

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Aspectos epidemiológicos y patogénicos de G. Lamblia

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Manuel Lopez-Brea Calvo

DIRECTOR:

Manuel Domínguez Carmona

Madrid, 2015

Manuel López-Brea Calvo

TP
1980

127



X-53-150061-5

ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS Y PATOGENICOS
DE G. LAMBLIA

Departamento de Medicina Preventiva y Social
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
1980



BIBLIOTECA

© Manuel López-Brea Calvo
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1980
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-35405-1980

ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS Y
PATOGENICOS DE Giardia lamblia.

TESIS DOCTORAL

M. LOPEZ-BREA.

AÑO 1980.

ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS Y
PATOGENICOS DE Giardia lamblia.

Tesis presentada para optar
al grado de Doctor en Medicina
por el licenciado:
MANUEL LOPEZ-BREA CALVO.

La presente Tesis Doctoral, ha sido dirigida por el Profesor D. Manuel Dominguez Carmona, Catedrático de Medicina Preventiva y Social de la Facultad de Medicina, de la Universidad Complutense de Madrid, y realizada en el Servicio de Microbiología (Dr. D. Fernando Baquero Mochales), del Centro Ramon y Cajal de Madrid.

**A Margarita mi mujer y a mis padres,
a quienes todo les debo.**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente la ayuda prestada, a todas aquellas personas, que han colaborado en la realización de la presente Tesis Doctoral.

Al Profesor D. Manuel Domínguez Carmona, catedrático de Medicina Preventiva y Social, de la Universidad Complutense de Madrid, director de la presente tesis doctoral.

Al Doctor D. Fernando Baquero Mochales, Jefe del Servicio de Microbiología del Centro Ramón y Cajal de Madrid, por su continuo estímulo y permanente ayuda, en la realización de la presente tesis.

Al Doctor D. Carlos Zozaya, profesor del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma de Madrid, por sus consejos y enseñanzas en el estudio de la Parasitología Médica.

A todos mis compañeros, componentes del Servicio de Microbiología del Centro Ramón y Cajal de Madrid por su ayuda y consejos.

A los componentes del Servicio de Pediatría del Centro Especial Ramón y Cajal de Madrid (Prof. Hernández) y especialmente a los doctores Escobar, Camarero y Suárez, de la Unidad de Gastroenterología Infantil, por su gran ayuda en la obtención de aspirados duodenales, procedentes de niños con malabsorción intestinal.

A los componentes del Servicio de Hematología pediátrica (Dra Hurtado), de la Clínica Infantil "La Paz" de Madrid, y en especial a la Dra. de Miguel, por su ayuda en la obtención de muestras fecales, de niños inmunodeprimidos.

Al Dr. Teófilo Sainz, del Servicio de Alergia Infantil del Centro Ramón y Cajal de Madrid, por su ayuda e interés, en la búsqueda de parásitos intestinales, en niños diagnosticados de asma bronquial.

A los Drs. D. S. Ridley y M. J. Ridley, así como al Jefe técnico del laboratorio de Parasitología, A. H. Moody, del Hospital de Enfermedades Tropicales de Londres, con quienes aprendí las técnicas serológicas, aplicables a la gariasis.

Al Dr. J. H. Thompson Jr., del Laboratorio de Parasitología, de la Sección de Microbiología de la Clínica Mayo de los Estados Unidos de América, y al personal técnico de laboratorio, de quienes aprendí las técnicas de tinción de los protozoos intestinales.

A las ayudantes técnicas de laboratorio Gloria Gutierrez y Milagros Barreno, quienes me ayudaron de forma incondicional, en todas las técnicas realizadas.

A Dorí Fernández-Jorge, por su ayuda en el diseño de esquemas.

A Charo Clemente, por su excelente preparación como mecanógrafa, y concretamente en el mecanografiado de esta tesis.

Un agradecimiento muy especial al Dr. D. Gregorio Baquero Gil, con quien aprendí a discernir entre lo útil y lo inútil, lo bien hecho y lo mal hecho, lo esencial y lo superfluo, y a quien debo gran parte de mi corto conocimiento.

Por fin, agradezco de todo corazón a mi hermano Antonio, todo lo que se ha preocupado por la realización de esta tesis, y a mis hijos Marcos y Ana, por el tiempo que no les he podido dedicar.

INDICE

A. -INDICE GENERAL

B. -INDICE DE FIGURAS.

C. -INDICE DE TABLAS.

INDICE GENERAL

	<u>Página</u>
INTRODUCCION Y OBJETO DE LA TESIS	2
PARTE I. - <u>Giardia lamblia</u>.	
1. - Concepto e historia	8
2. - Biología	10
3. - Taxonomía	15
4. - Métodos diagnósticos	22
PARTE II. - Aspectos epidemiológicos de <u>G. lamblia</u>	
1. - Introducción	39
2. - Incidencia de <u>G. lamblia</u> en niños	45
3. - Incidencia de <u>G. lamblia</u> en adultos ..	50
4. - <u>G. lamblia</u> y niños asmáticos	53
5. - <u>G. lamblia</u> y niños inmunodeprimidos .	56
PARTE III. - Aspectos patogénicos de <u>G. lamblia</u>.	
1. - Introducción	73
2. - <u>G. lamblia</u> como causa de diarrea	
aguda y crónica	80
3. - <u>G. lamblia</u> y malabsorción intestinal ..	88
4. - Sintomatología asociada a <u>G. lamblia</u> .	97
5. - Recuento de quistes de <u>G. lamblia</u> en	
heces	101

INDICE (Cont.)

	<u>Página,</u>
PARTE IV. - Aspectos inmunológicos de la giardiasis.	
1. - Introducción	122
2. - Preparación de antígeno de <u>G. lamblia</u>	128
3. - Determinación de anticuerpos circulantes	138
4. - Valoración de la serología	149
PARTE V. - Cultivo de <u>Giardia lamblia</u> .	
1. - Historia	163
2. - Técnicas de cultivo	167
3. - Exquistamiento de <u>G. lamblia</u> ..	177
4. - Experiencia personal en el cultivo de <u>G. lamblia</u>	182
CONCLUSIONES	199
BIBLIOGRAFIA	208

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE FIGURAS

	<u>Página.</u>
Fig. 1. - Trofozoito de <u>G. lamblia</u>	33
Fig. 2. - Esquema de trofozoito de <u>G. lamblia</u>	34
Fig. 3.- Trofozoitos de <u>G. lamblia</u> (visión lateral) ..	33
Fig. 4. - Esquema de trofozoito de <u>G. lamblia</u> (visión lateral)	35
Fig. 5. - Quistes de <u>G. lamblia</u>	37
Fig. 6. - Esquema de quiste de <u>G. lamblia</u>	36
Fig. 7. - Quistes de <u>G. lamblia</u> teñidos con lugol	37
Fig. 8. - Representación gráfica del % de positi- vidad de <u>G. lamblia</u> , comparando grupos de niños y adultos	70
Fig. 9. - Representación gráfica de la disminución progresiva, de los hallazgos de <u>G. lamblia</u> , con la edad	71
Fig. 10. - Trofozoitos de <u>G. lamblia</u> , procedentes de aspirado duodenal.	117
Fig. 11. - Trofozoitos de <u>G. lamblia</u> teñidos con Giemsa	118
Fig. 12. - Trofozoitos de <u>G. lamblia</u> teñidos con colorante tricrómico.	118

Página

Fig. 13. - Promedio de quistes excretados de <u>G. lamblia</u> , por gramo de heces, en relación con la sintomatología presentada.....	119
Fig. 14. - Quistes de <u>G. lamblia</u> eosina positivos (E+), y eosina negativos (E-)	120
Fig. 15. - Porta objetos conteniendo antígeno de <u>G. lamblia</u> , para la realización de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta, (cada círculo indica una dilución del suero problema, desde 1/10 hasta 1/40).	160
Fig. 16. - Imágenes de quistes de <u>G. lamblia</u> , que muestran una inmunofluorescencia positiva	161
Fig. 17. - Inmunofluorescencia negativa de quistes de <u>G. lamblia</u>	161
Fig. 18. - Tubo en U, utilizado para obtener trofozoitos de <u>G. lamblia</u> libres de <u>S. cerevisiae</u>	192

Página

Fig. 19. - Quiste de <u>G. lamblia</u> iniciando el exquistamiento.....	193
Fig. 20. - Trofozoito de <u>G. lamblia</u> exquistado	193
Fig. 21. - Microcámara de cultivo, realizada en porta objetos excavado, que lleva co- locado encima de la concavidad un cubre objetos	194
Fig. 22. - Placa de Petri, que lleva dos cintas adhesivas como soporte de la micro- cámara de cultivo, que se encuentra colocada de forma invertida	195
Fig. 23. - Trofozoitos vivos, junto con <u>Saccha- romyces cerevisiae</u>	196
Fig. 24. - Trofozoitos de <u>G. lamblia</u> en división	196
Fig. 25. - Trofozoitos de <u>G. lamblia</u> , mantenidos en cultivo con <u>S. cerevisiae</u>	197

INDICE DE TABLAS

INDICE DE TABLAS

	<u>Página</u>
Tabla I. - Incidencia de <u>Giardia lamblia</u> en distintos países. Modifi- cación de la tabla de Petersen (164).	60
Tabla II. - Porcentaje de hallazgos posi- tivos de <u>G. lamblia</u> , compa- rando grupos de niños meno- res de catorce años, con adultos mayores de esta edad.	61
Tabla III. - Número de hallazgos positivos de <u>G. lamblia</u> , según la edad	62
Tabla IV. - Incidencia de <u>G. lamblia</u> en niños	63
Tabla V. - Porcentaje de hallazgos posi- tivos de <u>G. lamblia</u> , en relación con la edad	64
Tabla VI. - Incidencia de <u>G. lamblia</u> en adultos.	65

Página

Tabla VII .- Datos comparativos entre los hallazgos de <u>G. lamblia</u> en niños diagnosticados de asma bronquial, y en un grupo de niños control	66
Tabla VIII.- Edad y diagnóstico en niños inmunodeprimidos	67
Tabla IX .- Resultados comparativos del hallazgo de <u>G. lamblia</u> en niños inmunodeprimidos, y en un grupo control, cuando realizamos de una a tres determinaciones de parásitos en heces.	68
Tabla X.- Resultados comparativos del hallazgo de <u>G. lamblia</u> en niños inmunodeprimidos, y en un grupo control, cuando realizamos de dos a tres determinaciones de parásitos en heces	68

Página

Tabla XI .- Edad y diagnóstico en niños de un grupo control	69
Tabla XII .- Sintomatología más frecuen- temente encontrada, en re- lación con el hallazgo de <u>G. lamblia</u> en heces.	109
Tabla XIII.- Sintomatología menos frecuen- temente encontrada, en relación con el hallazgo de <u>G. lamblia</u> en heces	110
Tabla XIV.- Número de enfermos diagnosti- cados de diarrea, en relación con la edad	111
Tabla XV .- Relación entre edad, diarrea y diarrea crónica.....	111
Tabla XVI.- Relación entre edad, diagnóstico y hallazgo de trofozoitos de <u>G. lamblia</u> en el aspirado duodenal ...	112
Tabla XVII.- Porcentaje de positividad de hallazgo de trofozoitos de <u>G. lamblia</u> , en niños afectados de malabsorción Intestinal	113

Página.

Tabla XVIII. - Número de quistes de <u>G. lamblia</u> excretados por gramo de heces, en relación con distintas mani- festaciones alérgicas	114
Tabla XIX . - Número de quistes excretados de <u>G. lamblia</u> por gramo de heces, en relación con cuadros diarreicos y abdominalgias	115
Tabla XX . - Número de quistes de <u>G. lamblia</u> excretados por gramo de heces, en relación con sintomatología no específica	116
Tabla XXI . - Serología positiva para <u>G. lamblia</u> en distintos pacientes	153
Tabla XXII . - Títulos séricos obtenidos para <u>G. lamblia</u> , en diferentes pacien- tes comparados con un grupo control	154
Tabla XXIII . - Niños diagnosticados de giar- diasis y títulos séricos obtenidos para <u>G. lamblia</u>	155

Página

Tabla XXIV. - Enfermos diagnosticados de diarrea crónica, hiperplasia nodular linfoide, y malabsorción intestinal. Edad y títulos séricos obtenidos para <u>G. lamblia</u> ,	156
Tabla XXV .- Enfermos diagnosticados de manifestaciones alérgicas. Edad y títulos séricos obtenidos para <u>G. lamblia</u> ,	157
Tabla XXVI .- Correlación entre los títulos séricos positivos para <u>G. lamblia</u> , y el hallazgo de este protozoo en heces	158
Tabla XXVII. - Correlación entre el diagnóstico clínico, el título serológico para <u>G. lamblia</u> y su hallazgo en heces	159

INTRODUCCION Y OBJETO
DE LA TESIS

INTRODUCCION Y OBJETO DE LA TESIS.

Los estudios realizados en España sobre epidemiología y patogenia de las protozoosis intestinales no son abundantes, y cuando existen, no han utilizado con frecuencia la totalidad de las posibilidades, que ofrece el diagnóstico parasitológico actual.

La falta de desarrollo de la investigación parasitológica, ha contribuido a mantener una serie de concepciones, que están siendo superadas en otros países.

Aún cuando en determinadas zonas de nuestro país, se vienen realizando detecciones de Giardia lamblia en las heces sometidas a estudio parasitológico, son escasos los grupos de investigación que tengan un planteamiento experimental, el cual permita definir el papel etiológico y la importancia epidemiológica de este protozoo intestinal flagelado.

Tradicionalmente se ha venido considerando que Giardia lamblia es un protozoo comensal. Sin embargo, ya en 1954, Rendtorff realiza los primeros ensayos experimentales en voluntarios humanos, llegando a la conclusión de que estas infecciones experimentales tienden a desaparecer espontáneamente,

aunque llama la atención acerca del hecho, de que de catorce Infecciones que estudia adecuadamente, dos persisten al menos durante 129 y 132 días.

