

Prevalencia de *Giardia intestinalis* y predominio de genotipos zoonóticos en ovinos y bovinos de traspatio de cinco estados de la República Mexicana

Prevalence of *Giardia intestinalis* and zoonotic genotype predominance in small scale sheep and cattle farms in five states of the Mexican Republic

Juana Jimena Otero-Negrete*
Mario Noé Martínez-Gordillo**

Froylán Ibarra-Velarde*
Martha Ponce-Macotela**

Abstract

The aim of this paper was to discover the prevalence and assemblages of *Giardia intestinalis*, harbored in sheep and cows on familiar farms from five states of the Mexican Republic. Stool samples from 265 sheep and 174 cows were analyzed by centrifugation and flotation in zinc sulfate to search for cysts and ova. The samples with *Giardia* cysts were processed in a Sheather solution in order to isolate them. Afterwards, cultures were established in TYI-S-33, each one of which was the *Giardia* DNA source. The DNA was obtained and used as a template to amplify a fragment of the glutamate dehydrogenase (gdh) enzyme. The 430 bp amplicons were restricted with Nla IV and Rsa I in order to identify the restriction fragments length polymorphisms (RFLP's) patterns. From the cyst analysis, *Giardia* cysts in nine cows (5.1%) and 30 sheep (11.3%) were found. Then 10 axenic cultures (5 from sheep and 5 from cows) were set up. From the RFLP's pattern it was found that one cow had assemblage (AI), another two had a mixture of assemblages (AI + BIII) and the other two had (E + BIII). In sheep, it was found that two sheep had assemblage (AI) and the other three had a mixture of assemblages (AI + BIII). This is the first report in which zoonotic assemblages (A-I and BIII) predominance in ruminants from five states of Mexico have been demonstrated. Therefore, it is necessary to carry out further studies aimed at discovering other *Giardia* genotypes and transmission patterns between animals and humans in Mexico.

Key words: *GIARDIA INTESTINALIS*, ZOOONOTIC GENOTYPES, GLUTAMATE DEHYDROGENASE, SHEEP, CATTLE.

Resumen

Con el fin de determinar la frecuencia y genotipos de *Giardia intestinalis* en ovinos y bovinos de traspatio de algunos estados de la República Mexicana, en este trabajo se colectaron heces de 265 ovinos y 174 bovinos, para la búsqueda de *Giardia* mediante coproparasitoscópicos (CPS) de concentración flotación. De las muestras fecales que resultaron positivas se obtuvieron los quistes por el método de Sheather. Los quistes se desenquistaron *in vitro* y los trofozoitos se mantuvieron en cultivo TYI-S-33 axénico. El ADN de los trofozoitos se obtuvo mediante extracciones fenólicas y se amplificó un segmento de ≈ 430 pb del gen de la enzima glutamato deshidrogenasa (gdh) por medio de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR), el producto se restringió con las enzimas Nla IV y Rsa I y se obtuvieron los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP). En los CPS se encontró a *Giardia* en nueve bovinos (5.1%) y 30 ovinos (11.3%). Se establecieron 10 cultivos axénicos (5 de bovinos y 5 de ovinos). En un bovino se encontró el genotipo (AI), dos tuvieron mezcla de los genotipos (AI + BIII) y los otros dos fueron (E + BIII). Un ovino fue genotipo (AI) y tres tuvieron mezcla de los genotipos (AI + BIII). Éste es el primer informe que presenta predominio de genotipos zoonóticos (AI y BIII) en ovinos y bovinos de México. Es necesario investigar los genotipos de *Giardia* y patrones de transmisión entre animales y humanos en México.

Palabras clave: *GIARDIA INTESTINALIS*, GENOTIPOS ZOOONÓTICOS, GLUTAMATO DESHIDROGENASA, OVINOS, BOVINOS.

Recibido el 30 de abril de 2010 y aceptado el 10 de enero de 2011.

*Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510. México, DF.

**Parasitología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría. Insurgentes Sur 3700-C. Col. Insurgentes Cuicuilco, Delegación Coyoacán, 04530. México, DF.

Producto de la tesis de Doctorado de Juana Jimena Otero-Negrete.

Responsables de la correspondencia: Martha Ponce-Macotela. Tel. (52) 55 10840900-1454, Correo electrónico: macotelam@yahoo.com y Juana Jimena Otero-Negrete, Correo electrónico: catjim99_2000@yahoo.com

Introduction

Giardia intestinalis (*G. duodenalis*, *G. lamblia*) is a worldwide parasite that is found in a broad range of domesticated and wild mammals, including man.¹⁻³ This parasitic disease is prevalent in children population, it causes diarrhea that impacts negatively in their growth and development, hence WHO proposes that giardiasis must be included in neglected diseases.⁴ In ruminants, giardiasis also causes malabsorption, weight gain reduction and diarrhea; therefore, impaired feed efficiency and economic losses for farmers.^{5,6} The prevalence is variable in different countries, 9 to 73 % in cattle and 1.5 to 38 % in sheep.⁷

