



**ESTANDARIZACIÓN DE UNA PRUEBA MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN
DE *Giardiavirus* EN MUESTRAS DE MATERIA FECAL**

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud Programa

Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de Grado

Bogotá D.C, Colombia 2024



**ESTANDARIZACIÓN DE UNA PRUEBA MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN
DE *Giardiavirus* EN MUESTRAS DE MATERIA FECAL**

Ruth Nayely Rodríguez Moya

Asesora Interna

Diana Marcela Parra, MSc.

Asesor Externo

Andrés Camilo González, MSc.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud Programa

Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de Grado

Bogotá D.C, Colombia 2024



**ESTANDARIZACIÓN DE UNA PRUEBA MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN
DE *Giardiavirus* EN MUESTRAS DE MATERIA FECAL**

APROBADA _____

JURADOS _____

ASESORES _____

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud Programa

Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de Grado

Bogotá D.C, Colombia 2024

«Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.

*Un científico en su laboratorio no es solo un técnico: es
también un niño colocado ante fenómenos naturales
que le impresionan como un cuento de hadas»*

Marie Curie

Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecerle a la institución educativa por su participación en el estudio, así como a todos los menores y acudientes correspondientes.

Agradezco a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por su colaboración en el desarrollo de la presente investigación.

Agradezco de manera especial a mis asesores Marcela Parra y Andrés González por su correcta disposición, comprensión y apoyo durante la investigación, por el tiempo dedicado en cada uno de los momentos necesarios, por su guía y enseñanzas que me dejaron a lo largo del desarrollo del estudio. Gracias por todos los conocimientos aportados como persona y de crecimiento profesional que me dejan tras la culminación de este proyecto.

En agradecimiento especial al grupo de investigación GIBMCAI que durante este proceso estuvieron como apoyo incondicional en cada uno de los pasos dejando enseñanzas de vida y quienes siempre aportaron con sus conocimientos y acompañamiento a mi crecimiento personal y profesional.

Quiero agradecer también a mis seres queridos y amigos que me acompañaron durante todo este proceso dando su apoyo y comprensión en cada uno de los pasos que creyeron pertinentes.

Por último, agradezco a los jurados quienes se tomaron el tiempo de leer y evaluar la presente investigación.

Tabla de contenido

1. Resumen.....	9
2. Introducción	10
3. Formulación del problema	12
3.1. Pregunta problema	12
3.2. Planteamiento del problema	12
4. Objetivos	13
4.1. Objetivo General.....	13
4.2. Objetivos específicos	13
5. Justificación	14
6. Impacto esperado	15
7. Usuarios directos e indirectos.....	15
8. Antecedentes	16
9. Marco teórico.....	27
9.1. Generalidades de <i>Giardia intestinalis</i>	27
9.1.1. Taxonomía.....	27
9.1.2. Ciclo de vida	28
9.1.3. Características morfológicas de <i>Giardia intestinalis</i>	30
9.1.4. División celular	31
9.1.5. Genoma.....	34
9.1.6. Ensamblajes.....	36
9.1.7. Epidemiología de <i>Giardia intestinalis</i> en América latina	39
9.1.8. Factores de virulencia	40
9.2. Generalidades de la giardiasis	42
9.2.1. Definición de la enfermedad.....	42
9.2.2. Trasmisión de la enfermedad.....	44
9.2.3. Diagnóstico de la enfermedad	45
9.2.4. Tratamiento de la enfermedad	47
9.2.5. Manifestaciones clínicas y severidad de cuadro clínico.....	48

9.2.6. Respuesta inmunológica de la giardiasis	51
9.3. <i>Giardiavirus</i>	52
9.3.1. Generalidades	52
9.3.2. Genoma	53
9.3.3. Replicación y traducción	56
9.3.4. Relación virus-parasito	57
9.3.5. Mecanismos de resistencia	58
10. Metodología	59
10.1. Tipo de estudio	60
10.2. Consideraciones éticas.....	60
10.3. Encuesta sociodemográfica	60
10.4. Recolección de muestras en población infantil.....	61
10.5. Coprológico directo.....	61
10.6. Cultivo de <i>Giardia intestinalis</i> cepa WB y G2M	62
10.7. Diseño de primers.....	62
10.8. Extracción de ácidos nucleicos.....	63
10.9. Retrotranscripción	64
10.10 Identificación de <i>G. intestinalis</i> mediante PCR.....	65
10.11. Estandarización de la detección de GLV en la cepa G2M de <i>G. intestinalis</i>	66
10.12. Identificación de GLV en muestras de materia fecal.....	67
10.13. Secuenciación de muestras positivas para <i>Giardia intestinalis</i>	68
11. Resultados	69
11.1. Análisis descriptivo de las variables sociodemográficas	69
11.1.1. Características sociodemográficas	70
11.1.2. Cuidador del menor	71
11.1.3. Consumo y acceso a los alimentos.....	72
11.1.4. Características de vivienda.....	72
11.1.4. Hábitos higiénico sanitarios	74
11.1.5. Mascotas	76
11.1.6. Aspectos clínicos de los menores.....	77
11.2. Análisis descriptivo de los hallazgos parasitológicos.....	78

11.3. Evaluación de la calidad de ARN total cepas G2M y WB.....	81
11.4. Detección de <i>G. intestinalis</i> por PCR anidada en muestras de materia fecal	82
11.5. Estandarización de la detección de GLV en la cepa G2M de <i>G. intestinalis</i>	84
11.5. Detección de GLV en muestras de materia fecal.....	86
12. Discusión.....	87
10. Limitaciones.....	95
11. Conclusión	95
12. Anexos	97
13. Referencias bibliográficas.....	98

1. Resumen

La giardiasis es una enfermedad gastrointestinal que afecta principalmente a niños en edad escolar; es causada por *Giardia intestinalis*, un parásito protozooario caracterizado por poseer dos núcleos transcripcionalmente activos y por la presencia de 8-11 ensamblajes y subensamblajes definidos según la especificidad del huésped. La transmisión de la enfermedad se da por vía fecal-oral y está asociada a condiciones higiénico-sanitarias deficientes. Recientemente diferentes autores afirman la presencia de virus dsARN en parásitos como *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania* spp. y *Giardia* spp. Gracias a las investigaciones realizadas se sabe que *Trichomonasvirus* le otorga factores de resistencia a *T. vaginalis* y que *Leishmanivirus* exacerba la enfermedad, sin embargo, las investigaciones realizadas hasta el momento no han permitido conocer el papel que cumple *Giardiavirus* (GLV) en *G. intestinalis* y/o en la giardiasis ya que no se cuenta con un método estandarizado para la detección del virus en muestras clínicas. Es por eso que la presente investigación pretende diseñar una prueba de biología molecular para la detección de GLV en muestras de materia fecal. Adicionalmente se realizó un muestreo a niños pertenecientes a un colegio ubicado en la localidad Rafael Uribe Uribe en Bogotá D.C. con el fin de identificar protozoos intestinales y reportar los ensamblajes de *G. intestinalis* encontrados en la población de estudio. Por último, se aplicó a ese set de muestras la prueba estandarizada para la detección de GLV.

2. Introducción

Las parasitosis intestinales son reportadas con altas frecuencias en países en vías de desarrollo debido a que se encuentran muy relacionadas con el predominio de las necesidades básicas insatisfechas (NBI) y los hábitos higiénico-sanitarios, es por ello que, en Colombia, en el 2015 se publicó la Encuesta Nacional de Parasitismo Intestinal en Población Escolar con el propósito de conocer prevalencia de protozoos y helmintos intestinales en el país (1–3). En el estudio se encuestaron a 7.860 niños entre los 7 y 10 años de edad, de los cuales se recolectaron muestras de materia fecal a 6.045 niños, donde se encontró que el 29,62% de la población estudiada estaba infectada con algún geohelminto, siendo la provincia de La Amazonía y la Sierra Nevada de Santa Marta las que presentaron mayor proporción global de infección (81,6% y 74,05%) respectivamente (1). Adicionalmente se encontró que el protozoo intestinal más prevalente fue *Blastocytis* spp., con un 60,3% en la Provincia Biogeográfica Norandina; seguido por el complejo *Entamoeba histolytica/dispar* con un 48,0% en la Provincia Biogeográfica Sierra Nevada de Santa Marta y *G. intestinalis* con un 37,3% en La Amazonía (1). Con esta encuesta se determina que existe una prevalencia a nivel nacional de *Blastocytis* spp. (60%), protozoos comensales (46%), Tricocéfalo (18,4%), *E. histolytica* (17%), *G. intestinalis* (15,4%), *Ascaris lumbricoides* (11,3%), uncinarias (6,4%) y *Cryptosporidium* spp (0,5%) en población infantil (1). Por otro lado, en Colombia *G. intestinalis* presenta una prevalencia del 13,5% en población general y en niños de 1 a 4 años de edad es del 28% (4,5).

La giardiasis es una parasitosis intestinal transmitida por vía fecal-oral causada por el protozoo flagelado *G. intestinalis*, el cual afecta el intestino delgado produciendo un

cuadro agudo de dolor abdominal y enfermedad diarreica aguda, o una afección crónica que puede llegar a tener implicaciones en el desarrollo cognitivo de la persona que la padece (1,2). El parásito impide el proceso de absorción de nutrientes lo que conlleva a un desequilibrio electrolítico que desemboca en una diarrea secretora la cual es abundante y lientérica; sin embargo, la mayoría de las personas que padecen giardiasis cursan cuadros asintomáticos que posteriormente se vuelven crónicos, los cuales llegan a generar consecuencias a largo plazo y extraintestinales (1,2,6–10).

La sintomatología causada durante la enfermedad es extremadamente variable, sin embargo, *G. intestinalis* puede influir en los procesos fisiológicos que suceden dentro de la luz intestinal e interferir con el proceso digestivo como la apoptosis de los enterocitos, la pérdida de la función de la barrera epitelial, hipersecreción de Cl^- , mala absorción de glucosa, agua y Na^+ , acortamiento difuso de las microvellosidades, afectación de la respuesta inmune (mastocitos, células T e IgA), inhibición de enzimas y tripsina, reducción de la actividad de las disacaridasas, consumo de arginina e interferencia con el metabolismo de las sales biliares (7,9,11–13). Adicionalmente, el parásito cuenta con factores de virulencia que le permiten realizar la colonización del intestino delgado de manera más efectiva o que le permiten evadir la respuesta inmune; dentro de los cuales encontramos el disco ventral, las lectinas de superficie, motilidad flagelar, las proteínas de variables de superficie (VSP) o variación antigénica, producción de antiinflamatorios y su proceso de enquistación (7,9,12,14–17).

Existen virus con la capacidad de afectar la morfología, los fenotipos, la patogenicidad y las tasas de crecimiento de los parásitos protozoarios a los cuales infecta haciendo que las

interacciones huésped-parásito se vuelvan más complejas como es el caso de GLV, un virus de ARN bicatenario capaz de infectar al protozoo *G. intestinalis* (18–20).

3. Formulación del problema

3.1. Pregunta problema

¿Cómo se puede diseñar una prueba de biología molecular (PCR) para la detección de *Giardiavirus* en muestras de materia fecal?

3.2. Planteamiento del problema

En Colombia se presentan bastantes casos de parasitosis intestinales en niños en edad escolar, sin embargo, muchas de estas parasitosis se cursan y se resuelven sin una determinación específica del agente causal, esto hace que sea difícil establecer frecuencias de los parásitos intestinales causantes de la enfermedad. Dentro de los parásitos que causan enfermedad intestinal en niños en el país está *G. intestinalis*, un parásito protozoario en el cual adicionalmente se ha documentado la presencia de un virus llamado GLV.

Para entender la participación de GLV en el curso de la enfermedad causada por *G. intestinalis* se hace perentorio contar con una identificación adecuada del virus en muestras clínicas. Sin embargo, los datos obtenidos a la fecha de la detección del virus son escasos y las aproximaciones metodológicas han variado. Es por ello que el presente

trabajo planea la estandarización de una prueba de biología molecular que permita la identificación de GLV en muestras de materia fecal.

Es importante resaltar que en Colombia no hay publicaciones sobre el tema y este estudio es la primera aproximación a la detección de este virus, proponiendo una PCR en tiempo real de gran sensibilidad y que adicionalmente ira seguido de un piloto con muestras de materia fecal provenientes de un ejemplar de niños entre los 5 y 7 años de edad.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Diseñar y aplicar una prueba de biología molecular para la detección de *Giardiavirus* en muestras de materia fecal.

4.2. Objetivos específicos

- Reportar los ensamblajes de *Giardia intestinalis* en el set de muestras del estudio.
- Estandarizar la prueba de biología molecular para la detección de *Giardiavirus* usando la cepa de *Giardia intestinalis* G2M (GLV+).
- Aplicar la prueba de biología molecular para la detección de *Giardiavirus* en un set de muestras de materia fecal.

5. Justificación

La giardiasis es una enfermedad intestinal que afecta principalmente a niños menores de 5 años en Colombia, un país en vía de desarrollo con condiciones higiénico-sanitarias deficientes las cuales hacen que la prevalencia de las parasitosis intestinales sea muy frecuente en la población principalmente en las zonas periféricas del territorio colombiano (1,3,21). Al ser una enfermedad que se presenta en algunos casos como asintomática su diagnóstico es difícil, lo que hace que las interacciones huésped patógeno no estén totalmente esclarecidas para comprender la pato biología de la enfermedad, además de la complejidad reflejada entre el parásito y sus factores de virulencia frente al desarrollo de la enfermedad (5,11,12).

Es por ello que la estandarización de una prueba de biología molecular que permita la detección de GLV en el protozooario *G. intestinalis* en muestras de heces fecales abriría las puertas a nuevas posibilidades de investigación para la comunidad científica. Estas nuevas investigaciones podrían aportar a la comprensión de la relación virus-parasito-huésped; avances científicos que tendrían gran impacto en la población colombiana.

Adicionalmente, la implementación y uso de esta prueba en otras investigaciones o encuestas nacionales que se realicen a futuro permitiría conocer el panorama de las parasitosis intestinales en Colombia además de la obtención de datos epidemiológicos sobre la presencia, ausencia o distribución de GLV en el parásito protozooario *G. intestinalis* en el territorio colombiano como causante de la giardiasis, así como brindar información sobre mejoras en la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

La detección de GLV en muestras de materia fecal proveniente de pacientes con giardiasis es algo novedoso y brindaría un mejor panorama de la giardiasis.

Se ha demostrado que otros virus de parásitos protozoarios pertenecientes a la familia *Totiviridae* tienen implicaciones en la enfermedad que causa el protozoo al que infectan, como es el caso de *Trichomonasvirus* y *Leishmaniavirus* capaces de infectar a *T. vaginalis* y *Leishmania* spp. respectivamente (18,20). Estos datos reflejan que GLV puede tener un comportamiento similar o relacionado con otros virus pertenecientes a la familia *Totiviridae* en cuanto a la patogenicidad de *G. intestinalis* en el transcurso de la enfermedad al compartir relaciones filogenéticas con estos.

6. Impacto esperado

La presente investigación tiene un impacto significativo en la comunidad científica en Colombia, siendo así la primera investigación sobre la identificación de GLV en *G. intestinalis* presente en muestras de materia fecal en el país. Adicionalmente, pretende abrir las puertas a nuevas investigaciones que a futuro permitan avanzar en la comprensión de la giardiasis y en la relación virus-parasito.

7. Usuarios directos e indirectos

Los usuarios directos son la comunidad científica y los profesionales del área de la salud, ya que son quienes día a día se ven enfrentados a la realidad colombiana de diversas

parasitosis que aún se presentan en el país, esta investigación abrirá las puertas para comprender mejor la evolución de la enfermedad y por ende permitirá en un futuro la toma de decisiones en la salud pública. Los usuarios indirectos es toda la población colombiana, principalmente los niños en edad escolar que es en quienes *G. intestinalis* tiene una mayor prevalencia.

8. Antecedentes

En 1986 Wang A. y Wang C. encontraron en muestras purificadas de trofozoítos de *G. intestinalis* de la cepa Portland I una banda de 7,0 Kb teñible con bromuro de etidio en el gel de electroforesis de agarosa cuando se encontraban preparando una biblioteca de ADNc de *G. intestinalis*; sin embargo, esta banda no se observaba en la cepa WB (19). Adicionalmente la banda observada en la cepa Portland I mostró disminución de susceptibilidad hacia las ribonucleasas con el aumento de la fuerza iónica, lo que sugiere que la banda corresponde a ARN de doble cadena (dsARN) (19). Este descubrimiento se confirmó mediante microscopia electrónica obteniéndose así micrografías electrónicas de las muestras purificadas donde se evidenció la presencia de partículas esféricas de 33 nm en los dos núcleos de *G. intestinalis* (19). Por otro lado, en esa misma investigación se expuso el producto obtenido a ADNasa I y ADN polimerasa sin tener cambios significativos por lo cual los autores indican que la banda de 7,0 Kb no podía ser considerado como ADN (19).

Este descubrimiento fue similar al realizado en 1987 por Jonckeheere y Gordts quienes aislaron ADN de *G. intestinalis* de 38 aislados provenientes de diferentes áreas geográficas y con un origen tanto humano como animal con el fin de hacer una tipificación del mismo, encontrando la banda en el gel de agarosa antes mencionada por Wang y Wang; agregando que el proceso de transfección del virus de dsARN es posible debido a que este se encuentra en el medio de cultivo del trofozoíto de *G. intestinalis* (22). Durante este estudio se determinó que la falla en la transfección por parte del virus hacia los trofozoítos de *G. intestinalis* dependían de la susceptibilidad de la cepa y su capacidad de adaptación a la infección (22). Por otro lado, ellos determinan que no hay correlación con la presencia del virus en el trofozoíto de *G. intestinalis* con la resistencia a anti protozoarios como el metronidazol, cloroquina, paramicina y pririmetamina que este microorganismo presenta, así como que no se puede relacionar la presencia de GLV con la presentación de un cuadro sintomático o asintomático (22).

En 1988 Miller y colaboradores identificaron las cepas de *G. intestinalis* susceptibles y resistentes a la infección por GLV partiendo de 38 aislados de *G. intestinalis* provenientes tanto de animales como humanos. Se evidenció que 28 aislados de *G. intestinalis* carecían del virus, de los cuales 19 podían ser infectados con GLV y los 9 restantes presentaban una resistencia a la infección por el virus (23). Por lo cual se evidencia que la presencia o ausencia para la infección por GLV no depende del mamífero al que infecta el protozoario *G. intestinalis* como se observa en la tabla 1 (23). Con este estudio se evidenció que la cepa Portland I ATCC 30888 no cuenta con el virus de dsARN identificado por Wang y Wang en la cepa Portland I CCW (23).

Tabla 1. Susceptibilidad de *G. intestinalis* a la infección por GLV (23). Traducida de: Identification of Giardia lamblia Isolates Susceptible and Resistant to Infection by the Double-Stranded RNA Virus (23).

Aislado	Origen	Presencia de GLV original	Susceptibilidad a la infección con GLV
Portland I - ATCC	Humano	-	+
Portland I – ATCC (Clon 1)	Humano	-	+
Portland I – ATCC (Clon 2)	Humano	-	+
Portland I – ATCC (Clon 3)	Humano	-	+
Portland I – ATCC (Clon 4)	Humano	-	+
Portland I – ATCC (Clon 5)	Humano	-	+
Portland I - CCW	Humano	+	
WB-ATCC	Humano	-	+
WB-ATCC (Clon 1)	Humano	-	+
WB-ATCC (Clon 2)	Humano	-	+
WB-ATCC (Clon 3)	Humano	-	+
WB	Humano	-	+
WB A-6 6E7S (C)	Humano	-	+
WB A-6 6E7R (C)	Humano	-	+
GS/M (NIH:1083-1)	Humano	-	+
Isr (NIH:1183)	Humano	-	+
GS/M-T	Humano	-	-
RS	Humano	+	
Ac (NIH:0484-1)	Humano	-	-
E-9M (NIH: 0285-9)	Humano	-	-
CM (NIH:0883-2)	Humano	-	-
N (NIH:0782)	Humano	-	-
DH/M (NIH:0284-2)	Humano	+	
LT	Humano	+	
G3M	Humano	+	
G1M	Humano	-	-
E4/E (NIH:0285-4)	Humano	+	
G2/M	Humano	+	
JH (NIH:1182)	Humano	-	-
T41K	Humano	-	+
TY1K	Humano	-	+
GP-1	Conejillo de indias	+	
CAT-1	Gato	+	
UPV:1085:1	Gato	-	-
Be-1 (IP-0482:1)	Castor	-	+
Be-2 (IP-0583:1)	Castor	+	
UPV:0985:2	Llama	-	-
UPV:1285:1	Oveja	+	

En ese mismo año Miller y colaboradores Purificaron partículas virales de GLV de la cepa WB de *G. intestinalis* infectada para realizar la caracterización de su genoma, lo

que les permitió determinar que GLV no tenía homología con *Trichomonasvirus* ni con el virus asesino de *Saccharomyces cerevisiae*. Por otro lado, este estudio permitió estimar que una célula de *G. intestinalis* alberga hasta 5×10^5 partículas virales sin que se afecte el crecimiento del parásito (24). Sin embargo, al analizar la relación virus/parásito sugieren que con una cantidad de 500.000 partículas virales de GLV en una célula (trofozoíto) detenía el crecimiento de *G. intestinalis* in vitro, debido a que las células infectadas con esa cantidad de partículas virales no contaban con adherencia al tubo de cultivo y perdían la capacidad de dividirse (20,24). Adicionalmente, los autores determinan que el virus está compuesto por una proteína de 100 kDa la cual hace referencia a la cápside viral con una forma icosaédrica encargada de encapsular el dsARN de 7,0 Kb (24).

En 1989 Furfine y colaboradores identificaron una copia de ARN monocatenario del genoma de ARN bicatenario del virus de *G. intestinalis* al comparar el ARN total de una cepa de *G. intestinalis* que contiene GLV (Portland I) con el ARN total de una cepa que no contiene el virus (WB), mediante electroforesis en gel de agarosa, demostrando que dos especies principales de ARN estaban presentes en la cepa infectada pero no en la cepa no infectada por GLV, identificándose la primera como el genoma viral dsARN de 7,0 Kb y el otro como ssARN de 6,8 Kb por lo que sugieren que es una copia de ARN monocatenario de una de las hebras de GLV (25). Por otro lado, indican que el virus parece replicarse sin inhibir el crecimiento ni dañar los trofozoítos de *G. intestinalis* que no se ha observado GLV en la forma quística del parásito impidiendo conocer si el virus puede transmitirse mediante la transformación entre quiste y trofozoíto (25).

En 1990 Furfine y colaboradores realizaron un estudio de Transfección del virus de ARN bicatenario de *G. intestinalis* mediante electroporación con una copia de ssARN aislada del genoma viral, purificado a partir del ARN total de la cepa Portland I el cual demostró que el ssARN es un intermediario de replicación viral y de la cadena mensaje del genoma viral, siendo un posible potencial ARNm (26). Cabe resaltar que este ssARN se sintetiza intracelularmente (26).

