secuenciación o hibridación, lo que la coloca en ventaja en relación con otras técnicas moleculares usadas para la caracterización genómica. Además, el polimorfismo es detectado a partir de patrones de amplificación del ADN, que no son más que marcadores anónimos (Singh, 1997; Guimarães *et al.*, 1999), y brinda información muy útil para estudios genealógicos, o de agrupamiento por distancias genéticas (Sedinova *et al.*, 2003). En nuestro estudio esta técnica mostró ser una herramienta efectiva para evaluar la distancia genética entre los 17 aislamientos de *G. lamblia*.

La heterogeneidad entre los aislamientos de *Giardia* ha sido mostrada por técnicas bioquímicas y moleculares (Nash *et al.*, 1985; Weiss *et al.*, 1992; Nash *et al.*, 1992; Meloni *et al.*, 1995; Homan *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 1999; Deng y Cliver, 1999; Paintlia *et al.*, 1999). Algunos autores han encontrado diferencias biológicas entre los aislamientos usando modelos experimentales, como ratones (*Mus musculus*) recién nacidos (Williamson *et al.*, 2000) y jerbillos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) (Aggarwal y Nash, 1987; Majewska y Gustowska, 1996; Astiazarán-García *et al.*, 2000); gran parte de esta variabilidad fenotípica detectada puede estar asociada con la heterogeneidad genética entre los aislamientos,



incluyendo aquellos obtenidos de diferentes huéspedes (McRoberts *et al.*, 1996; Guimarães *et al.*, 1999).

En los estudios previos no se ha encontrado una clara correlación, entre los niveles de diversidad genética, y algunas características fenotípicas como el comportamiento clínico (García *et al.*, 2002; Cedillo-Rivera *et al.*, 2003; Guimaraes *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2003).

Recientemente, se realizó un estudio (Homan y Mank, 2001) en 18 pacientes holandeses entre 8 y 60 años de edad quienes asistieron a la consulta por tener diarreas; en esta investigación los datos obtenidos fueron interpretados como que existía una relación entre los genotipos de *G. lamblia* y los síntomas clínicos. En el estudio se compararon los aislamientos recogidos de pacientes que tenían diarreas intermitentes, contra los que tenían un cuadro de diarrea persistente, y para eso se tuvo en cuenta la propia interpretación del paciente de sus episodios diarreicos. Los casos de diarrea intermitente fueron considerados por los investigadores como moderados mientras que los pacientes con diarrea persistente, fueron considerados como severos. Ellos observaron finalmente una fuerte correlación entre el Ensamble A y el tipo intermitente de diarrea (9 pacientes) y el Ensamble B con los casos afectados por diarrea persistente (9 pacientes) (Homan y Mank, 2001). Con estos resultados los autores concluyeron que este trabajo demostraba una clara relación entre el genotipo del parásito y la forma de presentación clínica. A pesar de que ellos encontraron una fuerte relación, ésta era dependiente de la valoración subjetiva del paciente sobre sus propios episodios diarreicos, sin un seguimiento previo por un período tiempo de al menos tres meses. Es de destacar que en esta investigación se estudiaron sólo pacientes que fueron todos sintomáticos y la correlación observada fue entre el genotipo y el grado de severidad de los síntomas, más bien que con la presencia o ausencia de síntomas.

Otro estudio longitudinal realizado más recientemente en 353 niños de varios círculos infantiles en el oeste de Australia encontró cierto grado de correlación entre el trasfondo genético de algunos aislamientos y las características clínicas, expresadas por la ocurrencia o ausencia de síntomas. En ese estudio se realizó el aislamiento de *Giardia* y la caracterización de los genotipos en 23 niños (Read *et al.*, 2002). Ellos encontraron la presencia del genotipo A en el

30 % de los niños (7/23) y el genotipo B en el 70 % de los niños (16/23). Por otra parte encontraron que en el grupo A, 6 de 7 niños, tenían diarreas (85,7%), mientras que en el grupo B, 3 de 16 niños tuvieron diarreas (18,7%); por lo que la probabilidad de tener diarrea fue 26 veces mayor en el grupo de niños en los que se aisló el ensamble A. Con estos resultados ellos plantean que el genotipo B es más prevalente en niños asintomáticos y el genotipo A es más frecuente en los sintomáticos.

Por primera vez nosotros identificamos con un cebador un posible marcador genético de patogenicidad. En otras infecciones humanas por protozoos tales como amebiasis se han descrito marcadores bioquímicos, inmunológicos, y genéticos de virulencia (Diamond y Clark, 1993; Katzwinkel-Wladarsch *et al.*, 1994); sin embargo, éstos no han sido claramente mostrados en las infecciones por *G. lamblia*. Otros estudios más amplios usando un mayor número de aislamientos de diferentes zonas geográficas serán necesarios para confirmar la importancia de este posible marcador genético de patogenicidad.

Entre los métodos moleculares usados para caracterizar los aislamientos de *Giardia* el RAPD ha mostrado ser una herramienta valiosa para estudios epidemiológicos (Singh, 1997; Deng y Cliver, 1999; Paintia *et al.*, 1999). Los estudios de caracterización de aislamientos de *G. lamblia* con la técnica de RAPD, han demostrado una gran diversidad genética o heterogeneidad, entre los aislamientos (Van Belkum *et al.*, 1993; McRoberts *et al.*, 1996; Morgan *et al.*, 1996; Sedinova *et al.*, 2003; Mohamed *et al.*, 2004). La mayoría de estos estudios se han hecho con el fin de buscar marcadores genéticos que puedan ser útiles para definir cepas (Mohamed *et al.*, 2004; Sedinova *et al.*, 2003). Sólo un estudio realizado con la técnica de RAPD, trató infructuosamente de encontrar alguna relación entre la sintomatología clínica y las agrupaciones genéticas (Rocha *et al.*, 2003).

Los elementos que determinan la severidad de la giardiasis no han sido profundamente estudiados; varios factores del huésped, como la presencia de inmunoglobulinas IgA secretora, son importantes (Faubert, 2000; Eckmann, 2003). Sin embargo, la virulencia o la patogenicidad del parásito pueden también desempeñar su rol. Nosotros encontramos, por primera vez, usando la técnica de RAPD, una fuerte relación entre las características genéticas de los aislamientos de *G. lamblia* y los patrones clínicos y epidemiológicos encontrados previamente en los niños, de los que se obtuvieron estos aislamientos. Una relación similar observamos en el experimento anterior desarrollado con algunos aislamientos en el modelo experimental. Todo esto pone en evidencia el papel del parásito, en la reinfección y en el comportamiento clínico y epidemiológico del hospedero humano.

## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. En los niños de círculos infantiles estudiados, se encontró un grupo con una mayor tendencia a la reinfección con *G. lamblia*, y una mayor asociación con la diarrea como principal manifestación clínica.
2. Dentro de las características socioeconómicas estudiadas, el nivel escolar menor de doce grado del padre, fue el único factor de riesgo encontrado en los niños reinfectados con *G. lamblia*.
3. Los principales factores de riesgo corroborados entre los hábitos higiénicos estudiados en las familias del grupo de niños reinfectados con *G. lamblia*, fueron el lavado incorrecto de vegetales y la ingestión de agua no hervida.
4. Los animales inoculados con los aislamientos obtenidos de niños sintomáticos, más frecuentemente reinfectados, se parasitaron en mayor porcentaje, mostraron una mayor duración de la parasitosis y eliminaron una mayor cantidad de quistes, que los animales inoculados con los aislamientos procedentes de niños asintomáticos infectados menos frecuentemente; lo que demostró desde el punto de vista biológico el papel del parásito.
5. Utilizando la técnica de RAPD, se encontró una fuerte relación entre los patrones clínicos y epidemiológicos encontrados previamente en los niños y las características genéticas de los aislamientos; lo que demuestra desde el punto de vista molecular el papel del parásito.
6. Por primera vez se encontró un posible marcador genético de patogenicidad, el cual identificó claramente los aislamientos patogénicos a pesar de las distancias genéticas entre éstos.

## **CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES**

- 1.- Mantener la medida de no suspender la asistencia a los círculos infantiles de los niños asintomáticos infectados con *G. lamblia* para su tratamiento.
- 2.- Investigar en niños de círculos infantiles factores del huésped que puedan estar asociados con las características clínicas y la reinfección con *G. lamblia*.
- 3.- Realizar la caracterización de los genotipos de *G. lamblia* que circulan en Cuba y su posible correlación con la sintomatología clínica.
- 4.- Evaluar la utilidad del posible marcador genético de patogenicidad en un mayor número de aislamientos de *G. lamblia* obtenidos de individuos con diferentes comportamientos clínicos y epidemiológicos.

## CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adagu IS, Nolder D, Warhurst DC, Rossignol JF. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. J Antimicrob Chemother 2002; 49:103-111
- Adam RD. The Biology of *Giardia* spp. Microbiol Rev 1991; 55: 706–732.
- Adam RD. Chromosome-size variation in *Giardia lamblia*: the role of rDNA repeats. Nucleic Acids Res 1992; 20:3057-3061.
- Adam RD, Nash TE, Wellems TE. The *Giardia lamblia* trophozoite contains sets of closely related chromosomes. Nucleic Acids Res 1998; 16:4555-4567.
- Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 447-475.
- Addiss DG, Davis JP, Roberts JM, Mast EE. Epidemiology of giardiasis in Wisconsin. Increasing incidence of reported cases and unexplained seasonal trends. Am J Trop Med Hyg 1992;47:13-9.
- Agarwal AK, Tripathi DM, Sahai R, Gupta N, Saxena RP, Puri A, et al. Management of giardiasis by a herbal drug "Pippali Rasayana": a clinical study. J Ethnopharmacol 1997; 56:233-236.
- Aggarwal A, Nash TE. Comparison of two antigenically distinct *Giardia lamblia* isolates in gerbils. AmJ Trop Med Hyg 1987; 36: 325–332.
- Ali SA, Hill DR. *Giardia intestinalis*. Curr Opin Infect Dis 2003;16:453-460.
- Anderson RM. The population dynamics and epidemiology of intestinal nematodes infection. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986; 80: 686-696.
- Andrews RH, Chilton NB, Mayhofer G. Selection of specific genotypes of *Giardia intestinalis* by growth in vitro and in vivo. Parasitology 1992; 105:375-386.
- Anónimo. New drug for parasitic infections in children. FDA Consum 2003 a; 37:4.
- Anónimo. Nitazoxanide (Alinia) - a new anti-protozoal agent. Med Lett Drugs Ther 2003 b; 45:29-31.
- Aparicio Tijeras C, Ezquerro Gadea J, López Larrayoz I, Sánchez Ruiz JC. Dolor abdominal en infección por *Giardia lamblia* Aten Primaria 2004; 34:104.

- Astiazarán-García H, Espinosa-Cantellano M, Castañón G, Chávez-Munguía B, Martínez-Palomo A. *Giardia lamblia*: effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the growth of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp Parasitol* 2000; 95:128–135.
- Azis H, Beck CE, Lux MF, Hudson MJ. A comparison study of different methods used in the detection of *Giardia lamblia*. *Clin Lab Sci* 2001; 14: 150-154.
- Bartlett AV, Englander SJ, Jarvis BA, Ludwig L, Carlson JF, Topping JP. Controlled trial of *Giardia lamblia*: Control strategies in day care centers. *Am J Public Health* 1991; 81:1001-1006.
- Baruch AC, Isaac-Renton J, Adam RD. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. *J Infect Dis* 1996; 174:233-236.
- Beaver, PC, Jung RC, Cupp EW. *Clinical Parasitology*, 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1984: 52-56.
- Belosevic M, Faubert MG, Guy R, Mac Lean DJ. Observations on natural and experimental infections with *Giardia* isolated from cats. *Can J Comparative Med* 1984; 48:241-244.
- Belosevic M, Faubert MG. *Giardia muris*: Correlation between oral dosage, course infection and trophozoite distribution in the mouse small intestine. *Exp Parasitol* 1983; 56:93-100.
- Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet* 2002; 359:564-571.
- Bienz M, Dai WJ, Welle M, Gottstein B, Muller N. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Giardia lamblia* infection but exhibit normal intestinal immunoglobulin A responses against the parasite. *Infect Immun* 2003; 71:1569-1573.
- Bryman A. *Quantitative Data Analysis with SPSS Release 10 for Windows*. London: Routledge; 2001.
- Buret A, Hardin JA, Olson ME, Gall DG. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterol* 1992;103:506-513.

- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol* 1997; 83:575–583.
- Campbell SR, Van Keulen H, Erlandsen SL, Senturia JB, Jarroll EL. *Giardia* sp.: comparison of electrophoretic karyotypes. *Exp Parasitol* 1990; 71:470-482.
- Carroccio A, Montalto G, Iacono G, Ippolito S, Soresi M, Notarbartolo A. Secondary impairment of pancreatic function as a cause of severe malabsorption in intestinal giardiasis: a case report. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56:599-602.
- Cedillo-Rivera R, Darby JM, Enciso-Moreno JA, Ortega-Pierres G, Ey PL. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. *Parasitol Res* 2003; 90:119-123.
- Cervelló A, Alfaro A. Hypokalemic myopathy induced by *Giardia lamblia*. *N Engl J Med* 1993; 329:210-211.
- Cevallos A, Carnaby S, James M, Farthing JG. Small intestinal injury in a neonatal rat model of giardiasis is strain dependent. *Gastroenterology* 1995; 109:766-773.
- Chan MS. The global burden of intestinal nematode infections. Fifty years on. *Parasitol Today* 1997; 113:438-443.
- Chappell CL, Okhuysen PC. Cryptosporidiosis. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15:523-527.
- Chung RN, Nagelkerke N, Karumba PN, Kaleli N, Wamwea M, Mutiso N et al. Longitudinal study of young children in Kenya: intestinal parasitic infection with special reference to *Giardia lamblia*, its prevalence, incidence and duration, and its association with diarrhoea and with other parasites. *Acta Trop* 1992; 50:39–49.
- Cifuentes E, Suarez L, Espinosa M, Juarez-Figueroa L, Martinez-Palomo A. Risk of *Giardia intestinalis* infection in children from an artificially recharged groundwater area in Mexico city. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71:65-70.
- Cox FEG. History of Human Parasitology. *Clin Microbiol Rev* 2002 a; 15:595–612.
- Cox FEG. Systematics of the parasitic Protozoa. *Trends Parasitol* 2002 b; 18:108.
- Crompton DWT. How much human helminthiasis is there in the world?. *J Parasitol* 1999; 85:397-403.
- Curtale F, Pezzotti P, Saad YS, Aloï A. An analysis of individual, household, and environmental risk factors for intestinal helminth infection among children in Qena Governorate, Upper Egypt. *J Trop Pediatr* 1999; 45:14-17.



- Curtale F, Pezzotti P, Sharbini AL, Maadat HA, Ingrosso P, Saad YS, et al. Knowledge, perceptions and behaviour of mothers toward intestinal helminths in Upper Egypt: implications for control. *Health Policy Plan* 1998; 13:423-432.
- De Jonckheere JF, Majewska AC, Kasprzak W. *Giardia* isolates from primates and rodents display the same molecular polymorphism as human isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 39:23-29.
- De Silva NR, Priyanka-Jayapani VP, de Silva HJ. Socioeconomic and behavioral factors affecting the prevalence of geohelminths in preschool children: Southeast Asian *J Trop Med Public Health* 1996; 27:36-42.
- Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. *Epi Info Version 6: A Word Processing, Database, and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control. 1994.
- Demirci M, Delibas N, Altuntas I, Oktem F, Yonden Z. Serum iron, zinc and copper levels and lipid peroxidation in children with chronic giardiasis. *J Health Popul Nutr* 2003; 21:72-75.
- Deng MQ, Cliver DO. Rapid DNA extraction methods and new primers for randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Giardia duodenalis*. *J Microbiol Methods* 1999; 37:193-200.
- Dennis DT, Smith RP, Welch JJ, Chute CG, Anderson B, Herndon JC, et al. Endemic giardiasis in New Hampshire: A case-control study of environmental risks. *J Infect Dis* 1993; 167:1391-1395.
- Diamond LS, Clark IA. Redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryotic Microbiol* 1993; 40:340-344.
- Diamond LS. Cryopreservation and storage of parasitic protozoa in liquid nitrogen. *J Euk Microbiol* 1995; 42:585-590.
- Diaz E, Mondragon J, Ramirez E, Bernal R. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68:384-385.
- Domenech I, Pérez O, Lastre M. Relación entre la IgG sérica total, la giardiasis humana y los signos alérgicos actuales. *Rev Cubana Med Trop* 1991; 43:127-131.

- Dorea RC, Salata E, Padovani CR, dos Anjos GL. Control of parasitic infections among school children in the peri-urban area of Botucatu, Sao Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; 29:425-430.
- Doumbo O, Rossignol JF, Pichard E, Traore HA, Dembele TM, Diakite M, et al. Nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhea and other intestinal parasitic infections associated with acquired immunodeficiency syndrome in tropical Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56:637-639.
- Eberhard ML, Arrowood MJ. *Cyclospora* spp. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15:519-522.
- Eckmann L, Gillin FD. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan *Giardia lamblia*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280:G1-G6.
- Eckmann L. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol* 2003; 25:259-270.
- Ertan P, Yereli K, Kurt O, Balcioglu IC, Onag A. Serological levels of zinc, copper and iron elements among *Giardia lamblia* infected children in Turkey. *Pediatr Int* 2002; 44:286-288.
- Escobedo AA, Nuñez FA, Moreira I, Vega E, Pareja A, Almirall P. Comparison of chloroquine, albendazole, and tinidazole in the treatment of children with giardiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 2003, 97: 367-371.
- Esrey SA, Collet J, Miliotis MD, Koornhof HJ, Makhales P. The risk of infection from *Giardia lamblia* due to drinking water supply, use of water, and latrines among preschool children in rural Lesotho. *Int J Epidemiol* 1989; 18:248-253.
- Esrey SA, Habicht JP. Maternal literacy modifies the effect of toilets and piped water on infant survival in Malaysia. *Am J Epidemiol* 1988; 127:1079-1087.
- Ey PL, Andrews RH, Mayrhofer G. Differentiation of major genotypes of *Giardia intestinalis* by polymerase chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoite surface antigen. *Parasitology* 1993 a; 106:347-356.
- Ey PL, Darby JM, Andrews RH, Mayrhofer G. *Giardia intestinalis*: detection of major genotypes by restriction analysis of gene amplification products. *Int J Parasitol* 1993 b; 23:591-600.