Since the morphological traits of cysts and trophozoites of the morphological group *G. duodenalis* are similar, then *Giardia* samples from farm animals, companion animals and humans are indistinguishable and it is necessary to apply molecular techniques to genotype them, in such way that, seven *Giardia* assemblages/genotypes have been described. Genotype "A" is found in humans, farm animals (cattle, sheep, goats, porcine and equines), companion animals (canines and felines) and wild animals (beavers, guinea pigs and lorises); the genotype "B" is found in human beings, canines, chinchilla, beavers, rats and lorises; genotypes "C" and "D" belong to canines; genotype "E" to livestock; genotypes "F" and "G" are found in felines and rats, respectively.⁸⁻¹¹

In Mexico, giardiasis has been detected in dogs¹² and samples from humans, dogs and a cat have been genotyped;¹³⁻¹⁵ however, there are no records of this parasitosis in ruminants and it is uncertain whether they are reservoirs of zoonotic genotypes or not, hence the aim of this work was to know giardiasis prevalence in sheep and cattle, and to determine if they are carriers of zoonotic genotypes, by using the PCR-amplification of a segment of the *gdh* gene and the RFLP patterns.

Material and methods

Collection and processing of biological material

Sampling was performed *ad hoc*, collecting faecal samples directly from the rectum (approximately 100 g) from 439 animals from small scale farms of five states of the Mexican Republic: Hidalgo (93 sheep and 69 bovines), Estado de México (12 sheep and 30 bovines), Morelos (160 ovine and 5 bovines), Queretaro (6 bovines) and Veracruz (64 bovines). The samples were transported in plastic containers and stored at 4°C un-

Introducción

Giardia intestinalis (*G. duodenalis*, *G. lamblia*) es un parásito de distribución mundial, que se encuentra en un amplio rango de mamíferos domésticos, selváticos y el hombre.¹⁻³ Esta parasitosis es muy frecuente en la población infantil, le produce diarrea e impacta negativamente en su crecimiento y desarrollo, por tal motivo, la OMS la incluyó en el grupo de las "enfermedades desatendidas".⁴ En rumiantes, la giardiosis también produce síndrome de malabsorción, pérdida de peso, evacuaciones anormales y por consiguiente, mala conversión alimenticia y pérdidas económicas para el productor.^{5,6} En diferentes partes del mundo la prevalencia es variable, en bovinos oscila entre 9 y 73%, y en ovinos entre 1.5 y 38%.⁷

Debido a que la morfología de los quistes y trofozoítos de *Giardia* del grupo morfológico *G. duodenalis* es similar en las muestras que se obtienen de animales de granja, animales de compañía y humanos, se ha recurrido a técnicas moleculares para genotipificarlas, de tal manera que se han descrito siete ensambles/genotipos. El genotipo "A" que se encuentra en humanos, animales de granja (bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y equinos), animales de compañía (caninos y felinos) y animales silvestres (castores, cueros y lorises); el genotipo "B" en el hombre, caninos, chinchilla, castores, ratas y lorises; los genotipos "C" y "D" en caninos; el genotipo "E" en animales de granja; el genotipo "F" en felinos, y el genotipo "G" en ratas.⁸⁻¹¹

En México, la giardiosis se ha detectado en perros¹² y se han genotipificado muestras procedentes de humanos, perros y de un gato,¹³⁻¹⁵ pero no hay registros de esta parasitosis en rumiantes y no sabemos si son portadores de genotipos zoonóticos, por tal motivo, el propósito de este estudio fue conocer la prevalencia de la giardiosis en ovinos y bovinos, así como determinar si son portadores de genotipos zoonóticos, mediante la amplificación de un segmento del gen de la glutamato deshidrogenasa y los polimorfismos de los fragmentos de restricción.

Material y métodos

Obtención y procesamiento del material biológico

Se realizó un muestreo por conveniencia, colectando muestras de heces directamente del recto (aproximadamente 100 g) de 439 animales de pequeños rebaños de traspatio, pertenecientes a cinco estados de la República Mexicana: Hidalgo (93 ovinos y 69 bovinos), Estado de México (12 ovinos y 30 bovinos), Morelos

til their analysis. Faust method by concentration and flotation in zinc sulphate was used for identification of *Giardia*.¹⁶

In vitro excystation and subsequent culturing of *Giardia* trophozoites

Faeces samples with *Giardia* cysts were processed to purified cysts by the Sheather's method.¹⁷ Cysts excystation was performed by incubation in Hank's balanced saline solution (HBSS) pH 2.0 at 37°C for 45 minutes; afterwards, activated cysts were buffered with HBSS pH 7.2 and concentrated by centrifugation, immediately, activated cysts were placed in TYI-S-33 culture medium supplemented with fetal bovine sera 10 % and bovine bile 1.0 mg/1.0 ml, and incubated at 37°C. To test bacterial contamination on *Giardia* cultures, aliquots were obtained and inoculated in blood agar and Sabouraud agar.¹⁸