Las más recientes publicaciones, a partir del año 1977, muestran que aunque parte de las personas en las que se detecta este protozoo, no presentan síntomas, existe un aumento de la evidencia epidemiológica y clínica de que Giardia lamblia puede ser un importante patógeno para el hombre, como causa de diarrea aguda epidémica y de diarrea crónica asociada a síndromes de malabsorción Intestinal.

Las distintas implicaciones de este protozoo en la patología médica, están aún por definirse con exactitud. Actualmente, no es infrecuente ser consultado por los distintos especialistas médicos, acerca de si G. lamblia puede ser la causa de la taquicardia que presenta su paciente, de las abdominalgias del niño, de la urticaria crónica que padece desde hace años, un paciente del departamento de alergia, de las molestias urinarias continuas donde no se encuentra bacteria causal de una

posible infección, de las molestias hepáticas, de las molestias gástricas, los cuadros de catarro habitual descendente, asma bronquial, dermatitis atópica y procesos alérgicos en general.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, hemos iniciado la presente tesis doctoral, en la idea de poder esclarecer en lo posible el papel epidemiológico, patogénico y la incidencia en nuestro medio de G. lamblia, gracias a la considerable cantidad de enfermos, que de una forma o de otra, hemos investigado, para descartar parásitos intestinales.

El mayor volumen de muestras procesadas, para investigación de este protozoo, lo hemos realizado a partir de heces, donde el número sobrepasa las 5.500 determinaciones, en un período de dos años.

Igualmente, hemos estudiado el aspirado duodenal de 27 niños afectos de cuadros de malabsorción intestinal y más de 100 sueros, en los que hemos realizado inmunofluorescencia indirecta, para la detección de anticuerpos circulantes como medida indirecta en el diagnóstico de Giardiasis.

El conocimiento más exacto acerca del papel de G. lamblia en la patología humana, puede en parte venir dado, por un modelo experimental en animales. Ahora bien, las dificultades para el cultivo de este protozoo son evidentes. Una vez que se le saca fuera de su hábitat, sus flagelos dejan de moverse en un corto espacio de tiempo a partir de las muestras obtenidas por aspiración duodenal, y es precisamente a partir de ellas, cuando se intenta el cultivo de Giardia lamblia.

La idea de que es un protozoo intestinal que no se cultiva no es exacta; ahora bien, el establecimiento de un cultivo de trofozoitos a partir de un aspirado duodenal no es siempre todo lo satisfactorio que se desea.

En el año 1962, Karapetyan, publica un artículo sobre cultivo de Giardia, en el que detalla sus hallazgos. Catorce años más tarde (1976), Meyer, obtiene un cultivo axénico de Giardia lamblia, aunque no es capaz de realizar el cultivo siguiendo las técnicas propuestas por Karapetyan, y realiza modificaciones.

Nuestra experiencia personal en el cultivo de este protozoo

flagelado intestinal, se concreta en el mantenimiento de un cultivo de G. lamblia, a partir de trofozoitos de aspirado duodenal, procedentes de una niña diagnosticada de malabsorción intestinal. Una vez establecido el cultivo, pudimos mantenerlo durante cinco días, y para que quedara constancia del hecho, hemos tenido ocasión de realizar una película de corta duración, donde pueden apreciarse los rápidos movimientos de G. lamblia, gracias a sus flagelos, y algunas imágenes que sugieren una multiplicación de los trofozoitos del cultivo.

El objeto fundamental, pues, de la presente tesis doctoral, es aportar la experiencia personal en el diagnóstico parasitológico, aspectos epidemiológicos, patogénicos y de cultivo, del flagelado intestinal Giardia lamblia.

A la luz de los conocimientos actuales, pensamos que la lucha contra las protozoosis intestinales, y en concreto de la Giardiasis, es más fácil, debido fundamentalmente a un mejor conocimiento de la biología del protozoo y al desarrollo de nuevas técnicas que hacen posible su diagnóstico parasitológico.

PARTE I : GIARDIA LAMBLIA

1. - Concepto e historia.
2. - Biología.
3. - Taxonomía.
4. - Métodos diagnósticos.

1. - Concepto e historia

Giardia lamblia es un protozoo flagelado que vive en la parte superior del intestino delgado, hábitat donde realiza su multiplicación.

Antonj van Leeuwenhoek, de Delft, fué su descubridor en 1681, a partir de sus propias heces diarreicas, viendo formas móviles con su propio microscopio (59).

Este descubrimiento, que se relata en una carta de Leeuwenhoek, se olvidó hasta su redescubrimiento en Praga, por Lambi, en 1859 (121), quién observó el parásito en las heces diarreicas de un niño, llamandole Cercomonas Intestinalis. Fue Stiles en 1925, quién lo situó en su género correcto y lo llamó Giardia lamblia (111). Parece ser que Giardia, fué puesto en honor de Alfred Giard, biólogo francés, (1846-1908).

En 1922, Kofoid y Swezy, describen la estructura de Giardia lamblia, diciendo que los quistes tienen una estructura celular hialina, cuatro núcleos, cuerpos parabasales, axostilos y porciones intracitoplásmicas de los flagelos (105).

La estructura fina de G. lamblia en el hombre, se describe en 1957, por Rossi-Espagnet y Picardo, gracias a sus estudios de microscopía electrónica (172).

La ultraestructura de los quistes de G. lamblia, fué puesta de manifiesto por Sheffield y Bjarne Bjorvatn en 1977 (184).

2. - Biología

Giardia lamblia vive en el intestino de toda clase de vertebrados, desde los peces hasta el hombre (55), fijándose a la superficie de las células de la mucosa intestinal.

Se presenta en dos estadios: -

a) Estadio de trofozoito (Fig. 1)

b) Estadio de quiste (Fig. 5)

a) Estadio de trofozoito.

El trofozoito es un flagelado piriforme, con simetría bilateral, con un extremo anterior redondeado y un extremo posterior en punta.

Es un organismo concavo convexo, que mide de 10 a 21 micras de longitud, de 5 a 15 micras de ancho y de 2 a 4 micras de espesor (71).

Presenta dos grandes núcleos y cuatro pares de flagelos. Los dos núcleos tienen grandes endosomas centrales, entre los que se sitúan los dos axostilos, a los que se fijan los núcleos mediante finas fibrillas.

Presenta un complicado sistema de gránulos basales y fibrillas, que conectan con los flagelos, y las varillas que sostienen el disco suctorio.

En su parte ventral anterior, tiene un disco suctorio concavo, que le sirve para adherirse firmemente a la superficie epitelial de la mucosa intestinal, y que le permite resistir al peristaltismo habitual del intestino. Presenta además blefaroplastos y un cuerpo parabasal. (Fig. 2).

La parte dorsal del trofozoito, es convexa. (Figs. 3 y 4).

El trofozoito, se mueve activamente por rápidas sacudidas de sus flagelos. Absorbe alimentos a través de la superficie de su cuerpo. Parece ser, que su entorno óptimo, se encuentra en un pH entre 6,38 y 7,02 (85).

Son poco tolerantes a la acidez y no sobreviven con facilidad fuera del cuerpo humano, aunque se encuentran en aspirados duodenales, y heces muy diarreicas de pacientes afectos de Giardiasis.

Viven en duodeno y primeras porciones del yeyuno, aunque a veces se pueden encontrar en conductos biliares y vesícula biliar.

Posiblemente, se alimentan de la abundante secreción de moco que su presencia estimula, y de una variedad de aminoácidos, vitaminas y otras sustancias de las células de la mucosa intestinal (176).

El trofozoito realiza su multiplicación por división en dos.

El paso de trofozoito a quiste (enquistamiento) ocurre normalmente en el íleon terminal, de modo intermitente. Los flagelos se retraen y se segrega una pared celular quística hialina delgada.

b) Estadio de quiste.

El quiste es de paredes gruesas y ovaladas, de 8 a 14 micras de longitud. Contiene de dos a cuatro núcleos y formaciones comparables a las del trofozoito. (Fig. 6).

Cuando se encuentra maduro, suele contener cuatro núcleos, axostilos y fibrillas dispuestas diagonalmente y de dos a cuatro cuerpos curvos. Los quistes se encuentran en el intestino grueso y heces. Pueden sobrevivir en heces más de 60 días (111).

La ultraestructura del quiste de G. lamblia, ha sido propuesta por Sheffield y Bjorvatn en 1977, describiendole de la siguiente forma:

"Se encuentra rodeado por una pared densa, moderadamente fibrosa de 0,3 micras de espesor. Una membrana delgada de citoplasma, separa la pared del quiste de los espacios intracelulares, situados alrededor de la perifería del quiste. Normalmente hay presentes cuatro núcleos. Los cuerpos basales y los filamentos axiales se sitúan entre los núcleos. Dos láminas de microtúbulos se asocian con los filamentos axiales. No se encuentran mitocondrias, retículo endoplásmico o aparato de Golgi.

En el citoplasma, se encuentran hileras paralelas de microtúbulos, con estructuras como cintas (ribbon-like) perpendiculares.

Se encuentran unidades subestructurales, con una periodicidad de 150 Å, orientadas perpendicularmente a los ejes longitudinales de las cintas (ribbons). Las estructuras como

cintas y los microtúbulos asociados, representan porciones separadas del disco suctorio del trofozoito, y aparentemente están reorganizadas dentro del disco suctorio". (184).

El paso de quiste a trofozoito (exquistamiento), se realiza, una vez ingerido el quiste y cuando pasa al estómago cuyo pH es aproximadamente de 2.

Se ha demostrado "in vitro", que las soluciones ácidas cuyo pH se acerque al del estómago, pueden inducir el exquistamiento de los quistes de G. lamblia, e incluso a partir de los trofozoitos exquistados, se ha intentado el posterior cultivo axénico. (17).

3. - Taxonomía,

Giardia lamblia es un microorganismo incluido en el phylum Protozoa, subphylum Mastigophorea y Clase Zoomastigophorea del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. (33).

Las distintas especies de Giardia, han sido y son actualmente objeto de discusión.

En 1952, Ansari, enumeró 38 especies de Giardia a las que aplicó distintos nombres y describió, así como ocho o diez especies más, a las que dió la denominación provisional de Giardia sp. (1).

Sin embargo, también en 1952, Filice, concluye que los criterios hasta ahora utilizados en la asignación de las distintas especies, no son exactos, y propone únicamente 3 especies: Giardia agilis, Giardia duodenalis y Giardia muris, (69).

Para mamíferos, han sido descritas 20 especies (1, 2, 153), en base a la especificidad de huésped y a diferencias morfológicas y dimensionales.

La especie hallada en el hombre, se le conoce como Giardia lamblia o Giardia duodenalis.

Se puede pensar, que los criterios aceptables para distinguir las distintas especies, han de basarse en los siguientes puntos:

- a) Morfología del trofozoito.
- b) Dimensiones del trofozoito.
- c) Especificidad del huésped a ser infectado por una determinada especie.

En 1973, Levine sugiere, que en ausencia de unos cuidadosos experimentos de transmisión cruzada, sería más conveniente que permanecieran los nombres originales específicos, para muchas de las Giardia sp. de los diferentes huéspedes (122). Sin embargo, algunos investigadores prefieren no poner nombre a las especies por ellos estudiadas (130).

En 1978, Grant y Woo, realizan experimentos de transmisión cruzada, combinados con estudios de morfología y dimensiones de Giardia sp. de diferentes huéspedes. (82).

Muchos autores anteriormente, habían puesto su confianza en las pequeñas diferencias morfológicas entre trofozoitos, para la identificación de las especies de Giardia. Los criterios más utilizados incluían:

- a) La oblicuidad de los núcleos en relación al eje axial.
- b) El punto de partida de los flagelos anteriores, en relación con la posición del núcleo.
- c) La densidad del citoplasma teñido.
- d) El grado de condensación de la cromatina nuclear.
- e) La presencia de gránulos, en el punto de partida de los flagelos.

Sin embargo, los estudios realizados bajo estos parámetros, indicaban que tales criterios eran dependientes de la posición y estadio de división de los trofozoitos, así como de los métodos de preparación, de los fijadores y de las tinciones utilizadas.

Así por ejemplo, variando el tiempo de prefijación y secado se producen diferencias en el tamaño, morfología general, densidad del citoplasma y relativa posición de los orgánulos.

Sin embargo, la forma del cuerpo medial (median body) fué al parecer el único carácter relativamente no afectado (82).

En 1909, Noc, en 1952, Filice, y en 1962, Bemrick, manifiestan que la única diferencia sustancial entre trofozoitos de diferentes especies de Giardia era la forma y posición del cuerpo medial. (154, 69, 15).

La morfología de los quistes, utilizada para diferenciar las distintas especies de Giardia, no parece ser un buen método, y así por ejemplo, el cuerpo medial que parece apreciarse en diversos quistes, cuando se observan al microscopio ordinario no es tal, ya que cuando se ve al microscopio electrónico, lo que se interpreta como cuerpo medial, es un reforzamiento del borde del disco succionario (184).

También se han utilizado en el pasado, las dimensiones de los trofozoitos, para diferenciar especies (83).

En 1930, Hegner, pensó que las especies eran estrictamente específicas del huésped, conclusión basada en las aparentes diferencias morfológicas y dimensionales entre los trofozoitos, obtenidos de huéspedes de diferentes especies. Sin embargo,

los resultados de los experimentos de transmisión cruzada, han sido contradictorios y no apoyan ni refutan el concepto de especificidad estricta del huésped (82).

En 1978, Grant y Woo, realizan una serie de mediciones de los trofozoitos de Giardia que estudian, y citan los parámetros que utilizan para sus mediciones. Piensan, que dentro y entre las distintas especies de Giardia, deben ocurrir variaciones, y es necesario examinar un gran número de trofozoitos de numerosos huéspedes de la misma especie, para obtener medidas representativas de la especie (82).