Ese mismo año White y Wang identificaron la Actividad de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RPRD) asociada con el virus de ARN bicatenario de *G. intestinalis* la cual sintetiza los ARN correspondientes a una hebra del genoma del GLV, la misma hebra que el ssARN descrito anteriormente por Furfine y colaboradores, que según este estudio se podría comportar como la hebra + o transcriptasa durante el proceso de replicación al mostrar un comportamiento similar a la RPRD del virus asesino de *Saccharomyces cerevisiae* (27). Estos mismos autores afirman que se han aislado células infectadas por GLV de diversos huéspedes con o sin síntomas clínicos, por lo tanto, la presencia del virus no parece ser asociado con la patogénesis (27). Siguiendo con el estudio de la RPRD se estima que el nivel más alto de ssARN se produce aproximadamente entre 24 y 48 horas después de la infección ya que, en este periodo de tiempo se detecta de forma óptima la actividad de la ARN polimerasa viral (27). Se determina adicionalmente que la temperatura óptima para que se lleve a cabo la actividad de la RPRD es a 37°C, temperatura paralela a la del crecimiento óptimo de *G. intestinalis* (27).

Posteriormente en 1991 Tai y colaboradores estudiaron el curso de la infección por GLV en trofozoítos de *G. intestinalis* en la cepa Portland I y en la cepa WB evidenciándose que en la fase temprana de la replicación viral (antes de las 72 h) se lleva a cabo en el citoplasma del trofozoíto, pero hay participación de los núcleos en la fase tardía (posterior a las 72 h) (28). Este estudio permitió identificar que los dos núcleos de *G. intestinalis* cuentan con una carga de ARN viral aproximadamente equivalente, así como su presencia en el citoplasma del trofozoíto (28). Se sugiere que el citoplasma es el sitio activo de GLV debido a que durante el proceso inicial de replicación se observa un aumento constante del ARN viral pero que posteriormente en la fase tardía del proceso de replicación el ARN viral se dirige hacia ambos núcleos de *G. intestinalis*, sin embargo, no es claro aún cuál es la función que el ARN viral desempeña en estos (28).

En 1991 Wang y Wang publicaron un artículo titulado Virus de Parásitos Protozoarios, en donde hacen una revisión de lo que se ha documentado sobre GLV aportando con su investigación que, al parecer, la proteína de 100 kDa es necesaria para iniciar la infección y la posterior replicación y ensamblaje de la progenie viral (29). Así como que GLV no infecta otras especies de protozoos o células epiteliales intestinales humanas transformadas, lo que sugiere que no hay transferencia libre de GLV entre el parásito y el huésped durante la giardiasis (29). Adicionalmente estiman que la ARN polimerasa de GLV tiene un peso molecular en el rango de 80-90 kDa y que este polipéptido y la proteína de la cápside de 100 kDa ocuparán juntos la mayor parte de la capacidad de codificación del genoma de dsARN de 7 Kb de GLV, por lo cual estas dos proteínas podrían ser las únicas producidas por el genoma del virus (29). Por otro lado, se sugiere que GLV tiene semejanza con el virus asesino de *Saccharomyces cerevisiae* (dsARN),

en el que se genera un producto de fusión de las dos proteínas mediante cambio de marco, y este producto realiza luego la función de replicasa para sintetizar la cadena negativa de ARN en el ssARN encapsulado (29). Al compararse con la proteína de GLV de aproximadamente 200 kDa obtenida mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS que es reconocida por el anticuerpo contra la proteína de la cápside de 100 kDa (29). Siendo esta la proteína que se obtiene como producto de fusión en la cápside viral que también forma la cadena negativa de ARN para el genoma viral de dsARN (29).

En 1993 Tai y colaboradores determinaron que GLV ingresa al trofozoíto WB de *G. intestinalis* mediante endocitosis al analizar los primeros eventos de la infección por GLV (30). Al infectar la cepa WB de *G. intestinalis* que está libre de GLV se sugiere que la vacuola periférica presente en el trofozoíto del parásito sirve como vehículo de translocación para la captación del virus al permitirle a las partículas virales externas atravesar la membrana y llegar al citoplasma (30). Adicionalmente, indican que para iniciar el proceso de infección las partículas de GLV requieren de una sensibilización con ácido, la cual tiene lugar en las vacuolas periféricas ya que estas contienen fosfatasa acida (30).

Ese mismo año Wang y colaboradores determinaron que el genoma de ARN bicatenario de GLV codifica un polipéptido de la cápside y una proteína de fusión similar a gag-pol mediante un cambio de marco de traducción al construir un ADNc genómico de GLV de 6100 nt (31). Esta secuencia reveló la presencia de dos grandes marcos abiertos de lectura (ORFs) que están separados por un desplazamiento de -1 y comparten una superposición de 220 nt, la cual cuenta con una estructura de pseudonudo (heptámero)

similar a las encontradas en los sitios de deslizamiento ribosómico en los retrovirus y el virus asesino de levaduras (31). El ORF3' contiene la secuencia de la RPRD (31). Las proteínas virales de 100 kDa y 190 kDa comparten un dominio común en la región amino-terminal, sin embargo, la proteína de 190 kDa realiza un cambio de -1 en su marco de lectura más allá del heptámero de absorción y, por lo tanto, es una proteína de fusión de marco -1 (31). Al secuenciar el genoma viral de GLV se obtuvo un fragmento de 6,1 Kb capaz de codificar para dos ORFs ubicados en la cadena SS (31). El ORF1 codifica para la proteína de la cápside (p100) y para la proteína de fusión (p190) con desplazamiento de marco ORF1/ORF2 (-1), sugiriendo que esta probablemente es la RPRD viral (31). En este mismo estudio se determina que las regiones 5' y T (UTR) del genoma viral no están traducidas, pero juegan un papel importante en la replicación viral (31).

En 1995 Wu y colaboradores secuenciaron los cuatro extremos terminales del dsARN de GLV encontrando que los extremos de la cadena sentido 5' y la cadena negativa 3' co-terminan para formar un extremo romo y que las secuencias en estos extremos están totalmente conservadas, sugiriendo que el genoma viral GLV es de 6277 pb (32). Así mismo se determina que la región 5' UTR tiene un tamaño de 367 pb y la región 3'UTR de 300 pb (32).

Ese mismo año Yu y colaboradores usaron el gen de la luciferasa de luciérnaga con las regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' del genoma GLV, con el fin de determinar si GLV podría ser utilizado como vector para realizar transfección en el parásito *G. intestinalis* gracias a que este virus cuenta con dos características importantes como su capacidad

para infectar trofozoítos de *G. intestinalis* y el hecho de que se puede aislar un transcrito monocatenario del genoma dsARN de GLV e introducirse en los trofozoítos de *G. intestinalis* (33).

En 1996 Tai y colaboradores separaron y caracterizaron dos GLV relacionados en *G. intestinalis* al encontrarse que dos dsARN de 6,2 Kb no homólogos cohabitan en el trofozoíto de *G. intestinalis* y que estaban encapsulados por separado en dos viriones distintos, uno designado GLV [p100] cuya cápside consta de p100 y p190, y el otro designado GLV [p95] cuya cápside consta de una proteína de 95 kDa (p95) y una proteína menor equivalente a p190 (34). Adicionalmente indican que p100 y p95 eran proteínas estrechamente relacionadas, pero cada una tenía secuencias de aminoácidos distintas, sin embargo, se detectó que GLV [p100] se secreta selectivamente en el medio, mientras que GLV [p95] permanece dentro de los trofozoítos de *G. intestinalis* en la fase tardía del crecimiento celular (34).

En 2001 Li y colaboradores realizaron un análisis estructural de los elementos del cambio de marco ribosómico -1 en el ARNm de GLV donde determinaron que para el correcto funcionamiento del cambio de marco ribosómico -1 se requiere de un heptámero para que de esta forma la ARN polimerasa de GLV se sintetice como una proteína de fusión a través del desplazamiento del marco ribosómico -1 en una región donde los marcos abiertos de lectura abiertos (ORF) gag y pol se superponen durante la transcripción del virus (35).

Ese mismo año Garlapati y colaboradores sugieren que se requieren estructuras secundarias específicas en la región codificante de la cápside de la transcripción de GLV para su traducción en *G. intestinalis*, ya que el ARNm de GLV requiere de la presencia de los 264 nt iniciales de la región codificante de la cápside viral, descubriéndose así una secuencia caja (DB) a 13 nt en sentido descendente dentro de esta región, complementaria a una secuencia de 15 nucleótidos cerca del extremo 3' del ARN ribosomal (ARNr), el cual es similar a la subunidad 16S de *G. intestinalis*, siendo esencial para la traducción (36). Dentro de la DB se identificaron cuatro estructuras principales de bucle, designadas de la I a la IV como estructuras secundarias de la región codificadora de la cápside de 264 nt (36). Por lo tanto, para la traducción se requiere de los bucles I, II, III y IV junto con la secuencia UCUCC para facilitar la interacción entre DB y el anti-DB presente en el ARNr de la subunidad 16S de *G. intestinalis* para iniciar la traducción del ARNm de GLV (36).

En 2009 Garlapati y Wang identificaron que GLV utiliza un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) para el inicio de la traducción en *G. intestinalis* localizado en la región 5' UTR (37). Este IRES comprende 253 nt de la región 5' UTR y los 264 nt iniciales del marco abierto de lectura (ORF) (37). Adicionalmente, se indica que el bucle U5 de la región 5' UTR y el bucle I de la DB son necesarios para la participación del IRES (37). Por otro lado, se sugiere que el IRES no requiere ningún complejo de reiniciación si no que se identificaron 3 proteínas necesarias para el reclutamiento de pequeños ribosomas e iniciar la traducción de GLV en *G. intestinalis*, una presente en *G. intestinalis* conocida como miembro de la familia de helicasas (IBP1) y dos proteínas virales conocidas como autoantígeno La (GILa) y SRp20 (37).

En 2020 Gong y colaboradores identificaron un nuevo microARN en la región traducida del gen RdRp del GLV, al clonar el ARN pequeño para amplificar ADNc del virus proveniente de trofozoítos de *G. intestinalis* perteneciente al ensamblaje A1, GdA1(38). Los resultados de este estudio indican que el microARN (GLV miARN1) de GLV es un producto de expresión especial de GLV y que la secuencia anti-sentido de este podría aumentar el número de copias del virus en *G. intestinalis*, lo que sugiere que GLV miARN1 es quien gobierna el número de copias de GLV en *G. intestinalis* (38). Adicionalmente el miARN1 de GLV se encuentra en la región traducida del gen RdRp, haciéndolo así el primer caso en el que el microARN se localiza en la región traducida de una proteína conocida (38).

Por otro lado, en 2021 Marucci y colaboradores hicieron un análisis genómico y estructural de GLV a partir de aislados de *G. intestinalis* al realizar la secuenciación de cuatro cepas de GLV de diferentes aislados con un origen tanto humano como animal (39). Esta secuenciación permitió identificar una nueva secuencia viral no clasificada (GdRV-2), la cual no se relaciona con GLV y que codifica y expresa una única proteína grande con dominio RdRp homólogo a *Totiviridae* y *Botybirnaviridae* (39). Estos hallazgos sugieren que la traducción de la proteína de la cápside viral comienza con una prolina y que la traducción de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) se produce a través de un mecanismo de cambio de marco ribosómico +1/-2 (39). Por otro lado, realizaron un análisis filogenético el cual indicó la aparición de al menos dos subtipos de GLV que muestran diferentes fenotipos y transmisibilidad en infecciones de *G. intestinalis* por GLV (39).

En el anexo N° 1 se relacionan en detalle los estudios a la fecha que han buscado detectar GLV.

9. Marco teórico

9.1. Generalidades de *Giardia intestinalis*

9.1.1. Taxonomía

Giardia intestinalis también conocida como *G. lamblia*, *G. entérica* y *G. duodenalis*, es un parásito anaerobio flagelado cosmopolita que se caracteriza por su simetría diádica y por poseer dos núcleos simétricos en los trofozoítos; taxonómicamente es un protozoo flagelado perteneciente al género *Giardia* y especie *G. intestinalis* (1–3,20,22,25,40–43). Las especies de *Giardia* carecen de algunos orgánulos como las mitocondrias, el aparato de Golgi y los peroxisomas a pesar de que en su genoma se encuentran los genes necesarios para desarrollar estos organelos (2,40). Actualmente el género *Giardia* cuenta con ocho especies respaldadas por comparaciones de secuencias de ADN, diferencias morfológicas y su especificidad al huésped, entre las que encontramos las descritas en la Tabla 2 (2,3,40,42,44).

Tabla 2. Especies y hospedares de *Giardia spp* (2,9,40,44).

Nombre de la especie	Huésped	Referencia
<i>G. intestinalis</i>	Humanos y mamíferos como perros, gatos, ganado, roedores, y otros mamíferos salvajes.	(2,40,44)
<i>G. muris</i>	Roedores	(2,40,44)
<i>G. agilis</i>	Anfibios	(2,40,44)
<i>G. psittaci</i>	Aves psitácidas	(2,9,40,44)
<i>G. microti</i>	Roedores	(2,40,44)

<i>G. ardea</i>	Garzas	(2,9,40)
<i>G. peramelis</i>	Marsupiales pequeños	(2,40)
<i>G. cricetarum</i>	Hámsteres	(2,40)

9.1.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *G. intestinalis* consta de dos fases una primera forma de resistencia denominada quiste y una segunda forma en la que el protozooario se presenta como trofozoíto (2,3,9,20,43). La infección del huésped inicia al ingerir los quistes presentes en el ambiente, es importante resaltar que estos quistes provienen de las heces de un huésped previamente infectado (2,3,9,25). Los quistes realizan el recorrido por el tracto gastrointestinal pasando así por el estómago donde son estimulados por el ácido gástrico. Posteriormente, llegan al duodeno, donde la presencia de bilis y tripsina desencadenan el proceso de des-enquistamiento transformándose en trofozoítos móviles en el intestino delgado. este disco contiene las proteínas contráctiles como la actinina, α -actinina, miosina y tropomiosina que le permiten la adherencia, además de permitirle al protozooario la obtención de los nutrientes necesarios, aunque también cumple la función de evitar ser transportados más allá del yeyuno (2,9,40,43). Algunos trofozoítos se diferencian a quistes en un proceso llamado enquistamiento, el cual se lleva a cabo en dos fases, una temprana y una tardía que se completan a las 10 y 16 horas respectivamente después de haber iniciado el enquistamiento (2,40,43).

En la fase temprana se desencadena la síntesis intracelular además de iniciar el transporte de los componentes de la pared del quiste gracias a la formación de vesículas específicas de enquistamiento (ESV) encargadas de transportar las proteínas principales de la pared

del quiste, por lo tanto, el disco adhesivo se desmonta, los flagelos se internalizan y las células se redondean.

En la fase tardía se da la aparición del plasmalema del trofozoíto y de los sitios para el inicio del ensamblaje de los filamentos de la pared del quiste, seguido por el ensamblaje de la porción filamentosa de la pared del quiste, además de producirse la división de los dos núcleos y la replicación del ADN (40,43). Adicionalmente, en la fase tardía los quistes de *G. intestinalis* muestran cambios extensos en la expresión génica, de los genes VSP y HCMP, involucrados en la variación antigénica (43).

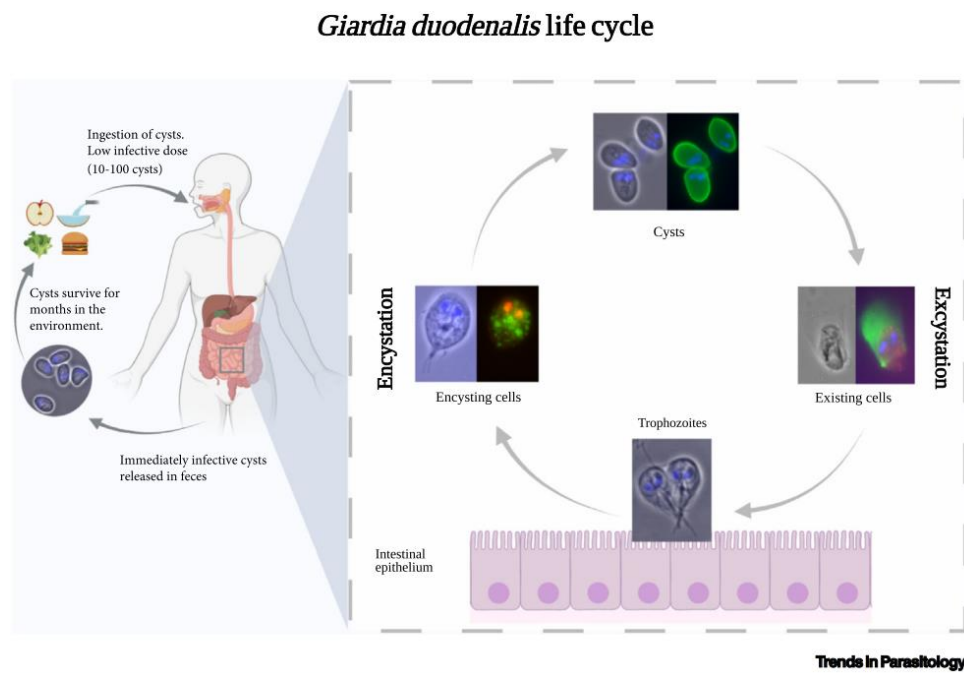


Figura 1. Ciclo de vida de *G. intestinalis*. Se evidencian los procesos de enquistación y des-enquistación del parásito al ingresar al cuerpo humano mediante el consumo de alimentos y/o agua contaminada. Imagen tomada de: *Giardia duodenalis* (45).

6.1.3. Características morfológicas de *Giardia intestinalis*

El quiste tiene un tamaño de 5 μm por 7 a 10 μm , cuenta con una pared de 0,3 a 0,5 μm de espesor y está compuesta por una capa filamentosa exterior y una capa membranosa interior con dos membranas (2,3,40). El enquistamiento de *Giardia sp.* se produce después de la replicación nuclear pero antes de que ocurra la citocinesis; como resultado, los quistes de *Giardia sp.* contienen cuatro núcleos y pierden su motilidad (40,43). La tasa metabólica de los quistes es reducida esto permite que haya una mayor supervivencia del parásito en el medio ambiente principalmente los frescos y húmedos (2,40,43).

El trofozoíto es la forma vegetativa de *G. intestinalis*, su forma es parecida a una pera, midiendo aproximadamente 12-15 μm de largo y 5- 9 μm de ancho; adicionalmente, su citoesqueleto incluye un cuerpo mediano exclusivo de *Giardia sp.* y su morfología varía según la especie de *Giardia*, cuenta con cuatro pares de flagelos (uno anterior, uno posterior, uno caudal y uno ventral) que facilitan su motilidad, pero no se asocian a su adhesión. Además, posee un disco ventral que le permite adherirse firmemente a la pared del intestino delgado (3,40,41,43). Los trofozoítos a diferencia de los quistes cuentan con dos núcleos simétricos ubicados en la región anterior y alineados con el eje largo, cada uno sin nucleolos. Estos núcleos se replican simultáneamente y son transcripcionalmente activos, conteniendo cantidades equivalentes de ADN, genes y cromosomas (9,40). En el citoplasma se encuentran vacuolas lisosómicas, así como gránulos ribosómicos y de glucógeno (40).

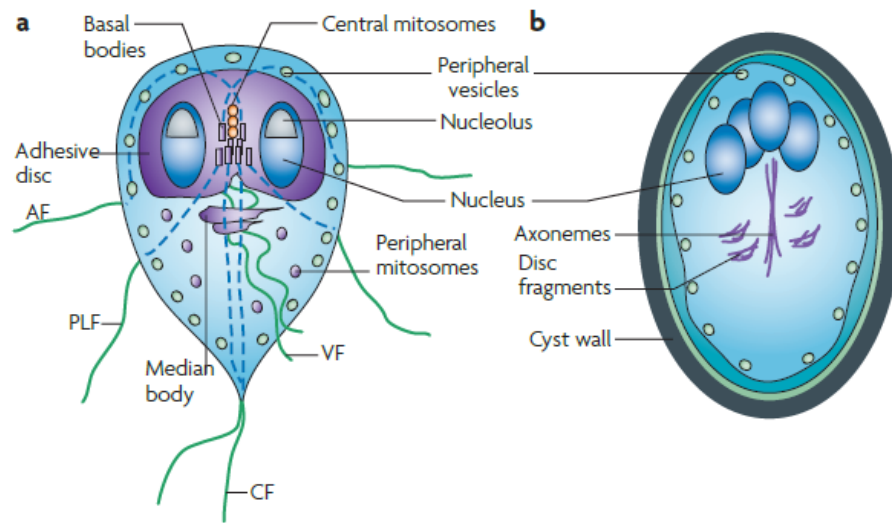


Figura 2. Morfología del trofozoíto y quiste de *G. intestinalis*. Figura 2 (a) trofozoíto de *G. intestinalis*. Figura 2 (b) quiste de *G. intestinalis*. Imagen tomada de: Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of Giardia species (7).

9.1.4. División celular

La división celular es el proceso en el cual el trofozoíto adulto de *G. intestinalis* debe replicarse para dar lugar a dos trofozoíto hijos, es decir debe dividir y duplicar los dos núcleos y las diferentes estructuras citoesqueléticas características del protozario mientras se encuentra adherido al intestino (2,46). Este proceso se lleva a cabo en dos grandes fases: la interfase y la mitosis (47).

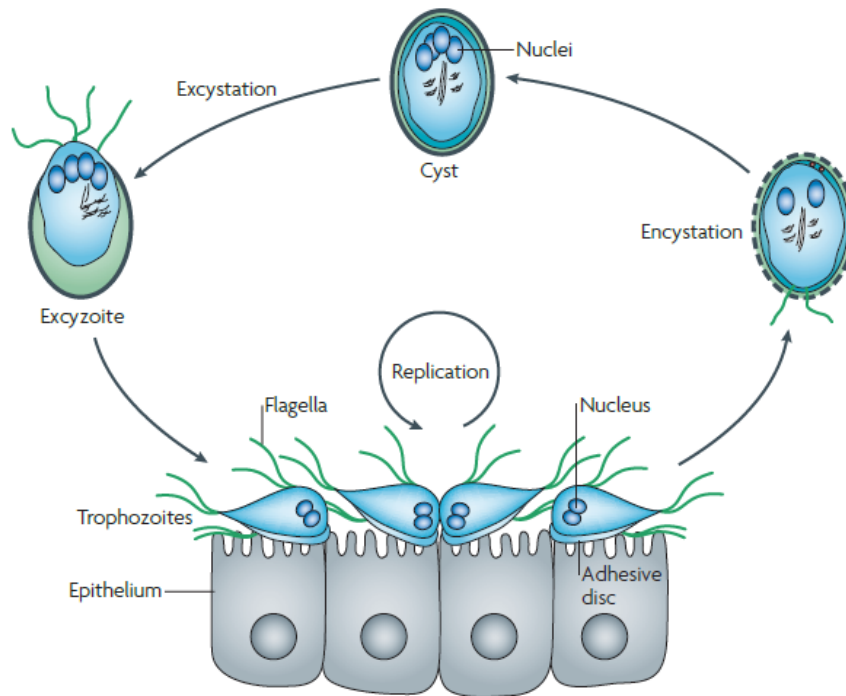


Figura 3. Ciclo de vida y replicación de *Giardia intestinalis*. Proceso de enquistamiento: quiste pasa a trofozoíto. Proceso de des-enquistamiento: trofozoíto pasa a quiste. La replicación del parásito se da cuando está adherido al epitelio intestinal. Imagen tomada de: Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species (7).