DNA isolation

Axenic trophozoites were washed in phosphate saline solution (PBS) pH 7.0, concentrated and incubated in a lysis solution Tris-HCl, 10 mM (pH 7.4); EDTA, 10 mM; NaCl, 150 mM; SDS, 0.4 % and proteinase K (0.2 mg/ml), overnight at 42°C. After, three phenolic extractions, with phenol:chloroform (1:1) and another with chloroform, were performed. The aqueous phase was obtained and the nucleic acids were precipitated with 3M sodium acetate (pH 7.0) and cold ethanol, the sample was incubated all night at -20°C. Afterwards, nucleic acids were dissolved in TE buffer (Tris-EDTA) (Tris-HCl 10 mM, pH 7.0; EDTA, 1 mM). Nucleic acids were incubated with RNase 20 µg/ml at 37°C for 1 hour in order to eliminate RNA, a new phenolic extraction was carried out and the DNA was precipitated in ethanol-sodium acetate and dissolved in TE buffer.

Polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphisms (RFLP)

Isolated *Giardia* DNA was used to amplify a ≈ 430 bp segment from the *gdh* gene.¹¹

The reaction mix contained: MgCl₂, 1.5 µM; dNTP, 200 µM; primers 12.5 µM; AmpliTaq Gold DNA polymerase,* 0.625 U; and *Giardia* DNA, 100 ng, in 25 µl final volume. Negative control was the reaction mix but without *Giardia* DNA, positive control was *Giardia* DNA from a culture obtained from a paediatric patient (INP-H12).

A first PCR step was performed with primers:

(160 ovinos y 5 bovinos), Querétaro (6 bovinos) y Veracruz (64 bovinos). Las muestras se colocaron en contenedores de plástico y se almacenaron a 4°C hasta su análisis. Para la búsqueda de quistes de *Giardia* se hicieron coproparasitoscópicos de concentración flotación (Faust).¹⁶

Desenquistamiento y cultivo de trofozoítos de *Giardia* in vitro

Las muestras positivas a *Giardia* se procesaron para concentrar los quistes por el método de Sheather.¹⁷ Los quistes se desenquistaron *in vitro*, incubándolos en solución salina balanceada de Hank (SSBH) pH 2.0 a 37°C durante 45 minutos; posteriormente, la muestra se amortiguó con SSBH pH 7.2, se centrifugó y los quistes activados se colocaron en medio de cultivo TYI-S-33 complementado con 10% de suero fetal bovino y 1.0 mg/1.0 ml de bilis bovina, y se incubaron a 37°C. Para corroborar que los cultivos de *Giardia* estuvieran axénicos, se obtuvieron alícuotas y se sembraron en gelosa sangre y Sabouraud.¹⁸

Purificación del ADN

Los trofozoítos axénicos se lavaron con solución salina fosfatos (PBS) pH 7.0, se concentraron e incubaron en solución de lisis (Tris-HCl, 10mM (pH 7.4); EDTA, 10mM; NaCl, 150mM; SDS, 0.4% y proteinasa K, 0.2 mg/ml) durante toda la noche a 42°C. Posteriormente se realizaron tres extracciones fenólicas con fenol:cloroformo (1:1) y una con cloroformo. Se obtuvo la fase acuosa y para precipitar los ácidos nucleicos se incubó a -20°C toda la noche con acetato de sodio 3M (pH 7.0) y etanol -20°C. Los ácidos nucleicos se disolvieron en amortiguador de TE (Tris, EDTA) (Tris-HCl, 10mM, pH 7.0; EDTA, 1mM). Para eliminar el ARN, los ácidos nucleicos se incubaron con 20µg/ml de RNasa a 37°C durante 60 minutos, se repitió una extracción fenólica y el ADN se precipitó con etanol-acetato de sodio y se disolvió con amortiguador de TE.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

El ADN de *Giardia* de los aislados que se obtuvieron se utilizó para la amplificación de un segmento de ≈430 pb del gen de la enzima glutamato deshidrogenasa (*gdh*) mediante la PCR.¹¹

La mezcla de la reacción contenía: MgCl₂, 1.5 µM; dNTP, 200µM; oligonucleótidos, 12.5µM; ADN taq po-

GDHeF: TCA AGC TYA AYC GYG GYT TCC GT and GDHiR: GTT RTC CTT GCA CAT CTC C, and the second step with inner primer GDHiF: CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG in combination with GDHiR.

The PCR conditions were: hold 95°C for 10 minutes, 2 cycles at 95°C/30 sec, 56°C/1 min and 72°C/2 min, followed by 55 cycles of amplification 95°C/15sec, 56°C/30sec, 72°C/45 seconds, and an elongation phase of 72°C/7 minutes. Products from the PCR were observed by electrophoresis in agarose gels 1.0% in TBE (Tris-Boric Acid-EDTA) buffer and stained with 0.5µg/ml ethidium bromide.