La forma del cuerpo medial del trofozoito, parece ser útil en el estudio de las distintas especies, y distintos autores, han sugerido que la presencia de cuerpos mediales en los trofozoitos, está en relación con el ciclo reproductivo del parásito. (16, 185, 105, 123).

Las observaciones de que trofozoitos con esta estructura son mayores que los que no tienen, y el hecho de que los cuerpos mediales no estén presentes en los quistes, parecen apoyar esta hipótesis.

Tal vez cabe pensar, que los trofozoitos con cuerpos mediales, son formas maduras, mientras que los trofozoitos sin cuerpos mediales, son formas que acaban de dividirse (82).

Los estudios con microscopía electrónica, revelan que los cuerpos mediales están formados por microtúbulos y no parecen ser orgánulos de depósito de nutrientes. (53, 54, 70, 84).

Parece ser pues, que actualmente, para estudiar las diferencias entre las distintas especies de Giardia, se sugiere el estudio de las dimensiones de los trofozoitos con cuerpos mediales (186, 82).

Los estudios realizados con respecto a la especificidad del huésped, por Grant y Woo, no llegan a una conclusión definitiva. Estos autores utilizan G. lamblia, G. muris, G. simoni, G. peromysci, G. microti, G. mesocricetus y Giardia spp. para estudiar la especificidad del huésped, y concluyen diciendo que, las tres primeras especies no infectaron a huéspedes de otras especies; pero que

G. microti obtenida de hamsters, si infecta otras especies.
G. mesocricetus de ratas de laboratorio infecta a hamsters.
Giardia spp. de ratas salvajes infecta a ratas de laboratorio
y que Giardia lamblia de humanos, no infectan a ratas de
laboratorio o ratones. (82).

Sin embargo, en 1956, Halba, transmite Giardia desde
seres humanos a ratas de laboratorio. (88).

Podemos pues concluir diciendo, que la taxonomía de
Giardia, no está aclarada y quizás sea necesario esperar a la
realización de estudios más profundos (genéticos, estructura
de DNA, relación índice citosina-guanina, etc).

No obstante cabe pensar, que los estudios que se realicen
para dilucidar las distintas especies de Giardia, se guiarán
siguiendo al menos tres patrones fundamentales, como son:
morfología, dimensiones de los trofozoitos y especificidad
del huésped.

4. - Métodos diagnósticos.

Para la búsqueda del protozoo Giardia lamblia, se utiliza básicamente cuatro procedimientos en patología humana:

- a) Búsqueda en heces.
- b) Búsqueda en aspiraciones duodenales.
- c) Búsqueda en biopsias de Intestino delgado.
- d) Demostración Indirecta mediante técnicas serológicas.

a) Búsqueda en heces.

El examen parasitológico de las heces, se puede llevar a cabo, realizando una suspensión de las mismas en solución salina, que bien puede tefirse con Lugol u otro colorante apropiado. Posteriormente, se procede a su examen al microscopio óptico para detectar los quistes o trofozoitos de G. lamblia, (Fig. 7)

Este método es obligado para la posible detección de trofozoitos en heces, a no ser que se utilicen sustancias preservadoras de los trofozoitos (P. V. A. o M. I. F.).

Para la detección de quistes de G. lamblia, bien puede emplearse el método anteriormente descrito, o mejor una

técnica de concentración, que permita visualizar los quistes de aquellas muestras donde sean incluso escasos.

Rutinariamente utilizamos una modificación del método de concentración de formol-éter (5) y que conlleva los siguientes pasos:

- Se toman 1-2 g. de heces problema.
- Se añaden a un tubo conteniendo 5 cc. de formalina al 10%.
- Se mezcla adecuadamente.
- Se filtra esta mezcla por un filtro, cuyo diámetro de poro no sea superior a 1 mm (nosotros utilizamos un colador de cocina, de 1 mm de diámetro de filtro).
- Se recoge el filtrado y se coloca en un tubo, al que se añaden 3 cc. de éter-etílico.
- Se agita la mezcla durante 15 segundos, si es posible en un agitador mecánico.
- Se centrifuga a 3.000 r. p. m. durante 1-2 minutos.
- Se forman cuatro capas que se decantan.

- Se recoge el fondo del tubo y se pone entre porta y cubre con o sin una gota de lugol, para su observación al microscopio óptico.

Debido a la periodicidad en la excreción fecal de quistes, (179, 21), la mayoría de los autores preconizan el examen parasitológico de más de una muestra de heces, en cada paciente donde se sospeche giardiasis.

Nuestra recomendación para el envío de muestras de heces, de aquellos enfermos con sospecha clínica de giardiasis, es que se realicen tres tomas de heces en intervalos de dos días, así obtenemos un número de tres muestras, que puede ser aumentado a seis en aquellos casos de fuerte sospecha clínica, pero que en las primeras tres determinaciones no se ha visualizado Giardia lamblia.

Es necesario el estudio de más de una muestra fecal, para descartar la parasitación por G. lamblia.

Wolfe, en su experiencia, con sujetos posiblemente afectados de esta parasitosis, obtiene un 76% de positiv-

dades cuando sólo procesa una muestra de heces; 90% de positividad, cuando son dos las muestras procesadas y 97,6% de positividad, cuando se procesan tres muestras.

Este estudio se realizó en 670 casos positivos, utilizando el examen en fresco y el método de concentración con formol-éter de las muestras fecales (211).

De la misma manera, no es infrecuente encontrarse hallazgos positivos para Giardia lamblia, cuando se realizan más de una investigación parasitológica de las heces de los sujetos sospechosos de giardiasis.

Por consiguiente, una sola muestra fecal, donde encontremos quistes de Giardia lamblia, es absolutamente diagnóstica. Ahora bien, en aquellos pacientes donde se sospeche giardiasis, se deben realizar varias determinaciones de parásitos en heces, para descartar esta parasitosis.

Una sola muestra de heces, en la que no se detecte Giardia lamblia no es excluyente de la posible parasitación por este protozoo, y se deben realizar posteriores exámenes parasitológicos para asegurar el diagnóstico.

b) Búsqueda en aspiraciones duodenales.

Como anteriormente hemos citado, la excreción de quistes de G. lamblia en heces, se realiza de forma periódica (21, 179).

Un determinado número de veces, no es posible encontrar el protozoo en las deyecciones emitidas, por eso es necesario buscarlo en su hábitat, como es el duodeno y primeras porciones del yeyuno, donde en forma de trofozoito realiza su nutrición, crecimiento y multiplicación.

El aspirado duodenal, es pues un método diagnóstico, que se puede realizar para la búsqueda de Giardia lamblia.

El método consiste en sondar al enfermo y esperar con paciencia a que la sonda llegue a duodeno, circunstancia que puede ocurrir en la mayoría de los casos en algunas horas.

Se comprueba radiologicamente en distintos períodos, si la sonda se encuentra alojada en el lugar deseado, y

es entonces cuando se procede al aspirado duodenal con una jeringa adecuada. Actualmente, existen métodos de obtención de jugo duodenal, que hacen más fácil la realización de este procedimiento diagnóstico, y así comercialmente se ha elaborado un dispositivo que lleva el nombre de Entero-test. Es un hilo, que en un extremo posee una cápsula de gelatina, que en su interior lleva una bolsita. Este dispositivo se deglute por el enfermo, y pasadas unas horas, cuando la bolsita ha llegado a duodeno, se procede a retirar el dispositivo y se obtiene la muestra duodenal (23, 24, 106, 197).

El diagnóstico de giardiasis por aspiración duodenal, es más dificultoso, comparado con el examen periódico de muestras fecales. Sin embargo, a veces es un método mejor desde el punto de vista de la seguridad diagnóstica, y es preferido por diversos autores. (25, 72, 76, 124, 155, 168, 164). Otros autores sin embargo, piensan que el examen de heces es suficiente (7, 110). Naik, en 1978, de

32 pacientes que tienen quistes de G. lamblia en heces, sólo 24 (75%) muestran trofozoitos en el aspirado duodenal (156).

Por consiguiente el aspirado duodenal, puede no mostrar trofozoitos de G. lamblia, y sin embargo, una búsqueda repetida de este protozoo en heces, puede ser diagnóstica.

Una vez obtenido el jugo duodenal, se procede mediante la colocación de una pequeña cantidad de este aspirado, entre porta objetos y cubre objetos a su observación al microscopio óptico. El tiempo transcurrido desde la obtención de la muestra, hasta su visión al microscopio, debe ser el menor posible, debido a la fragilidad de los trofozoitos de G. lamblia. Es fácil reconocer los trofozoitos, ya que sus movimientos son rápidos y su morfología característica, pero se debe proceder a su observación cuanto antes.

A partir de estos aspirados y sobre todo, si no puede verse lo más rápido posible, se pueden realizar extensiones

en portaobjetos que posteriormente, previo fijado, se pueden teñir con Giemsa o colorante tricrómico y así visualizar los trofozoitos que hubiere en el aspirado duodenal.

Ultimamente, se ha utilizado el microscopio electrónico, como medio diagnóstico, a partir del aspirado duodenal, de aquellos pacientes sospechosos de giardiasis (67, 187, 107, 134, 12). La utilidad de este procedimiento se pone de manifiesto, en aquellos casos en que hay una fuerte sospecha de giardiasis, pero no se encuentra el protozoo con los métodos habituales. Se pueden visualizar con este método, menos de cincuenta giardias por ml. de aspirado duodenal (14).

c) Búsqueda en biopsias de intestino delgado.

En este método diagnóstico, es necesario el sondaje del enfermo, y una vez obtenida la biopsia, se realizarán cortes histológicos para su demostración.

Se pueden realizar improntas de la mucosa intestinal, y posteriormente proceder a su fijado y teñido con Giemsa. Este método se utiliza en conjunción con el aspirado duodenal, para la búsqueda de G. lamblia.

Recientemente, se utilizan las improntas de mucosa intestinal de las biopsias yeyunales como método útil en el diagnóstico de giardiasis (8, 9, 110).

Nosotros hemos utilizado sistemáticamente la tinción con Giemsa, de las improntas de las biopsias intestinales, de los pacientes a los que se realizó aspirado duodenal con la consiguiente biopsia.

La demostración de G. lamblia en las biopsias de intestino delgado, ha sido puesta de manifiesto por diversos autores. (18, 45, 60, 87, 223), desde entonces constituye un método alternativo en el diagnóstico de giardiasis.

d) Demostración indirecta mediante técnicas serológicas,

La demostración indirecta de G. lamblia en patología humana, puede llevarse a cabo, realizando test serológicos, que detecten la presencia de anticuerpos circulantes, y así algunos autores, han contribuido de esta forma al diagnóstico de la giardiasis.

La demostración de anticuerpos circulantes, en el suero de un enfermo, se realiza a partir de trofozoitos o más frecuentemente de quistes de G. lamblia (que sirven como antígeno) obtenidos de las heces de personas infectadas.

La utilización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta es aplicable a este método diagnóstico. (174, 175, 129).

Actualmente, también se ha utilizado la inmunodifusión pasiva, como técnica diagnóstica de demostración de anticuerpos séricos circulantes, en pacientes con giardiasis, utilizando quistes de Giardia lamblia como antígeno (202).

Es necesario decir, que no en todos los pacientes que presentan parasitación por G. lamblia, se encuentran anticuerpos circulantes en su suero. Ahora bien, en determinadas situaciones en que se ha establecido una malabsorción intestinal, pueden no encontrarse quistes o trofozoitos del protozoo en las distintas investigaciones parasitológicas realizadas, y sin embargo, obtener un título sérico valorable. Estos sujetos son tratados de su giardiasis y mejoran espectacularmente de su sintomatología.

Estas situaciones clínicas, se ha pensado que puedan deberse a la existencia de una giardiasis críptica (174).

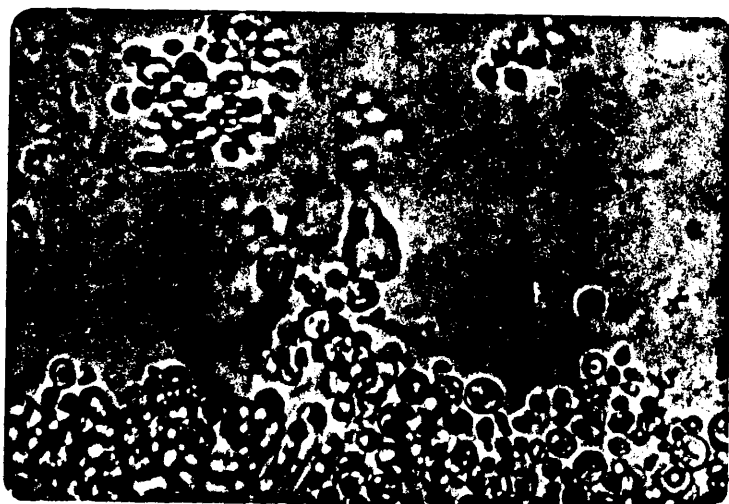


Fig. 1. -Trofozoito de Giardia lamblia.



Fig. 3. -Trofozoitos de G. lamblia(visión lateral).