Durante la interfase, la cromatina se descondensa y los cuerpos basales se localizan en la región inmediatamente supranuclear, posición que mantienen sobre ambos núcleos (47). Para hacer esto la interfase se subdivide en tres fases distintas: G1, S y G2; en la fase G1 la célula crece en tamaño y sintetiza los componentes esenciales para la replicación del ADN; posteriormente, en la fase S, se produce la replicación del ADN y finalmente en la fase G2, la célula se prepara para la división celular produciendo organelos y continúa su crecimiento en tamaño (47).

La mitosis en *Giardia sp.* se subdivide en cinco etapas. En la profase, la cromatina se condensa en los cromosomas y se forma el huso mitótico, uniendo el ADN condensado y replicado (cromátidas hermanas) al final de la profase, los núcleos se repositionan en la línea media de los trofozoítos a lo largo del eje dorso-ventral mientras que los microtúbulos del huso y los cuerpos basales flagelares quedan alrededor de cada núcleo. Seguidamente en la metafase se forman los husos bipolares y las cromátidas hermanas se alinean entre los polos del huso. En la anafase los microtúbulos se unen al centrómero de cada cromosoma, separándose sincrónicamente las cromátidas hacia los polos. En la telofase los conjuntos de cromosomas hijos llegan a los polos se des condensan. Finalmente tiene lugar la citocinesis, el citoplasma se divide en dos creando las dos células hijas con una forma característica de corazón y cuatro núcleos (46,47).

En *Giardia* la mitosis presenta una variante semiabierta, donde la envoltura nuclear permanece intacta. Esto se debe a que en la prometafase los husos mitóticos permanecen extra nucleares, los microtúbulos asociados logran penetrar en el núcleo a través de poros específicos en la membrana nuclear (47). La división nuclear en *Giardia* es asincrónica, es decir, ocurre primero en un núcleo con respecto al otro. Este proceso inicia en la profase temprana y en la anafase, donde la condensación del ADN y el estiramiento lateral de las cromátidas se producen a velocidades diferentes en cada núcleo por lo tanto *Giardia* garantiza la transferencia de una copia de cada núcleo parental a cada célula hija asegurando así la igualdad genética en la división celular (46,47).

Los flagelos se heredan de forma semiconservadora de células madre a células hijas además de contar con un amplio movimiento transformación de los tipos de flagelos

durante la replicación y división celular por lo cual el par de flagelos anteriores parentales se transforman en el flagelo caudal derecho en cada una de las células hijas; los flagelos posterolaterales parentales se transforman en flagelos anteriores en una de las células hijas, mientras que los flagelos ventrales se convierten en los flagelos anteriores en la otra célula hija y ambos flagelos caudales mantienen su tipo y se colocan siempre en el lado izquierdo en cada una de las células hijas (46,47). Por lo tanto, los ocho flagelos de la célula madre se conservan durante la división celular y pasan a cada prole, es decir, que cada célula hija, recibe un conjunto de cuatro pares flagelares proveniente del progenitor (48).

9.1.5. Genoma

El genoma de *G. intestinalis* ha sido ampliamente estudiado en la cepa WB lo que lo ha llevado a ser el genoma de referencia para investigación sobre *Giardia*, se caracteriza por ser un genoma muy compacto de aproximadamente 12,6 Mb por lo que se reducen la mayoría de los orgánulos representativos de otras células eucariotas como el aparato de Golgi, los peroxisomas y las mitocondrias (42,45,47,49). Adicionalmente este genoma presenta 4863 genes que codifican proteínas, de los cuales 2099 son proteínas hipotéticas; estas proteínas se dividen en 3 subgrupos, que incluyen proteínas variables de superficie (VSP), proteínas de membrana con alto contenido de cisteína (HCMP) y proteínas con alto contenido de cisteína (HCP) (2,43,45,49).

También cuenta con pequeños ARN no codificantes (ARNs) e incluyen microARNs (miARNs), que se han asociado con el control de la expresión del gen *vsp* el cual codifica

para las proteínas variables de superficie (VSP) que en *Giardia* probablemente estén involucradas en la evasión de la respuesta inmune del huésped además de otras proteínas que podrían contribuir a la resistencia a los nitroimidazoles (2,50).

Giardia cuenta con dos núcleos diploides transcripcionalmente activos de igual tamaño, aunque estos se alternan durante el ciclo celular del trofozoíto entre tetraploide 4N (ploidía de $2 \times 2N$) en la etapa G1 y octoploide 8N (ploidía de $2 \times 4N$) en la etapa G2 o crecimiento vegetativo y se duplica a 16N (ploidía $4 \times 4N$) durante la transición a quistes (2,42,47,49,51). El material genético de *Giardia* está dividido en cinco cromosomas de tamaño variable los cuales son propensos a reordenamientos sub teloméricos que dan lugar a duplicaciones o pérdidas de genes, además de ser cromosomas aneuploides con desigualdad en la distribución de estos en los dos núcleos lo que hace evidente en los aislados de *Giardia* una heterogeneidad del cariotipo debido a la ausencia de los reguladores del ciclo celular (42,51).

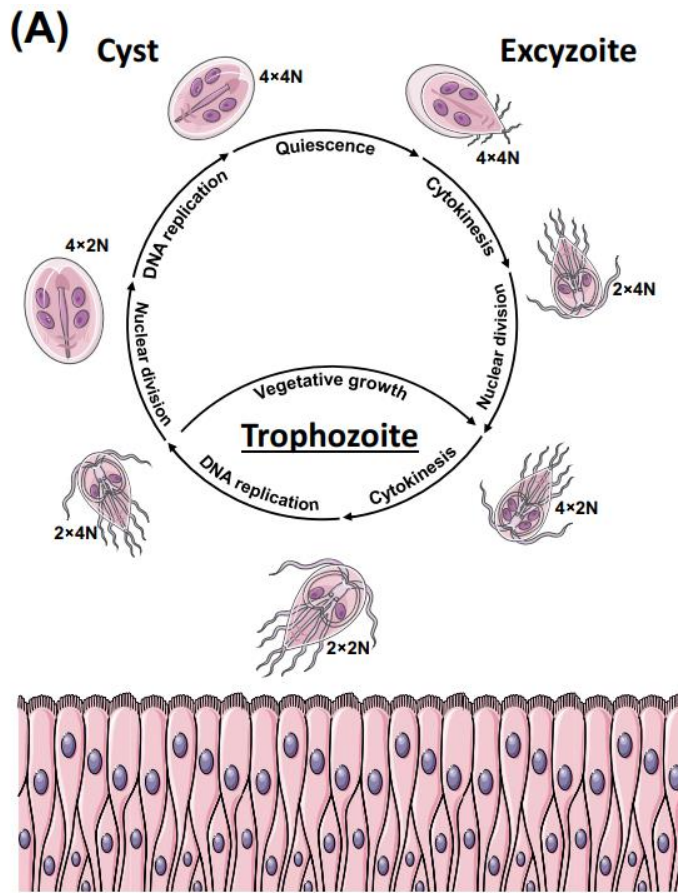


Figura 4. Descripción general del genoma de *Giardia intestinalis*. Representación de las diferentes fases por las que cursan los núcleos del parásito durante la replicación. Imagen tomada de: *Giardia duodenalis* (42).

9.1.6. Ensamblajes

Las especies de *G. intestinalis* se han subclasificado en un complejo genético conformado por 8-11 ensamblajes y subensamblajes filogenéticamente distintos determinados por letras del alfabeto (A-H), esta subclasificación surge por la necesidad de diferenciar las especies de *Giardia* que son morfológicamente idénticas mediante el análisis y secuenciación del ADN de *G. intestinalis* junto con los polimorfismos de los

fragmentos de restricción (RFLP) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en función de genes que codifican β -giardina (*bg*), *triosa fosfato isomerasa* (*tpi*), la *subunidad pequeña del ARN ribosómico* (*ssu*) y *glutamato deshidrogenasa* (*gdh*) con lo que se establecieron los ocho ensamblajes que demuestran la heterogeneidad del género *Giardia* (3,6,41,42,45).

En el 2023 Wielinga C. y colaboradores realizaron un análisis filogenético en el cual proponen la revisión taxonómica de *G. intestinalis* estableciendo que los ensamblajes de *Giardia* se divide en dos clados AEF y CD (41). Los ensamblajes E y F se derivan del ensamblaje A y el ensamblaje G es más cercano al clado AEF por lo cual los ensamblajes A, E, F y G pertenecen al clado AEF mientras que los ensamblajes B, C, D y H pertenecen al clado CD (41). Adicionalmente, se identifican tres subensamblajes del ensamblaje A y dos subensamblajes del ensamblaje B respaldados filogenéticamente por el gen *tpi* y el gen *gdh* (41). El subensamblaje AI se encontró en animales y cuenta con un comportamiento zoonótico, el AII es predominantemente en humanos y el AIII se encuentra asociado a animales rumiantes silvestres (41,42). El subensamblaje BIII se encuentra predominantemente en humanos, mientras que el subensamblaje BIV se asocia a animales con comportamiento zoonótico y predominante en primates no humanos, sin embargo, también se encuentra en animales omnívoros, herbívoros y humanos (41).

Estos ensamblajes y subensamblajes están caracterizados en función de la especificidad del huésped y las diferencias genéticas, los ensamblajes A y B son los únicos que causan infecciones humanas, pero pueden estar presentes en otros huéspedes principalmente

vertebrados mientras que los ensamblajes C-H son específicos para determinados huéspedes (6,41,49,52).

Tabla 3. Ensamblajes y subensamblajes de *Giardia spp* con sus huéspedes (2,6,41,42).

Ensamblaje - Subensamblaje	Huésped	Referencia
A	Humano, perro, gato, ganado, alpaca, venado, hurón, cerdo, castor, chinchilla, jaguar, caballo, marsupiales, ovejas, cabra, primates no humanos, cetáceos, focas, alce, reno, pollo y gaviota.	(2,6,41,42)
AI	Humanos, mono ardilla de cabeza negra, Mono hoja de François, bovinos, ovejas, búfalo, cabra doméstica, renos, venados, alces, cerdos, camélidos, alpacas, ciervos, castores, canguros, caballos, chinchillas, cobayas, conejos, gatos, perros, hurones, focas, delfines, jaguares, perros de la pradera, ardillas, tortugas.	(41,42)
AII	Humanos, macaco, mono aullador negro, mono aullador marrón, mono araña de frente blanca, lémures, bovinos, ovejas, caballos, castores, perros, gatos, delfines, focas grises, gaviotas y ostras.	(41,42)
AIII	Ciervos, gamos, alces, gatos, mapaches y ardillas.	(41,42)
B	Humano, perro, ganado, gacela, venado, caballo, castor, marsupiales, conejillo de indias, primates no humanos, pollo, oveja, foca, cerdo, avestruz, delfín y gaviota.	(2,6,41,42)
BIII	Humanos, macaco rhesus, macaco mulato, gibones, lémures, perros, gatos, chinchillas, bovinos, ovejas, cerdos, focas y zorro rojo.	(41,42)
BIV	Humanos, gorilas, chimpancés, orangutanes, macacos, gibones, lémures, mono ardilla, titi cabeciblanco, mono araña de manos negras, mono araña de cabeza negra, mono arrullador pardo, perros de las praderas cola negra, ratas, cerdos, zarigüeyas, bovinos, ovejas, cabras, gacelas, chinchillas, castores, rata de bambú, caballos, burros, canguros perros, zorro rojo, zorro gris, gatos, focas, delfines, oso hormiguero, demonio de Tasmania, gaviotas, avestruz, y halcón.	(41,42)
C	Perros, canguros, ganado, cerdos, mapaches, gatos, pollos, mejillones y cetáceos.	(2,6,41,42)
D	Perros, mapaches, lobos, zorro gris, gatos, guepardos, suricatas, focas, panda gigante, mejillones, chinchillas, ganado, cetáceos y zorros.	(2,6,41,42)
E	Bovinos, ovejas, cerdos, alpacas, cabras, caballo, yaks, zorro, búfalos, venados, ciervos, macaco rhesus, macaco mulato, mono ardilla, ardilla voladora, chinchillas, caballos, conejos, perros, gato montés, pumas, panda gigante y gatos.	(2,6,41)
F	Gatos, tigres, panteras, guepardos, perros, ganado Bos Taurus cetáceos y cerdo.	(2,6,41,42)
G	Rata parda, rata negra, ratones, ardillas, caballos y ratas.	(2,6,41)
H	Focas y gaviotas.	(2,6,41)

9.1.7. Epidemiología de *Giardia intestinalis* en América latina

La presencia de *G. intestinalis* en América latina es un tema aun en investigación debido a que la giardiasis sigue siendo una enfermedad olvidada en el mundo, sin embargo, gracias al estudio realizado por Wielinga y colaboradores en el año 2023 se pudo observar una predominancia del ensamblaje A frente al ensamble B en las Américas (3,41). En el año 2022 Sarria y colaboradores realizaron una revisión bibliográfica sobre los ensamblajes y subensamblajes reportados en América latina, lo que les permitió generar unos estimados de prevalencia de *Giardia spp* en Brasil (45,2-100%), Colombia (61-87%), Cuba (80-92,6%), Ecuador (20%), México (85,1%) y Venezuela (33,8%) (3). Adicionalmente, esta revisión bibliográfica permitió establecer que los países de América Latina han publicado muy pocos estudios sobre el estado epidemiológico de la Giardiasis y que Colombia es el país con mayor número de publicaciones sobre el tema (3,41).

En Colombia Avendaño y colaboradores en el año 2019 analizaron 307 muestras de materia fecal provenientes de individuos colombianos de zonas urbanas y rurales de entre 1 y 19 años donde se encontró un predominio del ensamblaje B en niños asintomáticos de 1 a 5 años y la presencia de subensamblaje AII (3,21). Por otro lado, Hernández y colaboradores en 2019 realizaron un estudio transversal para determinar la frecuencia de infecciones por parásitos intestinales en escolares rurales del municipio de Apulo, Colombia en el cual *G. intestinalis* tiene una frecuencia de 39,1% y se relaciona la infección con el consumo de agua contaminada e indican el predominio del

subensamblaje AII sobre BIII, así como la presencia de los subensamblajes AI y BIV, junto con una infección mixta con dos subensamblajes AII + BIII (3,10).

Sánchez y colaboradores en 2017 analizaron 284 muestras de materia fecal de niños menores de 15 años provenientes de poblaciones indígenas ubicadas en el Amazonas y encontraron una frecuencia de infección por *Giardia spp* por microscopía del 23,7% (62 muestras) y por qPCR del 64,8% (184 muestras); algunas de estas muestras tenían una coinfección con *Blastocystis*, además de la presencia del subensamblaje AI especialmente en niños de 9 a 12 años y el BIII limitada a una sola de las comunidades analizadas (3,53). Adicionalmente, Villamizar y colaboradores en 2019 analizaron 266 muestras de materia fecal (258 de niños que asistían a guardería y 8 de mascotas) de la comuna ocho de Popayán, Cauca; encontrándose una prevalencia de *G. intestinalis* por microscopía de 8,14% y 10,59% por qPCR y se menciona la presencia de los subensamblajes AII, BIII y BIV siendo el BIII el subensamblaje predominante sin asociación a ningún factor social o ambiental y reportan la coinfección por *G. intestinalis* con *Blastocystis* (3,54).

9.1.8. Factores de virulencia

Los productos de secreción excretora (ESP) en particular las cisteínas proteasas tiene como función principal el control de la enquistación y des-enquistación, pero también desempeñan funciones en la interacción entre el trofozoíto y el epitelio intestinal del huésped (2). Un estudio realizado en 2017 por Amat C. et. al plantea la hipótesis de que de que las cisteínas proteasas de *Giardia* pueden agotar la reserva de moco intestinal al

demostrarse que in vitro estas ESP tienen un efecto degradador sobre el moco intestinal (MUC2) al agotar las mucinas de las células caliciformes y alterando la expresión de los genes de mucina pero no se relaciona con la hiperplasia de células caliciformes, lo que afecta la función de barrera mucosa intestinal lo que demuestra que *Giardia* puede inducir efectos fisiopatológicos en lugares distales al sitio de colonización, en forma de hipersensibilidad visceral inducida por parásitos en el recto y el yeyuno (2,8).

La arginina deiminasa de *Giardia* es una enzima citoplasmática que se secreta tras la interacción con las células epiteliales intestinales, esta enzima es producto del metabolismo energético realizado por *Giardia* a través de la vía metabólica arginina dihidrolasa, pues a pesar de que puede obtener su energía a partir de la glucosa si se usa la arginina puede producir de 7 a 8 veces más energía por lo cual toma como fuente principal de energía a la arginina (2,55). Por lo cual es considerado un factor de virulencia ya que el agotamiento de arginina afecta la respuesta inmune al aumentar el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y disminuir la interleucina 10 (IL-10), además de que el agotamiento de arginina en el huésped genera la apoptosis de las células epiteliales intestinales y reduce la capacidad de estas células para producir óxido nítrico (NO), una molécula de defensa innata antimicrobiana al liberar ornitina alrededor del parásito, esto inhibe la absorción de arginina por parte de las células epiteliales intestinales con el fin de privatizar el consumo de arginina a favor del parásito (2,16,55).

Las proteínas variables de superficie (VSP) son los principales factores de virulencia identificados hasta la fecha para *Giardia spp* las VSP cubren toda la superficie de los trofozoítos incluidos el disco ventral y los flagelos, como una capa compacta que

proporciona una interfaz entre el parásito y el huésped por lo cual son los principales antígenos reconocidos por el huésped (7,9,15). Se ha demostrado que los mecanismos epigenéticos, los microARN y los ARN de interferencia son importantes en la regulación de la expresión del gen *vsp* (7). La variación antigénica es un mecanismo para evadir la respuesta inmune humoral de los huéspedes vertebrados, es por ello que *Giardia spp.*, activa y desactiva la expresión de genes que codifican las VSP, este cambio ocurre espontáneamente cada 6 a 13 generaciones, aunque esto depende del aislamiento, las condiciones de crecimiento y las VSP específicas que se expresan (7,9).

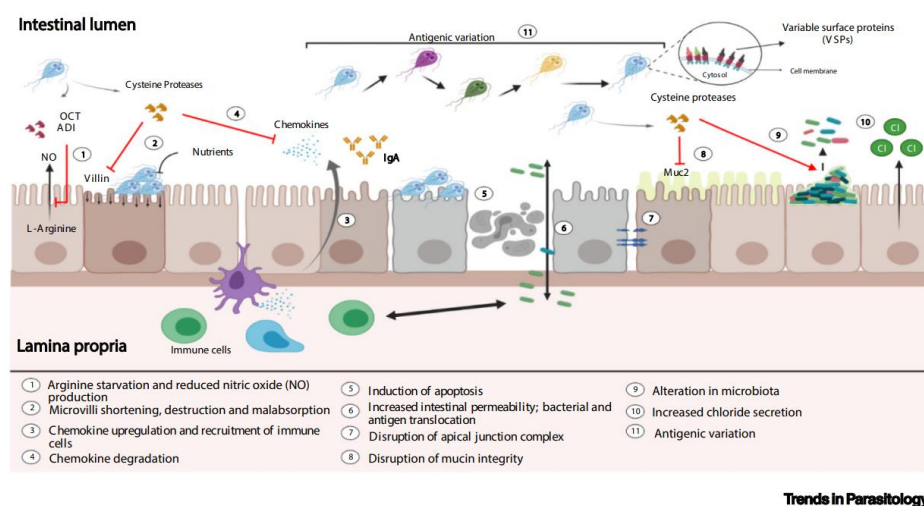


Figura 5. Comportamiento de los factores de virulencia de *G. intestinalis*. Cada uno de los números representa cada factor de virulencia y demuestra su comportamiento. Imagen tomada de: *Giardia duodenalis* (45).

9.2. Generalidades de la giardiasis

9.2.1. Definición de la enfermedad

La Giardiasis es una de las enfermedades intestinales más comunes en el mundo, anualmente, infecta a cientos de millones de personas, lo que llevó a su inclusión en la Iniciativa de Enfermedades Desatendidas de la Organización Mundial de la Salud (2,3,7,8,20,42). Es producida por *G. intestinalis*, un protozoo patógeno que afecta al intestino delgado generando una amplia gama de presentaciones clínicas como la diarrea crónica con pérdida de peso, complicaciones posinfecciosas de colon irritable y fatiga crónica, retraso en el crecimiento e infecciones asintomáticas que surgen de la combinación de proteasas secretadas por *Giardia* y la respuesta inmunitaria del huésped junto con la interacción de estos factores con la microbiota intestinal (2,7,9,41,42). Adicionalmente la giardiasis se ha relacionado con consecuencias a largo plazo y extraintestinales, dentro de las que se incluyen la artritis, las alergias cutáneas, miopatía y la disminución de la función cognitiva y se han reportado casos donde hay infecciones mixtas entre ensamblajes de *Giardia*, es decir, una persona puede cursar una giardiasis causada por el ensamblaje A y B al mismo tiempo (6,8,42).

Los trofozoítos de *G. intestinalis* se adhieren fuertemente a la mucosa del intestino delgado proximal por medio de un disco adhesivo ventral, aunque también se han encontrado en el íleon y en el ciego, esta adherencia deja una huella detectable cuando se desprenden del epitelio intestinal, por lo cual los síntomas asociados con la giardiasis son la diarrea acuosa, náuseas, vómitos, pérdida de peso y dolor epigástrico (2,3,7–9,42,55). Estos síntomas aparecen de 6 a 15 días teniendo el impacto clínico es más fuerte en bebés, niños pequeños, personas desnutridas, ancianos, viajeros e inmunocomprometidos o inmunodeficientes (3,7–9). Sin embargo, en personas sanas se puede presentar la enfermedad de manera asintomática (3).