For RFLPs, 10µl of PCR product were incubated, all night, at 37°C with 5 U restriction enzyme *Nla IV* and *Rsa I*** in the corresponding buffers. Restriction fragments were identified in 1.5 high resolution agarose gels in TBE buffers and stained with 0.5µg/ml ethidium bromide.

Results

Giardia prevalence and axenic cultures

Giardia prevalence in bovines was 5.17 % and sheep 11.3 % (Table 1). Five *Giardia* axenic cultures from sheep were obtained: INP-06, INP-045, INP-O11, INP-O14 and INP-03. There were also five from bovines: INP-B43, INP-B47, INP-B438, INP-B704, and INP-BVD3. Other isolates failed to be established by contamination, few cysts in the sample or were unable to grow in culture TYI-S-33 medium.

PCR and RFLP's

All samples produced a ≈ 430 bp amplicon from the *gdh* gene. The restriction pattern produced with *Nla IV* from five sheep isolates and three bovine isolates gave rise to 90, 120 and 150 bp, which is characteristic of genotype "AI". Two bovine isolates produced bands of 80, 100 and 220 bp, belonging to genotype "E" (Figure 1).

The restriction enzyme *Rsa I* produced ≈130 and ≈300 bp in four samples from sheep and four from bovines, characteristic of genotype "BIII". Presence of ≈240 bp (lanes 5, 7-9) suggests an additional component to published data (Figure 2).

Two bovine *Giardia* DNA samples (INP-B438 and INP-BVD3) and four sheep *Giardia* DNA samples (INP-O6, INP-O45, INP-O11 and INP-O14) displayed mixed zoonotic genotypes AI+BIII. Two bovines (INP-B704 and INP-B47) showed a different mixture "AI" + "E" (Table 1).

limerasa,* 0.625 unidades; y ADN de *Giardia*, 100 ng, todo en un volumen final de 25 µL. El testigo negativo consistió en la mezcla de la reacción sin el ADN de *Giardia* y el testigo positivo fue el ADN de un aislado de *Giardia* previamente obtenido de un niño (INP-H12).

Se realizó una primera amplificación con los oligonucleótidos: externo GDHeF: TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT, reverso GDHiR: GTT RTC CTT GCA CAT CTC C y la segunda amplificación fue con el interno GDHiF: CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG y el reverso GDHiR.

Las condiciones de la PCR fueron: una etapa de desnaturalización a 95°C por 10 min, 2 ciclos a 95°C por 30 seg, 56°C por 1 min y 72°C por 2 min; seguido de 55 ciclos a 95°C por 15seg, 56°C por 30 seg y 72°C por 45 seg, y un ciclo de extensión a 72°C por 7 min. Los productos generados se identificaron en geles de agarosa a 1.0% en amortiguador de tris boratos EDTA (TB) y teñidos con 0.5µg/ml de bromuro de etidio.

Para los RFLP, se incubaron 10 µL de los productos de la PCR toda la noche a 37°C, con 5 unidades de las enzimas *Nla IV* o *Rsa I*** en los amortiguadores correspondientes. Los fragmentos de las restricciones se identificaron en geles de agarosa de alta resolución a 1.5% en amortiguador de tris boratos EDTA (TB) y teñidos con 0.5µg/ml de bromuro de etidio.

Resultados

Prevalencia de Giardia y cultivos axénicos

La prevalencia de *Giardia* en bovinos fue de 5.17% y en ovinos de 11.3% (Cuadro 1). Se obtuvieron cultivos axénicos de *Giardia* procedentes de cinco ovinos: INP-O6, INP-O45, INP-O11, INP-O14 e INP-O3. También fueron cinco de bovinos: INP-B43, INP-B47, INP-B438, INP-B704 e INP-BVD3. No se obtuvieron otros aislados de *Giardia* porque la cantidad de quistes fue insuficiente, se contaminaron después del desquistamiento o fueron refractarios al cultivo.

PCR y RFLP

En todos los casos la amplificación del gen de la *gdh* generó una banda de ≈ 430 pb. La restricción con *Nla IV* de los cinco aislados de ovinos y tres de bovinos generó las bandas de 90, 120 y 150 pb características del genotipo AI. En dos aislados de bovinos las bandas fueron de 80, 100 y 220 pb que corresponden al genotipo E (Figura 1).

La restricción con la enzima *Rsa I* de tres muestras

*AmpliTaQ Gold ADNpolimerasa (Roche).