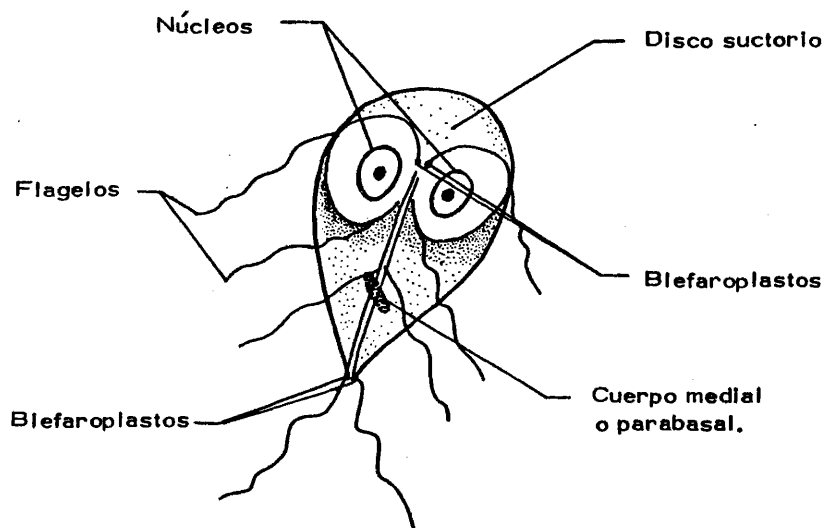


Fig. 2. - Trofozoitos de G. lamblia (esquerña)

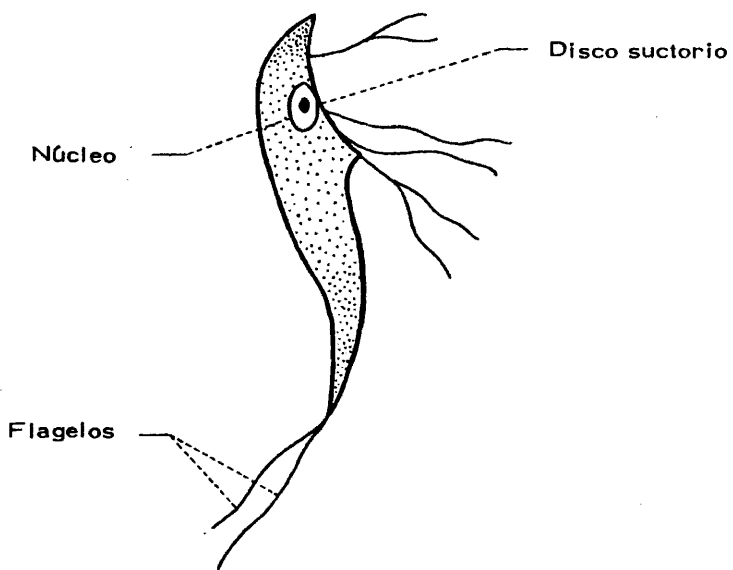


Fig. 4 . - Esquema de trofozoito de G. lamblia (visión lateral)

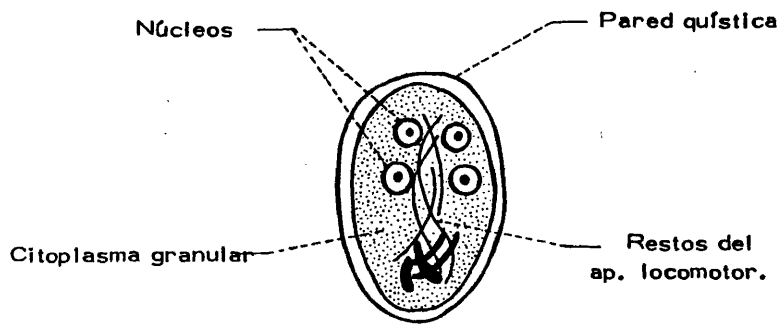


Fig. 6. - Esquema de quiste de G. lamblia

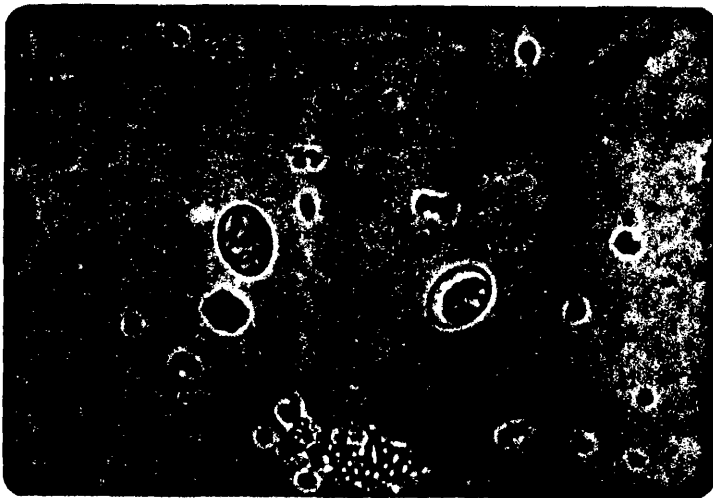


Fig. 5. -Quistes de Giardia lamblia.

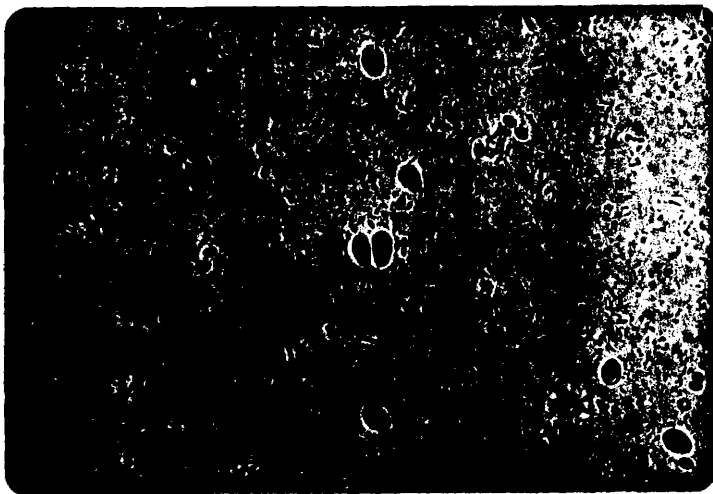


Fig. 7. -Quistes de G. lamblia, teñidos con lugol.

PARTE II

ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DE GIARDIA LAMBLIA

1. - Introducción.
2. - Incidencia de Giardia lamblia en niños.
3. - Incidencia de Giardia lamblia en adultos.
4. - Giardia lamblia y niños asmáticos.
5. - Giardia lamblia y niños inmunodeprimidos.

1. - Introducción.

La giardiasis es una parasitación distribuida por todo el mundo, y su incidencia puede variar desde el 1 al 30% (164).

El porcentaje medio de incidencia de Giardia lamblia, citado hasta 1931, por 60 autores diferentes, era de acuerdo con Behnke de aproximadamente un 12,5% (29).

Sin embargo, la incidencia de giardiasis en el mundo, en los últimos treinta años es aproximadamente de un 2 a un 6%, bien se haya hecho el diagnóstico parasitológico a partir de las heces o del aspirado duodenal (164).

Ha sido Leningrado, una de las principales zonas del mundo, donde se citaba que se contraía la infección, pero sin embargo, Wolfe, dice haber encontrado casos de giardiasis de 97 países diferentes (211).

Boe, en Oslo, encuentra Giardia lamblia en un 5 a 6% de 1.100 pacientes, donde investiga parásitos en heces en 1943 (26).

En Dinamarca, Lund, encuentra hallazgos similares en 1943 (125), y algunos años antes, parecidos porcentajes

fueron encontrados por Svenson en Finlandia y Suecia (188).

En Estados Unidos, Gleason, en 1970, encuentra un 5% de positividad, en los exámenes parasitológicos realizados en heces (77).

En Francia Brumpt y Brumpt, citan un porcentaje de parasitación del orden del 10% (28), aunque Ligny lo sitúa en aproximadamente un 7% (126).

En Alemania, Haas, de 23.078 muestras de heces, en 1967, sólo encuentra un 2,6% de positividad (89).

En la India, Das Gupta, en 1944, de 1.000 muestras de heces, encuentra hallazgos positivos para Giardia lamblia, en el 7,9 de las muestras estudiadas (61). Aunque este porcentaje baja al 6,4% si se compara con el estudio de Antia, también en la India, pero en 1966 y con mayor número de muestras fecales procesadas, ya que éste autor cita haber estudiado 4.720 muestras (3).

En nuestra estadística, realizada desde Octubre del año 1977 a Octubre del año 1979, hemos encontrado un porcentaje

de positividad para Giardia lamblia del orden del 7, 35%. Este porcentaje se ha obtenido, de considerar el número de muestras procesadas para determinación de parásitos en heces, que ha sido de 5.600 muestras fecales, y el número de enfermos donde hemos encontrado Giardia lamblia en heces, que ha sido en 412.

Los estudios comparativos de distintas partes del mundo, incluyendo nuestra estadística son expuestos en la Tabla I.

Parece ser, que las condiciones higiénicas desfavorables, favorecen el aumento de la parasitación por Giardia lamblia (III, 27).

Las principales fuentes de infección son:

- a) El agua (30, 135, 212, 189, 190, 37).
- b) Las comidas contaminadas (31, 213).
- c) El contacto interpersonal (164, 32, 112).

El agua, puede ser un vehículo efectivo de transmisión de giardiasis.

Giardia lamblia, en forma de quistes mantenidos en agua a 8°C. durante un período de dieciséis días, infectó a voluntarios que bebieron el agua (179).

Otras fuentes de transmisión, incluyen ingestión de comidas contaminadas y vegetales (31).

Se ha citado el hallazgo de Giardia lamblia en perros, y así se ha postulado su posible papel en el ciclo epidemiológico (163).

El contacto interpersonal, ha sido descrito sobre todo en guarderías (32, 112).

Esta última vía de contagio, seguiría probablemente el mecanismo fecal-oral.

Estas tres vías fundamentales de transmisión, se realizan gracias a los quistes del parásito, que son capaces de sobrevivir en agua fría o templada de uno a tres meses, aunque son destruidos inmediatamente a 50°C (33).

Los quistes de G. lamblia, resisten aguas cloradas al 0,5% durante dos a tres días, aunque parece ser que son

destruidos por compuestos de yodo, en las dosis recomendadas para la purificación del agua (213).

Se han citado epidemias de giardiasis en Colorado (135), en el estado de Nueva York (136), en Kentucky (30), y en otras localidades en los Estados Unidos de América (180).

El Centro para Control de las Enfermedades (C. D. C) de E. E. U. U. , examinó 1419 personas, procedentes de Leningrado y otras ciudades de la U. R. S. S. , de 1969 a 1973. En este estudio, se detalla, que el 35% de estos pacientes, estuvieron enfermos durante el período de estancia, o al poco tiempo de regresar a E. E. U. U. El período medio de duración de la enfermedad, fué de seis semanas. Trescientos seis pacientes llevaron al menos una muestra de heces y el 30% fué positivo para Giardia lamblia (34, 198).

Por consiguiente, la posibilidad de epidemias de giardiasis es un hecho constatado y que puede representar un problema, desde el punto de vista sanitario.

Las tres fuentes fundamentales de contagio, es decir, agua, alimentos contaminados y la transmisión por el contacto interpersonal, son los puntos importantes de la epidemiología de esta parasitosis.

Aunque diversos animales pueden ser portadores espontáneos de Giardia en la naturaleza, como ratas, cobayas, perros, conejos, aves, etc., el perro es quizás el animal que tiene mayor contacto con el hombre. Y así, habiéndose encontrado perros parasitados por Giardia, se ha pensado en la posible transmisión de este protozoo desde el perro hasta el hombre, como mecanismo que puede ocurrir espontáneamente (163).

La parasitación por Giardia es una realidad en nuestro medio, y es necesario tenerlo en cuenta en los diversos cuadros diarreicos, que se presentan sin causa aparentemente explicable.

2. - Incidencia de Giardia lamblia en niños.

El protozoo G. lamblia es más frecuente en niños, que en adultos y así lo reflejan en sus publicaciones distintos autores (35, 36, 46, 137, 138).

En 1943, Boe y Rinvik, estudian 402 niños hospitalizados en Oslo y encuentran G. lamblia en el 7,7% de los niños estudiados (26).

En 1921, Maxcy, se refiere a G. lamblia como un protozoo común parásito de niños. (139). En 1922, Mac Gill y Lyons, y en 1925, Swaln, están de acuerdo en el hecho de que es un protozoo especialmente patógeno para niños (140, 127).

Powell, en Irlanda, en 1956, investigó 100 niños cuyas edades eran de 6 meses a 14 años y encontró un porcentaje de parasitación del 3% (168).

En 1967, Kidney y Holland, citan haber encontrado 243 casos de giardiasis, en niños de edad inferior a 14 años, encontrado los hallazgos positivos en el 5% de

niños menores de 1 año, en el 62% de los niños menores de 5 años y a partir de esta edad la incidencia disminuía considerablemente (111).

En estudios donde se consideró el contacto Interpersonal como mecanismo de contagio, las edades más susceptibles de infectarse, fueron de 1 a 3 años (112).

En 1968, Kapoor y Mody, de 145 casos de giardiasis, encuentran 75, en niños menores de 15 años, y 69 en adultos mayores de 15 años (113).

Los niños mantienen G. lamblia más frecuentemente que los adultos y son probablemente más vulnerables a sus efectos (49, 204).

En 1954, Chandler, realizando exámenes parasitológicos en aldeas egipcias, encontró este parásito en un 16% de las personas en edad inferior a la pubertad y sólo en un 3% de las personas que habían pasado ya dicha edad (55).

Nuestro estudio de giardiasis, que comprende un total de 5,600 determinaciones de parásitos en heces, apoya la

idea expresada por los distintos autores, a los que nos hemos referido, ya que de 279 pacientes donde pudimos documentar edad, el mayor porcentaje de positividad correspondió a niños de edad inferior a los 14 años. (89,24% de los hallazgos positivos). El porcentaje disminuyó considerablemente en edades superiores a 14 años (10,75% de los hallazgos positivos). Estos datos se expresan en la Tabla II.

Las edades de presentación de Giardia lamblia en heces, variaron desde pocos meses de vida hasta 81 años (Tabla III).

El hallazgo de G. lamblia en niños, así como en adultos, probablemente se encuentra en relación con el nivel de higiene (164).

La incidencia de G. lamblia en niños, se expresa en la Tabla IV.

En nuestro estudio el mayor porcentaje de hallazgos de G. lamblia, correspondió a niños cuyas edades estaban

comprendidas entre 0 y 5 años (44, 80% de los hallazgos positivos), el porcentaje inmediatamente inferior correspondió a niños, cuyas edades estaban comprendidas entre 6 y 10 años. (31, 89% de los hallazgos positivos) y por último, el porcentaje más bajo lo obtuvimos en niños cuyas edades oscilaban de 11 a 14 años (12, 54% de los hallazgos positivos) (Tabla V).