9.2.2. Trasmisión de la enfermedad

La giardiasis es una de las enfermedades diarreicas transmitida por agua o alimentos contaminados con quistes de *G. intestinalis* por lo cual en países en desarrollo se observa una alta incidencia y prevalencia de la enfermedad (40). La infección comienza con la ingestión de agua o alimentos contaminados con una dosis mínima de 10 quistes, los cuales se des enquistan y los trofozoítos liberados colonizan el intestino delgado superior del huésped (9,15,42,45,52,56). Cuando los trofozoítos descienden por el intestino del huésped, se diferencian en forma de quiste (enquistación) para ser liberados en las heces en grandes cantidades lo cuales pueden permanecer infecciosos durante meses en el agua o en áreas frescas y húmedas para ser transmitidos a otros huéspedes susceptibles a través de la ruta fecal-oral, incluido el contacto directo con heces humanas o animales que contienen quistes, o el consumo de alimentos o agua contaminados con quistes (9,15,43,45,56).

La transmisión de persona a persona es una fuente importante de infección y ha sido ampliamente documentada, particularmente en guarderías, hogares de ancianos y otros entornos institucionales, donde la higiene personal puede ser deficiente, aunque también se ha documentado la transmisión sexual de la giardiasis (56). Los principales brotes de giardiasis se han dado por la vía fluvial, es decir están asociados con agua potable contaminada con quistes, estas fuentes de agua se pueden contaminar a través de la escorrentía agrícola, la descarga de aguas residuales, la descarga de aguas pluviales y el acceso directo a las fuentes de agua por parte de animales domésticos y salvajes (56).

Otro modo de transmisión de la giardiasis menos frecuente es a causa de alimentos dentro de los que se encuentran los productos frescos como vegetales de hojas verdes, hierbas, bayas, cebollas verdes, zanahorias, tomates, etc. productos lácteos, carne, mariscos y alimentos procesados contaminados con quistes de *G. intestinalis* y se ha asociado con la creciente globalización del comercio de alimentos, los viajes internacionales y los cambios en los hábitos de los consumidores (56). La contaminación directa de los productos frescos puede ocurrir a través de la aplicación de heces de animales o heces humanas ("tierra nocturna") como fertilizante a las tierras de cultivo o durante la producción, cosecha, empaque o transporte por una manipulación inadecuada por parte del operador que incumpla con las normas básicas de higienización y de forma indirecta por el uso de agua contaminada con heces en el riego, la mezcla de pesticidas o el lavado de productos, manos o equipos (56).

9.2.3. Diagnóstico de la enfermedad

El diagnóstico de la giardiasis se realiza mediante la detección de quistes o trofozoítos de *Giardia spp.* en muestras de materia fecal a través del examen microscópico de preparaciones húmedas y muestras concentradas o después de la conservación con alcohol polivinílico y/o formalina al 10 % para tinción permanente con tricrómico o hematoxilina férrica (3,56,57). Debido a que los parásitos pueden excretarse a intervalos irregulares o espontáneamente, el examen de una sola muestra de heces tiene una sensibilidad de sólo 50 a 75%; la sensibilidad aumenta a más del 90 % con tres muestras seriadas recolectadas cada dos o tres días (56,57).

En algunos lugares se tienen disponibles pruebas estándar para el diagnóstico de *Giardia spp* con el fin de superar las limitaciones asociadas a la microscopia y reducir el tiempo de diagnóstico, dentro de estas están las pruebas de anticuerpos fluorescentes directos (DFA), que detectan organismos intactos, y los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), que detectan antígenos solubles en las heces (3,9,56,57). Sin embargo, estas pruebas son propensas a resultados falsos positivos y falsos negativos, aunque mejoran la sensibilidad y la especificidad (56,57).

Los métodos microscópicos tradicionales tiene limitaciones para diferenciar especies y ensamblajes de *Giardia* sin embargo, los métodos moleculares han revolucionado el diagnóstico, como el uso de ensayos multiplex de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para la detección de *Giardia sp.* y otros patógenos protozoarios gastrointestinales en humanos y animales, han contribuido en gran medida a la comprensión de los patrones de transmisión, además de permitir la determinación de especies y ensamblajes a través de la secuenciación del ADN por lo que se ha vuelto más popular al ofrecer una sensibilidad del 98 % y una especificidad del 100 % (56,57). Los ensayos de PCR pueden detectar el parásito con concentraciones bajas gracias al reconocimiento de genes específicos que comúnmente incluyen la subunidad pequeña del ARN ribosómico (SSU-rARN), los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2), la β giardina, la triosafosfato isomerasa (TPI) y la glutamato deshidrogenasa (GDH) (3,42,56,57).

Las muestras de heces fecales deben dejarse sin conservantes y almacenarse en un refrigerador o congelador, o deben recolectarse y almacenarse en un conservante que sea compatible con los métodos moleculares y almacenarse a temperatura ambiente otra alternativa es mezclar las heces con dicromato de potasio al 2,5 % y almacenarse hasta un mes antes de la prueba de PCR (56).

Es necesario realizar un diagnóstico diferencial de giardiasis con gastroenteritis viral, enfermedad de Crohn, intolerancia a la lactosa, síndrome del intestino irritable, diarrea del viajero, intoxicación alimentaria, amebiasis, criptosporidiosis, estrongiloidiasis e infección por *Dientamoeba fragilis* (57).

9.2.4. Tratamiento de la enfermedad

La infección por giardiasis es tratada inicialmente con una hidratación óptima para mantener el equilibrio de electrolitos y así minimizar la severidad y duración de la diarrea (56). Adicionalmente se debe tratar con medicamentos o fármacos como los nitroimidazoles, incluido el metronidazol para reducir la duración de los síntomas, prevenir complicaciones y minimizar la transmisión del parásito a otros huéspedes, sin embargo, se han documentado tasas crecientes de resistencia en la literatura, lo que subraya la necesidad de nuevos descubrimientos terapéuticos (7,8,25,45,56).

Investigaciones recientes han demostrado que los probióticos tienen efecto significativo en el control de la infección por *Giardia sp.* al reducir la carga parasitaria, la eliminación de quistes y la duración de la infección por lo cual representa una gran alternativa ya que

se ha documentado un aumento de casos de fallas terapéuticas debido a los efectos adversos de medicamentos como albendazol, la paromomicina y la nitaxozanida junto con la resistencia a los medicamentos que empieza a tomar fuerza en *Giardia spp.* (56).

Uno de los mecanismos de resistencia más estudiados en *Giardia* se debe al fracaso del tratamiento frente al metronidazol, un fármaco utilizado como primera línea para el tratamiento de la giardiasis, este medicamento puede ser activado por cuatro enzimas principales en *Giardia* como la piruvato-flavodoxina oxidorreductasas (PFOR-1 y 2), la enzima tiorredoxina reductasa (TrxR) y la nitroreductasa (NR)-1 (58). El metronidazol causa un estrés oxidativo en *Giardia* que conduce a la muerte celular al generar un mal funcionamiento de las proteínas, interrumpir la multiplicación y dañar del ADN, es por ello que los mecanismos de resistencia desarrollados por *Giardia* consisten en la regulación negativa de las enzimas NR-1, PFOR y TrxR o la regulación positiva de las enzimas que pueden convertir el medicamento en una molécula inerte (58).

9.2.5. Manifestaciones clínicas y severidad de cuadro clínico

La infección suele comenzar con la ingestión de quistes que se diferencian en trofozoítos que colonizan la parte superior del intestino delgado, el período de incubación es de 1 a 3 semanas (2,9,16,56,57). Las manifestaciones clínicas de la giardiasis varían desde un estado asintomático hasta diarrea crónica y malabsorción grave; esta variación en cuanto a las manifestaciones clínicas se debe a que el parásito no es invasivo por lo cual hay poca o ninguna inflamación de la mucosa durante la infección aguda, sin embargo, la gravedad de la enfermedad puede depender de múltiples factores del parásito y del

huésped (9,16). Aproximadamente del 50 al 75% de las personas infectadas son asintomáticas, sin embargo, las infecciones sintomáticas ocurren con mayor frecuencia en niños que en adultos (57). Las personas asintomáticas pueden eliminar los quistes durante seis meses o más (9,57).

Los primeros síntomas tras el periodo de incubación consisten en heces blandas y grasosas acompañadas de flatulencia las cuales se pueden volverse malolientes lo que desencadena con frecuencia la de pérdida de peso, otros síntomas incluyen malestar general, dolor o calambres abdominales, náuseas, vómitos, anorexia, distensión abdominal, fatiga, astenia y en casos muy raros induce a la aparición de fiebre, escalofríos y dolor de cabeza, aunque es muy poco frecuente (2,56,57). Los síntomas generalmente se resuelven en 2 a 4 semanas, sin embargo, los síntomas varían según múltiples factores, como la edad del paciente, la carga parasitaria, la virulencia del parásito y la respuesta inmunitaria del huésped (9,57).

Dentro de las causas de la severidad del cuadro están los factores de virulencia del protozooario, pues las cisteínas proteasas afectan la función de barrera mucosa intestinal, el agotamiento de arginina en el huésped genera mayor apoptosis de las células epiteliales intestinales, el acortamiento de las microvellosidades que quedan como resultado de la unión de los trofozoítos a las células epiteliales que recubren el intestino delgado y a la activación de los linfocitos TCD8 generando la activación de la apoptosis, lo que lleva a la pérdida de uniones intercelulares, reordenamiento del citoesqueleto y disfunción de la barrera, lo que contribuye a la diarrea (9,16,55,56,59).

Por otro lado, la hipersecreción de aniones aumenta las tasas de tránsito intestinal debido a la desgranulación de los mastocitos, esto genera deshidratación y desequilibrio electrolítico además de la activación exacerbada de los linfocitos TCD8 que en la giardiasis es responsable de las insuficiencias de disacaridasa y la malabsorción de electrólitos, nutrientes y agua por lo cual en casos extremos puede llegar a causar mortalidad por deshidratación extrema en personas que no son tratados o tratados inadecuadamente, ocurriendo principalmente en lactantes y niños desnutridos (55,57,59). Adicionalmente, los niveles de NO en las células epiteliales intestinales son importantes en la regulación de la adsorción/secreción de agua, lo que sugiere que podría estar asociado con síntomas de giardiasis (16).

Los pacientes con deficiencia de IgA tienen un ligero aumento en la incidencia de infección por *G. intestinalis* a causa de una respuesta ineficaz de IL17A lo que genera una infección prolongada, aunque una respuesta excesivamente exuberante puede dar como resultado una respuesta inflamatoria del huésped que es perjudicial para el huésped (2,60).

La desnutrición en la giardiasis juega un papel importante ya que impide una respuesta inmunitaria eficaz debido a que tanto la respuesta inmunitaria innata como la adaptativa son importantes para el control de esta infección (2,7,9). La inmunodeficiencia, en particular la deficiencia de anticuerpos, predispone a una mayor intensidad y persistencia de las infecciones por *Giardia* ya que la producción de anticuerpos específicos se correlaciona con la eliminación del parásito y existe una mayor frecuencia de infecciones sintomáticas en pacientes con hipogammaglobulinemia (7,9,61).

9.2.6. Respuesta inmunológica de la giardiasis

La respuesta inmune del huésped frente a la infección por *Giardia* inicialmente es mediada por la capa mucosa intestinal quien proporciona una defensa crítica del huésped contra la exposición a patógenos y la lesión epitelial; las células caliciformes del epitelio secretan mucinas, como la Mucina-2 (MUC2), que es el componente principal de la mucosidad en los intestinos delgado y grueso encargada de proteger contra la colonización de patógenos (8). Adicionalmente, las células epiteliales intestinales son las responsables de producir óxido nítrico (NO) un antimicrobiano dirigido contra patógenos bacterianos y parasitarios esto lo convierte en una parte esencial de la respuesta inmune innata del huésped frente la infección, este antimicrobiano tiene funciones en la neurotransmisión y en la regulación de la integridad de la barrera mucosa y junto con el tono vascular en el intestino (55,60). El NO también inhibe la enquistación y la desenquistación de *Giardia*, por lo tanto, podría interferir con la transmisión del parásito, ya que inhibe el crecimiento y diferenciación (enquistamiento) de los trofozoítos de *G. intestinalis*, es importante aclarar que el efecto del NO es citostático ya que no elimina los trofozoítos (16,60).

Por otro lado, las células TH17 producen IL-17A reconocida como un componente clave de la respuesta inmunitaria a la infección por *Giardia* al facilitar la respuesta de los anticuerpos anti-giardiales, particularmente del isotipo IgA, estos anticuerpos desempeñan un papel importante en la eliminación del parásito y los mastocitos participan en el control de la infección por *Giardia* aunque se ha visto que también

pueden contribuir a los calambres abdominales que son comunes en las personas que presentan un cuadro de giardiasis sintomática(2,9,60).

9.3. *Giardiavirus*

9.3.1. Generalidades

GLV es un virus que infecta al protozoo *G. intestinalis*, pertenece a la familia *Totiviridae*, siendo pariente de otros virus que infectan hongos (*Totivirus* y *Victorivirus*) y protozoos (*Trichomonasvirus* y *Leishmaniavirus*), se identificó por primera vez en un aislado de *G. intestinalis* de un paciente humano (HP-1, Human Portland-1) en 1980 (20,25,31,39,62,63).

La literatura ha relacionado la gravedad de las enfermedades causada por parásitos como *Leishmania spp* y *Trichomonas vaginalis* con la presencia de endosimbiontes virales en su citoplasma y su efecto en el huésped humano (20,39). Estos endosimbiontes son virus de ARN de doble cadena (ds), *Leishmaniavirus* (LRV) y *Trichomonasvirus* (TVV), en el caso de LRV la liberación del dsARN viral induce a la respuesta inmunitaria innata humana a una hiperinflamación a través de la activación de la señalización del receptor Toll-like 3 (TLR3) del huésped, lo que aumenta la carga parasitaria y exacerba la enfermedad; por otro lado, la presencia de TVV también puede modular la respuesta inmune humana a la infección por *T. vaginalis* aumentando la colonización de bacterias patógenas vaginales asociadas con la vaginosis y promueve su virulencia (20,39).

Se cree que el GLV ingresa a la célula por endocitosis mediada por receptor de superficie aun no identificado debido a que se han encontrado cepas resistentes a la infección viral independientemente del ensamblaje de *Giardia*, una vez el virus ingresa por endocitosis se dirige a las vacuolas periféricas porque requiere de un pH bajo para liberar su material genético y así infectar al parásito (20,23,39,62). El GLV se replica en el citoplasma inicialmente con una replicación lenta hasta llegar a una replicación exponencial, cuando esto sucede se ven procesos de replicación también en el núcleo de *Giardia spp* (62).

El GLV cuenta con un virión que se caracteriza por ser más termoestable que otros viriones de la familia *Totiviridae*, lo que explica la capacidad de GLV para transmitirse extracelularmente, una característica única entre los protozoos y hongos que pueden ser infectados por virus pertenecientes a la familia *Totiviridae* (39). Recientemente se ha planteado la hipótesis de que en la cepa *G. intestinalis* WB hay dos tipos de partículas GLV, que difieren en el tamaño de las proteínas CP una p100 y otra p95, debido a los perfiles de mapeo de péptidos y a la secreción de estas partículas en el medio, sin embargo, estos dos supuestos virus no se definieron individualmente a nivel genómico (39).

9.3.2. Genoma

GLV es un virus pequeño de ARN de doble cadena (dsARN) no segmentado, sin envoltura; su cápside viral tiene una apariencia icosaédrica (simetría $T = 2$) construida por 120 subunidades de proteínas (CP) y un tamaño aproximado de 36 nm a 48,5nm (20,39,62). Tiene una estructura simple compuesta por una sola molécula de dsARN y

dos proteínas codificadas en su genoma, una proteína de 100 KDa que constituye la cápside viral y un polipéptido de 190 KDa que corresponde a una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (20,31,39,62).

El genoma de GLV es lineal y cuenta con un tamaño genómico de 6,3 Kb; fue secuenciado por primera vez en 1990 en la cepa HP-1 de *G. duodenalis* (20,39,62). Consta de dos ORF superpuestas por 220 nt separados por un desplazamiento de marco de -1, el primer ORF codifica la cápside viral (CP), mientras que el segundo ORF codifica la ARN polimerasa (RdRp) (20,31,33,39,62,64).

El ARNm de GLV abarca toda la hebra genómica positiva carece de una protección convencional y no está poliadenilado, lo que hace que la traducción de las proteínas CP dependan de mecanismos independientes como un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) el cual está ubicado en la región no traducida 5' (5'-UTR) que se superpone parcialmente a la ORF1, para ello una región de ARN actúa como cis para promover la síntesis de proteínas (31,39). Adicionalmente el ARNm de GLV es conocido por ser capaz de actuar como vector para realizar actividades de transfección en los trofozoítos de *G. intestinalis* lo que favorece la proliferación intracelular de las partículas de GLV infecciosas en el parásito (33,36,63).

La RdRp se expresa con una baja eficiencia y actúa como proteína de fusión gag-pol (CP/RdRp) por medio de un cambio en el marco ribosomal programado (ORF) -1 que se produce durante el proceso de traducción gracias a la presencia de un heptámero y un pseudonudo necesario para el cambio del marco en la superposición (39,63,64).

La CP o producto de ORF se somete a un proceso de maduración postraduccional con la eliminación de los primeros 32 residuos N-terminales por una cisteína proteasa de *G. duodenalis* no identificada (39,63).

La cápside viral está compuesta por dos subunidades CP en forma triangular CPA y CPB, las subunidades CPA se acercan entre ellas a través del extremo angosto mientras que las subunidades CPB se encuentran encajadas entre las subunidades A vecinas, esta unión forma una "meseta" elevada, plana y centrada en cada uno de los ejes icosaédricos con una apariencia de "rebanada de pizza" triangular alargada (63). Cada una de las mesetas está constituida por porciones de 10 subunidades CP: cinco A y cinco B (63).

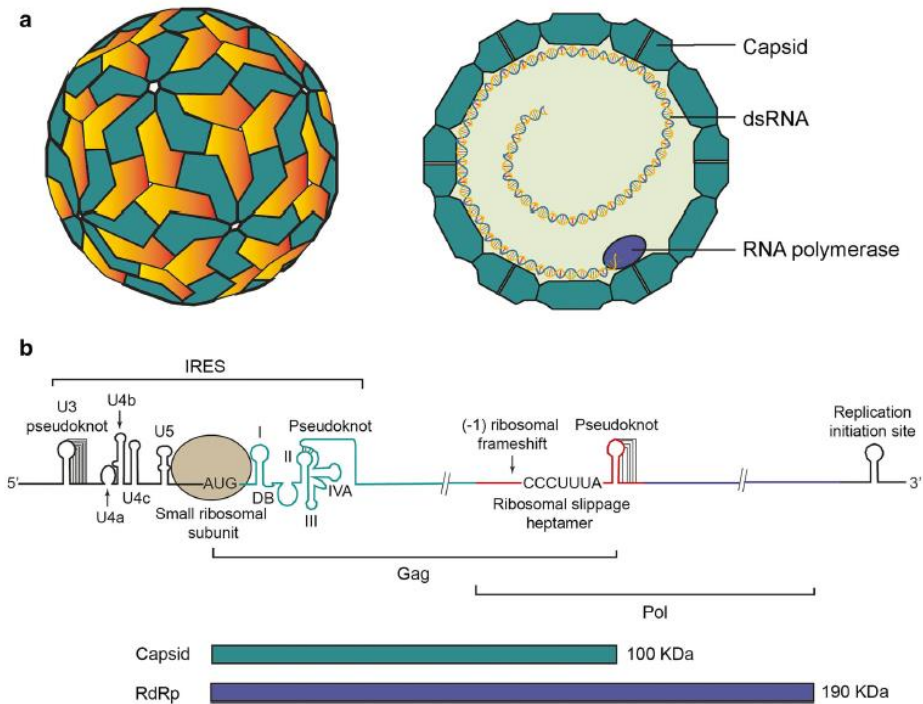


Figura 6. Representación esquemática del virión de *Giardiavirus*. Figura 6 (a) virión de *Giardiavirus*. Figura (b) Inicio del sitio de replicación. Imagen tomada de: *Giardiavirus: an update* (62).

9.3.3. Replicación y traducción

El GLV se replica en el citoplasma en la primera etapa de la infección, sin embargo, durante la etapa final de su replicación migra a los núcleos de *Giardia spp* donde madura y finalmente es liberado al medio extracelular (30). Para llevar a cabo su replicación viral en las células huésped, los viriones deben interactuar con las moléculas receptoras presentes en la membrana del trofozoíto adulto de *Giardia spp*, el virión ingresa a la célula por medio de endocitosis y la vacuola periférica actúa como un vehículo de translocación para la absorción del virus en *G. intestinalis* quienes son liberados en el citoplasma del protozoario para iniciar su replicación (30). La infección por GLV se puede inhibir por inhibidores de endocitosis como la cloroquina y el NH₄Cl (30,65).

El GLV cuenta con una estructura 5'UTR, pero no es suficiente para iniciar la traducción de la transcripción viral, por lo que necesita combinarse con 264 nts de la región codificante de la cápside para funcionar como un IRES en *Giardia spp*, reclutando así la maquinaria de traducción del parásito para iniciar la síntesis de sus proteínas (20,23,33,63). Sin embargo, el IRES de GLV no requiere de ningún complejo de pre iniciación para iniciar el proceso de traducción, pero si requiere de una serie de factores proteicos transactivadores (ITAF) ya que no se puede unir directamente a la subunidad pequeña del ribosoma de *Giardia* (37,66).

Se encontraron tres ITAF para iniciar la traducción de GLV-IRES el primero es un miembro de la familia de helicasas IBP1 y los otros dos son homólogos de proteínas virales conocidas de unión a IRES, la proteína SRp20 y el autoantígeno La (GILa) (37,66). El homólogo del autoantígeno presente en *Giardia lamblia* (GILa) actúa como un factor transactivador en función de su unión específica a GLV-IRES in vitro, esta proteína se localiza principalmente en el citoplasma del trofozoíto de *Giardia* y cuenta con 348 residuos de aminoácidos (66).

9.3.4. Relación virus-parasito

El virus está presente en los núcleos de los trofozoítos de *G. intestinalis* infectados, sin embargo, el crecimiento exponencial de GLV en el parásito no causa lisis celular ni retarda el crecimiento de la célula huésped, aunque sí puede generar reordenamientos internos en el citoesqueleto (19,20,24). El proceso de infección de *Giardia spp* por GLV no evidencia efectos como la lisis celular, la formación de sincitios o cuerpos de inclusión (20,65). Adicionalmente aún no se ha demostrado si la presencia de GLV está relacionado con una giardiasis sintomática o asintomática, así como tampoco se ha demostrado que el GLV esté relacionado con la resistencia a los antiparasitarios que recientemente ha venido tomando fuerza en *G. intestinalis* (22).

G. intestinalis al ser un protozoario cuenta con dos formas una quística y una vegetativa, el GLV aún no se ha observado en la forma quística del parásito y aún no se ha determinado si el virus puede transmitirse mediante la transformación entre quiste y

trofozoíto (25). Adicionalmente se sabe que con una cantidad de 500.000 partículas virales de GLV en un trofozoíto se detiene el crecimiento de *G. intestinalis* in vitro, no se conoce muy bien el papel que GLV juega en las infecciones por *G. intestinalis* (20,24).