***Nla IV*, *Rsa I* (New England Biolabs, Estados Unidos).

Discussion

This is the first report showing *Giardia* prevalence and zoonotic genotype predominance ("AI" and "BIII") in sheep and cattle from five states of the Mexican Republic. Contrary to expectations, a low *Giardia* prevalence in small scale sheep (11.3%) and cattle (5.1%) farms was found in this study; perhaps, this low prevalence was due to the fact that only one sample per animal was obtained, and it has been demonstrated that faecal samples in series of three increase the likelihood to find parasites in the sample, since *Giardia* cysts have an intermittent waste pattern.¹⁹ In spite of the low prevalence in sheep (30/265), data are important because: 1) in Mexico there are no reports on this parasitosis in sheep, 2) this prevalence report came from different places: Morelos, Estado de Mexico and Hidalgo, 3) five isolates from sheep in axenic culture were zoonotic genotype "AI", and 4) there was mixture of zoonotic genotypes ("AI" + "BIII") in four *Giardia* isolates (Table 1). Results are significant because more cases of giardiasis have been worldwide recorded in bovines rather than in sheep, and because the main assemblage reported is ruminant-specific genotype "E".^{1,20}

The results of the present study are not the lowest found in literature; in Italy, authors report 5/325 (1.5%) *Giardia* prevalence from 20 farms and zoonotic

procedentes de ovinos y cuatro de bovinos generaron bandas de ≈ 130 y ≈ 300 pb características del genotipo BIII. La presencia de una banda de ≈ 240 pb (carriles 5, 7-9) sugiere un componente adicional a lo publicado (Figura 2).

Dos aislados de bovinos (INP-B438 e INP-BVD3) y tres aislados de ovinos (INP-O6, INP-O45, INP-O11 e INP-O14) tuvieron mezcla de los genotipos AI + BIII. Dos aislados de bovinos (INP-B704 e INP-B47) tuvieron mezcla de los genotipos AI + E (Cuadro 1).

Discusión

Éste es el primer informe que presenta la prevalencia de *Giardia* y predominio de genotipos zoonótico (AI y B) en muestras de ovinos y bovinos procedentes de cinco estados de la República Mexicana. Contrario a lo esperado, porque los animales analizados eran de pequeños rebaños de traspatio, en este estudio se encontró baja prevalencia de *Giardia* en ovinos (11.3%) y bovinos (5.1%); probablemente esta baja prevalencia se debió a que solamente se obtuvo una muestra por animal, ya que se ha demostrado que los coproparásitos en serie de tres incrementan la posibilidad de encontrar animales parasitados, porque la eliminación de los quistes de *Giardia* es de forma intermitente.¹⁹ A pesar de la baja prevalencia en ovinos (30/265),

CUADRO 1

Prevalencia de *Giardia* y genotipos predominantes en bovinos y ovinos de granjas de cinco estados de la República Mexicana

Giardia intestinalis prevalence and genotype predominance in cattle and sheep from small scale farms in five states of the Mexican Republic

State	Farms	Cattle analyzed	Prevalence (%)	Culture in vitro	Genotypes	Sheep analyzed	Prevalence (%)	Culture in vitro	Genotypes
Morelos	1	NA				27	2 (7.4)	2	2 (AI + BIII)
	2	NA				93	12 (12.9)		
	3	5	0			11	0		
	4	NA				14	3 (21.4)		
	5	NA				15	0		
Estado de Mexico	1	30	0			12	4 (33.3)	1	1 (AI)
Hidalgo	1	8	3 (37.5)	1	1 (AI)	29	3 (10.3)	1	1 (AI + BIII)
	2	NA				64	6 (9.37)	1	1 (AI + BIII)
	3	5	0			NA			
	4	10	0			NA			
	5	46	5 (10.8)	3	1 (AI + BIII) 2 (E + BIII)	NA			
Queretaro	1	6	1 (16.6)	1	1 (AI + BIII)	NA			
Veracruz	1	64	0			NA			
Total	13	174	9 (5.17)	5		265	30 (11.3)	5	

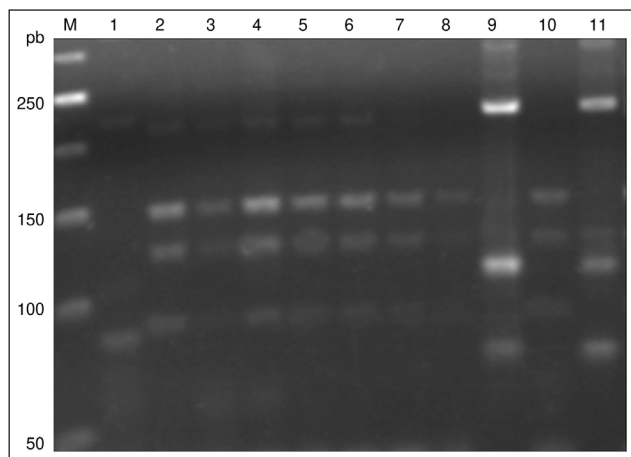


FIGURA 1. Análisis electroforético de los polimorfismos de los fragmentos de restricción *Nla IV* de los productos amplificados del gen de la *gdh* de *Giardia intestinalis* pb: pares de bases. M: escalera de 50 pb. Carril 1: aislado de humano INP-H12, con productos de 70, 80, 90 y 120 (no bien definidos), característicos del genotipo AII. Carriles 2-6: aislados de ovinos (INP-014; INP-06, INP-045, INP-011 y INP-03), todos con productos de 90, 120 y 150 pb características del genotipo AI. Carriles 7-11: aislados de bovinos (INP-B43, INP-B438, INP-B704, INP-BVD3, INP-B47). 7, 8 y 10 con genotipo AI y 9 y 11 con productos de 80, 100 y 220 pb característicos del genotipo E.