El menor cuidado higiénico por parte de la población infantil, es quizás un factor importante dentro de las posibles explicaciones que pueden encontrarse, en relación con la mayor parasitación por Giardia lamblia en niños.

Anteriormente hemos hecho mención a distintos autores, que hacen a su vez referencia, a un mayor índice de parasitación en los niños. En nuestro trabajo, hemos encontrado igualmente un aumento en la incidencia de G. lamblia en niños, comparada con la del adulto.

Las comunidades de niños facilitan el contacto interpersonal y el contagio de unos a otros. Así se han descrito casos de epidemias en guarderías, recomendándose diversas

medidas para reducir la transmisión de G. lamblia en estos centros (121, 38, 32).

También se ha citado una mayor susceptibilidad por parte de los niños a ser infectados, y a presentar más fácilmente sintomatología que los adultos. (49, 121, 224).

Por consiguiente, es necesario, no olvidar, que esta mayor incidencia y su asociación con una mayor facilidad a padecer síntomas, nos puede ayudar en el diagnóstico parasitológico de los niños. Indudablemente en los cuadros diarréicos infantiles conviene descartar la parasitación por Giardia lamblia, debido a que este protozoo no es infrecuente en los niños y puede ser la causa o al menos formar parte de la causa de su diarrea.

3. - Incidencia de Giardia lamblia en adultos.

La aceptación de G. lamblia como patógeno Intestinal, ha llevado a considerar su implicación en la patología digestiva del adulto, así como en procesos alérgicos en general entre otras sintomatologías.

En 1965, Ligny, cita haber realizado 991 exámenes parasitológicos motivados por trastornos digestivos y encuentra G. lamblia en 86 casos (126). Este mismo autor, refiere que los obtiene en el grupo de personas de edad comprendida entre 20 y 30 años.

En nuestra estadística, considerando adultos aquellas personas cuya edad era superior a 14 años, obtenemos un mayor porcentaje de parasitación en edades que oscilan de 20 a 30 años, encontrando casos de parasitación desde 15 años hasta 81 años (Tabla VI).

El número de hallazgos positivos considerando los 279 pacientes donde pudo documentarse la edad, fué de 30 para adultos, lo que supone un 10,75% de los hallazgos positivos (Tabla II).

La disminución de la parasitación por G. lamblia es un hecho a medida que llega la edad adulta, esta observación la hemos podido constatar personalmente, ya que es un hospital general, donde hemos realizado este trabajo, y la frecuencia de petición de parásitos en heces, así como la incidencia de parasitación, es baja en las personas adultas.

La progresiva disminución de la parasitación por G. lamblia queda reflejada si comparamos, distintos grupos de edad y así de un 44,80% de porcentaje de positividad en niños cuya edad oscilaba de 0 a 5 años, solamente obtenemos un 10,75% de porcentaje de positividad en el grupo de adultos (Fig. 9).

La parasitación por G. lamblia supuso un 89,24% de los hallazgos positivos en niños cuya edad era inferior a 14 años y un 10,75% de los hallazgos positivos en adultos cuya edad era superior a 14 años (Fig. 8).

La disminución de la parasitación por Giardia lamblia en la población adulta, es un hecho claro si se compara con la incidencia de este protozoo en niños.

Los hábitos higiénicos mejores, favorecen esta disminución de la incidencia de parasitación por G. lamblia.

El nivel de incidencia de G. lamblia se encuentra en relación probablemente con el nivel de higiene (164).

La menor incidencia en personas adultas, en parte también viene dada, por una probable resistencia adquirida a la parasitación, después de haberse puesto en contacto con el protozoo en edades más tempranas.

Así en estudios realizados en zonas endémicas, se ha pensado en la posibilidad de una inmunidad adquirida, ya que las personas que están en estas zonas un corto período de tiempo y son parasitadas por G. lamblia, presentan parasitaciones porcentualmente mucho más altas que las personas que llevan viviendo largas temporadas (211).

Se ha encontrado experimentalmente resistencia a la infección con Giardia muris en un modelo animal, como la rata (211).

Estas consideraciones explicarían en cierta medida la disminución de la parasitación por G. lamblia en edad adulta.

4. - Giardia lamblia y niños asmáticos,

La asociación entre asma bronquial y parasitosis intestinal es un tema objeto de discusión.

En 1970, David y Tullis estudian 201 pacientes con asma bronquial y encuentran que el 93% tienen Ascaris lumbricoides 6% Strenqiloides stercoralis y 1% Necator americanus (62).

Van Dellen y Thompson encuentran Ascaris lumbricoides en 60 de 123 pacientes con asma bronquial (203).

En 1978, Kayan y Cols, de 50 pacientes que estudian con asma bronquial, y 50 controles normales, encuentran un 40% de parasitación por Ascaris lumbricoides en pacientes con asma bronquial, y sólo un 14% de parasitación en el grupo control (114).

La asociación de asma bronquial y parasitación intestinal es pues un hecho.

En el período de tiempo comprendido entre Octubre de 1977 y Octubre de 1978, estudiamos las heces desde el punto de vista parasitológico de 164 niños, cuyas edades oscilaban de 0 a 14

años y que procedían del Departamento de Alergia Infantil, donde habían sido diagnosticados de asma bronquial.

El número de determinaciones parasitológicas varió entre una y tres, siendo la mayoría de las veces, tres las determinaciones realizadas en heces.

Las muestras de heces fueron procesadas siguiendo la técnica de concentración con formol y éter (5).

En el grupo de niños estudiados encontramos G. lamblia en 22 niños, lo que representa un porcentaje del 13,41%.

Para comparar este hallazgo con un grupo de niños que no presentaran manifestaciones alérgicas en general, realizamos el estudio de 75 niños. En este grupo sólo encontramos G. lamblia en 2 niños, lo que representa un 2,66% de positividad de los niños estudiados. (Tabla VII).

Este hecho nos ha llevado a pensar en la asociación existente entre giardiasis y asma bronquial, sin hacer, referencia a su implicación en la patogénesis de la enfermedad.

Desde el punto de vista epidemiológico, nos parece pues necesario puntualizar, que la presencia de G. lamblia en

niños con asma bronquial, es un hallazgo, que conviene tener en cuenta a la hora de asociar procesos asmáticos con parasitosis intestinales.

Quizás sea demasiado aventurado el implicar el protozoo G. lamblia en la patogénesis del asma bronquial, pero lo que nos parece fuera de toda duda es la asociación entre G. lamblia y asma bronquial.

Tal vez sea necesario resaltar, que estos niños a los que hemos encontrado G. lamblia en heces, que presentaban un cuadro alérgico de asma bronquial, cuando se les trata de su protozoosis mejoran considerablemente de su asma bronquial.

La asociación entre giardiasis y asma bronquial requiere un estudio experimental más profundo, para intentar buscar una relación de causa-efecto o por el contrario descartar completamente este hecho.

Los pacientes alérgicos en general, se encuentran más frecuentemente parasitados, y tal vez G. lamblia sea una parasitación más de los procesos alérgicos en general.

Estudios inmunológicos más extensos y profundos son necesarios, para estudiar estas asociaciones que son objeto de discusión.

5. - Giardia lamblia y niños inmunodeprimidos.

En relación con el estudio epidemiológico de la giardiasis y teniendo en cuenta las posibles razones de base para una asociación entre giardiasis e inmunodepresión. (115, 214, 225).

Hemos estudiado un grupo de niños cuyas edades estaban comprendidas entre 1 y 9 años de edad. Todos ellos estaban diagnosticados de procesos tumorales, y todos presentaban una inmunodepresión.

Este estudio se realizó, con la idea de encontrar un mayor porcentaje de parasitación por G. lamblia, en todos estos niños que presentaban cuadros patológicos malignos, como leucosis, tumoración abdominal, neuroblastoma, etc (Tabla VIII).

Hicimos estudio parasitológico de las heces de estos niños, siguiendo la técnica modificada de Allen y Ridley (5). El número de determinaciones realizadas varió de una a tres.

Todos estos niños se encontraban hospitalizados en la Clínica Infantil "La Paz" de Madrid.

Estudiamos 37 niños con procesos tumorales en los que se realizó de 1 a 3 determinaciones de parásitos en heces, encontrando G. lamblia en 11 niños lo que supone un 29,72% de positividad (Tabla IX).

De estos 37 niños, en 15 de ellos se realizaron de 2 a 3 determinaciones de parásitos en heces, encontrando G. lamblia en 10 niños, lo que supone un 66,66% de positividad (Tabla X).

Para comparar estos hallazgos, tomamos un grupo de 60 niños control, que se encontraban hospitalizados en el Centro Ramón y Cajal de Madrid, cuyas edades oscilaban de 0 a 13 años y que no estaban diagnosticados de procesos malignos. (Tabla XI).

De estos niños, 35 procedían del Departamento de Pediatría y 25 del Departamento de Traumatología infantil.

En todos ellos se realizó de 1 a 3 determinaciones de parásitos en heces, siguiendo la técnica de concentración con formol y éter (5).

De estos 60 niños, en los que se realizaron de 1 a 3

determinaciones de parásitos en heces, encontramos G. lamblia en 2 niños, lo que supone un 3,33% de positividad. (Tabla IX).

De los 60 niños, en 30 de ellos se realizaron de 2 a 3 determinaciones de parásitos en heces, encontrando G. lamblia en 2 niños, lo que supone un 6,66% de positividad (Tabla X).

Por consiguiente, encontramos una incidencia mayor de parasitación en niños con problemas de inmunodepresión, si lo comparamos con el grupo de niños control que no estaban al menos, diagnosticados de inmunodepresión.

Los grupos de niños estudiados, todos estaban hospitalizados y ninguno de los grupos pertenecía a policlínicas o estudios realizados de forma ambulatoria.

Aunque es cierto que los niños conviviendo juntos proporcionan un mayor número de incidencia de parasitación por Giardia lamblia (39). Sin embargo, en nuestro estudio tomando poblaciones similares encontramos hallazgos, que al menos desde el punto de vista epidemiológico nos parecen significativos.

El grupo de niños que estaba diagnosticado de procesos tumorales malignos, y que por consiguiente tenían problemas de inmunodepresión, mostraron una mayor incidencia de Giardia lamblia en sus heces.

En el grupo de niños que no presentaban procesos tumorales malignos, el índice de parasitación fué considerablemente inferior.

La asociación entre inmunodepresión e incidencia de G. lamblia, es una cuestión que actualmente se encuentra en controversia.

Para determinados autores, la inmunodepresión se encuentra asociada a la giardiasis y consideran la inmunodeficiencia como causa facilitadora de la giardiasis (214, 225). Para otros sin embargo, el hallazgo de unas funciones inmunológicas normales en pacientes afectados de giardiasis (104, 159), les lleva a poner en duda lo que otros han citado.

La base inmunológica como causa de susceptibilidad a esta parasitación, ha sido propuesta, ya que la giardiasis parece ser una infección común en pacientes inmunodeficientes. No obstante la cuestión no queda aclarada, y tal vez los estudios de inmunidad celular y otros, puedan dar luz a este problema.

<u>Año</u>	<u>Autor</u>	<u>País</u>	<u>Nº de muestras examinadas</u>	<u>Muestra</u>	<u>% de Incidenci de G lamblia</u>
1931	Behnke	Varios	38.686	Varías	12,5
1941	Nutter	U. S. A	1.539	Heces	1,5
1951	McMurray	U. S. A	2.522	"	3,1
1957	Nohr	Alemania	2.153	Jugo duodenal	3,3
1963	Gassmann	Suíza	7.800	Heces	3,2
1967	Haas	Alemania	23.078	"	2,6
1970	Gleason	U. S. A	419	"	5,0
1966	Gherman	Rumania	6.000	Jugo duodenal	2,4
1965	Antia	India	4.720	Heces	6,4
1943	Lund	Dinamarca	372	Heces	4,6
1942	Boe	Noruega	1.111	Heces	5,6
1960	Payne	U. S. A	400	Heces	9,5
1972	Petersen	Noruega	190	Heces	3,2
1972	Petersen	Noruega	293	Jugo duodenal	6,7
1979	López-Brea	España	5.600	Heces	7,3

Tabla I. - Incidencia de Giardia lamblia en distintos países. Modificación de la tabla de Petersen (164).

<u>Edad en años</u>	<u>Nº de hallazgos de G. lamblia</u>	<u>%</u>
0 - 14	249	89.24
14	30	10.75

Tabla II. - Porcentaje de hallazgos positivos de G. lamblia,
comparando grupos de niños menores de catorce
años, con adultos mayores de esta edad.

<u>Edad en años</u>	<u>Nº de casos positivos</u>	<u>Edad en años</u>	<u>Nº de casos positivos</u>
1	3	22	2
1	13	24	1
2	37	25	2
3	32	26	2
4	23	28	1
5	27	29	3
6	16	30	2
7	13	33	1
8	29	35	1
9	24	37	1
10	7	38	1
11	14	44	1
12	4	48	1
13	5	49	1
14	3	53	1
15	2	57	1
18	1	64	1
21	2	61	1

Tabla III. - Número de hallazgos positivos de G. lamblia según la edad.

<u>Edad en años</u>	<u>Nº de casos positivos</u>
1	3
1	13
2	37
3	32
4	23
5	27
6	16
7	13
8	29
9	24
10	7
11	14
12	4
13	15
14	3

Tabla IV. - Incidencia de G. lamblia en niños.

<u>Grupos de edad</u> (en años)	<u>Nº de hallazgos positivos</u>	<u>%</u>
0 - 5	125	44,80
6 - 10	89	31,89
11 - 14	35	12,54
Más de 14	30	10,75

Tabla V. - Porcentaje de hallazgos positivos de G. lamblia,
en relación con la edad.