9.3.5. Mecanismos de resistencia

Los virus que pertenecen a la familia *Totiviridae* como *Leishmaniavirus* (LRV) y *Trichomonasvirus* (TVV), se han relacionado con la exacerbación de la enfermedad causa por *Leishmania spp* y *Trichomonas vaginalis* respectivamente, aunque todavía no está claro si sucede lo mismo con GLV en la giardiasis, aunque varios autores afirman que no existe correlación entre la patogenicidad de *Giardia* y la presencia de GLV (39,63).

10. Metodología

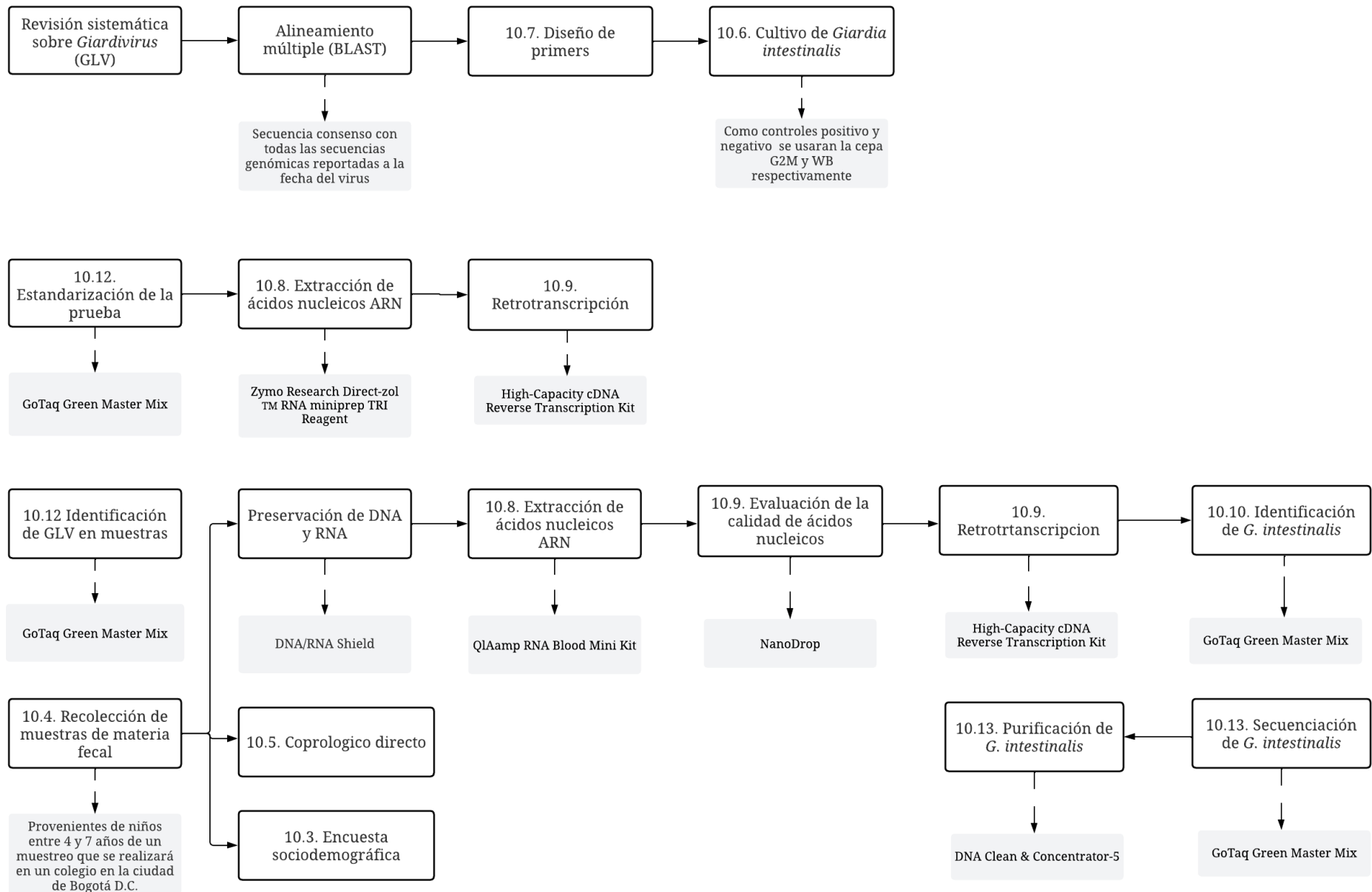


Figura 7. Representación esquemática de la metodología. Elaboración propia.

10.1. Tipo de estudio

El estudio es descriptivo e incluye trabajo experimental.

10.2. Consideraciones éticas

La presente investigación no incluye experimentación con animales, sin embargo, se hará uso de muestras biológicas (materia fecal proveniente de humanos). Por lo tanto, se acoge a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki y en la Resolución 008430 de octubre 4 de 1993 del Ministerio de Salud para el desarrollo de la actividad investigativa en salud. Según el artículo 11 de la resolución antes mencionada la investigación no representa ningún tipo de riesgo ya que no se intervendrá o modificara las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participaran en el estudio. Adicionalmente, se dio cumplimiento con el artículo 6 de la misma resolución al contar con un consentimiento informado por parte de los sujetos a participar y el estudio se llevó a cabo únicamente cuando se tuvo la autorización de los participantes, garantizando el anonimato y la confidencialidad de la información personal identificable y de contacto como nombre, documento de identidad, dirección y teléfono de los participantes.

10.3. Encuesta sociodemográfica

Se aplicó una encuesta sociodemográfica a los cuidadores de los menores participantes, estructurada en siete categorías: características sociodemográficas, cuidador del menor, consumo y acceso a los alimentos, características de vivienda, hábitos higiénico-sanitarios,

mascotas y aspectos clínicos de los menores. Con el fin de analizar la relación entre la presencia de parásitos y las condiciones sociodemográficas de los menores.

Los datos recopilados se analizaron mediante la prueba de chi cuadrado para identificar asociaciones significativas entre la presencia de parásitos y las variables sociodemográficas descritas anteriormente. Para este análisis se utilizó el software GraphPad Prism 10.

10.4. Recolección de muestras en población infantil

Se realizó un muestreo en un colegio ubicado en la localidad 18 Rafael Uribe Uribe (Bogotá D.C, Colombia), donde se obtuvo un conjunto de muestras de materia fecal de niños en edad escolar (4 - 11 años), con el objetivo de realizar un análisis coprológico y pruebas moleculares. Las muestras se fraccionaron, destinando una porción para el montaje directo y otra para las pruebas moleculares. En este último caso dicha fracción se preservó en DNA/RNA Shield (Cat. R1100-50, Zymo Research).

10.5. Coprológico directo

Se realizó un coprológico directo a las muestras usando una gota de solución salina al 0.85% y una gota de Lugol (67). Las muestras fueron procesadas y analizadas inmediatamente después de su recolección con el fin de evitar la pérdida de vitalidad de los trofozoítos o quistes de los protozoarios. Durante la recolección y el traslado de las muestras a las instalaciones necesarias para ser analizadas se mantuvieron a temperatura de refrigeración.

10.6. Cultivo de *Giardia intestinalis* cepa WB y G2M

Las cepas de *G. intestinalis* WB y G2M fueron utilizadas como control negativo y positivo para GLV respectivamente. La cepa WB se obtuvo a través de BEI Resources, NIAID, NIH: *Giardia lamblia*, cepa WB, clon 6 (axénico), NR-9706” y la cepa G2M se obtuvo a través del Repositorio de recursos de investigación sobre biodefensa e infecciones emergentes del NIH, NIAID, NIH: *Giardia lamblia*, cepa G2M, NR-9240”. Ver anexo N°1.

Las cepas control crio preservadas utilizadas fueron descongeladas según lo indicado en la ficha técnica y el cultivo se realizó bajo las condiciones establecidas por Keister en 1983 en medio TYI-S-33 suplementado con Gentamicina y suero fetal bovino al 10% (68–75). El medio se esterilizó con membrana de 0.22 mm, se distribuyó en tubos y se almacenó a 4 °C en la oscuridad antes de realizar la siembra del parásito (71–75). Los tubos se incubaron a 37 °C con una inclinación de 15°C durante 96 horas (71–75).

10.7. Diseño de primers

Para el diseño de primers se realizó un análisis de homología con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, por sus siglas en inglés) con todas las secuencias reportadas a la fecha de GLV en el NCBI, seleccionando un total de 4 secuencias (MW659707.1, MW659704.1, NC_003555.1 y L13218.1). Con estos archivos se realizó un alineamiento múltiple para la generación de una secuencia consenso mediante el programa NCBI Multiple Sequence Alignment Viewer, Version 1.25.2. Posteriormente, por medio del software

Geneious prime, se diseñaron los primers teniendo en cuenta una extensión máxima de 20 pb y un porcentaje de GC entre 40-60% y cuyas secuencias son: Forward 5' CGTAGACATCGGTTTCGAGGG 3' y Reverse 5' ACGCCATTTTGATAGGGCCA 3' los cuales amplifican un fragmento de 165 pb de la región que codifica la cápside viral.

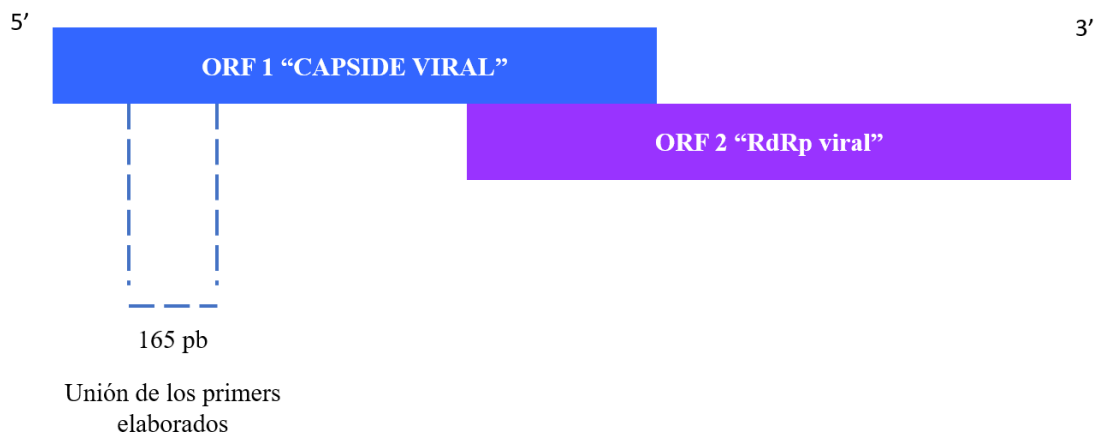


Figura 8. Diagrama del genoma viral de GLV con ubicación de los primers elaborados para su detección. Elaboración propia.

10.8. Extracción de ácidos nucleicos

Se realizaron extracciones de ARN de las muestras de materia fecal y de los controles. Para los controles positivo y negativo se empleó el kit Zymo Research Direct-zol™ RNA miniprep TRI Reagent para la extracción de ARN total, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para las muestras de materia fecal se utilizó QIAamp RNA Blood Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante con un paso adicional de lisis mecánicas con perlas para mejorar el rendimiento de la extracción de ARN total.

Finalmente, se evaluó la calidad del ARN total obtenido mediante cuantificación por espectrofotometría (NanoDrop, Thermo Scientific).

10.9. Retrotranscripción

Se realizó la retro transcripción de ARN total utilizando el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Cat. 4374966, Applied Biosystems) para generar el cDNA a partir del ARN total obtenido de los cultivos de las cepas WB y G2M, así como de las cinco muestras de materia fecal seleccionadas para la genotipificación de *G. intestinalis*. Se retrotranscribieron 100 ng de ARN total extraído de las cepas WB y G2M y 1 µg del ARN extraído de las muestras de materia fecal.

Las condiciones del ensayo se estandarizaron a un volumen final de 20 µl. La mezcla de reacción contenía 1X de RT Buffer, 2mM de dNTP Mix, 2mM de RT Random Primers, 25 U de la enzima Transcriptasa inversa MultiScribe, 0,5 U de RNAsa inhibidor y agua libre de nucleasas.

El perfil térmico utilizado fue el recomendado por Applied Biosystem, consistiendo en tres ciclos: un ciclo inicial de 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 2 horas y un último ciclo a

85°C durante 5 minutos para la inactivación de la enzima. Posteriormente, el cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

10.10 Identificación de *G. intestinalis* mediante PCR

Para la identificación de *G. intestinalis* en las muestras de materia fecal se realizó una PCR anidada, utilizando GoTaq Green Master Mix. La selección de los primers para realizar la identificación de *G. intestinalis* se tomaron de la investigación realizada por Sulaiman I., y colaboradores en 2003 donde proponen dos juegos de primers capaces de amplificar en el gen de la triosafosfato isomerasa (TPI) (76). Para la primera ronda de la PCR anidada se tomó como Forward 5' AAATNATGCCTGCTCGTCG 3' y Reverse: 5' CAAACCTTNTCCGCAAACC 3' los cuales amplifican un fragmento de 605 pb; mientras que para la segunda ronda se tomó como Forward: 5' CTTATCGGNGGTAACCTT 3' y Reverse: 5' GTGGCCACCACNCCCGTGCC 3' los cuales amplifican un fragmento de 530 pb (76). Para ambas rondas se empleó el mismo perfil térmico el cual también fue propuesto por Sulaiman I., y colaboradores en 2003, consiste en un primer ciclo de 94°C por 5 minutos y 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto y un último ciclo de 72°C por 10 minutos (76).

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando concentraciones específicas de cDNA: 100 ng para las muestras, 10 ng para las cepas G2M y WB. El volumen final de reacción fue de 10 µl. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en solución amortiguadora TAE 1X a 90 V. La resolución de los productos de PCR se visualizó con SYBR Safe 1X. La banda específica de *G. intestinalis* de aproximadamente

530 pb se comparó con un marcador de peso molecular de 100 bp GeneRuler Plus DNA Ladder (Cat. SM0321, Thermo Scientific).

10.11. Estandarización de la detección de GLV en la cepa G2M de *G. intestinalis*

Para la estandarización de la PCR para la detección de GLV, se utilizó la cepa G2M conocida por contener el virus. Se empleó GoTaq Green Master Mix 1X, los primers diseñados previamente Forward 5' CGTAGACATCGGTTCGAGGG 3' y Reverse 5' ACGCCATTTTGATAGGGCCA 3' en una concentración final de 1µM y dos cantidades de cDNA de la cepa G2M: 10 ng y 5 ng. El volumen final de la reacción fue de 10 µL. El perfil térmico consistió en un ciclo inicial de 95°C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos y un ciclo final de 72°C por 5 minutos.

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en solución amortiguadora TAE 1X a 90 V. La resolución de los productos de PCR se visualizó con SYBR Safe 1X. La banda específica de GLV aproximadamente 165 nt se comparó con dos marcadores de peso molecular uno de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) y otro de 100 bp GeneRuler Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), permitiendo verificar tamaño de los productos amplificados.

Posteriormente se realizó rango dinámico para determinar la sensibilidad de la PCR estandarizada para la detección de GLV a partir de diferentes concentraciones de cDNA

obtenido de la cepa G2M de *G. intestinalis*. Se utilizaron diluciones en serie con factor de dilución 2 probando 6 puntos con las siguientes cantidades 5 ng, 2.5 ng, 1.25 ng, 0.625 ng, 0.3125 ng y 0.15625 ng. Los productos amplificados se analizaron en las condiciones anteriormente descritas.

10.12. Identificación de GLV en muestras de materia fecal

Se realizó la identificación molecular de GLV mediante PCR a tres muestras de materia fecal que habían sido previamente seleccionadas basándose en los resultados positivos para *G. intestinalis* obtenidos mediante el montaje húmedo directo y confirmado por la PCR anidada descrita anteriormente.

Se empleó GoTaq Green Master Mix, con los primers diseñados previamente Forward 5' CGTAGACATCGGTTTCGAGGG 3' y Reverse 5' ACGCCATTTTGATAGGGCCA 3' en una concentración final de 1µM. Las concentraciones empleadas de cDNA de las cepas G2M y WB y de las muestras fue de 10 ng. El volumen final de la reacción fue de 10 µL. El perfil térmico consistió en un ciclo inicial de 95°C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos y un ciclo final de 72°C por 5 minutos.

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en solución amortiguadora TAE 1X a 90 V. La resolución de los productos de PCR se visualizó con SYBR Safe. La banda específica de GLV aproximadamente 165 nt se comparó

con un marcador de peso molecular de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), permitiendo verificar tamaño y pureza de los productos amplificados.

10.13. Secuenciación de muestras positivas para *Giardia intestinalis*

Para la caracterización molecular de *G. intestinalis* se tuvieron en cuenta aquellas muestras que mediante el montaje húmedo directo dieron positivas. En total fueron 5 muestras y se sometieron a PCR anidada para obtener los productos de amplificación usando como marcador molecular el gen *tpi* (triosa fosfato isomerasa) para la identificación de los ensamblajes de *G. intestinalis* (76).

Los productos de PCR se purificaron con el kit DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research) a un volumen final de 20 µL siguiendo las instrucciones de manufactura. Se analizaron los productos de purificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en solución amortiguadora TAE 1X a 90 V. La resolución de los productos de PCR se visualizó con SYBR Safe 1X. La banda específica de *G. intestinalis* de aproximadamente 530 pb se comparó con un marcador de peso molecular de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), permitiendo verificar tamaño y pureza.

Los productos purificados se enviaron a secuenciar al GenCore (centro de secuenciación y análisis de datos genómicos de la universidad de los Andes) mediante el método Sanger. Las secuencias obtenidas fueron corregidas y alineadas en MEGA 11 y comparadas con las secuencias de referencia por BLAST. La reconstrucción filogenética para asignar el

ensamblaje al grupo de secuencias de *G. intestinalis*, se realizó utilizando Máxima Verosimilitud con secuencias de referencia contenidas en GenBank con los siguientes números de acceso: AI (I02120), AII (U57897), AII (DQ650648), BIII (AF069561), BIV (AF069560), C (AY228641), D (DQ246216), E (KF891311), G (EU781013) y out group con *G. ardeae* (AF069564) (77).

11. Resultados

11.1. Análisis descriptivo de las variables sociodemográficas

La población de estudio para el presente trabajo fueron niños de una edad escolar entre los 4 a 11 años, residentes de un barrio ubicado al sur oriente de la ciudad, perteneciente a la localidad Rafael Uribe Uribe de Bogotá D.C.

Se definieron como criterios de inclusión los estudiantes que estuviesen matriculados en el colegio público y que contaron con consentimiento informado del responsable legal mayor de edad. Por su parte los criterios de exclusión comprendieron el personal no matriculado y el que no hubiese firmado el consentimiento informado.

La encuesta utilizada permitió la recolección de información relacionada con la identificación y aspectos sociodemográficos del menor, aspectos alimentarios y de vivienda, aspectos higiénico-sanitarios y afiliación al Sistema General de Seguridad Social en Salud (SGSSS).

En total se encuestaron 31 menores pertenecientes al colegio, en la tabla 4 se puede observar la edad y el género de los encuestados.

Tabla 4. Edad y sexo de la población infantil encuestada.

Edad	Niños	Niñas	Total
4	7	2	9
5	6	5	11
6	5	2	7
10	0	1	1
11	2	1	3
Total	19	11	31

11.1.1. Características sociodemográficas

La localidad 18 Rafael Uribe Uribe es una zona residencial en el sur de Bogotá, Colombia, caracterizada por contar con varios parques rodeados por grandes zonas verdes como el parque Metropolitano Bosque San Carlos. Se clasifica como zona urbana según la definición oficial de la ciudad. Del total de los encuestados el 71% (22 de 31) indicó que vive en un sector urbano mientras que el 26% (8 de 31) indicó vivir en un sector rural, adicionalmente el 3% (1 de 31) de los encuestados no contestó esta categoría. Se evidencia que algunos de los encuestados (26%) percibe la zona donde vive como rural. Esta percepción se puede deber a la presencia de zonas verdes y espacios naturales descritos anteriormente y que se observan a los alrededores de la zona donde se encuentra ubicado el colegio que finalmente es aledaño a la vivienda de los encuestados.

El 71% (22 de 31) de los encuestados viven en los estratos 1 y 2 (19% (6 de 31) y 52% (16 de 31) respectivamente), mientras que el 13% (4 de 31) viven en estrato 3, por otro lado, el

16% (5 de 31) de los encuestados no saben en qué estrato socioeconómico viven. Lo que se correlaciona con el tipo de afiliación al SGSSS pues el 52% (16 de 31) de los encuestados tienen un régimen de afiliación al SGSS subsidiado, el 19% (6 de 31) no tienen ningún tipo de afiliación, el 13% (4 de 31) no sabe su tipo de afiliación, el 10% está bajo el régimen contributivo y el 6% (2 de 31) de los encuestados no dio respuesta a esta pregunta en la encuesta.

La posible asociación entre las variables sociodemográficas y la presencia de los parásitos se evaluó por medio de tablas de contingencia realizando un análisis de chi cuadrado.

11.1.2. Cuidador del menor

Con los datos obtenidos a partir de la encuesta se pudo evidenciar que el 71% (22 de 31) de los encuestados es cuidado por su madre, el 23% (7 de 31) es cuidado por su abuela, mientras que un 3% (1 de 31) es cuidado por una persona no familiar y el 3% (1 de 31) por su madre y padre; sin embargo, esta variable no tuvo significancia estadística ($p=0,561$) al compararse con la presencia de parásitos intestinales. En cuanto al nivel educativo del cuidador del menor el 32% (10 de 31) cuenta con secundaria completa, el 26% (8 de 31) con primaria completa, el 23% (7 de 31) con secundaria incompleta, el 6% (2 de 31) con tecnológico completo, 6% (2 de 31) con tecnológico incompleto y un 6% (2 de 31) no tiene conocimiento del nivel educativo del cuidador del menor lo que correlacionado con la presencia de parásitos intestinales no muestra significancia estadística ($p=0,634$).

11.1.3. Consumo y acceso a los alimentos

Las variables relacionadas con los ingresos y gastos del hogar permitieron identificar que los ingresos del 29% (9 de 31) de los encuestados no alcanza para cubrir los gastos mínimos del hogar mientras que el 61% (19 de 31) solo alcanza a cubrir los gastos mínimos y el 3% (1 de 31) cubre más de los gastos mínimos del hogar. El 3% de los encuestados no tiene conocimiento de cómo son los ingresos y gastos del hogar y el 3% no contestó esta categoría. Esta categoría de la encuesta permitió evidenciar que no existe significancia estadística relacionada con la presencia de parásitos intestinales ($p=0,574$).

Aun así, el 81% (25 de 31) de los encuestados manifestó sentir preocupación porque se le acabaran los alimentos debido a la falta de dinero, el 32% (10 de 31) manifestó que el menor dejó de tener una alimentación nutritiva, el 35% (11 de 31) indicó que debió disminuir la cantidad de comidas al menor y el 19% (6 de 31) debió suprimir una de las comidas principales del menor por la falta de dinero.