FIGURE 1. Electrophoretic analysis of restriction fragment polymorphisms with *Nla IV* of the amplified product of the gene from *Giardia intestinalis*. bp: base pair. M: 50 bp ladder. Lane 1: isolated from human INP-H12, with products of 70, 80, 90 and 120 (not well defined), characteristic of genotype "AII". Lanes 2-6: isolated from sheep (INP-014, INP-06, INP-045, INP-011 and INP-03), all products of 90, 120 and 150 bp genotype characteristic of "AI". Lanes 7-11: isolation from cattle (INP-B43, INP-B438, INP-B704, INP-BVD3 and INP-B47). Lanes 7, 8 and 10 with genotype "AI". Lanes 9 and 11 with 80, 100 and 220 bp, characteristic of genotype "E".

genotype "AI" was also found.²¹ Highest *Giardia* prevalence was recorded in Canada 38% from 89 sheep²² and 25.5% from 137 samples in Belgium; the molecular analysis showed a major prevalence of genotype "E" (6 cases), two displayed genotype "AI" and another two presented a mixture of genotypes "E" + "A".²³ In another work, the analysis from 63 samples showed better PCR sensitivity (25.4%) than immunofluorescence (12.7%). Livestock genotype "E" prevailed, but also there was a sample with genotype "A".²⁴

In this work, low *Giardia* prevalence in bovines (9/174) was found. This result is fundamental because genotype "E" (ruminant-specific) was detected for the first time in bovine samples in Mexico. Two bovine samples with genotype "E" came from a farm in Hidalgo state, another three, including Queretaro state, showed genotype "AI" (zoonotic). As far as it is known, there are no records of these genotypes in bovine samples from Mexico. Besides, genotype ruminant-specific mixed with zoonotic genotype "E" + "BIII" (two cases) and mixed with zoonotic genotypes "AI" + "BIII" (two cases) were found. It is necessary to know the open

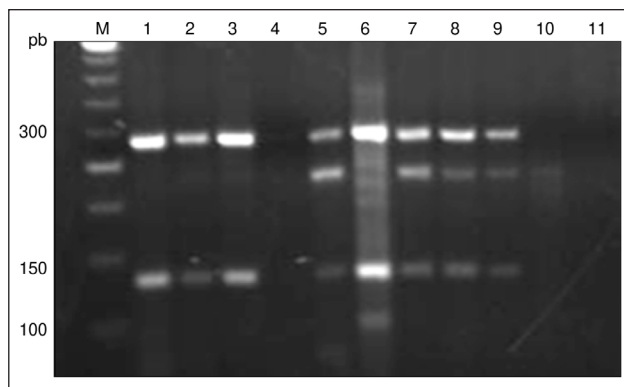


FIGURA 2. Análisis electroforético de los polimorfismos de los fragmentos de restricción *Rsa I* de los productos amplificados del gen de la *gdh* de *Giardia intestinalis* pb: pares de bases. M: escalera de 50 pb. Carril 1: aislado de humano INP-H12, con productos de 130 y 300 pb característicos del genotipo BII. Carriles 2-6: aislados de bovinos (INP-B47; INP-B438, INP-B43, INP-BVD3 y INP-B704), carriles 2, 3, 5 y 6 con genotipo BIII. Carriles 7-11: aislados de ovinos (INP-045, INP-014, INP-06, INP-03, INP-011), carriles 7-9 con genotipo BIII.

FIGURE 2. Electrophoretic analysis of restriction fragment polymorphisms with *Rsa I* of the amplified product of the *gdh* gene from *Giardia intestinalis*. bp: base pair. M: 50 bp ladder. Lane 1: isolated from human INP-H12, with products of 130 and 300 bp characteristic of the genotype "BII". Lanes 2-6: isolates from cattle (INP-B47, INP-B438, INP-B43, INP-BVD3 and INP-B704). Lanes 2, 3, 5 and 6 with genotype "BIII". Lanes 7-11: isolates from sheep (INP-045, INP-014, INP-06, INP-03 and INP-011). Lanes 7-9 with genotype "BIII".

los datos son importantes porque: 1) en México no hay registros de esta parasitosis en ovinos; 2) se encontró en los tres estados, de donde se obtuvieron las muestras: Morelos, Estado de México e Hidalgo; 3) porque los cinco aislados que se mantuvieron en cultivo axénico fueron del genotipo "AI" zoonótico; y 4) en tres muestras se encontró mezcla de los genotipos zoonóticos AI+BIII (Cuadro 1). Los resultados son significativos porque en todo el mundo se han registrado más casos de giardiasis en bovinos que en ovinos y porque fundamentalmente se ha encontrado el genotipo "E", que es específico de rumiantes.^{1,20}