<u>Edad en años</u>	<u>Nº de casos positivos</u>
15	2
18	1
21	2
22	2
24	1
25	2
26	2
28	1
29	3
30	2
33	1
35	1
37	1
38	1
44	1
48	1
49	1
53	1
57	1
64	1
81	1

Tabla VI. - Incidencia de G. lamblia en adultos

<u>Niños diagnosticados de asma bronquial</u>	<u>Hallazgo de G. lamblia</u>	<u>%</u>
146	22	13,41
<u>Grupo de niños control</u>		
75	2	2,66

Tabla VII. - Datos comparativos entre los hallazgos de G.
lamblia en niños diagnosticados de asma bronquial,
y en un grupo de niños control.

<u>Edad en años</u>	<u>Diagnóstico</u>	<u>Edad en años</u>	<u>Diagnóstico</u>
3	Tumoración	5	Leucosis
9	Linfoma	5	Leucosis
7	Linfoma	4	Linfoma
6	Tumoración	6	Tumor maligno
6	Leucosis	5	Linfoma
3	Leucosis	7	Tumoración
6	Linfoma	3	Tumor óseo
6	Leucosis	6	Leucosis
5	Leucosis	4	Neuroblastoma
6	Linfoma	3	Granuloma
7	Leucosis	3	Leucosis
2	Linfoma	4	Leucosis
6	Tumor de Ewing	2	Neuroblastoma
5	Adenopatías	5	Leucosis
1	Linfoma	6	Leucosis
3	Neuroblastoma	2	Tumor de Willms
7	Linfoma	4	Linfoblastoma
6	Linfoma	4	Púrpura
4	Leucosis		

Tabla VIII. - Edad y diagnóstico en niños inmunodeprimidos.

<u>Niños inmunodeprimidos</u>	<u>G. lamblia</u> <u>(1 a 3 determinaciones)</u>	<u>%</u>
37	11	29,72
<u>Niños Grupo Control</u>		
60	2	3,33

Tabla IX. - Resultados comparativos del hallazgo de G. lamblia en niños Inmunodeprimidos y en un grupo control, cuando realizamos de 1 a 3 determinaciones de parásitos en heces.

<u>Niños inmunodeprimidos</u>	<u>G. lamblia</u> <u>(2-3 determinaciones)</u>	<u>%</u>
15	10	66,66
<u>Niños Grupo control</u>		
30	2	6,66

Tabla X. - Resultados comparativos del hallazgo de G. lamblia en niños inmunodeprimidos y en un grupo control, cuando realizamos de 2 a 3 determinaciones de parásitos en heces.

<u>Edad en años</u>	<u>Diagnóstico</u>	<u>Edad en años</u>	<u>Diagnóstico</u>
1	Malformación	1	Encefalopatía
6	Tuberculosis	8	Convulsiones
4	Psicopatía	11	Fractura
5	Diabetes	1	"
11	Dolor abdominal	1	"
12	Ausencias	8	"
8	Absceso subfrénico	3	"
12	Cólico nefrítico	5	"
11	Dolor abdominal	6	"
7	-	9	"
8	Dolor abdominal	2	"
12	Artritis reumatoide	4	"
8	Dolor abdominal	7	"
4	Bronconeumonía	6	"
7	Cólico nefrítico	6	"
4	-	1	"
5	Crisis	9	"
9	Abdominalgia	2	"
9	Corea	5	"
7	Vómitos	6	"
11	Apendicitis	1	"
6	Piodermitis	2	"
5	Cefaleas	3	"
7	Síndrome febril	6	"
6	Pancreatitis	7	"
8	Intoxicación por Metopirone	8	"
9	Malrotación renal	6	"
8	-	5	Fiebre
9	Cefaleas	4	Diabetes
8	Diabetes	8	Convulsiones

Tabla XI. - Edad y diagnóstico en niños del Grupo control.

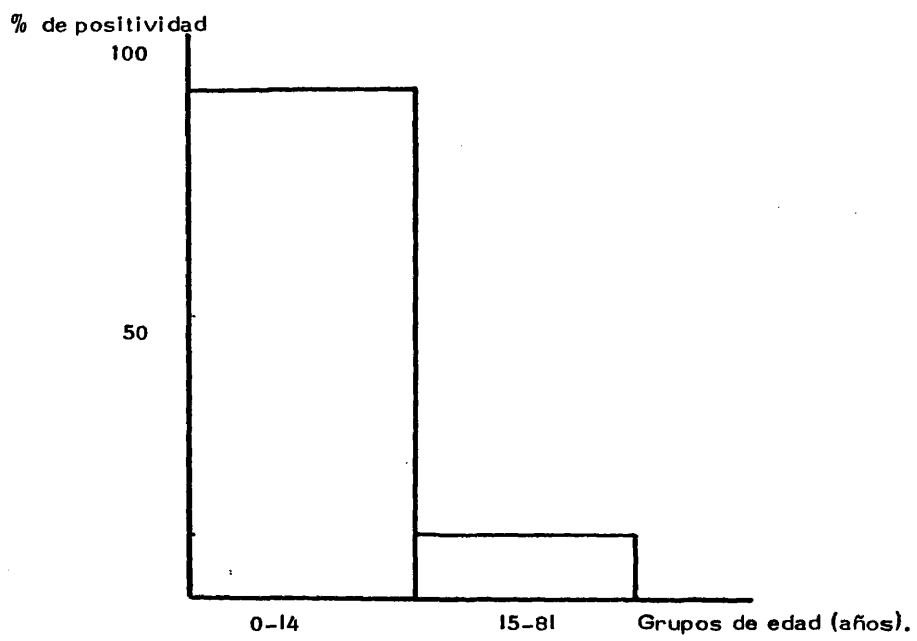


Fig. 8. -Representación gráfica del % de positividad de G. lamblia comparando grupos de niños y adultos.

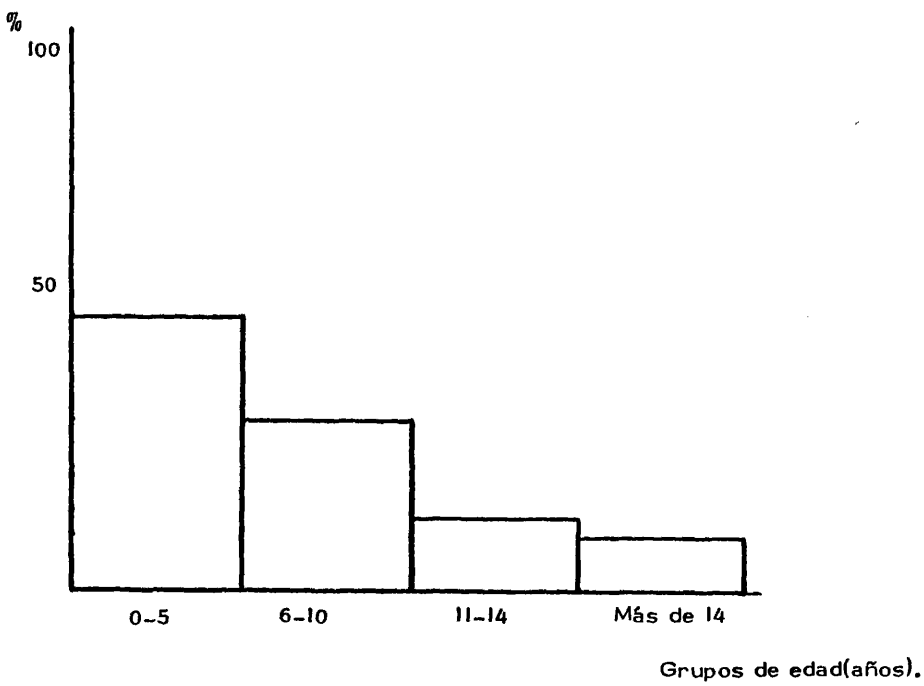


Fig.9. -Representación de la disminución progresiva de los hallazgos positivos de G. lamblia con la edad.

PARTE III

ASPECTOS PATOGENICOS DE G. LAMBLIA

1. - Introducción
2. - G. lamblia como causa de diarrea aguda y crónica.
3. - G. lamblia y malabsorción intestinal.
4. - Sintomatología asociada con G. lamblia.
5. - Recuento de quistes de G. lamblia en heces. Viabilidad.

1. - Introducción.

La implicación en la patología humana del protozoo G. lamblia es relativamente reciente, debido entre otras causas, a que se encuentra en individuos sin aparente sintomatología.

Algunos autores han dudado acerca de su capacidad para causar enfermedad (35, 116, 141, 177).

Tradicionalmente se le ha venido considerando como protozoo intestinal comensal, y actualmente se encuentra ya incluido como causa de trastornos intestinales y hepáticos.

Chandler, dice que ya no hay duda acerca del papel de G. lamblia como agente patógeno (55). Junto a él, otros autores no sólo le han considerado patógeno, sino que le han creído responsable de todo un conjunto de síntomas (63, 90, 127, 191).

La frecuencia con que G. lamblia causa patología, varía mucho en relación con los distintos autores.

Haas y Bücken, estudiaron un gran número de pacientes no seleccionados y encontraron G. lamblia en 689, les trataron a todos y concluyeron que en la cuarta parte de estos sujetos el protozoo había causado síntomas (89).

Rendtorff, realiza estudios experimentales en voluntarios a los que administra quistes de G. lamblia y observa cambios en la consistencia y frecuencia de las heces emitidas (179).

Veghelyi encontró en 1939, indicios evidentes de interferencia mecánica con absorción desde el intestino, principalmente de grasas, por parte de la capa de parásitos que estaban adheridos a la pared intestinal (207).

Las alteraciones gastrointestinales han sido las manifestaciones patógenas más evidentes de G. lamblia, y así diversos autores encuentran mayor incidencia de este protozoo, en aquellas personas que presentan problemas intestinales. (29, 27, 3, 142, 169, 192).

Además de las manifestaciones gastrointestinales, otras patologías se han incluido como consecuencia de la parasitación

por G. lamblia, y así las manifestaciones alérgicas han sido propuestas por diversos autores (91, 92, 90, 215, 216).

Alteraciones de la vesícula biliar y disfunción del tracto biliar (79, 80). La forma hepatobiliar de la giardiasis, fué descrita en 1923, por Westphal y Georgi, en siete pacientes en los cuales son sintomatología hepatobiliar, encuentran trofozoitos de Giardia lamblia en la aspiración duodenal. En un paciente de estos, al que se realiza colecistectomía, se obtienen gran cantidad de trofozoitos de G. lamblia de la vesícula biliar, este paciente se cura de toda su sintomatología después de la operación (217).

Posteriormente, se han citado en la literatura diversas publicaciones relacionando G. lamblia y disfunciones hepatobiliares (127, 63, 41, 97, 193, 194).

Se han asociado también con G. lamblia otros cuadros clínicos como la fiebre intermitente (78, 160), la linfocitosis infecciosa (64), neuropatía periférica (40), uveítis (48), pancreatitis crónica (164).

G. lamblia es pues un protozoo intestinal que causa patología en el ser humano. Sin embargo, los mecanismos patogénicos por los cuales este parásito produce cuadros clínicos son desconocidos (211).

La respuesta individual, a la exposición a G. lamblia, es variable y depende del propio parásito o del huésped.

Respecto al propio parásito, se puede pensar que existan unas cepas virulentas y otras no virulentas, además de la especificidad de huésped. Los estudios de especificidad de huésped, ya han sido comentadas anteriormente.

Pero no existe evidencia hasta el momento, que sugiera una virulencia variable por parte del parásito.

La respuesta individual del huésped, se estudió por Rendtorff en 1954, quien infectó a 40 hombres con una cepa de G. lamblia a diferentes dosis y sólo logró infectar a 21 personas. La mayoría no revelaron síntomas importantes, pero 9 personas notaron un cambio en sus heces.

La dosis infectante fué una variable que se manejó en este trabajo, y así aunque 10 quistes de G. lamblia condujeron a la infección en algunos individuos, 100 o más quistes, fueron necesarios para asegurar la infección en todos.

La infestación se resolvió espontáneamente en la mayoría de los casos, después de un breve período, pero en 2 hombres las heces fueron positivas para G. lamblia más de 3 meses (179).

Es probable que distintas cepas de Giardia geográficamente puedan variar en su patogenicidad (211).

El inóculo de G. lamblia, es decir, el número de quistes ingeridos, es pues, una condición necesaria para asegurar la infección.

Se ha citado también que la hipoclorhidria o aclorhidria facilitan la infección por G. lamblia, y así ocurre un aumento en la susceptibilidad a ser infectado en aquellos sujetos gastrectomizados (90, 223).

La hipoclorhidria o aclorhidria, ha sido encontrada por diversos autores en sujetos infectados con G. lamblia y se

acepta que estos sujetos son más susceptibles a padecer giardiasis (89, 117, 143, 180).

La infancia, está probablemente asociada con una mayor susceptibilidad a presentar cuadros de giardiasis (49).

La insuficiencia en lactasa, es otro factor que se aduce como favorecedor de giardiasis (3, 8, 181).

La hipogammaglobulinemia, es otro factor que se ha relacionado con giardiasis. (87, 98). En general los mecanismos Inmunes alterados pueden ser un factor significativo, en la susceptibilidad de los distintos individuos, a la infección por Giardia lamblia (224).

La hipogammaglobulinemia concretamente, se ha asociado con giardiasis y se ha relacionado con un marcado descenso de las inmunoglobulinas IgA e IgM. Hermans y Cois relatan, que en 6 de 7 pacientes con hipogammaglobulinemia y giardiasis, les desapareció la hipogammaglobulinemia después del tratamiento de su giardiasis. (98).

La malnutrición se ha sugerido y documentado, como factor favorecedor de giardiasis (90, 144).

Así pues, los posibles factores implicados en una mayor susceptibilidad a padecer una infestación por G. lamblia, son los siguientes:

- a. - Respuesta individual
- b. - ¿Cepas virulentas y no virulentas?.
- c. - Variación geográfica de las distintas cepas.
- d. - Inóculo de G. lamblia,
- e. - Hipoclorhidria y aclorhidria.
- f. - Infancia.
- g. - Insuficiencia en lactasa.
- h. - Hipogammaglobulinemia.
- i. - Malnutrición.