- Ey PL, Bruderer T, Wehrli C, Köhler P. Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analyses of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia. *Parasitol Res* 1996; 82:52-60.
- Ey PL, Khanna K, Andrews RH, Manning PA, Mayrhofer G. Distinct genetic groups of *Giardia intestinalis* distinguished by restriction fragment length polymorphisms. *J Gen Microbiol* 1992; 138:2629-2637.
- Ey PL, Mansouri M, Kulda J, Nohynkova E, Monis PT, Andrews RH, et al. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J Eukaryot Microbiol* 1997; 44:626-635.
- Farthing MJG, Mata L, Urrutia JJ, Kronmal RA. Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. *Am J Clin Nutr* 1986; 43:395-405.
- Farthing MJG. Giardiasis. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25:493-515.
- Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:35-54.
- Faubert MG, Belosevic M, Walker ST, Mac Lean DJ, Meerovitch E. Comparative studies on the pattern of infection of *Giardia* spp. in Mongolian gerbils. *J Parasitol* 1983; 69:802-805.
- Fenollar F, Lepidi H, Gerolami R, Drancourt M, Raoult D. Whipple disease associated with giardiasis. *J Infect Dis* 2003; 188:828-34.
- Fuller R, Gibson GR. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1997; 222:28-31.
- Furness BW, Beach MJ, Roberts JM. Giardiasis surveillance? United States, 1992-1997. *Morb Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ* 2000; 49 (SS-7):1-16.
- García EL, Jiménez E, Silvia C, Galván SC. Distancia filogenética de aislados de *Giardia intestinalis* de niños sintomáticos y asintomáticos. *Rev Invest Clín* 2002; 54:113-118.
- Garcia LS, Bruckner DA. *Diagnostic Medical Parasitology. Macroscopic and Microscopic Examination of Fecal Specimens.*, Washington, DC : American Society for Microbiology; 1993. p. 501-540.
- Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:114-128.

- Gendrel D, Treluyer JM, Richard-Lenoble D. Parasitic diarrhea in normal and malnourished children. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17:189-197.
- Ghosh S, Frisardi M, Rogers R, Samuelson J. How *Giardia* swim and divide. *Infect Immun* 2001; 69:7866-7872.
- Gilman RH, Marquis GS, Miranda E, Vestegui M, Martinez H. Rapid reinfection by *Giardia lamblia* after treatment in a hyperendemic third world community. *Lancet* 1988; i:343-345.
- Goka AKJ, Rolston DDK, Mathan VI, Farthing MJG. The relative merits of faecal and duodenal microscopy in the diagnosis of giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84:66-7.
- Gómez M, Orihuela JL, Orihuela ME. Parasitismo intestinal en círculos infantiles. *Rev Cubana Med Gen Integr* 1999; 15:266-269.
- Graczyk TK, Grimes BH, Knight R, Da Silva AJ, Pieniazek NJ, Veal DA. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent *in situ* hybridization and a monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68:228-232.
- Grant J, Mahanty S, Khadir A, MacLean JD, Kokoskin E, Yeager B, *et al.* Wheat germ supplement reduces cyst and trophozoite passage in people with giardiasis. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:705-710.
- Guimarães S, Sogayar MIL, Franco MF. *Giardia duodenalis*: Inter-strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1999; 41:45-58.
- Guimarães S, Sogayar MI. Detection of anti-*Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. *Rev Saude Publica* 2002; 36:63-68.
- Guimarães S, Sogayar MI, Franco MF. Protease activity in *Giardia duodenalis* trophozoites of axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:77-81.
- Guy RA, Payment P, Krull UJ, Horgen PA. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69:5178-5185

- Harris JC, Plummer S, Lloyd D. Antigiardial drugs. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 57:614-619.
- Haswell-Elkins MR, Elkins DB, Anderson RM. Evidence for predisposition in humans to infection with *Ascaris*, hookworm, *Enterobius* and *Trichuris* in a South Indian fishing community. *Parasitol* 1987; 95:323-337.
- Hawrelak J. Giardiasis: Pathophysiology and Management. *Altern Med Rev* 2003; 8:129-142.
- Heller F, Duchmann R. Intestinal flora and mucosal immune responses. *Int J Med Microbiol* 2003; 293:77-86.
- Heymans HSA, Aronson DC, van Hooft MAJ. Giardiasis in childhood: an unnecessarily expensive diagnosis. *Eur J Pediatr* 1987; 146:401-403.
- Hill DR. Giardiasis Issues in diagnosis and management. *Infect Dis Clin North Am* 1993, 7:503-525.
- Hill Gaston JS, Lillcrap MS. Arthritis associated with enteric infection. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003; 17:219-239.
- Homan WL, Van Enkevort FH, Limper L, van Eys GJ, Schoone GJ, Kasprzak W, et al. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitol Res* 1992; 78:316-323.
- Homan WL, Gilsing M, Bentala H, Limper L, van Knapen F. Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. *Parasitol Res* 1998; 84:707-714.
- Homan, WL, Mank TG. Human giardiasis genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol* 2001; 31:822-826.
- Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol* 1997; 83:44-51.
- Hoque ME, Hope VT, Kjellström T, Scragg R, Lay-Yee R. Risk of giardiasis in Aucklanders: a case control study. *Int J Infect Dis* 2002; 6:191-197.
- Hoque ME, Hope VT, Scragg R, Kjellström T. Children at risk of giardiasis in Auckland: a case-control analysis. *Epidemiol Infect* 2003; 131:655-662.

- Isaac-Renton JL, Cordeiro C, Sarafis K, Shahriari H. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. *J Infect Dis* 1993; 167:431-440.
- Jarroll EL, Sener K. Potential drug targets in cyst-wall biosynthesis by intestinal protozoa. *Drug Resist Updat* 2003; 6:239-246.
- Jimenez JC, Fontaine J, Grzych JM, Dei-Cas E, Capron M. Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004; 11:152-160.
- Jimenez JC, Uzcanga G, Zambrano A, Di Prisco MC, Lynch NR. Identification and partial characterization of excretory/secretory products with proteolytic activity in *Giardia intestinalis*. *J Parasitol* 2000; 86:859-862.
- Jimenez-Cardoso E, Flores-Luna A, Angeles E, Martinez P, Lopez-Castanares R, Castaneda-Hernandez G, et al. In vitro anti-giardial activity of IRE-6A and IRE-7B, two ethyl-phenylcarbamate derivatives. *Rev Invest Clin* 2003; 55:444-447.
- Jong E. Intestinal parasites. *Prim Care Clin Office Pract* 2002; 29:857-877.
- Jordán JR. Crecimiento y desarrollo: una meta cumplida. *Rev Cubana Pediatr* 1988; 60:924-930.
- Kappus KD, Lundgren RG, Juranek DD, Roberts JM, Spencer HC. Intestinal Parasitism in the United States: Update on a continuing problem. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 705-713.
- Katzwinkel-Wladarsch S, Loscher T, Rinder H. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51:115-118.
- Kaur H, Ghosh S, Samra H, Vinayak VK, Ganguly NK. Identification and characterization of an excretory-secretory product from *Giardia lamblia*. *Parasitology* 2001; 123:347-356.
- Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77:487-488.
- Keith CL, Radecki SV, Lappin MR. Evaluation of fenbendazole for treatment of *Giardia* infection in cats concurrently infected with *Cryptosporidium parvum*. *Am J Vet Res* 2003; 64:1027-1029.