11.1.4. Características de vivienda

En el análisis de las características de vivienda de los encuestados se encontró que el 94% (29 de 31) de los encuestados vive en casa o apartamento en arriendo y el 6% (2 de 31) en casa o apartamento familiar. De los cuales el 71% (22 de 31) está compuesto por un núcleo familiar de 4 y 5 personas (39% (12 de 31) y 32% (10 de 31) respectivamente) y el 25% (8

de 31) por un núcleo familiar de 3, 6, 8 y 9 personas (6% (2 de 31), 13% (4 de 31), 3% (1 de 31) y 3% respectivamente).

Adicionalmente el 35% (12 de 31) de los encuestados cuentan con patio en su vivienda mientras que el 61% (19 de 31) no. En las viviendas predominó el piso de baldosa (81% (25 de 31)), seguido del piso laminado (10% (3 de 31)) o de cemento (10%). Las viviendas de los encuestados cuentan con servicio de acueducto (94% (29 de 31)) y con servicio de alcantarillado (100% (31 de 31)).

Las variables relacionadas con las características de vivienda mencionadas anteriormente evidenciaron que no hay significancia estadística (valor p) al correlacionarla con la presencia de parásitos intestinales.

Por otro lado, el 55% (17 de 31) de las viviendas se encuentran cerca de basureros lo que tiene significancia estadística con la presencia de parásitos ($p=0,049$) y el 58% (18 de 31) de los encuestados reportan la presencia de ratas y/o roedores alrededor de su vivienda, sin embargo esta última no tiene una significancia estadística ($p=0,747$).

Basureros cerca a las viviendas

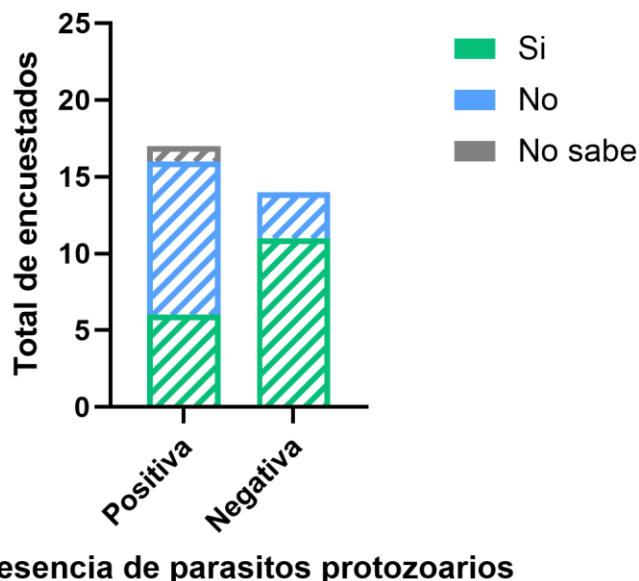


Figura 9. Distribución de basureros cerca de las viviendas frente a la presencia de parásitos protozoarios.

11.1.4. Hábitos higiénico sanitarios

Para los hábitos higiénico sanitarios se hicieron preguntas en la encuesta relacionada con el consumo de agua y alimentos por parte del menor, la eliminación final de excretas y hábitos relacionados con la preparación de alimentos. Aunque no se encontró significancia estadística (valor p) al correlacionar las siguientes variables con la presencia de parásitos intestinales.

Se observó que el 84% (26 de 31) de los encuestados toma agua directamente de la llave mientras que un 16% (5 de 31) no. Por otro lado, el 35% (11 de 31) informó que hierve el agua de la llave antes de tomarla y un 61% (19 de 31) no. En la mayoría de los hogares la

persona encargada de preparar los alimentos es la madre (65% (20 de 31)), seguido de la abuela (19% (6 de 31)), madre y padre (10% (3 de 31)), madre y abuela (3% (1 de 31)) y en un 3% (1 de 31) hay una participación de todos los miembros del hogar. El 97% (30 de 31) de los encuestados indicó que el agua con la que prepara sus alimentos proviene del acueducto y un 3% (1 de 31) no contestó esta categoría.

En cuanto a los hábitos higiénicos sanitarios de las personas que preparan los alimentos el 97% (30 de 31) siempre se lava las manos antes de preparar las comidas y después de ir al baño, mientras que un 3% (1 de 31) lo hace casi siempre; esta variable no mostró tener significación estadística ($P=0,356$). Adicionalmente el 100% (31 de 31) de los encuestados lava las frutas y verduras antes de consumirlas, pero solo el 19% (6 de 31) siempre le agrega hipoclorito (legía), seguido de un 10% (3 de 31) que lo hace casi siempre, 6% (2 de 31) casi nunca y un 58% (18 de 31) nunca se lo agregan; hubo un 6% (2 de 31) de los encuestados que desconocen si este proceso se lleva a cabo. Por otro lado, el 87% (27 de 31) de los menores no consumen carne cruda o a medio cocinar mientras que el 10% (3 de 31) siempre lo hace y un 3% (1 de 31) casi nunca lo hacen. La eliminación final de excretas se da por alcantarillado en el 74% (23 de 31) y por pozo séptico en un 19% (6 de 31). Las variables antes mencionadas no tienen una significancia estadística (valor de p) con la presencia de parásitos intestinales.

En cuanto a los hábitos higiénicos sanitarios del menor se observó que un 52% (16 de 31) juega en el suelo o con tierra teniendo una significancia estadística con la presencia de parásitos intestinales ($p=0,045$), un 84% (26 de 31) de los menores siempre se lava las manos después de ir al baño mientras que un 16% (5 de 31) lo hace casi siempre. El 65% (20 de 31)

de los menores se lava las manos siempre antes de consumir cualquier alimento y un 35% (11 de 31) casi siempre.

Niños que juegan con tierra o en el suelo

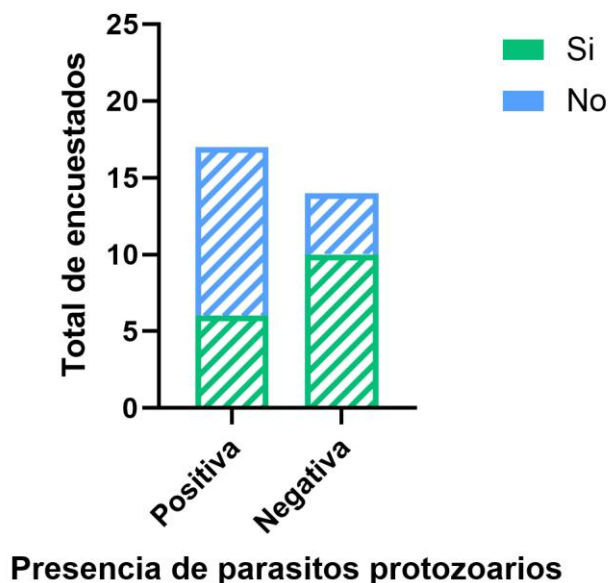


Figura 10. Distribución de niños que juegan con tierra o en el suelo frente a la presencia de parásitos protozoarios

11.1.5. Mascotas

Del total de los encuestados solo el 32% (10 de 31) vive con mascotas de los cuales el 30% (3 de 10) tienen perros, 10% (1 de 10) gatos, 10% (1 de 10) pájaros y un 10% (1 de 10) reportó tener gato y perro como mascota. Sin embargo, el 40% (4 de 10) de los encuestados que manifestaron tener mascota no especificaron cual tenían. Esta variable no tuvo un valor p con significancia estadística en correlación con la presencia de parásitos intestinales.

11.1.6. Aspectos clínicos de los menores

En las características clínicas, se tuvieron en cuenta como variables: haber tenido en las dos últimas semanas previas a la encuesta diarrea, vómito, dolor abdominal y fiebre, si alguna vez al menor le han diagnosticado parásitos o le han hecho un coprológico y haber recibido antiparasitario antes de la encuesta.

Se pudo observar que el 13% (4 de 31) de los encuestados presentaba dolor abdominal y fiebre, solo un 10% (3 de 31) ha presentado diarrea y un 6% (2 de 31) vomito en los últimos 15 días previos a la realización de la encuesta. Al 48% (15 de 31) de los encuestados se les ha suministrado purgante en el último año solo al 10% (3 de 31) le han diagnosticado parásitos anteriormente y al 3% (1 de 31) le han hecho coprológico.

Del total de encuestados purgados previamente a la encuesta el 7% (1 de 15) fue purgado en los últimos 5 días, el 40% (6 de 15) en los últimos 2 a 4 meses, el 20% (3 de 15) en los últimos 5 a 8 meses, 20% (3 de 15) en el último año y el 13% (2 de 15) no contestó esta categoría. Los encuestados manifestaron haber utilizado como desparasitante Haturion (7% (1 de 15)), Albendazol (60% (9 de 15)), Metronidazol (7% (1 de 15)), Jarabe (7% (1 de 15)) e Ivermectina (7% (1 de 15)); aunque el 7% (1 de 15) no sabía con que se purgó al menor y el 7% (1 de 15) no contestó esta categoría.

Las variables analizadas en este apartado no tuvieron significancia estadística (valor de p) al correlacionarse con la presencia de parásitos intestinales.

11.2. Análisis descriptivo de los hallazgos parasitológicos

De las 31 muestras analizadas se detectó la presencia de parásitos protozoarios en el 58% (18 de 31) de los encuestados. De las muestras infectadas se identificó específicamente: *Giardia intestinalis*. (15%), *Entamoeba coli* (15%), Complejo *Entamoeba histolytica/dispar/moskovskii* (12%), *Endolimax nana* (33%) y *Blastocystis sp.* (24%).

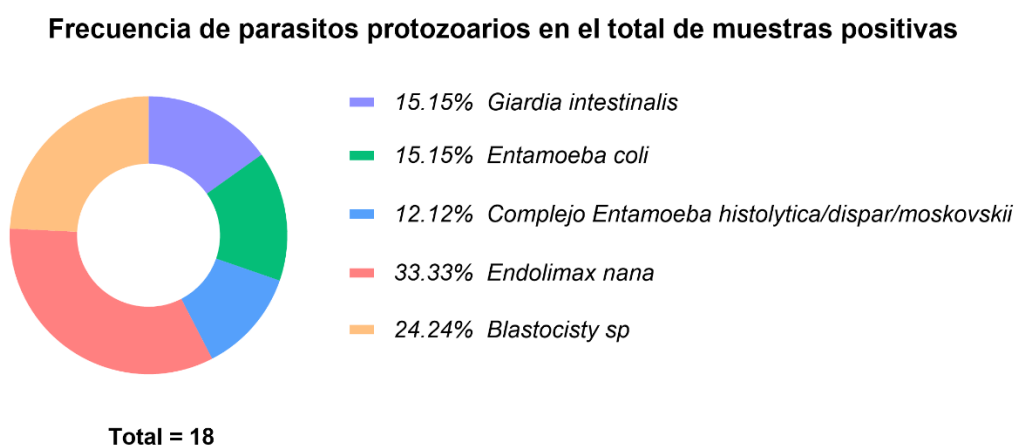


Figura 11. Parásitos protozoarios observados en las muestras de materia fecal.

El estudio reveló que el 44% (8 de 18) de la población encuestada estaba infectada por un solo parásito (monoparasitismo), mientras que el 56% (10 de 18) presentó infección por múltiples parásitos (multiparasitismo). En las tablas 5 y 6 se puede observar la distribución de parásitos protozoarios en función monoparasitismo y multiparasitismo.

Distribución de monoparasitismo y multiparasitismo

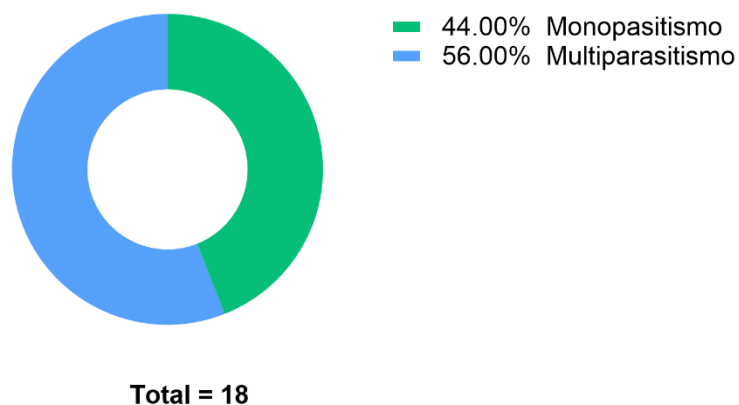


Figura 12. Distribución del parasitismo intestinal de las muestras de materia fecal.

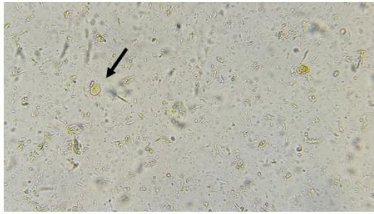
Tabla 5. Distribución de monoparasitismo observado en las muestras.

Mono parasitismo		
<i>Blastocystis</i> sp.	38%	3 de 8
<i>Endolimax nana</i>	50%	4 de 8
<i>Giardia intestinalis</i>	12%	1 de 8
Total		8

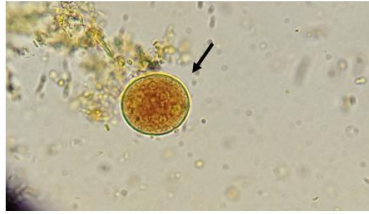
Tabla 6. Distribución de multiparasitismo observado en las muestras.

Multiparasitismo		
<i>Giardia intestinalis</i> <i>Entamoeba coli</i>	20%	2 de 10
<i>Endolimax nana</i> <i>Blastocystis</i> sp.	30%	3 de 10
<i>Giardia intestinalis</i> <i>Endolimax nana</i> Complejo <i>Entamoeba</i> <i>histolytica/dispar/moskovskii</i>	20%	2 de 10
<i>Entamoeba coli</i> <i>Endolimax nana</i>	10%	1 de 10

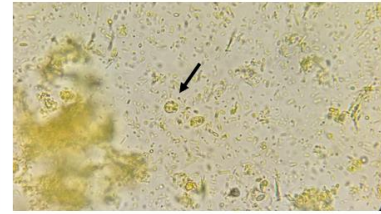
<i>Complejo Entamoeba histolytica/dispar/moskovskii</i>	10%	1 de 10
<i>Entamoeba coli</i>		
<i>Complejo Entamoeba histolytica/dispar/moskovskii</i>	10%	1 de 10
<i>Endolimax nana</i>		
Total		10



A. Quiste de *Endolimax nana*. 40x.



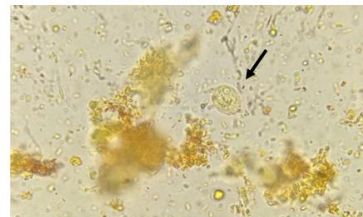
B. Quiste de *Entamoeba coli*. 100x.



C. Quiste de *Blastocystis* sp. 40x.

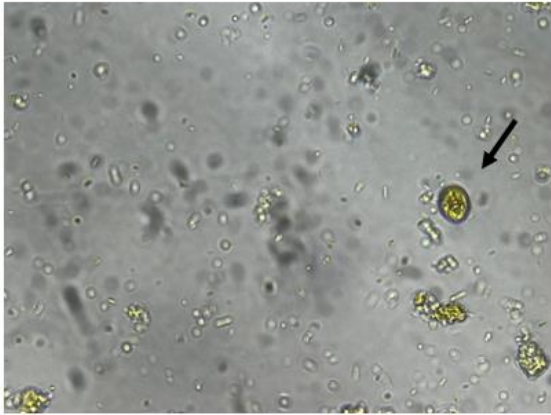


D. Quiste de *Complejo Entamoeba histolytica/dispar/moskovskii*. 40x.

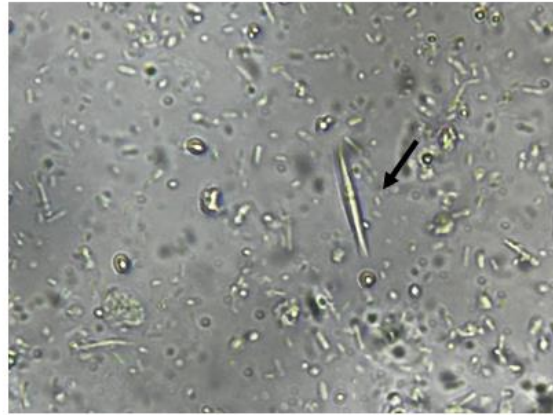


E. Quiste de *Giardia intestinalis*. 100x.

Figura 13. Fotografías de los parásitos protozoarios encontrados en las muestras de materia fecal.



A. Quiste de *Giardia spp.* Aumento 40x. Preparación en fresco con Lugol.



B. Cristal de Charcot-Leyden. Aumento 40x. Preparación en fresco con Lugol.



C. Quiste de *Entamoeba coli.* Aumento 100x. Preparación en fresco con Lugol.



D. Quiste de *Giardia spp.* Aumento 100x. Preparación en fresco con Lugol.

Figura 14. Fotografías de los parásitos protozoarios encontrados en las muestras de materia fecal.

11.3. Evaluación de la calidad de ARN total cepas G2M y WB

Se realizó cuantificación del ARN total obtenido a partir de la extracción de ácidos nucleicos de las cepas G2M y WB mediante espectrometría (NanoDrop, Thermo Scientific). El análisis

reveló una concentración de 6,7 ng/μl de la cepa WB y 10,5 ng/μl de la cepa G2M. Las concentraciones de ARN total obtenido de las muestras se describen en la tabla 5.

Tabla 7. Cuantificación de ARN total por NanoDrop de las muestras de materia fecal.

Muestra de materia fecal	Cuantificación por NanoDrop
1	94,3 ng/μl
3	368,7 ng/μl
10	159,1 ng/μl
20	40,3 ng/μl
31	291,0 ng/μl

11.4. Detección de *G. intestinalis* por PCR anidada en muestras de materia fecal

La PCR anidada destinada a la identificación y tipificación de los ensamblajes de *G. intestinalis* se aplicó a las muestras positivas por microscopia, obteniendo en el segundo round una banda específica del tamaño esperado en solo tres de las muestras (Figura 15 carriles D, E, F, G y H).

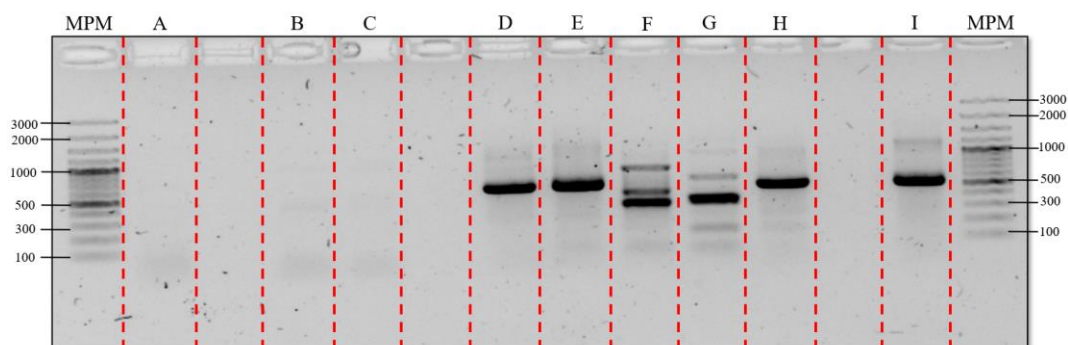


Figura 15. Detección de *G. intestinalis* en muestras de materia fecal. **MPM.** Marcador de peso molecular. **A.** Anidado del control negativo (NTC). **B-C.** Control negativo (NTC).

Muestra 1. **E.** Muestra 3. **F.** Muestra 10. **G.** Muestra 20. **H.** Muestra 31. **I.** Control positivo cepa WB.

Se analizaron un total de 5 muestras según los criterios de inclusión establecidos. De total de muestras analizadas tres amplificaron un fragmento de aproximadamente 530 pb lo que confirma la presencia de *G. intestinalis* (Figura 15 carriles D, E y H). Estas tres muestras fueron las seleccionadas para realizar la genotipificación de *G. intestinalis*. Adicionalmente, se observa que dos muestras tienen inespecificidades posiblemente debido a la poca carga parasitaria presente en la muestra o a la una gran diferencia existente entre las temperaturas de anillamiento de los primers las cuales podrían impedir la amplificación correcta de la zona de interés (Figura 15 carriles F y G).

Las secuencias obtenidas posterior secuenciación Sanger fueron corregidas y alineadas en MEGA 11 y comparadas con las secuencias de referencia por BLAST. El análisis BLAST demuestra que las muestras 1, 3 y 31 pertenecen al ensamblaje B con un porcentaje de identidad del 100%. La reconstrucción filogenética para asignar el ensamblaje al grupo de secuencias de *G. intestinalis*, se realizó mediante el método de máxima verosimilitud confirmando que las muestras 1, 3 y 31 pertenecen al ensamblaje B de *G. intestinalis*.

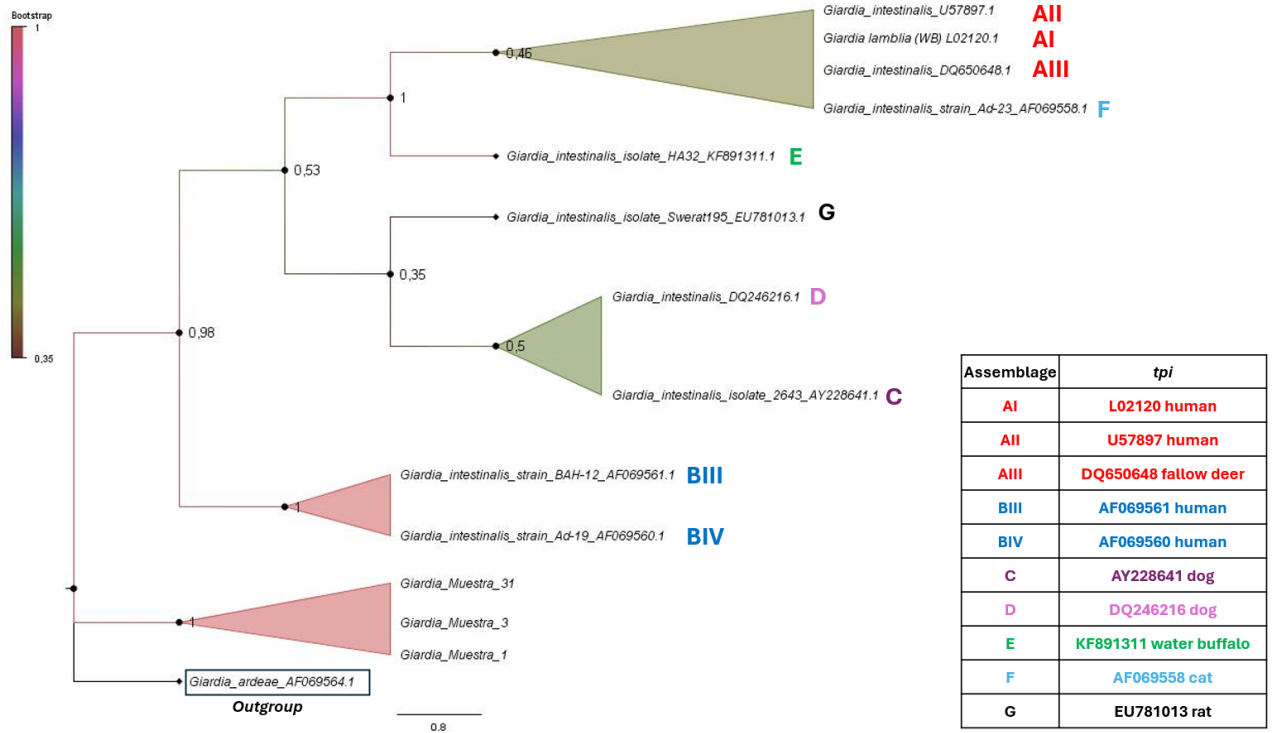


Figura 16. Dendrograma de *Giardia* mediante el gen *tpi*. Las secuencias de referencia se representan mediante el número de acceso correspondiente.