En un estudio que se realizó en Italia, se registró una prevalencia menor: de 325 ovinos, de 20 granjas, se encontraron cinco infectadas (1.5%), pero concuerda con los datos del presente estudio, ya que ellos también encontraron el genotipo "AI".²¹ Prevalencias mayores se registraron en Canadá, 38% de 89 ovinos²² y en Bélgica, de 137 muestras, 25.5 % tuvo *Giardia*, el análisis molecular demostró mayor prevalencia del genotipo "E" (6), dos tuvieron el genotipo "A" y dos presentaron mezcla de los genotipos E+A.²³ En otro estudio, el análisis de 63 muestras reflejó mayor sensibilidad con la PCR (25.4%) que con la inmunofluorescencia (12.7%). Prevaleció el genotipo "E", pero también tuvieron una muestra con genotipo "A".²⁴

Por otro lado, en este trabajo se encontró baja pre-

read frame of the amplicons from BVD3, O45, O14 and O6, because they presented an additional ≈ 240 bp band (Figure 2). There are few studies in other parts of the world showing genotype ruminant-specific mixed with zoonotic genotypes ("E" + "A") or ("E" + "B"). As an example, in farms in Belgium, from 101 *Giardia* bovine samples, 53% showed genotype "E", 16% genotype "A" and 31% showed mixed genotypes ("E" + "A").²⁵ In Italy, 12 *Giardia* bovine samples displayed genotypes "A", five genotypes "B", three genotypes "E" and four showed mixed genotypes "A" + "B" (2 cases) and "A" + "E" (2 cases).²⁶ In the study of three farms in Georgia, USA, 83% of genotype "E", 14% of genotype "A", and 3% mixed genotypes ("E" + "A") were found.²⁷ In other places of the world there is a predominance of genotype "E" in ovine and bovine;^{28,30} however, higher prevalence of zoonotic genotype "AI" was found in this study.

The results of this work showed that production animals, mainly small scale sheep and cattle farms are reservoirs of *G. intestinalis* zoonotic genotypes and they are cyst dissemination sources for owners that handle the cattle every day. Besides, it has been observed that giardiasis negatively impacts cattle weight gain, hence it is necessary to evaluate the consequences on the ovine and bovine production in small scale farms in Mexico, establish control and prevention measures to avoid *Giardia* cyst dissemination, and to develop integral epidemiologic studies to clarify the transmission patterns between farm animals, companion animals and human beings.

Referencias

1. ROBERTSON LJ. *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: a review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. *Epidemiol Infect* 2009;137:913-921.
2. THOMPSON RC, MONIS PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol* 2004;58:69-137.
3. ADAM RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:447-475.
4. SAVIOLI L, SMITH H, THOMPSON A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the neglected diseases initiative. *Trends Parasitol* 2006;22:203-208.
5. ALOISIO F, FILIPPINI G, ANTENUCCI P, LEPRI E, PEZZOTTI G, CACCIÒ SM *et al*. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. *Vet Parasitol* 2006;142:154-158.
6. OLSON ME, MCALLISTER TA, DESELLIERS L, MORCK DW, CHENG KJ, BURET AG *et al*. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. *Am J Vet Res* 1995;56:1470-1474.

valencia de *Giardia* en bovinos (9 de 174), pero el resultado es fundamental, ya que por primera vez se informa del genotipo "E" (característico de rumiantes) en muestras de bovinos en México, los dos procedían de una granja del estado de Hidalgo; otros tres bovinos, incluido el del estado de Querétaro, registraron el genotipo "AI" (zoonótico). Hasta donde se sabe, no había registros de estos genotipos en muestras de bovinos en México. Adicionalmente, se encontró mezcla del genotipo especie-específico con genotipo zoonótico E+BIII (2) y mezcla de genotipos zoonóticos AI+BIII (2). Se debe secuenciar el amplicón de los aislados BVD3, O45, O14 y O6, porque presentaron una banda adicional de ≈ 240 pb (Figura 2). Pocos estudios en otras partes del mundo también muestran mezclas de genotipos especie específicos con genotipos zoonóticos (E+A) o (E+B). Por ejemplo, en granjas de Bélgica, de 101 muestras de bovinos con *Giardia*, el 53% tuvo genotipo "E", 16% genotipo "A" y 31% mezcla de genotipos (E+A).²⁵ En Italia, 12 muestras de bovinos fueron genotipo "A", cinco "B", tres "E", y cuatro tuvieron mezcla de los genotipos A+B (2) y A+E (2).²⁶ En el estudio de tres granjas de Georgia, USA, se registró 83% con el genotipo "E", 14% con el genotipo "A" y 3% con mezcla de los genotipos (E+A).²⁷ En otras partes del mundo predomina el genotipo "E" en ovinos y bovinos;²⁸⁻³⁰ sin embargo, en este trabajo se encontró mayor prevalencia del genotipo "AI" que es zoonótico.