- Khaw M, Panosian CB. Human antiprotozoal therapy: past, present, and future. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:427–439.
- Kilic E, Yazar S, Saraymen R. Responsiveness of total content changes of magnesium and zinc status in patients infected with *Giardia intestinalis*. *Biol Trace Elem Res* 2004; 96:153-158.
- Korman SH, Le Blancq SM, Deckelbaum RJ, Van der Ploeg LH. Investigation of human giardiasis by karyotype analysis. *J Clin Investig* 1992; 89:1725-1733.
- Kvalsvig JD, Cooppan RM, Connolly KJ. The effects of parasite infection on cognitive processes in children. *Ann Trop Med Parasitol* 1991; 85:551-568.
- Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol* 2002; 28:123-47.
- Langford TD, Housley MP, Boes M, Chen J, Kagnoff MF, Gillin FD, et al. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun* 2002; 70:11-18.
- Larocque R, Nakagaki K, Lee P, Abdul-Wahid A, Faubert GM. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. *Infect Immun* 2003; 71:5662-5669.
- Le Blancq SM, Korman SH, Van der Ploeg LH. Frequent rearrangements of rRNA-encoding chromosomes in *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:4405-4412.
- Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E. Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit Rev Microbiol* 2002; 28:371-409.
- Lengerich EJ, Addiss DG, Juranek DD. Severe giardiasis in the United States. *Clin Infect Dis* 1994;18:760-3.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux J, Grain J, Honigberg BM, et al. A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozool* 1980; 27:37–58.
- Lewis JRM, Belosevic M, Faubert MG, Curthoys L, Mac Lean DJ. 1987. Cortisone-induced recrudescence of *Giardia lamblia* infections in gerbils. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36:33-40.
- Llanio R, Fernández JE, Pérez F, Fernández JA, Pena A, Rodríguez L, et al. *Propedéutica Clínica y Fisiopatología*. La Habana: Pueblo y Educación; 1991.
- López JL, Barrero E, Núñez FA, Finlay CM, de Rojas V. Algunas características

psicosociales de individuos con predisposición a *Trichuris trichiura*. Rev Cubana Med Trop 1993; 45:180-183.

- Lunn PG, Erinoso HO, Northrop-Clewes CA, Boyce SA. *Giardia intestinalis* is unlikely to be a major cause of the poor growth of rural Gambian infants. J Nutr 1999; 129:872-877.
- Mahmud MA, Chappell C, Hossain MM, Habid M, Dupont HL. Risk for development of first symptomatic *Giardia* infection among infants of a birth cohort in rural Egypt Am J Trop Med Hyg 1995; 53:84-88.
- Majewuska AC, Gustowska L. Comparative studies of experimental giardiasis in Mongolian gerbils. 3. Changes in small intestine induced with human and zoo animal *Giardia* isolates. Acta Parasitol 1996; 41:128-135.
- Mank TG, Zaat JOM. Diagnostic advantages and therapeutics options for giardiasis. Expert Opin Investig Drugs 2001; 10:1513-1519.
- Margolis KD, Lundgren RG, Juranek DD, Roberts DD, Spencer HC. The use of ecological terms in parasitology (Report of an “ad hoc” committee of American Society of Parasitologists). J Parasitol 1982; 68:131-133.
- Marshall MM, Naumovitz D, Ortega YR, Sterling CR. Waterborne protozoan pathogens. Clin Microbiol Rev 1997; 10:67-85.
- Martín-Moreno JM, Banegas JR. Sobre la traducción del término inglés *odds ratio* como oportunidad relativa. Salud Publica Mex 1997; 39:72-74.
- Mason PR, Patterson BA. Epidemiology of *Giardia lamblia* infection in children: cross-sectional and longitudinal studies in urban and rural communities in Zimbabwe. Am J Trop Med Hyg 1987; 37:227-282.
- Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. 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 1995; 111:11-17.
- McRoberts KM, Meloni BP, Morgan UM, Marano R, Binz N, Erlandsen SL, et al. Morphological and molecular characterization of *Giardia* isolated from the straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) in Western Australia. J Parasitol 1996; 82:711-718.



- Meloni BP, Lymbery AJ, Thompson RCA. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy and epidemiology. *J Parasitol* 1995; 81:368-383.
- Mendoza D, Núñez FA, Escobedo A, Pelayo L, Fernández M, Torres D, et al. Parasitosis intestinales en 4 círculos infantiles de San Miguel del Padrón, Ciudad de la Habana, 1998. *Rev Cubana Med Trop* 2001; 53: 189-193.
- Miller SA, Rosario CL, Rojas E, Scorza JV. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centres in Trujillo, Venezuela. *Trop Med Int Health* 2003; 8:342-347.
- Minenoa T, Avery MA. Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. *Curr Pharm Des* 2003; 9:841-855.
- Mohamed NH, Salama MM, Moustafa MA, El-Wakil HS, Mohareb EW, Thabet HS. Molecular characterization of Egyptian *Giardia lamblia* isolates. *J Egypt Soc Parasitol* 2004; 34:213-226.
- Moitinho M, Bértoli, M, Guedes TA, Ferreira S. Influence of refrigeration and formalin on the floatability of *Giardia duodenalis* cysts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94:571-574.
- Monis PT, Mayrhofer G, Andrews RH, Homan WL, Limper L, Ey PL. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology* 1996; 112:1-12.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Isaac-Renton JL, et al. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology* 1998; 116:117-119.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol* 1999; 16:1135-1144.
- Monis PT, Thompson RC. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infect Genet Evol* 2003; 3:233-244.
- Montresor A, Crompton DWT, Gyorkos TW, Savioli L. Helminth Control in school age children: a guide for managers of control programmes. Geneva, World Health Organization, 2002.

- Morales G, Loaiza L, Pino LA. Marcadores de riesgo para individuos con altas cargas de *Ascaris lumbricoides* en una comunidad rural del Estado Cojedes, Venezuela. Bol Chil Parasitol 1999; 54:88-96.
- Morgan UM, Constantine CC, Greene WK, Thompson RC. RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis of *Giardia* DNA and correlation with isoenzyme data. J Parasitol 1996; 82:711-718.
- Motulsky HJ. Analyzing Data with GraphPad Prism, 1999, GraphPad Software Inc., San Diego CA. (Manual en línea) (citado de 2 de octubre 2003); Disponible en: URL: <http://www.graphpad.com/manuals/PrismUsersGuide.pdf>
- Moya-Camarena SY, Sotelo N, Valencia ME. Effects of asymptomatic *Giardia intestinalis* infection on carbohydrate absorption in well-nourished Mexican children. Am J Trop Med Hyg 2002; 66:255-259.
- Muniz-Junqueira MI, Queiróz EFO. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in living in Brasília. Rev Soc Bras Med Trop 2002; 35:133-141.
- Nain CK, Dutt P, Vinayak VK. Alterations in enzymatic activities of the intestinal mucosa during the course of *Giardia lamblia* infection in mice. Ann Trop Med Parasitol 1991; 85:515-522.
- Nash, TE, McCutchan T, Keister D, Dame JB, Conrad JD, Gillin FD. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. J Infect Dis 1985; 152:64-73.
- Nash TE, Herrington DA, Losonsky GA, Levine MM. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. J Infect Dis 1987; 156:974-984.
- Nash TE, Mowatt MR. Identification and characterization of a *Giardia lamblia* group-specific gene. Exp Parasitol 1992; 75:369-378.
- Nash TE. Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1997; 352:1369-1375.
- Navarrete-Vázquez G, Yépez L, Hernández-Campos A, Tapia A, Hernández-Luis F, Cedillo R, et al. Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. Bioorg Med Chem 2003; 11:4615-4622.

- Newman RD, Moore SR, Lima AA, Nataro JP, Guerrant RL, Sears CL. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. *Trop Med Int Health* 2001; 6:624-634.
- Niehaus MD, Moore SR, Patrick PD, Derr LL, Lorntz B, Lima AA, et al. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 6:590-593.
- Nokes C, Grantham-McGregor SM, Sawyer AW, Cooper ES, Bundy DAP. Parasitic helminthic infection and cognitive function in school children. *Proc R Soc Lond B* 1992; 24:77-81.
- Norhayati M, Penggabean M, Oothuman P, Fatmah MS. Prevalence and some risk factors of *Giardia duodenalis* infection in a rural community in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998; 29:735-738.
- Novotny TE, Hopkins RS, Shillam P, Janoff EN. Prevalence of *Giardia lamblia* and risk factors for infection among children attending day-care facilities in Denver. *Public Health Rep* 1990; 105:72-75.
- O'Handley RM, Olson ME, McAllister TA, Morck DW, Jelinski M, Royan G, et al. Efficacy of fenbendazole for treatment of giardiasis in calves. *Am J Vet Res* 1997; 58:384-8.
- Okhuysen PC. Traveler's diarrhea due to intestinal protozoa. *Clin Infect Dis* 2001; 33:110-114.
- Olivares JL, Fernández R, Fleita J, Rodríguez G, Clavel A. Serum mineral levels in children with intestinal parasitic infection. *Dig Dis* 2003; 21:258-261.
- Ortega YR, Adam RD. *Giardia*: Overview and Update. *Clin Infect Dis* 1997; 25:545-550.
- Ortega YR, Bonavia D. *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in ancient Peruvians. *J Parasitol* 2003; 89:635-636.
- Paget T, Maroulis S, Mitchell A, Edwards MR, Jarroll EL, Lloyd D. Menadione kills trophozoites and cysts of *Giardia intestinalis*. *Microbiology* 2004; 150:1231-1236.
- Paintlia AS, Mahajan RC, Chakraborti A, Sehgal R, Ganguly NK. Characterization of *Giardia lamblia* groups A and B from North India by isoenzyme and random amplified polymorphic DNA analysis. *Parasitol Res* 1999; 85:510-512.