Todos estos factores, se han asociado a giardiasis, y se pueden considerar como favorecedores de la parasitación por Giardia lamblia.

2. - G. lamblia como causa de diarrea aguda y crónica.

Fundamentalmente son dos las entidades clínicas, donde G. lamblia juega un papel patógeno cada vez más aceptado. Estos dos cuadros clínicos son la diarrea aguda y la crónica.

En 1916, Fantham y Porter, demuestran la importancia de G. lamblia como causa de disentería en soldados en guerra y así de 1.300 casos encuentran G. lamblia en un 13,5% (73).

No hay que olvidar, que fué Leeuwenhoek en 1681, quién a partir de sus propias heces diarreicas, vió formas móviles con su propio microscopio (59) y que Lambi, en 1859, observó el parásito en las heces diarreicas de un niño (121).

La diarrea es uno de los síntomas más frecuentes debido a la parasitación por G. lamblia, y así se cita en la literatura por diversos autores (164, 68, 3, 101, 142).

Petersen, en un grupo de pacientes con "diarrea sin explicar", encontró Giardia lamblia en un 15%. (164).

Se ha demostrado, que cuando se trata la giardiasis desaparece el cuadro diarreico, y que por consiguiente

G. lamblia juega un papel importante en la producción de la diarrea. (4, 3, 38, 74, 97, 102, 145, 155, 161, 168, 164, 218).

Parece pues, que la asociación entre G. lamblia y diarrea es un hecho claro, tanto en niños como en adultos, y que su implicación como patógeno intestinal, se encuentra cada vez mas fuera de toda duda.

Diversos autores han publicado sus experiencias donde encuentran G. lamblia en enfermos diarreicos, y así se cita la incidencia de este protozoo, que puede variar desde un 10% de los enfermos diarreicos (117), hasta un 76% de los sujetos afectos de diarrea (111).

Los cuadros diarreicos, pueden presentarse de forma epidémica o de forma esporádica.

La forma de presentación como diarrea epidémica, se ha descrito de una manera clara desde que Ormiston y Coles, en 1942, citaran la producción en una guardería, de una epidemia de enteritis asociada a G. lamblia en Inglaterra. (161).

En 1969, Moore y Cols, refieren una epidemia debida a G. lamblia, en una estación de ski. (135). Más tarde, se han publicado diversos trabajos, haciendo referencia a las diarreas epidémicas producidas por G. lamblia (112, 32, 37, 212, 190, 195, 205).

La forma de diarrea esporádica, es aquella que de vez en cuando, se ve en determinados sujetos que presentan cuadros diarreicos, y que no guardan una relación directa con una fuente común de infección.

La sintomatología que se observa en los sujetos afectados de diarrea es variable, y puede presentarse de forma aguda y de forma crónica.

La diarrea aguda, puede tener un período de incubación que varía de una a tres semanas después de la infección. Después del período de incubación, comienza una diarrea explosiva y acuosa, con marcada distensión abdominal, flatulencia, náuseas y anorexia.

El estado agudo suele durar de tres a cuatro días, y a partir de aquí, si no se diagnostica y trata, se puede desarrollar una infección subaguda o crónica. En algunos casos, el estado agudo se puede prolongar y establecerse un cuadro de malabsorción intestinal, con marcada pérdida de peso y debilidad general.

La mayoría de los pacientes tienen débiles o moderados síntomas, que incluyen episodios periódicos breves de heces sueltas, con aumento de la flatulencia y de la distensión abdominal.

Entre las exacerbaciones, las heces pueden presentarse blandas o puede haber estreñimiento. En otros pacientes la sintomatología y el parásito pueden desaparecer espontáneamente después de períodos variables (211).

Determinados pacientes con predisposición a la deficiencia en lactasa, pueden desarrollar un "Síndrome post-giardico" de intolerancia a la lactosa, después de la erradicación aparente de G. lamblia con tratamiento específico. Este síndrome debe

ser tenido en cuenta en aquellos pacientes, que una vez tratados, persisten con heces blandas, distensión abdominal y flatulencia (211).

Los cuadros clínicos de diarrea crónica, son aquellos que se manifiestan durante meses e incluso años, y que a veces se acompañan de una malabsorción intestinal.

Los sujetos afectados de diarrea crónica, llevan una larga temporada con deposiciones a veces típicamente diarreicas, otras veces son heces blandas y se pueden acompañar de períodos de estreñimiento.

Es necesario en estos casos, seguir una pauta diagnóstica estricta, para poner en claro la causa productora de su diarrea. La determinación de parásitos en heces, realizada periódicamente, la determinación serológica de anticuerpos circulantes y el sondaje, incluso la biopsia intestinal, deben ser valorados y llevados a cabo, para descartar la implicación de G. lamblia en su diarrea crónica.

Se ha citado, el llamado período prepatente de la giardiasis, en aquellos sujetos que aún estando infectados por G. lamblia, no muestran esta parasitación con los distintos métodos diagnósticos. Así, este período, con un tiempo medio de duración de unas dos semanas, puede variar entre una semana y mes y medio aproximadamente, hasta su diagnóstico de confirmación. Se deben realizar exámenes repetidos de heces, al menos hasta tres semanas después de una posible exposición a Giardia lamblia, aunque los resultados iniciales hayan sido negativos (103).

La diarrea, es pues, una de las manifestaciones más frecuentes de la parasitación por G. lamblia.

Desde Octubre de 1977 a Octubre de 1979, hemos podido documentar el diagnóstico de 270 pacientes, en los que encontramos G. lamblia en sus heces (Tablas XII y XIII). El método seguido para la determinación de parásitos en heces ha sido ya expuesto anteriormente, de concentración con formol y éter (5).

De los 270 casos positivos para G. lamblia, encontramos cuadros diarreicos en 72 enfermos, lo que supone un 26,66% de los hallazgos positivos (Tabla XII). Este porcentaje es el más alto con respecto al resto de la sintomatología más frecuentemente encontrada, cuando comparamos el hallazgo de G. lamblia con el diagnóstico del paciente. La mayoría de estos pacientes, presentaban cuadros diarreicos, que unas veces eran etiquetados por el clínico como cuadros agudos, y otras como cuadros diarreicos crónicos. Otras veces, el diagnóstico sugerido por el clínico era el de abdominalgias, independientemente de aspecto y consistencia de las heces.

Diarrea aguda y crónica, son pues dos entidades clínicas, donde la sospecha de giardiasis como causa de estos procesos, debe tenerse en cuenta, y realizar las investigaciones parasitológicas oportunas para descartar esta parasitación.

De los 72 enfermos con cuadros diarreicos donde encontramos G. lamblia pudimos documentar diarrea, diarrea crónica y edad en 49 enfermos. De estos pacientes, 32 eran niños y 17 adultos. (Tabla XIV), 19 enfermos presentaban diarrea crónica y

20 enfermos estaban diagnosticados de diarrea sin especificar si el cuadro era agudo (Tabla XV).

Es necesario descartar pues, la parasitación por G. lamblia, en los cuadros diarreicos en general y más específicamente en aquellas diarreas crónicas, donde no se encuentra microorganismo causal.

3. - Giardia lamblia y malabsorción intestinal.

La asociación entre giardiasis y malabsorción intestinal, se viene gestando desde hace más de cincuenta años, cuando Miller, en 1926, llamó la atención acerca del hecho de que la infección por G. lamblia en niños, podría asociarse a un cuadro clínico similar como era la enfermedad celiaca (146).

En 1939, Veghelyi, demostró que la malabsorción en niños, podría ser causada por G. lamblia (206, 207, 208, 209).

Diferentes autores han publicado sus experiencias, demostrando la asociación entre malabsorción intestinal y parasitación por Giardia lamblia (49, 46, 56, 13, 226, 223, 87, 147, 99, 50, 4, 118, 182).

En áreas endémicas, los niños han sido el grupo más importante que ha presentado malabsorción. (115).

En 1975, Blanco Rabassa, cita 31 casos de malabsorción en 50 niños infectados por G. lamblia (42). Tewari y Tandon, en 1974, demuestran en indúes, fallo en la absorción de grasa y d-xilosa en sujetos infectados por G. lamblia (199).

En 1977, Wright y Cols, en 40 sujetos que estudian, encuentran malabsorción en 20 pacientes a dos o tres sustancias de las que prueban, que son grasa, xilosa y vitamina B₁₂ (219).

El fallo en la absorción de vitamina B₁₂ ha sido citado también por otros autores (157, 8).

La malabsorción de vitamina A, debido a la parasitación por G. lamblia ha sido demostrada en niños (119, 148).

La esteatorrea, debida a la parasitación por Giardia lamblia en adultos, ha sido referida por diversos autores (56, 99, 4, 87).

Otros autores, sin embargo, no han llegado a una conclusión definitiva para afirmar que G. lamblia cause un síndrome de malabsorción, y así Palumbo, en 1962, de 430 pacientes con giardiasis que revisa en la clínica Mayo de Estados Unidos, no llega a una conclusión clara, aunque de estos, 69 pacientes tienen al menos algún dato de laboratorio relacionado con la función abortiva intestinal (162). A conclusión similar llegan otros autores (51, 120).

La malabsorción intestinal causada por G. lamblia es sin embargo, un hecho aceptado por la mayoría de los autores, y se han postulado diferentes mecanismos patogénicos para explicarlo.

Así pues, estos mecanismos intentan explicar porqué en determinados sujetos, parasitados por G. lamblia, se producen cambios importantes en la absorción intestinal.

Se han postulado diferentes mecanismos patogénicos, en la giardiasis con síndrome de malabsorción, y entre los fundamentales, podemos citar los siguientes.

- a) Ataque a la mucosa intestinal por parte de G. lamblia (98, 223).
- b) Producción de una barrera mecánica que dificulte la absorción debido al número masivo de parásitos, situados sobre la superficie de la mucosa intestinal (14, 207).
- c) Irritación de la mucosa intestinal, con salida de moco y fluido y alteración de la motilidad intestinal (170, 14).
- d) Competición entre el microorganismo y el huésped por los nutrientes (226).

- e) Posible efecto antifolato por parte de G. lamblia, que estimularía la deficiencia de ácido fólico o vitamina B₁₂ (18).
- f) La malnutrición que se asocia con frecuencia a la malabsorción y giardiasis (144).
- g) Invasión de los conductos pancreáticos por G. lamblia y por consiguiente, la esteatorrea sería de origen pancreático (63).
- h) Asociación entre bacterias y giardiasis (128, 224). Sobrecrecimiento bacteriano en la luz del intestino delgado. La colonización intestinal por enterobacterias, puede jugar un papel importante, en el desarrollo de la malabsorción en pacientes con giardiasis (200).
- i) Asociación entre Candida albicans y G. lamblia (158).

Todos estos mecanismos patogénicos postulados, intentan explicar la asociación entre giardiasis y malabsorción intestinal.

Tal vez sea necesario aunar estos criterios, para llegar a un mejor conocimiento de la patógena, de los síndromes de malabsorción producidos por G. lamblia.

Esta claro, que las malabsorciones intestinales, en gran número de casos, mejoran e incluso desaparecen por completo, una vez que se trata la giardiasis, en aquellos donde se encuentra implicado G. lamblia en el cuadro clínico de malabsorción.

Por consiguiente, el pensar en G. lamblia, ante un cuadro de malabsorción intestinal es obligado, por parte del gastroenterólogo, habida cuenta de que en nuestro medio la parasitación por G. lamblia, es un hecho no infrecuente.

En 1967, se demuestra la invasión de la mucosa intestinal por Giardia lamblia, con demostración histopatológica del hecho (18, 147).

Los mecanismos patogénicos enunciados por distintos autores, tienden a aclarar la relación entre G. lamblia y malabsorción intestinal, pero sin embargo, su causa íntima no está lo suficientemente aclarada.

Estamos de acuerdo con Wolfe, cuando dice, que los mecanismos patogénicos exactos, por los cuales G. lamblia produce determinados cuadros clínicos, son desconocidos (211).

Teniendo en cuenta la asociación entre la infestación por G. lamblia y malabsorción intestinal, hemos estudiado un grupo de niños cuyas edades oscilaban de 0 a 9 años y que estaban diagnosticados de malabsorción intestinal (Tabla XVI).

En todos estos niños, se realizó sondaje intestinal, con control radiológico, para la búsqueda de trofozoitos en el aspirado.

Una vez obtenida la aspiración, procedimos a su visión microscópica, siempre en un tiempo no superior a diez minutos, desde que se obtenía la muestra, hasta que se observaba microscópicamente.

La técnica que realizamos, consistió en tomar una pequeña cantidad del jugo duodenal aspirado, con una pipeta Pasteur, y colocarlo en un porta objetos encima del cual colocamos un cubre objetos.

En las muestras donde se veían trofozoitos de G. lamblia, estos mostraban sus típicos movimientos, que no siempre eran de la misma intensidad, y no todas las muestras presentaban igual cantidad de imágenes de trofozoitos a partir del aspirado. (Fig. 10).

Estudiamos un total de 27 aspiraciones intestinales, correspondientes a 27 niños diagnosticados de malabsorción intestinal, encontrando trofozoitos de G. lamblia en 7 niños lo que supone un 25,92% de positividad (Tabla XVII).

En todas las aspiraciones intestinales, se realizó biopsia, para su estudio anatomopatológico, a partir de la cual realizamos improntas sobre un cobre objetos y procedimos a su tinción con Giemsa o colorante tricromico (Figs. 11 y 12).

En todas las muestras donde se vieron trofozoitos de G. lamblia en fresco, se observaron igualmente a partir de la tinción.

La búsqueda de G. lamblia a partir de las aspiraciones duodenales, ha sido preconizada por diferentes autores como método más efectivo.

Ament, en 1972, observó que se había omitido el diagnóstico de giardiasis, en cinco niños, en los que se había usado como único criterio, el examen parasitológico de las heces (7).