Los resultados de este trabajo muestran que los animales de producción, sobre todo en producciones de traspato, como los ovinos y bovinos, son portadores de genotipos zoonóticos de *G. intestinalis* y son una fuente de diseminación de quistes para los propietarios, debido a que regularmente son los que manejan al ganado. Adicionalmente, se ha observado que la giardiosis impacta negativamente en la ganancia de peso del ganado, por lo tanto, es necesario evaluar las consecuencias en la producción de ovinos y bovinos de granjas de traspato mexicanas, establecer medidas de control y prevención para evitar su diseminación, así como también el desarrollo de estudios epidemiológicos integrales que esclarezcan el flujo de los genotipos zoonóticos entre animales de producción, animales de compañía y humanos.

7. GEURDEN T, VERCRUYSE J, CLAEREBOU E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Exp Parasitol* 2010;124:98-106.
8. EY PL, BRUDERER T, WEHRLI C, KÖHLER P. Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analyses of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia. *Parasitol Res* 1996;82:52-60.
9. EY PL, MANSOURI M, KULDA J, NOHÝNKOVÁ E, MONIS PT, ANDREWS RH *et al*. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-

- specific and potentially zoonotic genotypes. *J Eukaryot Microbiol* 1997;44:626-635.
10. MONIS PT, ANDREWS RH, MAYRHOFFER G, EY PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol* 1999;16:1135-1144.
 11. READ CM, MONIS PT, THOMPSON RCA. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* 2004;4:125-130.
 12. PONCE-MACOTELA M, PERALTA-ABARCA GE, MARTINEZ-GORDILLO MN. *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico City. *Vet Parasitol* 2005;131:1-4.
 13. PONCE-MACOTELA M, MARTINEZ-GORDILLO MN, BERMUDEZ-CRUZ RM, SALAZAR-SCHETTINO PM, ORTEGA-PIERRES G, EY PL. Unusual prevalence of *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *Int J Parasitol* 2002;32:1201-1202.
 14. CEDILLO-RIVERA R, DARBY JM, ENCISO-MORENO JA, ORTEGA-PIERRES G, EY PL. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. *Parasitol Res* 2003;90:119-123.
 15. LALLE M, JIMENEZ-CARDOSA E, CACCIÒ SM, POZIO E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol* 2005;91:203-205.
 16. ZAJAC AM, JOHNSON J, KING SE. Evaluation of the importance of centrifugation as a component of zinc sulfate fecal flotation examinations. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002;38:221-224.
 17. ARROWOOD MJ, STERLING CR. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. *J Parasitol* 1987;73:314-319.
 18. PONCE-MACOTELA M, MARTINEZ-GORDILLO MN, ALVAREZ-CHACON R. Obtención y cultivo de *Giardia* spp. *Infectología* 1989;10:91-95.
 19. BURET A, DENHOLLANDER N, WALLIS PM, BEFUS D, OLSON ME. Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. *J Infect Dis* 1990;162:231-237.
 20. XIAO L, FAYER R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol* 2008;38:1239-1255.
 21. GIANGASPERO A, PAOLETTI B, IORIO R, TRAVERSA D. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from sheep in central Italy. *Parasitol Res* 2005; 96:32-37.
 22. OLSON ME, THORLAKSON CL, DESELLIERS L, MORCK DW, MCALLISTER TA. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Vet Parasitol* 1997;68:375-381.
 23. GEURDENT T, THOMAS P, CASAERT S, VERCRUYSSSE J, CLAEREBOU E. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. *Vet Parasitol* 2008;155:142-145.
 24. SANTIN M, TROUT JM, FAYER R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Vet Parasitol* 2007;146:17-24.
 25. GEURDENT T, GELDHOF P, LEVECKE B, MARTENS C, BERKENS D, CASAERT S *et al.* Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. *Int J Parasitol* 2008;38:259-264.
 26. LALLE M, POZIO E, CAPELLI G, BRUSCHI F, CROTTI D, CACCIÒ SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 2005;35:207-213.
 27. FENG Y, ORTEGA Y, CAMA V, TERRELL J, XIAO L. High intragenotypic diversity of *Giardia duodenalis* in dairy cattle on three farms. *Parasitol Res* 2008;103:87-92.
 28. TROUT JM, SANTIN M, GREINER E, FAYER R. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves. *Vet Parasitol* 2005;130:177-183.
 29. TROUT JM, SANTIN M, GREINER EC, FAYER R. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in 1-2 year old dairy cattle. *Vet Parasitol* 2006;140:217-222.
 30. SOUZA SLP, GENNARI SM, RICHTSENHAIN LJ, PENA HFJ, FUNADA MR, CORTEZ A *et al.* Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Vet Parasitol* 2007;149:258-264.