- Perez PF, Minnaard J, Rouvet M, Knabenhans C, Brassart D, De Antoni GL, et al. Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from *Lactobacilli*: an in vitro study. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:5037-5042.
- Ponadi J. SYN-TAX. Computer programs from multivariate data analysis in ecology and systematics. Version 5.0. User's guide, Budapest, Hungary: Scientific Publishing; 1993.
- Procop GW. Gastrointestinal Infections. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15:1073-1108.
- Pruett KD. Father's influence in the development of infant's relationships. *Acta Paediatr Scand* 1988; 77:43-53.
- Rauch AM, Van R, Bartlett AV, Pickering LK. Longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in a day care center population. *Pediatr Infect Dis* 1990; 9:186-189.
- Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol* 2002; 32:229-231.
- Robertson LJ, Gjerde B. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *J Food Prot* 2001; 64:1793-1798.
- Rocha MO, Gomes MA, Costa AO, Furst C, Silva EF. Molecular characterization of Brazilian human *Giardia duodenalis* isolates using isoenzyme and random amplified polymorphic DNA analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46:273-278.
- Rodríguez-Guzmán LM, Hernández-Jerónimo EJ, Rodríguez-García R. Parasitosis intestinal en niños seleccionados en una consulta ambulatoria de un hospital. *Rev Mex Pediatr* 2000; 67:117-122.
- Romero Cabello R, Guerrero LR, Muñoz García MR, Geyne-Cruz A. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91:701-703.
- Rose JB, Slifko TR. *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Cyclospora* and their impact on foods: A review. *J Food Prot* 1999; 62:1059-1070.
- Rossignol JF, Ayoub A, Ayers MS. Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E. dispar*: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *J Infect Dis* 2002; 185:1692.
- Sackey ME, Weigel MM, Armijos RX. Predictors and nutritional consequences of intestinal parasitic infections in rural Ecuadorian children. *J Trop Pediatr* 2003; 49:7-23.

- Sanjurjo E, Rodríguez M, Bravo JR, Finlay CM, Silva LC, Gálvez MB, *et al.* Encuesta Nacional de Parasitismo Intestinal. Ciudad de La Habana. IPK. 1984.
- Sarafis K, Isaac-Renton J. Pulsed-field Gel electrophoresis as a method of biotyping of *Giardia duodenalis*. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48:134-144.
- Savioli L, Bundy DAP, Tomkins A. Intestinal parasitic infections: a soluble public health problem. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86:353-4.
- Scott KG, Logan MR, Klammer GM, Teoh DA, Buret AG. Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia muris*-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. *Infect Immun* 2000; 68:3412-3418.
- Sedinova J, Flegr J, Ey PL, Kulda J. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for the identification of *Giardia intestinalis* subtypes and phylogenetic tree construction. *J Eukaryot Microbiol* 2003; 50:198-203.
- Shant J, Bhattacharyya S, Ghosh S, Ganguly NK, Majumdar S. A potentially important excretory-secretory product of *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol* 2002;102:178-186.
- Singer SM, Nash TE. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun* 2000 a; 68:170-175.
- Singer SM, Nash TE. The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *J Infect Dis* 2000 b;181:1510-1512.
- Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int J Parasitol* 1997; 27:1135–1145.
- Smalheiser NR. Bath toys—a source of gastrointestinal infection. *N Engl J Med* 2004; 350:521.
- Sneath PHA Some thoughts on bacterial classification. *J General Microbiol* 1957; 17:201-226.
- Sneath, PHA, Sokal RR. Numerical Taxonomy. San Francisco: W. H. Freeman and Co., California; 1973. p. 230-234.
- Sousa MC, Goncalves CA, Bairos VA, Poiars-Da-Silva J. Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8:258-265.

- Stuart JM, Warburton FG, Jeyakanth S, Pugh C, Morris I, Sarangi J, et al. Risk factors for sporadic giardiasis: A case-control study in Southwestern England. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:229-233.
- Suárez Hernández M, Ocampo Ruiz I, Baly Gil A, González Álvarez N, Artiga Serpal JR. Prevalencia de parasitosis intestinales en círculos infantiles de la provincia de Ciego de Avila, Cuba: 1989-1993. *Bol Chil Parasitol* 1999; 54:37-40.
- Sullivan PS, DuPont HL, Arafat RR, Thornton SA, Selwyn BJ, Alamy MAE, et al. Illness and reservoirs associated with *Giardia lamblia* infection in rural Egypt: the case against treatment in developing world environments of high endemicity. *Am J Epidemiol* 1988; 127:1272–1281.
- Tellez A, Winiiecka-Krusnell J, Paniagua M, Linder E. Antibodies in mother's milk protect children against giardiasis. *Scand J Infect Dis* 2003; 35:322-325.
- Thompson RCA, Reynoldson JA, Mendis AHW. *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol* 1993; 32:71–160.
- Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 2000; 30:1259-1267.
- Thompson RCA. Molecular variation in *Giardia* and its implications. *Acta Trop* 1993; 53:167–184.
- Tomkins A, Watson F. 1989. *Malnutrition and Infection. A Review*. London: Lavenham Press; 1989. p. 21–22.
- Torres DMAGV, Chieffi PP, Costa WA, Kudzielics E. Giardíasis em creches mantidas pela Prefeitura do Município de São Paulo, 1982:1983. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991; 33:137–142.
- Torres MA, Uetanabaro APT, Costa AF, Alves CA, Farias LM, Bambirra EA, et al. Influence of bacteria from the duodenal microbiota of patients with symptomatic giardiasis on the pathogenicity of *Giardia duodenalis* in gnotoxenic mice. *J Med Microbiol* 2000; 49:209-215.
- Traub RJ, Robertson ID, Irwin P, Mencke N, Thompson A. The role of dogs in transmission of gastrointestinal parasites in a remote tea-growing community in Northeastern India. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67:539–545.

- Tupchong M, Simor A, Dewar C. Beaver fever, a rare cause of reactive arthritis. *J Rheumatol* 1999;26:2701-2.
- Upcroft J, Upcroft P. My favorite cell: *Giardia*. *Bioessays* 1998; 20:256-263.
- Upcroft JA, Boheram PFL, Campbell RW, Shepherd RW, Upcroft P. Biological and genetic analysis of a longitudinal collection of *Giardia* sample derived from humans. *Acta Trop* 1995; 60:35-41.
- Upcroft P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:150-164.
- Valencia ME, McNeill G, Haggarty P, Moya SY, Pinelli A, Quihui L, et al. Energetic consequences of mild *Giardia intestinalis* infestation in Mexican children. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:860–865.
- Van Belkum A, Homan W, Limper L, Quint WG. Genotyping isolates and clones of *Giardia duodenalis* by polymerase chain reaction: implications for the detection of genetic variation among protozoan parasite species. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61:69–77.
- Van Keulen H, Homan WL, Erlandsen SL, Jarrol EL. A three nucleotide signature sequence in small subunit rRNA divides human *Giardia* in two different genotypes. *J Euk Microbiol* 1995; 42:13-17.
- Van Keulen H, Feely DE, Macechko EL, Jarroll EL, Erlandsen SL. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. *J Parasitol* 1998; 84:294-300.
- Vanderhoof JA, Young RJ. Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;27:323-332.
- Wallis PM, Wallis HM. Excystation and culturing of human and animals *Giardia* sp. by using gerbils and TYI-S-33 medium. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51:647-651.
- Weiland ME, Palm JE, Griffiths WJ, McCaffery JM, Svard SG. Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity. *Int J Parasitol*. 2003; 33:1341-1351.
- Weiss JB, van Keulen H, Nash TE. Classification of Subgroups of *Giardia lamblia* based upon ribosomal RNA sequence using PCR. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 54: 73–86.

- WHO. Informal Consultation on Intestinal helminth Infections. Geneva: World Health Organization, 1990. (WHO/CDS/IPI/90.1).
- WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series No. 912. World Health Organization, 2002.
- WHO/PAHO. Informal consultation on intestinal protozoal infections. Mexico DF: OPS; 1992. (WHO/CDI/IPI/92.2).
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6531-6535.
- Williamson AL, O'Donoghue PJ, Upcroft JA, Upcroft O. Immune and pathophysiological responses to different strains of *Giardia duodenalis* in neonatal mice. *Int J Parasitol* 2000; 30:129–136.
- World Health Organization. Operational Guidelines for Ethics Committees that review Biomedical Research. Geneva: World Health Organization; 2000. (TDR/PRD/ETHICS/2000.1).
- World Medical Association. Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2000; 284:3043-3045.
- Wrigth CE, El Alamy M, DuPont HL, Holguin AH, Hsi BP, Thacker SB, et al. The role of home environment in infant diarrhea in rural Egypt. *Am J Epidemiol* 1991; 134:887-894.
- Zajac AM, LaBranche TP, Donoghue AR, Chu TC. Efficacy of fenbendazole in the treatment of experimental *Giardia* infection in dogs. *Am J Vet Res* 1998; 59:61-63.
- Zhou P, Li E, Zhu N, Robertson J, Nash T, Singer SM. Role of interleukin-6 in the control of acute and chronic *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun* 2003; 71:1566-1568.



## CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR

### IX.1. Autobiografía.

- Torres D, **Núñez F**, Finlay C. Aislamiento y axenización de *Giardia lamblia* en niños procedentes de círculos infantiles de Ciudad de La Habana. Rev Cubana Invest Biomed 1996; 15:123-126.
- **Núñez FA**, Hernández M, Finlay CM. Longitudinal study of giardiasis in three day care centres of Havana city. Acta Trop 1999; 73:237-242.
- Bouza M, Maciques I, Torres D, **Núñez FA**. *Giardia lamblia* in Mongolian gerbils: Characteristics of Infection using different human isolates. Exp Parasitol 2000; 96:43-46.
- **Núñez FA**, López JL, de la Cruz AM, Finlay CM. Factores de riesgo de la infección por *Giardia lamblia* en niños de guarderías infantiles de Ciudad de La Habana, Cuba. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2003; 19:109-118.
- Pelayo L, Fraga J, **Núñez FA**, Mendoza D, Torres DR, Finlay CM. Genetic characterization by random polymorphic DNA analysis (RAPD) of 18 isolates of *Giardia lamblia* obtained from day care children. Exp Parasitol 2003; 104:162-166.
- **Núñez FA**. *Giardia lamblia*. En: Llop A, Valdés-Dapena M, Suazo JL, editores. Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo III. Capítulo 78. Ciudad de La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2001. p. 31-38.

**IX.2. Artículos del autor relacionados con el tema de tesis.**

- **Núñez FA**, Sanjurjo E, Finlay CM. Estudio de la Giardiasis en una comunidad rural. Rev Asoc Guatemalteca Parasit Med Trop 1989; 4:13-18.
- Alonso-Fiel R, **Núñez FA**, Mancebo T, Grandío O, García V. Pesquisaje de *Giardia lamblia* por los métodos de heces fecales directo e intubación duodenal. Rev Cubana Pediat 1990; 62:572-580.
- Sanjurjo E, Santana N, **Núñez FA**, Finlay CM. Enterobiasis en niños asistentes a círculos infantiles del municipio Artemisa en 1988. Rev Cubana Med Gen Integral 1990; 6:168-174.
- López JL, Barrero E, **Núñez FA**, Finlay CM, de Rojas V. Algunas características psicosociales de individuos con predisposición a *Trichuris trichiura*. Rev Cubana Med Trop 1993; 45:180-183.
- Castro J, Yovera J, **Núñez F**. Control de Calidad del Diagnóstico Coproparasitológico en Centros de Salud de Lima y Callao. Rev Peruana Epidemiol 1995; 8:18-22.
- **Núñez FA**, Hernández M, Finlay CM. A longitudinal study of enterobiasis in three day care centers of Havana city. Rev Inst Med trop São Paulo 1996; 38:129-132.
- **Núñez FA**, Ginorio D, Finlay CM. Control de la Calidad del Diagnóstico Coproparasitológico en la provincia de Ciudad Habana, Cuba. Cad Saúde Públ 1997; 13: 67-72.
- **Núñez FA**, Ginorio D, Cordoví R, Finlay CM. Intervención educativa para mejorar la calidad del diagnóstico coproparasitológico en la red de salud de Ciudad Habana, Cuba. Cad Saúde Públ 1998; 74:139-144.
- González MM, Londoño AL, **Núñez FA**. Control de la calidad del diagnóstico coproparasitológico. Revista de la Facultad Ciencias de la Salud. Universidad del Quindío 1998; 1:5-8.

- **Núñez FA**, Finlay CM. Adiestramiento en el diagnóstico de las parasitosis intestinales. *Cad Saúde Pública*, Rio de Janeiro 2001; 17: 719-724.
- Mendoza D, **Núñez FA**, Escobedo A, Pelayo L, Fernández M, Torres D, Cordoví RA. Parasitosis Intestinales en 4 círculos infantiles de San Miguel del Padrón, Ciudad de la Habana, 1998. *Rev Cubana Med Trop* 2001; 53:189-193.
- **Núñez FA**, González OM, Bravo JR, Escobedo AA, González I. Parasitosis Intestinales en niños ingresados en el Hospital Universitario Pediátrico del Cerro, La Habana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 2003; 55:19-26.
- **Núñez FA**, González OM, González I, Escobedo AA, Cordoví RA. Intestinal Coccidia in Cuban Pediatric Patients with Diarrhea. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:539-542.
- Escobedo AA, **Núñez FA**, Moreira I, Vega E, Pareja A, Almirall P. Comparison of chloroquine, albendazole, and tinidazole in the treatment of children with giardiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97: 367-371.
- Mendoza D, **Núñez FA**, Escobedo AA, Pelayo L, Fernández M, Torres D, Cordoví RA. Utilidad de dos métodos coproparasitológicos y su empleo en un ensayo terapéutico anti-giardiasis. *Rev Cubana Med Trop* 2003; 55:178-178.
- **Núñez FA**, Escobedo AA, Finlay CM. Eficacia de varios esquemas de tratamiento para la infección por *Giardia lamblia* en niños. *Rev Panam Infectol* 2004; 6:17-20.

### **IX.3. Presentación en eventos.**

Los resultados que se exponen en esta tesis han sido presentados en los siguientes eventos:

- 1- IV Congreso Cubano de Microbiología y I Congreso Cubano de Medicina Tropical. Ciudad de La Habana, Noviembre de 1993.
  - Predisposición a la giardiasis en niños de círculos infantiles.
  
- 2- V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical. V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. II Congreso Cubano de Medicina Tropical. Congreso 60 Aniversario del IPK. Ciudad de La Habana, 1997.
  - Giardiasis en niños preescolares. Cartel.
  
- 3- XIII Congreso Latinoamericano de Parasitología (FLAP), La Habana, Cuba, 17-23 de Noviembre de 1997.
  - Predisposición a la giardiasis en niños de círculos infantiles. Presentación Oral.
  
- 4- V Congreso Nacional de Gastroenterología y V Reunión Latinoamericana de Gastroenterología Pediátrica. Del 16 al 20 de Noviembre de 1998. Palacio de las Convenciones. La Habana.
  - Características clínicas y epidemiológicas de la “predisposición” a la giardiasis en niños de círculos infantiles. Cartel.
  
- 5- I Encuentro Expertos Cubano-Venezolano, Actualización en Alergia, Infectología, Pediatría y Neumología, días 6 al 9 de Mayo de 1999. Hotel Nacional. Invitado como conferencista y facilitador para el “Taller de Parasitología”.
  - Parasitosis Intestinales en Cuba: Grupos de Riesgo. Mesa Redonda.

- 6- IV Jornada Internacional de Infectología Pediátrica, y I Jornada de la Filial Cuba de SLIPE (Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica). Del 25 al 28 de Abril del 2001 en Guardalavaca, Holguín.
  - Giardiasis en niños de círculos infantiles. Cartel.
  
- 7- IX Congreso Latinoamericano de Infectología Pediátrica (SLIPE 2001). Del 15 al 20 de Agosto del 2001. En San Salvador, El Salvador.
  - Factores Biológicos y Moleculares asociados a la infección por *Giardia lamblia* en niños de guarderías infantiles. Conferencia.
  
- 8- The 13<sup>th</sup>. Japanese-German Symposium on Protozoan Diseases. 2-5 Octubre del 2002, Nagasaki, Japón.
  - Socioeconomic factors and hygienic habits associated with predisposition to giardiasis in day care children. A case-control study. Póster.
  
- 9- XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM), y VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, y el III Congreso Cubano de Medicina Tropical de Infectología Pediátrica. Del 11 al 15 de noviembre del 2002, Ciudad de La Habana, Cuba. Póster.
  - Caracterización genética de 18 aislamientos de *Giardia lamblia* por RAPD-PCR. Póster.
  
- 10- V Jornada Internacional de Infectología Pediátrica, organizada por la Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica (SLIPE). Del 24 al 27 de marzo del 2004. Centro de Convenciones “Plaza América”, Varadero, Cuba. Conferencia.
  - Parasitosis en el niño. Conferencia.