11.5. Estandarización de la detección de GLV en la cepa G2M de *G. intestinalis*

En el gel se observan la amplificación del virus en los carriles C y D de la figura 17.

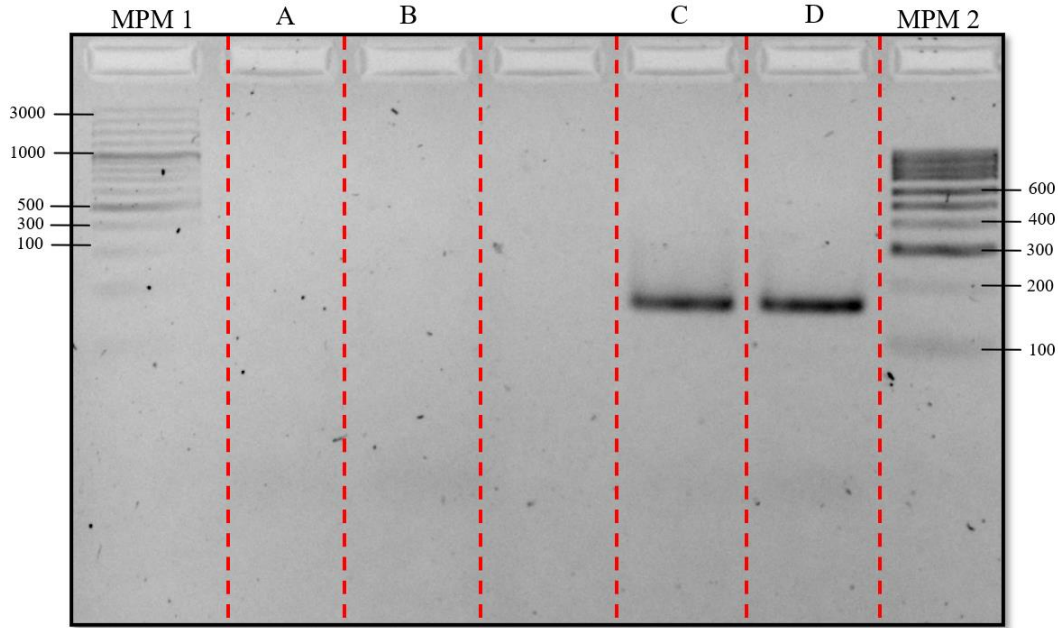


Figura 17. Detección de GLV en la cepa G2M de *G. intestinalis*. **MPM 1.** Marcador de peso molecular (GeneRuler Plus DNA Ladder). **MPM 2.** Marcador de peso molecular (DNA Ladder). **A-B.** Control negativo (NTC). **C.** Cepa G2M con 10 ng de ARN total. **D.** Cepa G2M con 5 ng de ARN total.

Posteriormente se realizó rango dinámico para determinar la sensibilidad de la PCR estandarizada para la detección de GLV obteniendo una banda específica de aproximadamente 165 pb de las diferentes concentraciones aplicadas en los carriles C, D, E, F, G y H de la figura 18, lo que evidencia que la prueba estandarizada cuenta con una buena sensibilidad.

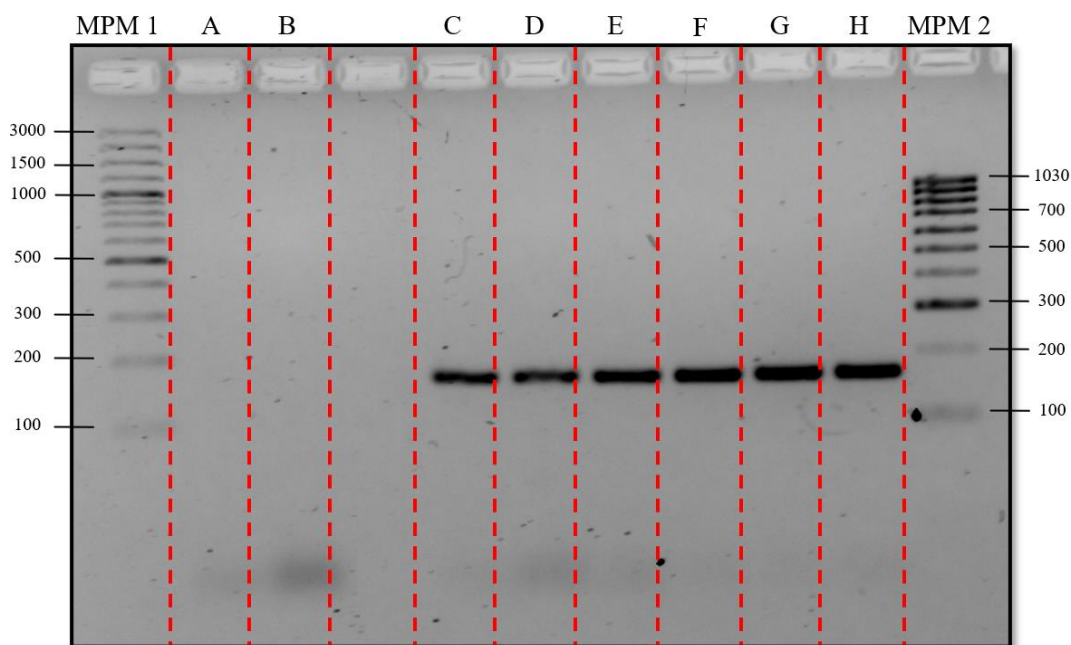


Figura 18. Rango dinámico de GLV en la cepa G2M de *G. intestinalis*. **MPM 1.** Marcador de peso molecular (GeneRuler Plus DNA Ladder). **MPM 2.** Marcador de peso molecular (DNA Ladder). **A-B.** Control negativo (NTC). **C.** Cepa G2M con 0.15 ng de ARN total. **D.** Cepa G2M con 0.31 ng de ARN total. **E.** Cepa G2M con 0.62 ng de ARN total. **F.** Cepa G2M con 1.25 ng de ARN total. **G.** Cepa G2M con 2.5 ng de ARN total. **H.** Cepa G2M con 5 ng de ARN total.

11.5. Detección de GLV en muestras de materia fecal

Se aplicó la prueba molecular estandarizada previamente para la detección de GLV en las tres muestras de materia fecal que contaban con la presencia de *G. intestinalis* microscópicamente y fueron confirmadas por medio de PCR. La reacción se empleó como se describió anteriormente con un volumen final de 10 μ L y 10 ng/ μ L de cDNA de cada una de las muestras. La cepa G2M de *G. intestinalis* se utilizó como control positivo y la

cepa WB de *G. intestinalis* como control negativo. Se realizó un gel de agarosa al 2% con se comparó con dos marcadores de peso molecular uno de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) y otro de 100 bp GeneRuler Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), permitiendo verificar tamaño y pureza de los dos productos amplificados. En el gel se observa la amplificación del virus en la cepa G2M (control positivo) en el carril G de la figura 19. Por otro lado, se evidencia que en ninguna de las muestras hay presencia de GLV (carriles C, D y E de la figura 19).

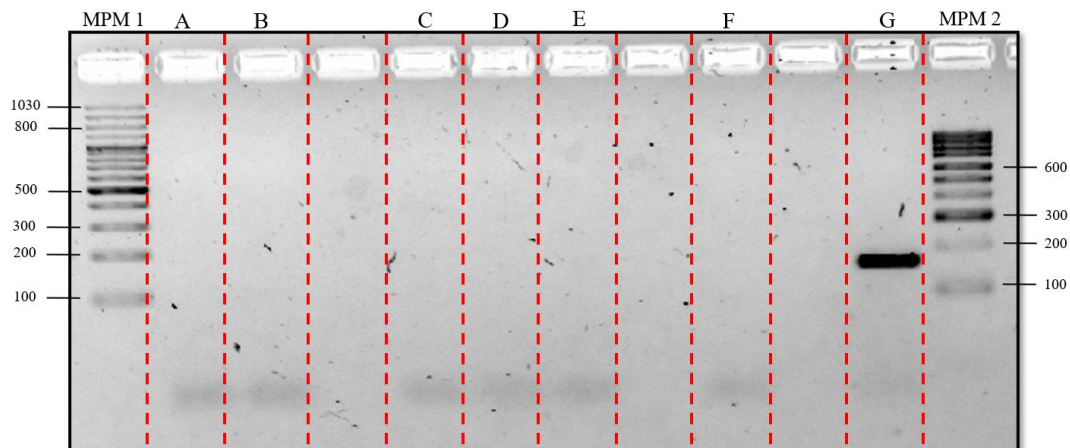


Figura 19. Detección de GLV en muestras de materia fecal. **MPM 1.** Marcador de peso molecular (DNA Ladder). **MPM 2.** Marcador de peso molecular (GeneRuler Plus DNA Ladder). **A.** Control negativo (NTC). **B.** Control negativo Cepa WB. **C.** Muestra 1. **D.** Muestra 3. **E.** Muestra 31. **F.** Cepa WB. **G.** Cepa G2M.

12. Discusión

Los parásitos intestinales representan un problema significativo de salud pública, especialmente en niños en edad escolar, ya que pueden afectar negativamente su desarrollo físico y cognitivo (78,79). La prevalencia de parásitos intestinales en América Latina es alta

y se relaciona con las condiciones socioeconómicas e inadecuados hábitos higiénicos sanitarios (78,80). La presente investigación obtuvo como resultado que el 58% (18/31) de los encuestados estaban parasitados con protozoarios, dentro de los que se encuentra *Endolimax nana*, Complejo *Entamoeba histolytica/dispar/moskovskii*, *Blastocystis sp.*, *G. intestinalis*. y *Entamoeba coli*.

Los resultados obtenidos de la encuesta socioeconómica aplicada en el presente estudio evidenciaron que la mayoría de las categorías analizadas no obtuvieron un valor estadístico de p significativo con la presencia de parásitos protozoarios lo que difiere con lo expresado por otros autores que afirman que los altos niveles de pobreza, mala higiene, problemas de saneamiento de agua potable, clases sociales y condiciones de vida son factores determinantes para la prevalencia de parasitosis debido a que la transmisión de estos microorganismos se da por medio del consumo de agua y/o alimentos contaminados con materia fecal (78–83). Esta diferencia entre el presente estudio y los realizados por otros autores se puede deber al número de encuestados que participaron, ya que se contó con un número de 31 participantes y esto puede afectar los resultados obtenidos en los análisis estadísticos de asociación realizados.

Por otro lado, la presencia de basureros cerca de las viviendas ($p=0,049$) y si el menor juega en el suelo o con tierra ($p=0,045$) fueron la dos variables que en el presente estudio arrojaron una asociación con la presencia de parásitos, lo que se correlaciona adecuadamente con otros estudios realizados en América Latina que dentro de sus variables contemplan la ausencia de servicios de saneamiento básico con un valor de $p < 0,05$ indicando una asociación significativa entre la presencia de residuos cerca de las viviendas con la

presencia de parásitos, evidenciando que la infraestructura sanitaria y disposición inadecuada de residuos es deficiente en sectores sociales vulnerables (79–81,83–85). Adicionalmente la presencia de pisos de tierra ($p < 0,05$) se puede asociar directamente con la manipulación o interacción directa con la tierra o el suelo por parte de los menores haciendo que sea más probable la infección por parásitos (78–80,83–86).

Otras variables analizadas en la encuesta aplicada fueron los hábitos higiénicos sanitarios y manipulación de alimentos como el correcto lavado de manos y desinfección de frutas y verduras por parte de los cuidadores y de los menores antes de consumir o manipular alimentos y después de ir al baño. Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que las acciones anteriormente mencionadas se realizaban de manera estricta, sin embargo, la presencia de parásitos en el 58% (18 de 31) de los participantes evidencian que no se cumplen de manera adecuada estos hábitos higiénico sanitarios, esto se correlaciona con lo mencionado por Vásquez D. et., al., en 2021 y por Pinzón M. et., al., en 2020 ambos estudios realizados en Colombia donde se observa este mismo comportamiento (81,86).

Por otro lado, en este estudio no se pudo establecer asociación entre la presencia de mascotas y la presencia de parásitos intestinales ya que la mayoría de los participantes no tenían mascota, sin embargo, es importante recalcar que existen estudios donde se establece que existe asociación entre la presencia de mascotas en el hogar y que conviven con los menores y la presencia de parásitos intestinales debido a la interacción mascota-niño con acciones como besar, acariciar o dejarse lamer por las mascotas además de la falta de lavado de manos después de jugar con ellas favorece la infección de parásitos (82,85–90). También se evidencia que la falta de supervisión veterinaria y los malos hábitos de crianza como la

ausencia de un lugar específico para que las mascotas orinen o defecuen dentro del hogar se podría generar un potencial riesgo para la transmisión de parásitos (82,85–90).

Los datos de la encuesta nos permitieron evidenciar que el 48% (15/31) de los encuestados se les ha suministrado purgante en el último año siendo el 60% (9/15) de los menores desparasitado con Albendazol un medicamento efectivo contra helmintos. Estos resultados se correlacionan con los hallazgos de otras investigaciones donde se evalúa que el uso de Albendazol solo es eficaz frente a las parasitosis causadas por helmintos y esto hace que la prevalencia de parasitosis causadas por protozoarios sea mayor debido a que el Albendazol cuenta con una escasa actividad antiamibiana (81,91–93). Adicionalmente también se sabe que el Albendazol tiene actividad anti giardiásica en caso de administrarse en varias dosis ya que el antihelmíntico no es eficaz en dosis única para *G. intestinalis*, esto explicaría porque a pesar del uso de este medicamento se sigue evidenciando la presencia de *G. intestinales* en los participantes (81,91–93).

La presencia de *G. intestinalis*. en niños en edad escolar se ha relacionado con problemas cognitivos además de ocasionar un cuadro sintomático caracterizado por presentar síntomas como malestar general, náuseas, vómitos, distensión abdominal, fatiga y dolor o calambres abdominales (2,3,7–9,42,55). Además, *G. intestinalis*. es el parásito más frecuentemente identificado siendo reconocido por causar desnutrición en preescolares debido a una infección crónica y severa a causa del síndrome de malabsorción (80,81,84).

En América Latina se han realizado diversos estudios que permiten establecer las prevalencias de los parásitos intestinales identificados más frecuentes en niños en edad escolar. La prevalencia de *Blastocystis sp.*, *G. intestinalis* y *E. coli* evidenciada por Murillo et., al., en la revisión sistemática realizada en 2022 concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación ya que la mayor prevaecía de parásitos protozoarios en nuestro estudio fue de *Blastocystis sp.* (24%); seguido de *G. intestinalis* (15%), *E. coli* (15%) y *Complejo E. histolytica/dispar/moskovskii* (12%) con excepción de *E. nana* que en nuestro estudio tuvo una prevalencia de 33% mientras que la revisión mencionada anteriormente no se identificó la presencia de este protozoo (80).

Por otro lado, Alegre R. et., al., en 2023 indicaron que en América Latina los parásitos protozoarios más prevalentes en niños son *Blastocystis sp.* y *G. intestinalis* mientras que la menos prevalente es *E. coli*, estos datos difieren con los resultados obtenidos en la presente investigación ya que la presencia de *E. nana* (33%) prevaleció por encima *Blastocystis sp* (24%) (83). Así mismo la prevalencia de *G. intestinalis* (15%) se observó en misma proporción que *E. coli* (15%) y en menor frecuencia se observó el *Complejo E. histolytica/dispar/moskovskii* (12%) (83).

En Colombia la encuesta Nacional de Parasitismo Intestinal en Población Escolar realizada en 2015 dio a conocer la prevalencia de parásitos intestinales en territorio (1). En el estudio se encontró que el protozoo intestinal más prevalente a nivel nacional es *Blastocytis sp.* (60%), concordando con los resultados obtenidos en el presente estudio con una prevalencia de 24%, sin embargo, existe discrepancia en los datos obtenidos de *G. intestinalis* y *Complejo E. histolytica/dispar/moskovskii* ya que en la encuesta se reporta una prevalencia

de 15.4% y 17% respectivamente mientras que en nuestro estudio fue más prevalente *G. intestinalis* con un 15% que el Complejo *E. histolytica/dispar/moskovskii* con un 12% (1). En cuanto a los protozoos comensales no existe concordancia entre los hallazgos de la encuesta y los obtenidos en el presente estudio ya que *E. nana* fue más prevalente que *E. coli* con un 33% y 15% respectivamente mientras que en la encuesta fue más prevalente *E. coli* (28,2%) que *E. nana* (24.6%) (1).

Adicionalmente, en Colombia Sarmiento L. et., al., en 2018 realizan un estudio donde se evidenció que *Blastocystis sp.* es el protozoario más prevalente con una frecuencia de 49,05% lo que concuerda con los resultados de la presente investigación. Adicionalmente los otros dos protozoos comensales más prevalentes fueron *E. coli* (37,33%) y *E. nana* (20,71%), resultados que difieren con la presente investigación. La frecuencia de *G. intestinalis* y complejo *E. histolytica/dispar* fue de 16,62 % y 12,53 % respectivamente lo que concuerda con los resultados obtenidos (94).

El método de diagnóstico más común para estos parásitos sigue basándose en técnicas tradicionales y limitadas como la microscopia óptica, siendo el montaje húmedo directo la técnica empleada para su diagnóstico. Este método diagnóstico requiere una pequeña porción de la muestra de material fecal para realizar la visualización de las estructuras parasitarias, reduciendo significativamente la probabilidad de detectar la presencia de parásitos intestinales lo que puede llevar a falsos negativos y diagnósticos erróneos. Los métodos basados en PCR permiten la detección de parásitos causantes de diarrea al hacer la identificación de especies y subpoblaciones parasitarias (95,96). En 2017 Sánchez A. comparó la identificación de parásitos intestinales mediante microscopia y qPCR

observándose altas tasas de infección por *Giardia* donde se identificó solo el 23,8% mediante la técnica de microscopía y 65,9% por qPCR. El mismo procedimiento lo realizó con *Blastocystis sp* identificándose un 35,3% por microscopía y un 89,7% por qPCR. En nuestro estudio se realizó PCR convencional para la detección de *G. intestinalis*, pero no se realizó a todas las muestras, solamente a las muestras que por microscopia demostraron la presencia del parásito y se empleó la PCR para obtener los productos necesarios para la secuenciación. Esto demuestra una discrepancia entre la técnica de PCR empleada para la detección de *G. intestinalis* puesto que dos muestras arrojaron discrepancias debidas a la carga parasitaria indicando que la qPCR tiene un grado mayor de sensibilidad para la detección de *G. intestinalis* tal y como se evidencia en el estudio anteriormente mencionado.

Dentro de los estudios epidemiológicos realizados en América Latina Wielinga y colaboradores en el año 2023 observó una predominancia del ensamblaje A frente al ensamblaje B de *G. intestinalis*, sin embargo, los resultados de la genotipificación del presente estudio arrojaron que las tres muestras secuenciadas pertenecen al ensamblaje B de *G. intestinalis* (41). Se debe recalcar que debido a que los 31 participantes son poco representativos no se puede asociar a una predominancia que permita correlación entre los resultados obtenidos en el presente estudio a los hallazgos obtenidos en el estudio anteriormente mencionado.

En Colombia Avendaño y colaboradores en el año 2019 encontraron un predominio del ensamblaje B en niños asintomáticos de 1 a 5 años (10). A pesar de que las tres muestras secuenciadas pertenecen al ensamblaje B de *G. intestinalis* no se pudo establecer relación entre la ausencia de síntomas con la presencia de la infección por *G. intestinalis* en niños.

Existen virus específicos que pueden infectar parásitos protozoarios, modificando significativamente su biología. Estos virus tienen la capacidad de alterar la morfología, los fenotipos, la patogenicidad y las tasas de crecimiento de los parásitos protozoarios a los cuales infecta haciendo que las interacciones huésped-parasito se vuelvan más complejas como se observa en el caso de GLV, un virus de ARN bicatenario capaz de infectar al protozoo *G. intestinalis* (18–20).

Recientemente, varios estudios han confirmado la presencia de virus de dsARN en diversos parásitos, incluyendo *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania* spp. y *Giardia* spp (18–20). Las investigaciones realizadas han demostrado que *Trichomonasvirus* confiere factores de resistencia a *T. vaginalis* mientras que *Leishmaniavirus* exacerba la enfermedad (18–20). Sin embargo, el papel de (GLV) en *G. intestinalis* y la giardiasis sigue siendo desconocido. Aunque se sabe que con una cantidad de 500.000 partículas virales de GLV en un trofozoíto se detiene el crecimiento de *G. intestinalis* in vitro, lo que es indicativo de que GLV tiene un efecto controlador en la replicación del parásito (20,24).

GLV se identificó por primera vez en un aislado de *G. intestinalis* de un paciente humano (HP-1, Human Portland-1) en 1980 (20,25,31,39,62,63). Actualmente en Colombia no se cuentan con estudios que permitan establecer la presencia de GLV en el territorio colombiano. El presente estudio es la primera aproximación experimental que se realiza en el país para determinar la presencia del virus, sin embargo, dentro de las tres muestras analizadas no se encontró. Estos resultados abren paso a nuevas investigaciones ya que para determinar la presencia del virus se requiere de una unidad experimental más amplia, ya

que una de las limitaciones del presente estudio fue el número de participantes (n=31) que, aunque tuvieron una alta prevalencia de *G. intestinalis* el n obtenido no fue suficiente para poder identificar si GLV está presente en el territorio colombiano. Se sugiere realizar un estudio más amplio para poder determinar la presencia del virus en nuestro país.

13. Limitaciones

El tamaño muestral reducido puede afectar significativamente los resultados estadísticos obtenidos de las encuestas aplicadas, lo que podría llevar a errores en la identificación de asociaciones entre las características sociodemográficas y la presencia de parásitos intestinales.