#### **IX.4. Distinciones Científico-técnicas relacionadas con el tema de tesis.**

##### **I- Resultados Relevantes**

- 1- Estudio longitudinal del Parasitismo Intestinal en círculos infantiles de Ciudad de La Habana. (1991). **Autor.**
- 2- Niveles de IgA secretora en niños con predisposición a la infección por *Giardia lamblia*. (1996). **Autor.**
- 3- Papel del parásito en la predisposición a la giardiasis en niños que asisten a círculos infantiles (2001). **Autor principal.**

##### **II- Premios.**

- 1- Algunas consideraciones en la Giardiasis de niños de círculos infantiles en Ciudad de La Habana. **Premio Nacional** de las Brigadas Técnicas Juveniles (BTJ), sello: “Forjadores del Futuro” (1995). **Autor Principal.**
- 2- Parasitosis intestinales en niños preescolares. **Premio en el concurso nacional** de trabajos científicos de SLIPE (Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica). (2001). **Autor Principal.**
- 3- Papel del parásito en la predisposición a la giardiasis en niños de círculos infantiles (2002). **Relevante** en el XIV Forum Municipal de Ciencia y Técnica. **Autor Principal.**
- 4- Papel del parásito en la predisposición a la giardiasis en niños de círculos infantiles (2002). **Destacado** en el XIV Forum Provincial Ramal de Ciencia y Técnica. **Autor Principal.**

## CAPÍTULO X. ANEXOS

### ANEXO I

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO Información a los Padres o tutores legales

##### Protocolo de Investigación:

##### “Giardiasis y otros parásitos intestinales en niños de círculos infantiles”

El Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), se propone realizar una investigación acerca del comportamiento de la infección por *Giardia* y otros parásitos intestinales en niños de tres círculos infantiles, de Ciudad de La Habana.

A cada niño se le recogerán tres muestras de heces cada 6 meses durante los dos años que dure la investigación, lo que coincidirá respectivamente con los meses de Mayo y Noviembre de cada año. La enfermera del círculo le entregará a cada padre o tutor los frascos donde recogerán las muestras, las que se analizarán en el Laboratorio Nacional de Parasitismo Intestinal del IPK.

Además a cada padre que dé su autorización para participar en el estudio, se le recogerán datos clínicos y epidemiológicos del niño en una entrevista individual con el médico parasitólogo, estos datos se recogerán en un modelo de encuesta confeccionado al efecto. En caso de que al niño se le diagnostique infección con *Giardia* u otro parásito intestinal el médico del círculo infantil le indicará el tratamiento apropiado.

Esta investigación será útil para conocer los patrones de infección a diferentes parasitosis en los niños, y los aspectos epidemiológicos, y biológicos relacionados con el parasitismo en nuestros niños de círculos infantiles.

Declaro que he sido informado (a) del objetivo del estudio, así como la importancia de los resultados de la investigación para la adopción de medidas que conduzcan a un mejor control de las enfermedades parasitarias intestinales.

Para constancia de lo expuesto con anterioridad firmamos este documento a los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_.

Nombre del niño \_\_\_\_\_

Nombre del padre o tutor \_\_\_\_\_

Firma del padre o tutor: \_\_\_\_\_

## ANEXO 2

### ENCUESTA PARA NIÑOS DE CÍRCULOS INFANTILES

Encuesta No. ....

Nombre y Apellidos del Niño: \_\_\_\_\_

Nombre y apellidos de los padres o tutores: \_\_\_\_\_

Nombre del Círculo Infantil: \_\_\_\_\_

Año de Vida: \_\_\_\_\_

Dirección particular: Calle \_\_\_\_\_ No. \_\_\_ entre \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_

Barrio \_\_\_\_\_ Municipio \_\_\_\_\_ Provincia \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_ (kg.) Talla: \_\_\_\_\_ (cm.)

Fecha de llenado de la encuesta: \_\_\_\_\_

(Día/Mes/Año)

1. EDAD: \_\_\_\_ (Años cumplidos)

2. FECHA DE NACIMIENTO: \_\_\_\_\_

(Día/Mes/Año)

3. SEXO.

Masculino SI\_\_ NO\_\_

Femenino. SI\_\_ NO\_\_

4. Color de Piel.

? Blanco SI\_\_ NO\_\_

? Negro SI\_\_ NO\_\_

? Mestizo SI\_\_ NO\_\_

? Amarillo SI\_\_ NO\_\_

5. Lactancia Materna

SI\_\_ NO\_\_

Duración \_\_\_\_\_ (Meses)

6. No. de miembros núcleo familiar: \_\_\_\_\_

#### 7. SÍNTOMAS EN LOS ÚLTIMOS 6 MESES.

- Diarreas SI\_\_ NO\_\_

- Dolor abdominal SI\_\_ NO\_\_

- Vómitos SI\_\_ NO\_\_

- Nauseas SI\_\_ NO\_\_

- Anorexia SI\_\_ NO\_\_

- Pérdida de peso SI\_\_ NO\_\_

- Prurito anal SI\_\_ NO\_\_

- Pérdida de apetito SI\_\_ NO\_\_

- Fatigas SI\_\_ NO\_\_

- Flatulencia SI\_\_ NO\_\_

- Dolor de cabeza SI\_\_ NO\_\_

- Urticaria SI\_\_ NO\_\_

- Rinitis alérgica SI\_\_ NO\_\_

- Otros. (Cuáles?: \_\_\_\_\_)

- Ninguno SI\_\_ NO\_\_

#### 8. AUSENCIAS AL CÍRCULO INFANTIL POR EPISODIOS DE DIARREAS EN LOS ÚLTIMOS 6 MESES.

SI\_\_ NO\_\_

No. de Ausencias: \_\_\_\_\_

No. de Episodios diarreicos: \_\_\_\_\_

---

### PARA SER LLENADO POR EL LABORATORIO

#### Resultados del 1er. Corte transversal (0 mes-Comienzo)

	Parásitos diagnosticados		
	Directo	Ritchie	Total
Muestra 1			
Muestra 2			
Muestra 3			
Total			



**Resultados del 2do. Corte transversal (6 meses)**

	Parásitos diagnosticados		
	Directo	Ritchie	Total
Muestra 1			
Muestra 2			
Muestra 3			
Total			

**Resultados del 3er. Corte transversal (12 meses)**

	Parásitos diagnosticados		
	Directo	Ritchie	Total
Muestra 1			
Muestra 2			
Muestra 3			
Total			

**Resultados del 4to. Corte transversal (18 meses)**

	Parásitos diagnosticados		
	Directo	Ritchie	Total
Muestra 1			
Muestra 2			
Muestra 3			
Total			

**ANEXO 3**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**  
**Información a los Padres o tutores legales**

**Protocolo de Investigación:**

**“Estudio caso-control en los pacientes re infectados con *Giardia lamblia*”**

El Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"(IPK), se propone realizar una investigación acerca de los factores de riesgo y las condiciones de vida de los niños que asisten al círculo infantil y se les diagnosticó infección con *Giardia lamblia* en tres o más ocasiones durante la investigación (grupo de casos) y compararla con la de niños que también asisten a los mismos círculos pero a los que nunca se les diagnosticó infección con *Giardia* (grupo control).

Si el padre o tutor legal autoriza a participar en el estudio, los investigadores visitarán las casas de los niños y a cada padre o tutor se le recogerán datos clínicos y epidemiológicos en una entrevista individual. Estos datos se recogerán en un modelo de encuesta confeccionada al efecto. Esta investigación será útil para conocer los patrones de infección de este parásito en los niños, y los aspectos epidemiológicos, relacionados con su transmisión.

Declaro que he sido informado (a) del objetivo del estudio, así como la importancia de los resultados de la investigación para la adopción de medidas que conduzcan a un mejor control de las enfermedades parasitarias intestinales.

Para constancia de lo expuesto con anterioridad firmamos este documento a los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_.

Nombre del niño \_\_\_\_\_

Nombre del padre o tutor \_\_\_\_\_

Firma del padre o tutor: \_\_\_\_\_

#### ANEXO 4

### ENCUESTA PARA NIÑOS DE CÍRCULOS INFANTILES. ESTUDIO DE CASOS-CONTROLES

Encuesta No. \_\_\_\_\_.

Nombre y Apellidos del Niño: \_\_\_\_\_

Nombre y apellidos de los padres o tutores: \_\_\_\_\_

Nombre del Círculo Infantil: \_\_\_\_\_

Dirección particular: Calle \_\_\_\_\_ No. \_\_\_\_\_ entre \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_

Barrio: \_\_\_\_\_ Municipio: \_\_\_\_\_ Provincia: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_ (años cumplidos). Año de vida en el círculo: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ SEXO: Masculino \_\_\_\_ Femenino \_\_\_\_

(Día/Mes/Año)

Fecha de llenado de la encuesta: \_\_\_\_\_

(Día/Mes/Año)

---

#### SOBRE FACTORES SOCIOECONÓMICOS Y CULTURALES

##### A). No. Integrantes en la Vivienda

Grupo de Edad	Género o Sexo		Total
	Masculino	Femenino	
Menor de 1 año			
De 1 a 4 años			
De 5-16 años			
De 17-55 años			
De 56-60 años			
De 61-70 años			
De 71 años y más			
Total			

B) Salario total devengado por el núcleo familiar. \_\_\_\_\_ (pesos cubanos)

C) Percápita Familiar \_\_\_\_\_ (pesos cubanos).

D) Nivel de escolaridad de la madre \_\_\_\_\_ (último grado vencido)

E) Nivel de escolaridad del padre \_\_\_\_\_ (último grado vencido)

F) Presencia de equipos electrodomésticos:

1. Radio SI \_\_\_\_ NO\_\_ ¿Cuántos? \_\_\_\_\_

2. Refrigerador SI \_\_\_\_ NO\_\_ ¿Cuántos? \_\_\_\_\_

3. Ventilador SI \_\_\_\_ NO\_\_ ¿Cuántos? \_\_\_\_\_

4. Televisor SI \_\_\_\_ NO\_\_ ¿Cuántos? \_\_\_\_\_

5. Batidoras SI \_\_\_\_ NO\_\_ ¿Cuántos? \_\_\_\_\_

6. Videos SI \_\_\_\_ NO\_\_ ¿Cuántos? \_\_\_\_\_

7. Otros: \_\_\_\_\_

G) Composición de la Vivienda

- Portal SI\_\_ NO\_\_ - Sala-Comedor SI\_\_ NO\_\_  
- Sala SI\_\_ NO\_\_ - Cocina SI\_\_ NO\_\_  
- Comedor SI\_\_ NO\_\_ - Sala-Comedor- Cocina SI\_\_ NO\_\_
- Dormitorios SI\_\_ NO\_\_ Cantidad-No. \_\_\_\_  
- Número de personas por dormitorio \_\_\_\_  
- Número de personas por cama \_\_\_\_  
- Número de matrimonios o uniones conyugales durmiendo en una cama \_\_\_\_

---

**SOBRE HÁBITOS HIGIÉNICOS**

1- ¿Como usted lava los vegetales?

- a) ¿Lava las verduras por mazos?. Si\_\_ No\_\_  
b) ¿Lava las verduras hoja por hoja?. Si\_\_ No\_\_  
c) ¿Cómo usted lava las verduras?

En la pila \_\_\_\_ Introduciéndola en recipientes \_\_\_\_ Otros \_\_\_\_  
Lavado de Vegetales (para ser llenado por el entrevistador)

Correcto \_\_\_\_ Incorrecto \_\_\_\_

2- ¿De donde proviene el agua de beber en su casa?

- De la pila \_\_\_\_ De pozo \_\_\_\_  
De pipa \_\_\_\_ De presa \_\_\_\_  
Agua Mineral \_\_\_\_ Otros \_\_\_\_  
¿Cuál? \_\_\_\_\_

- ¿Almacena usted el agua de beber en algún depósito? SI \_\_ NO \_\_  
- ¿Ese depósito se utiliza sólo para agua en el hogar? SI \_\_ NO \_\_  
- ¿Hierve usted al agua? SI \_\_ NO \_\_  
- Enséñenos el recipiente en que usted hierve el agua  
Sí se corresponde las incrustaciones con la respuesta anterior \_\_\_\_  
No se corresponde las incrustaciones con la respuesta anterior \_\_\_\_  
- Después de hervida el agua ¿Cómo la guarda?  
Tapada \_\_\_\_ Destapada \_\_\_\_

3- Las reglas de higiene plantean que todo el mundo debe lavarse las manos antes de sentarse a comer y después de hacer las necesidades. Sin embargo, sabemos que no todas las personas tienen la posibilidad de hacerlo.

¿En qué caso está usted?

- \_\_\_\_ Se lava las manos siempre antes de comer y después de las necesidades.  
\_\_\_\_ Se lava las manos en ocasiones para ambas cosas.  
\_\_\_\_ Se lava las manos siempre antes de comer y en ocasiones después de las necesidades.  
\_\_\_\_ Se lava las manos en ocasiones antes de comer y siempre después de las necesidades.  
\_\_\_\_ Nunca se lava las manos para una u otra cosa.

¿Su hijo se lava las manos antes de sentarse a comer?

Siempre \_\_\_\_ Frecuentemente \_\_\_\_ A veces \_\_\_\_ Nunca \_\_\_\_

¿Le lava usted las manos a su hijo después de hacer las necesidades?

Siempre \_\_\_\_ Frecuentemente \_\_\_\_ A veces \_\_\_\_ Nunca \_\_\_\_

## ANEXO 5

### Protocolos de trabajo

#### 1. Cultivo de *Giardia lamblia*.

Fórmula del Medio de Cultivo axénico TYI-S-33, para crecimiento “in vitro” de trofozoitos de *Giardia lamblia*

<b>Reactivo</b>	<b>500 ml</b>	<b>1000 ml</b>	<b>10 L</b>
Triptona (digestión pancreática de caseína)	10 g	20 g	200 g
Extracto de levadura	5 g	10 g	100 g
Dextrosa (D-Glucosa)	5 g	10 g	100 g
NaCl	1 g	2 g	20 g
L-Cisteína	1 g	2 g	20 g
Ácido Ascórbico	0,1 g	0,2 g	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g	1 g	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g	0,6 g	6 g
Sulfato Férrico de Amonio (0,224 g/10 ml H <sub>2</sub> O bidestilada)	0,5 ml	1 ml	10 ml
Bilis Bovina comercial	0,25 g	0,5 g	5 g

1. Ajustar pH a 7,0-7,2, con NaOH 2N. Esterilizar por filtración, primero con membranas de 0,8 y 0,45  $\mu\text{m}$ , y finalmente con membranas de 0,22  $\mu\text{m}$ .
2. Almacenar a -20° C.
3. En el momento de usar se coloca suero bovino al 10% (puede ser de ternera con calostro o sin calostro, o fetal) inactivado por calor (56°C por 20 min).
4. Durante el crecimiento *in vitro* los organismos se desarrollan en tubos de cristal bien sellados, los que se llenan casi por completo con medio de cultivo. Cuando esto sea imposible, como por ejemplo cuando se clona o se hacen diluciones en placas de 96 pocillos, entonces se usa una bolsa sellada conteniendo algún generador de anaerobiosis.

## **2. Subcultivo.**

- a) Poner 5 ml de medio fresco en tubos 13 x 100.
- b) Adicionar 0,2–0,5 ml de medio con parásitos en fase logarítmica de crecimiento, previamente enfriados en baño de hielo por 10 min.
- c) Incubar a 37° C.

Nota: Los cultivos se deben monitorear diariamente al microscopio y los subcultivos deben realizarse entre las 48 y 72 h según el aislamiento.

## **3. Criopreservación de los parásitos.**

### **3.1. Congelación**

- a) Tomar un cultivo con la monocapa formada.
- b) Poner en baño de hielo por 10 min.
- c) Centrifugar a 300 g por 5 min.
- d) Remover el sobrenadante.
- e) Adicionar 5 ml de medio fresco y mezclar.
- f) Transferir 0,5 ml para un tubo de criopreservación y adicionar 0,5 ml de Dimetil Sulfoxido (DMSO) al 10% en agua destilada.
- g) Poner los tubos a -20° C por 1 hora ( importante deben congelarse)
- h) Pasar inmediatamente para Nitrógeno líquido -196 °C.

Nota : Todo el proceso debe ser con material estéril, en el flujo laminar.

### **3.2. Descongelación**

- a) Sacar los tubos del nitrógeno líquido y poner en un baño a 37° C.
- b) Pasar para un tubo 13 x 100 y poner 5 ml de medio fresco.
- c) Poner a 37° C por 4 h, si los parásitos se han adherido al cristal cambiar el medio.
- d) Incubar a 37° C por 24 h y reemplazar el medio nuevamente.

Nota: Todas las etapas deben realizarse con esterilidad.

## ANEXO 6

Datos clínicos y epidemiológicos principales de los niños en los que se obtuvieron los 18 aislamientos de *G. lamblia*.

<b>Aislamiento</b>	<b>Características</b>
C3	edad 5 años, signos alérgicos, (++++)
C4	edad 4 años, asintomático (- -+)
C5	edad 2 años, episodios diarreicos, (++++)
C6	edad 2 años, episodios diarreicos,(++++)
C7	edad 4 años, episodios diarreicos,(++++)
C8	edad 4 años, asintomático, (- -++)
C10	edad 2 años, asintomático (-+ -+)
C11	edad 3 años, episodios diarreicos, (++ -+)
C13	edad 3 años, asintomático (- - + -)
C17	edad 2 años, ND (- - - +)
C19	edad 3 años, episodios diarreicos, (++ - +)
C20	edad 3 años, asintomático, (- + - +)
C25	edad 4 años, signos alérgicos, (++++)
C27	edad 4 años, asintomático, (- - - +)
C28	edad 4 años, asintomático, (- - - +)
C33	edad 4 años, asintomático, (- - + +)
C36	edad 2 años, cuadros diarreicos, (++ -+)

+ Examen parasitológico semestral positivo a infección por *Giardia lamblia*.

- Examen parasitológico semestral negativo a infección por *Giardia lamblia*.

ND: Dato no disponible.