Se sugiere aplicar la prueba de biología molecular para la detección de *G. intestinalis* en un muestreo más amplio. Esto se debe a que las pruebas moleculares tienen una mayor sensibilidad de detección frente a la microscopia óptica.

14. Conclusión

El presente estudio evidenció que, a pesar las medidas de higiene declarada por los participantes el 58% (18/31) estaban parasitados con un 56% de mono parasitosis y 44% de multi parasitosis. Los parásitos intestinales identificados mediante el montaje húmedo directo incluyeron *Giardia intestinalis*. (15%), *Entamoeba coli* (15%), *Complejo Entamoeba histolytica/dispar/moskovskii* (12%), *Endolimax nana* (33%) y *Blastocystis sp.*

(24%). Además, se encontró una asociación significativa entre la presencia de basureros cerca de las viviendas ($p=0,049$) y el juego en el suelo o con tierra ($p=0,045$) con la presencia de parásitos. Cabe resaltar que debido a la limitada muestra (31 participantes), no se pudo establecer una relación entre la presencia de parásitos con la sintomatología o condiciones sociodemográficas por parte de los encuestados.

La detección de *G. intestinalis* mediante pruebas de biología molecular demostró ser una alternativa efectiva para mejorar el diagnóstico. Sin embargo, la carga parasitaria resultó ser un problema que podría abordarse con técnicas moleculares que permitan su cuantificación. Este estudio evidenció que las técnicas moleculares diseñadas para la detección de *G. intestinalis* no se ven afectadas por el uso de cDNA ya que no se alteraron los resultados.

Aunque se identificaron los ensamblajes de *G. intestinalis* la muestra limitada (31 participantes) y el número reducido de casos con presencia microscópica del protozoo en el montaje húmedo directo confirmadas por PCR no permitieron establecer una relación significativa entre la presencia de estos ensamblajes y la sintomatología o condiciones sociodemográficas evaluadas en la encuesta aplicada. Esta limitación sugiere la necesidad de estudios posteriores con muestras más representativas para explorar estas relaciones y comprender mejor la dinámica de la infección por *G. intestinalis* en la población estudiada.

La ausencia de GLV en las tres muestras analizadas no implica necesariamente que el virus este ausente en Colombia. Por el contrario, este resultado sugiere la necesidad de realizar estudios más exhaustivos para esclarecer la presencia y distribución de GLV en el territorio nacional. Es importante destacar que la literatura científica ha demostrado que GLV puede

inhibir el crecimiento de *G. intestinalis* cuando superan las 500.000 partículas virales por trofozoíto in vitro (20,24). Esta capacidad sugiere la relevancia de investigar más afondo la relación ente GLV y *G. intestinalis* en la población colombiana. Por lo tanto, se recomienda continuar investigando para determinar la prevalencia y el papel de GLV en la infección por *G. intestinalis* en Colombia.

15. Anexos

Anexos	
1. Cuadro resumen de ensayos de identificación de GLV.	Cuadro resumen de todos los ensayos realizados a la fecha con respecto a la identificación de GLV.
2. Ficha técnica <i>Giardia lamblia</i> , cepa WB, clon 6. BEI Resources. Catalogo No. NR-9706.	Ficha técnica de <i>G. intestinalis</i> , cepa de referencia WB, clon 6 utilizada como control negativo.
3. Ficha técnica <i>Giardia lamblia</i> , cepa G2M, BEI Resources. Catalogo No. NR-9240.	Ficha técnica de <i>G. intestinalis</i> , cepa de referencia WG2M utilizada como control positivo.
4. Encuesta sociodemográfica.	Encuesta sociodemográfica aplicada a los participantes del estudio.
5. Consentimiento informado.	Consentimiento informado entregado a los participantes del estudio donde aceptan hacer parte del mismo.
6. Datos obtenidos a partir de la encuesta sociodemográfica y resultados microscopia óptica.	Base de datos con toda la información recolectada a través de la encuesta sociodemográfica obtenida aplica en el presente estudio junto con los resultados obtenidos del montaje húmedo directo de las muestras mediante microscopia óptica.

16. Referencias bibliográficas

1. Análisis en profundidad.
2. Adam RD. *Giardia duodenalis*: Biology and Pathogenesis. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR>
3. Sarria-Guzmán Y, Chávez-Romero Y, Bernal JE, González-Jiménez FE, Serrano-Silva N, Fusaro C. Molecular identification of *Giardia* spp. In Latin America: An updated systematic review on reports from 2017 to 2021. Vol. 16, *Journal of Infection in Developing Countries*. *Journal of Infection in Developing Countries*; 2022. p. 392–401.
4. Atlas_de_Parasitologia_Consuelo_Lopez.
5. 2005 Giraldo-Gomez J. Prevalencia de giardiasis y parasitos intestinales en preescolares de hogares atendidos en un progrma estatal en Armenia, Colombia.
6. Heyworth MF. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite*. 2016;23.
7. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Vol. 8, *Nature Reviews Microbiology*. 2010. p. 413–22.
8. Amat CB, Motta JP, Fekete E, Moreau F, Chadee K, Buret AG. Cysteine Protease–Dependent Mucous Disruptions and Differential Mucin Gene Expression in *Giardia duodenalis* Infection. *American Journal of Pathology*. 2017 Nov 1;187(11):2486–98.
9. Faubert GT. Immune Response to *Giardia duodenalis* [Internet]. Vol. 13. 2000. Available from: <https://journals.asm.org/journal/cm>
10. Hernández PC, Morales L, Chaparro-Olaya J, Sarmiento D, Jaramillo JF, Ordoñez GA, et al. Intestinal parasitic infections and associated factors in children of three rural schools in Colombia. A cross-sectional study. *PLoS One*. 2019 Jul 1;14(7).
11. Michael F. The Molecular Pathogenesis of Giardiasis.
12. Buret AG. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. Vol. 56, *Gut*. 2007. p. 316–7.
13. Chin AC, Teoh DA, Scott KGE, Meddings JB, Macnaughton WK, Buret AG. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun*. 2002;70(7):3673–80.
14. Lauwaet T, Davids BJ, Reiner DS, Gillin FD. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. Vol. 10, *Current Opinion in Microbiology*. 2007. p. 554–9.
15. Prucca CG, Lujan HD. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. Vol. 11, *Cellular Microbiology*. 2009. p. 1706–15.
16. Ringqvist E, Palm JED, Skarin H, Hehl AB, Weiland M, Davids BJ, et al. Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Mol Biochem Parasitol*. 2008 Jun;159(2):85–91.

17. Prucca CG, Slavin I, Quiroga R, Elías E V., Rivero FD, Saura A, et al. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*. 2008 Dec 11;456(7223):750–4.
18. Zhao Z, Li X, Zhang N, Li J, Zhao N, Gao M, et al. Multiple Regulations of Parasitic Protozoan Viruses: A Double- Edged Sword for Protozoa. Vol. 14, *mBio*. American Society for Microbiology; 2023.
19. Wang AL, Wang CC. Discovery of a specific double-stranded RNA virus in *Giardia lamblia*. Vol. 21, *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1986.
20. Zhang H, Zhao C, Zhang X, Li J, Gong P, Wang X, et al. A potential role for *Giardia* chaperone protein GdDnaJ in regulating *Giardia* proliferation and *Giardiavirus* replication. *Parasit Vectors*. 2023 Dec 1;16(1).
21. Avendaño C, Ramo A, Vergara-Castiblanco C, Bayona M, Velasco-Benitez CA, Sánchez-Acedo C, et al. Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in child population from Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019 Dec 1;76.
22. De Jonckheere JF, Gordts B. Occurrence and transfection of a *Giardia* virus. Vol. 23, *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1987.
23. Miller, RL, Wang AL, Wang CC, Miller RL, Wang AL, Wang CC. Identification of *Giardia lamblia* Isolates Susceptible and Resistant to Infection by the Double-Stranded RNA Virus. Vol. 66, *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY*. 1988.
24. Miller RL, Wang AL, Wang CC. Purification and characterization of the *Giardia lamblia* double-stranded RNA virus. Vol. 28, *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1988.
25. Furfine ES, White TC, Wang AL, Wang CC. A single-stranded RNA copy of the *Giardia kunblia* virus double-stranded RNA genome is present in the infected *Giardia lamblia* [Internet]. Vol. 17, *Nucleic Acids Research*. 1989. Available from: <http://nar.oxfordjournals.org/>
26. Furfinet ES, Wang CC. Transfection of the *Giardia lamblia* Double-Stranded RNA Virus into *Giardia lamblia* by Electroporation of a Single-Stranded RNA Copy of the Viral Genome [Internet]. Vol. 10, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*. 1990. Available from: <https://journals.asm.org/journal/mcb>
27. White TC, Wang CC. RNA dependent RNA polymerase activity associated with the double-stranded RNA virus of *Giardia lamblia* [Internet]. Vol. 18, *Nucleic Acids Research*. 1990. Available from: <http://nar.oxfordjournals.org/>
28. Tai JH, Wang AL, Ong SJ, Lai KS, Lo C, Wang CC, et al. The Course of *Giardiavirus* Infection in the *Giardia lamblia* Trophozoites. Vol. 73, *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY*. 1991.
29. Wang A.L., Wang C.C. Viruses of Parasitic Protozoa. Vol. 7, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991.
30. 1993 Tai J.H *Giardiavirus* enters *Giardia lamblia* WB trophozoite via endocytosis.

31. Wang AL, Yangt HM, Shen KA, Wang CC. Giardivirus double-stranded RNA genome encodes a capsid polypeptide and a gag-pol-like fusion protein by a translation frameshift (RNA-dependent RNA polymerase/pseudoknot) [Internet]. Vol. 90, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. Available from: <https://www.pnas.org>
32. Wu CH, Wang CC, Yang HM, Wang AL. Sequences at four termini of the giardivirus double-stranded RNA* (*Giardia lamblia*; dsRNA virus; totivirus). Vol. 158, Gene. 1995.
33. Wang AL, Wang CC, Wang L, Yang H m, Shen KA, Wang CC, et al. Virus-Mediated Expression of Firefly Luciferase in the Parasitic Protozoan *Giardia lamblia* [Internet]. Vol. 15, MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. 1995. Available from: <http://mcb.asm.org/>
34. Tai JH, Chang SC, Chou CF, Ong SJ. Separation and Characterization of Two Related Giardiviruses in the Parasitic Protozoan *Giardia lamblia*. Vol. 216, VIROLOGY. 1996.
35. Li L, Wang AL, Wang CC. Structural Analysis of the -1 Ribosomal Frameshift Elements in Giardivirus mRNA. J Virol. 2001 Nov 15;75(22):10612–22.
36. Garlapati S, Chou J, Wang CC. Specific secondary structures in the capsid-coding region of giardivirus transcript are required for its translation in *Giardia lamblia*. J Mol Biol. 2001;308(4):623–38.
37. Garlapati S, Wang CC. Giardivirus internal ribosome entry site has an apparently unique mechanism of initiating translation. PLoS One. 2009 Oct 14;4(10).
38. Gong P, Li X, Wu W, Cao L, Zhao P, Li X, et al. A Novel MicroRNA From the Translated Region of the Giardivirus rdrp Gene Governs Virus Copy Number in *Giardia duodenalis*. Front Microbiol. 2020 Nov 23;11.
39. Marucci G, Zullino I, Bertuccini L, Camerini S, Cecchetti S, Pietrantoni A, et al. Re-discovery of giardivirus: Genomic and functional analysis of viruses from giardia duodenalis isolates. Biomedicines. 2021 Jun 1;9(6).
40. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Vol. 14, Clinical Microbiology Reviews. 2001. p. 447–75.
41. Wielinga C, Williams A, Monis P, Thompson RCA. Proposed taxonomic revision of *Giardia duodenalis*. Infection, Genetics and Evolution. 2023 Jul 1;111.
42. Capewell P, Krumrie S, Katzer F, Alexander CL, Weir W. Molecular Epidemiology of *Giardia* Infections in the Genomic Era. Vol. 37, Trends in Parasitology. Elsevier Ltd; 2021. p. 142–53.
43. Rojas-López L, Krakovka S, Einarsson E, Ribacke U, Xu F, Jerlström-Hultqvist J, et al. A detailed gene expression map of giardia encystation. Genes (Basel). 2021 Dec 1;12(12).
44. Tangtrongsup S, Scorza V. Update on the Diagnosis and Management of *Giardia* spp Infections in Dogs and Cats. Vol. 25, Topics in Companion Animal Medicine. 2010. p. 155–62.

45. Rojas-López L, Marques RC, Svärd SG. *Giardia duodenalis*. Vol. 38, Trends in Parasitology. Elsevier Ltd; 2022. p. 605–6.
46. Sagolla MS, Dawson SC, Mancuso JJ, Cande WZ. Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *J Cell Sci*. 2006 Dec 1;119(23):4889–900.
47. Lagunas-Rangel FA, Yee J, Bermúdez-Cruz RM. An update on cell division of *Giardia duodenalis* trophozoites. Vol. 250, Microbiological Research. Elsevier GmbH; 2021.
48. Nohýnková E, Tůmová P, Kulda J. Cell division of *Giardia intestinalis*: Flagellar developmental cycle involves transformation and exchange of flagella between mastigonts of a diplomonad cell. *Eukaryot Cell*. 2006 Apr;5(4):753–61.
49. Xu F, Jex A, Svärd SG. A chromosome-scale reference genome for *Giardia intestinalis* WB. *Sci Data*. 2020 Dec 1;7(1).
50. Saraiya AA, Li W, Wu J, Chang CH, Wang CC. The microRNAs in an Ancient Protist Repress the Variant-Specific Surface Protein Expression by Targeting the Entire Coding Sequence. *PLoS Pathog*. 2014;10(2).
51. Tůmová P, Uzlíková M, Jurczyk T, Nohýnková E. Constitutive aneuploidy and genomic instability in the single-celled eukaryote *Giardia intestinalis*. *Microbiologyopen*. 2016 Aug 1;5(4):560–74.
52. Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol*. 2010 Aug;40(9):1063–74.
53. Sánchez A, Munoz M, Gómez N, Tabares J, Segura L, Salazar Á, et al. Molecular epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among Indigenous children from the Colombian Amazon basin. *Front Microbiol*. 2017 Feb 21;8(FEB).
54. Villamizar X, Higuera A, Herrera G, Vasquez-A LR, Buitron L, Muñoz LM, et al. Molecular and descriptive epidemiology of intestinal protozoan parasites of children and their pets in Cauca, Colombia: A cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 2019 Feb 26;19(1).
55. Stadelmann B, Merino MC, Persson L, Svärd SG. Arginine Consumption by the Intestinal Parasite *Giardia intestinalis* Reduces Proliferation of Intestinal Epithelial Cells. *PLoS One*. 2012 Sep 19;7(9).
56. Dixon BR. *Giardia duodenalis* in humans and animals – Transmission and disease. Vol. 135, Research in Veterinary Science. Elsevier B.V.; 2021. p. 283–9.
57. Leung AKC LAWASCKJKM. Giardiasis: an overview. Vol. 13, Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov . 2019. p. 134–43.
58. Saghaug CS, Klotz C, Kallio JP, Brattbakk HR, Stokowy T, Aebischer T, et al. Genetic variation in metronidazole metabolism and oxidative stress pathways in clinical giardia lamblia assemblage A and B isolates. *Infect Drug Resist*. 2019;12:1221–35.
59. Scott KGE, Yu LCH, Buret AG. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun*. 2004 Jun;72(6):3536–42.

60. Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, et al. Nitric Oxide Production by Human Intestinal Epithelial Cells and Competition for Arginine as Potential Determinants of Host Defense Against the Lumen-Dwelling Pathogen *Giardia lamblia*. *The Journal of Immunology*. 2000 Feb 1;164(3):1478–87.
61. Heyworth MF. Immunological aspects of *Giardia* infections. *Parasite*. 2014;21.
62. Lagunas-Rangel FA, Yoshio Kameyama-Kawabe L, María Bermúdez-Cruz R. *Giardavirus: an update*. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07167-y>
63. Janssen MEW, Takagi Y, Parent KN, Cardone G, Nibert ML, Baker TS. Three-Dimensional Structure of a Protozoal Double-Stranded RNA Virus That Infects the Enteric Pathogen *Giardia lamblia*. *J Virol*. 2015 Jan 15;89(2):1182–94.
64. Li L, Wang AL, Wang CC. Structural Analysis of the –1 Ribosomal Frameshift Elements in *Giardavirus* mRNA. *J Virol*. 2001 Nov 15;75(22):10612–22.
65. Sepp T, Wang AL, Wang CC. *Giardavirus-Resistant Giardia lamblia Lacks a Virus Receptor on the Cell Membrane Surface* [Internet]. Vol. 68, *JOURNAL OF VIROLOGY*. 1994. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jvi>
66. Garlapati S, Saraiya AA, Wang CC. A La autoantigen homologue is required for the internal ribosome entry site mediated translation of giardavirus. *PLoS One*. 2011;6(3).
67. Mancel Martinez D, Ayala M, Cristina Barros-Marysol Gonzalez Hormiga E, Carolina Flórez Sánchez A. Elaborado por.
68. *Hygiene TOTRSROTMA, Var. Axenic culture of Giardia lamblia in TYI-S-33 medium supplemented with bile*. Vol. 77. 1983.
69. Product Information Sheet for NR-9706 [Internet]. 2009. Available from: www.beiresources.org.
70. Product Information Sheet for NR-9706 [Internet]. 2009. Available from: www.beiresources.org.
71. 2019 RAMIREZ G. TESIS EVALUACION DE LOS PARAMETROS DE TIEMPO Y TEMPERATURA PARA EL CRECIMIENTO DE GIARDIA LAMBLIA EN MEDIO DE CULTIVO TYI-S-33 COMERCIAL Y ARTESANAL.
72. 2011 DAVIDS B. METHODS FOR GIARDIA CULTURE, CRYOPRESERVATION, ENCYSTATION, AND EXCYSTATION IN VITRO.
73. Hernández PC, Caldas ML, Wasserman M. Enquistación in vitro de *Giardia lamblia*: análisis por electroforesis bidimensional de proteínas expresadas diferencialmente.
74. Katelaris PH, Naeem A, Farthing JG. Attachment of *Giardia lamblia* trophozoites to a cultured human intestinal cell line [Internet]. Vol. 37, *Gut*. 1995. Available from: <http://gut.bmj.com/>
75. Bowie' WR, Isaac-Renton' JL, Prasad' N. *Giardia duodenalis*: enhanced growth in cell culture.
76. Sulaima I. 2003 Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potencial Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*.

77. Minetti C, Lamden K, Durband C, Cheesbrough J, Fox A, Wastling JM. Determination of *Giardia duodenalis* assemblages and multi-locus genotypes in patients with sporadic giardiasis from England. *Parasit Vectors*. 2015 Dec 1;8(1):1–10.
78. Parrales Toala JA, Pilco Romero TJ, Pin Guerra AI, Durán Pincay YE. Estudio de la prevalencia de la parasitosis intestinal a nivel de Latinoamérica. *MQRInvestigar*. 2022 Sep 2;6(3):1373–95.
79. Pedraza B, Suarez H, De-la-Hoz I, Fragoso P. Prevalencia de parásitos intestinales en niños de 2-5 años en hogares comunitarios de Cartagena de Indias, Colombia. *Revista chilena de nutrición*. 2019 Jun;46(3):239–44.
80. Enrique W, María A. Revisión Sistemática Parasitología Parasitosis intestinal, anemia y desnutrición en niños de Latinoamérica: Revisión Sistemática Intestinal parasitosis, anemia and malnutrition in children of Latin America. *Systematic Review*. Available from: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5816437>
81. Vásquez D, Drews-Elger K, Juan Saldarriaga-Muñoz P, Correa-Sierra S, Alejandro Gaviria-Gallego D, Atehortúa-Salazar S, et al. Intestinal parasitosis in children from a rural Caribbean area in Colombia [Internet]. Available from: <https://orcid>.
82. Lucero-Garzón TA, Álvarez-Motta LA, Chicue-López JF, López-Zapata D, Mendoza-Bergaño CA. Intestinal parasitism and risk factors among children from the Illegal settlements of Florencia-Caquetá, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Salud Publica*. 2015 May 1;33(2):171–80.
83. Alegre RE, Gómez-Muñoz M de los Á, Flores-Lacsi EJ, Robles M del R, Milano F. PREVALENCE OF INTESTINAL PARASITES IN CHILDREN AND DOMESTIC ANIMALS FROM TWO PERI-URBAN NEIGHBORHOODS IN NORTHEASTERN ARGENTINA. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2023 Oct 1;40(4):466–73.
84. Boy L, Franco D, Alcaraz R, Benítez J, Guerrero D, Galeno E, et al. Parasitosis intestinales en niños de edad escolar de una institución educativa de Fernando de la Mora, Paraguay. *Revista científica ciencias de la salud*. 2020 May 28;2(1):54–62.
85. De C, Clínico B. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA-LEÓN FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA.
86. Palmira S, Una Posacuerdo Como Oportunidad Entre La Sociedad Y Su Patrimonio P EL. Cartilla divulgativa NUE VA REL ACIÓN NATURAL Y CULTURAL.
87. 2011 ANCHANTE H. PARASITOSIS ZOONOTICAS EN MASCOTAS CANINA Y FELINAS DE NIÑOS DE EDUCACION PRIMARIA DEL CONO NORTE DE LIMA, PERU.
88. Enfermedades Infecciosas y Microbiología volumen 23, núm 4. octubre-diciembre, 2003 MG.
89. 2016 PIACENZA G. PARASITOS ZOONOTICOS EN MASCOTAS CANINAS Y FELINAS DE ESCOLARES SUBURBANOS.

90. De La Cruz TB. Palabras clave SUMMARY Intestinal parasites prevalence in children from "Templo-Comedor Sagrado Corazón.
91. Devera R, Cermeño JR, Blanco Y, Bello Morales C, Guerra X, De Sousa M, et al. ARTÍCULO ORIGINAL PREVALENCE OF BLASTOCISTOSIS AND OTHERS INTESTINAL PARASITOSIS IN A RURAL COMMUNITY FROM ANZOATEGUI STATE, VENEZUELA. Vol. 58, Parasitol Latinoam. 2003.
92. 2008 FONSECA J. PARASITOSIS INTESTINAL EN NIÑOS DE ZONAS PALUDICAS DE ANTIOQUIA COLOMBIA.
93. 2005 Giraldo-Gomez J. Prevalencia de giardiasis y parasitos intestinales en preescolares de hogares atendidos en un progrma estatal en Armenia, Colombia.
94. Adriana Sarmiento-Rubiano L, García Y, Fillot M, Gómez L, Becerra JE. Intestinal parasitism in populations with a high degree of vulnerability in the Colombian Caribbean. Vol. 70, Revista Cubana de Medicina Tropical. 2018.
95. 2020 DACAL E. DIAGNOSTICO MOLECULAR DE PARASITOSIS INTESTINALES.
96. tesis AngieJ.SánchezCastro.2017.