Kamath y Murugasu, en 1974, encontraron que el aspirado intestinal, había omitido el diagnóstico de 2 niños, de un grupo de 12, que ya habían sido diagnosticados de giardiasis, por tinción de la impronta de la mucosa intestinal (110).

Sin embargo, Naik y cols, en 1978, encuentran que de 32 pacientes, que habían mostrado quistes de G. lamblia en sus heces, sólo 24 (75%), mostraron trofozoítos por ambos métodos, aspiración duodenal y tinción de la impronta de la mucosa intestinal.

Aunque estos mismos autores, no desprecian la aspiración duodenal, basandose en el hecho de que en uno de sus pacientes, no se demostraron quistes de G. lamblia, hasta la séptima determinación de parásitos en heces y sin embargo el aspirado duodenal mostró trofozoítos en el primer examen. (156).

La idea de que deben ser empleadas todas aquellas técnicas, que resultan más útiles desde el punto de vista diagnóstico, es quizá el mejor resumen de estas aportaciones.

La búsqueda de trofozoitos de G. lamblia en aspirados duodenales, debe ser una técnica complementaria de la búsqueda del parásito en heces y así, debe hacerse en aquellos casos donde se sospeche de forma insistente una giardiasis, con diarrea recurrente y en síndromes inmunodeficientes con diarrea recurrente (7).

En los cuadros de malabsorción intestinal, donde la búsqueda de quistes de G. lamblia, en el examen parasitológico de las heces, es negativo repetidamente, la aspiración duodenal debe ser realizada, para descartar la presencia de trofozoitos de G. lamblia.

4. - Sintomatología asociada con Giardia lamblia.

El hecho de que este protozoo intestinal pueda encontrarse en personas sin aparente sintomatología, ha sido y podemos decir que aún sigue siendo, causa de controversia.

Así diversos autores no han creído en su capacidad para causar enfermedad y otros en cambio han aceptado que sí (35, 141, 63, 90).

Ya hemos detallado los diversos aspectos patológicos, en los que se implica G. lamblia, como causa de trastornos gastrointestinales.

Otros procesos patológicos, han sido asociados con el hallazgo del protozoo Giardia lamblia y así las manifestaciones alérgicas han sido citadas por diferentes autores (91, 92, 90, 215, 216).

Otras manifestaciones donde se ha citado esta asociación, pueden ser, la fiebre, pancreatitis, enfermedades de la vesícula biliar y del hígado, del Intestino grueso y Úlcera péptica.

La asociación entre G. lamblia y trastornos hepáticos y de vesícula biliar, ha sido sugerida por diferentes autores (25, 43, 65, 66, 90, 117, 149, 171, 196, 220, 79).

Afectaciones pancreáticas y hallazgo de G. lamblia se ha relacionado igualmente (52, 63, 81).

La úlcera péptica también ha sido asociada con el hallazgo de G. lamblia. (90).

Las abdominalgias, náuseas, flatulencia, vómitos, anorexia, fatiga, pérdida de peso y síntomas neurológicos, han sido relacionados de la misma forma con la parasitación por G. lamblia (164).

El retraso en el crecimiento, se ha observado en niños parasitados por G. lamblia (111, 204).

La asociación entre G. lamblia y anemia, se ha citado por diversos autores (90, 150, 204, 215).

La eosinofilia se ha asociado también algunas veces (2, 150, 221).

Los cuadros clínicos de urticaria, se han relacionado de igual forma con la parasitación por G. lamblia (58, 222).

Entre los distintos enfermos a quienes hemos realizado investigación parasitológica, se ha podido documentar el diagnóstico de 270 pacientes, donde encontramos G. lamblia,

La sintomatología más frecuentemente encontrada, correspondió a diarrea, con 72 casos positivos para G. lamblia, después abdominalgias, asma bronquial, urticaria, rinitis, prurito, eosinofilia, etc... (Tabla XII).

Hemos considerado los problemas alérgicos en general como asma bronquial, urticaria, rinitis prurito, dermatitis atópica, etc., como una parte importante de hallazgos positivos para G. lamblia,

Estos pacientes, han mejorado sustancialmente de su cuadro clínico, cuando se les trata su giardiasis, y así los cuadros de urticaria, responden con una considerable mejoría cuando se tratan con un antiprotozoario.

La sintomatología menos frecuentemente encontrada, en nuestra serie de enfermos, fué hipocrecimiento, obesidad, forunculosis, vómitos, pancreatitis crónica, etc. (Tabla XIII).

En distintos pacientes, el hecho de encontrar G. lamblia en sus heces, por supuesto que no sería exacto, el incluir a este protozoo como causa de su enfermedad y así en determinados sujetos, el hecho del hallazgo, puede ser accidental y no estar relacionado con su padecimiento.

No cabe duda, que la sintomatología asociada a G. lamblia es tema de controversia, pero es necesario pensar en esta protozoosis, al menos en los trastornos intestinales, hepáticos, y en las manifestaciones alérgicas en general.

5. - Recuento de quistes de G. lamblia en heces. Viabilidad.

Para buscar una posible relación entre el número de quistes de G. lamblia encontrados en heces, y el cuadro clínico del paciente, realizamos el recuento de estos quistes en 100 muestras de heces, pertenecientes a 100 sujetos donde habíamos encontrado G. lamblia en las muestras fecales.

El método que utilizamos para el recuento de quistes en heces consistió, en pesar 1 g. de heces y mezclarlo con 5 ml de formol al 10% y con 5 ml. de éter - etílico, es decir, que realizamos la técnica que habitualmente empleamos para la determinación de parásitos en heces (5), pero siempre partiendo de 1 g. de heces y de 5 ml. de formol al 10%.

Del centrifugado final, tomamos por capilaridad una pequeña cantidad con una pipeta Pasteur y colocamos en una cámara de recuento, tipo Neubauer. Situamos un cubre objetos encima de la cámara y con el microscopio óptico, realizamos el conteo de los quistes de G. lamblia.

Si contamos 70 quistes en un mm^2 , de la cámara de Neubauer, en 1 mm^3 , tendremos 700 quistes.

Como hemos partido de 5 ml. de formol + 5 ml. de éter, tendremos que serán 10 ml. el contenido líquido total.

Sabemos que $10 \text{ ml} = 10 \text{ cm}^3 = 10.000 \text{ mm}^3$. Por consiguiente si en 1 mm^3 , tenemos 700 quistes, en 10.000 mm^3 , tendremos 7.000.000 de quistes, luego diremos que en 1 g. de heces hay 7.000.000 de quistes de G. lamblia.

El número de quistes presentes, en una deyección corriente, de un caso de infección moderada, se calcula superior a 300.000.000 (55).

El recuento de quistes de Giardia lamblia en heces, se realizó en 41 pacientes, con manifestaciones alérgicas, en 14, con diarrea, en 6, con abdominalgias y en 39, con sintomatología no específica.

En los 41 pacientes con manifestaciones alérgicas, el número de quistes excretados varió desde 100.000 quistes

de G. lamblia por gramo de heces, hasta 80.000.000 de quistes por gramo de heces. (Tabla XVIII). Siendo el promedio de quistes excretados por gramo de heces de 11.839.024 ($1,1 \times 10^7$ quistes de G. lamblia por gramo de heces).

En los 14 pacientes afectos de cuadros diarreicos, el número de quistes excretados varió desde 200.000 quistes de G. lamblia por gramo de heces, hasta 150.000.000 de quistes por gramo heces (Tabla XIX). Siendo el promedio de quistes excretados por gramo de heces de 21.492.857 ($2,1 \times 10^7$ quistes de G. lamblia por gramo de heces).

En 6 pacientes con abdominalgias, el recuento varió desde 3.000.000 de quistes excretados por gramo de heces hasta 20.000.000 de quistes por gramo de heces. (Tabla XIX) Siendo el promedio de quistes excretados por gramo de heces de 15.033.333 ($1,5 \times 10^7$ quistes de G. lamblia excretados por gramo de heces).

En los restantes 39 pacientes con sintomatología no específica, en el sentido de que no presentaban diarrea, abdominalgias o manifestaciones alérgicas, el número de quistes excretados por gramo de heces varió desde 100.000 quistes, hasta 100.000.000 de quistes (Tabla XX). Siendo el promedio de quistes excretados por gramo de heces de 12.787.179 ($1,2 \times 10^7$ quistes de G. lamblia excretados por gramo de heces.).

Por consiguiente, el mayor promedio de quistes excretados por gramo de heces, se obtuvo en el grupo de enfermos diarreicos ($2,1 \times 10^7$), después en el grupo de abdominalgias ($1,5 \times 10^7$), luego en el de sintomatología no específica ($1,2 \times 10^7$) y por último en el de manifestaciones alérgicas ($1,1 \times 10^7$).

Estos valores quedan expresados graficamente de mayor a menor en la figura 13.

Sin pretender una conclusión definitiva de estos hallazgos, podemos decir, que como promedio, aquellos sujetos afectos de diarrea, mostraron mayor cantidad de quistes excretados por gramo de heces y que en los otros grupos de pacientes estudiados, el promedio de quistes excretados por gramo de heces fué menor. La diferencia entre los distintos grupos, fué de aproximadamente más de 6.000.000 de quistes excretados por gramo de heces en los enfermos diarreicos, que en los pacientes con abdominalgias y de más de 9.000.000 de quistes excretados por gramo de heces en los enfermos diarreicos, que en los pacientes con manifestaciones alérgicas.

Teniendo en cuenta estos promedios, hay que decir, que aunque no todos aquellos sujetos afectos de cuadros diarreicos producidos por G. lamblia, deban excretar mayor cantidad de quistes por gramo de heces, sin embargo, los mayores promedios de excreción de quistes los hemos obtenido en este grupo.

No es exacto decir, que a mayor número de quistes excretados, sintomatología más acusada, pues no es difícil encontrarse con sujetos afectados de cuadros de malabsorción intestinal, donde el hallazgo de quistes de G. lamblia, supone una repetida búsqueda y que cuando se encuentran, sólo aparecen pequeña cantidad de estos quistes.

VIABILIDAD.

La viabilidad de los quistes de G. lamblia, como condición para producir enfermedad, es un hecho que debe tenerse en cuenta.

Desde el punto de vista epidemiológico, es necesario que esta viabilidad se mantenga, para que el contagio sea efectivo.

La utilización del colorante eosina diluido al 0,1%, puede servir como método diagnóstico de viabilidad del quiste de G. lamblia, y así aquellos quistes que toman la eosina (E +), están muertos, y aquellos que no toman la eosina (E -), están vivos (75).

Los quistes que toman la eosina, aparecen de color anaranjado y aquellos que no la absorben quedan incoloros (Fig. 14).

La realización de esta técnica como sistema rutinario, muestra una viabilidad de los quistes que es variable y que depende de determinados factores, como la pronta observación

una vez emitidas las heces y las condiciones de resistencia propias del quiste. Así se pueden encontrar muestras fecales que contienen quistes de G. lamblia vivos (E -) en un 90% , y otras sin embargo en que el porcentaje de quiste muertos (E ↓) es del 80%.

Es importante considerar la viabilidad de los quistes, si se pretende saber el grado de infectividad.

El exquisamiento de los quistes de G. lamblia, se ha utilizado recientemente como criterio de viabilidad. Los quistes mantenidos a 21°C, conservan su viabilidad de cinco a veinticuatro días, mientras que si se mantienen a 3°C nunca sobreviven más allá de cuatro días. La congelación de los quistes, conduce a una casi completa pérdida de viabilidad, aunque persiste un pequeño número de quistes viables hasta 14 días. Si se calientan hasta hervir en agua, los quistes no son capaces de exquisarse (20).

La viabilidad pues de los quistes de G. lamblia, debe considerarse, para establecer unos criterios de infectividad, tanto desde el punto de vista epidemiológico, como patogénico.

<u>Sintomatología</u>	<u>Nº de casos</u> <u>positivos (270)</u>	<u>%</u>
Diarrea	72	26,66
Asma bronquial	68	25,18
Abdominalgias	53	19,62
Urticaria	19	7,03
Rinitis	9	3,33
I. urinaria	9	3,33
Catarro descend.	6	2,22
Prurito anal	5	1,85
Prurito generalizado	3	1,11
Fiebre	3	1,11
D. atópica	2	0,74
Eosinofilia	2	0,74
Angioedema	2	0,74
Hepatitis	2	0,74
Enurésis	2	0,74

Tabla XII. - Sintomatología más frecuentemente encontrada, en relación con el hallazgo de G. lamblia en heces.

<u>Sintomatología</u>	<u>Nº de casos</u> <u>positivos (270)</u>	<u>%</u> <u>_____</u>
Hipocrecimiento	1	0,37
Obesidad	1	0,37
Pielonefritis	1	0,37
Forunculosis	1	0,37
Estenosis aórtica	1	0,37
Crisis hipotónica	1	0,37
Vómitos	1	0,37
Neumonía	1	0,37
Alergia medicamentosa	1	0,37
Atrofia muscular	1	0,37
Anemia ferropénica	1	0,37
Úlcera de recto	1	0,37
Pancreatitis crónica	1	0,37

Tabla XIII. - Sintomatología menos frecuentemente encontrada, en relación con el hallazgo de G. lamblia en heces.

<u>Nº de enfermos</u>	<u>Niños</u>	<u>Adultos</u>
49	32	17

Tabla XIV. - Número de enfermos diagnosticados de diarrea, en relación con la edad.

<u>Nº de niños</u>	<u>Diarrea</u>	<u>Diarrea crónica</u>
32	20	12
<u>Nº de adultos</u>		
17	10	7

Tabla XV. - Relación entre edad, diarrea y diarrea crónica.



<u>Edad</u>	<u>Diagnóstico</u>	<u>Aspirado duodenal</u>
3 años	S. de malabsorción	
2 "	"	
7 "	"	T. de <u>G. lamblia</u>
8 "	"	
9 "	"	
17 meses	"	T. de <u>G. lamblia</u>
2 años	"	
7 "	"	
8 "	"	
6 "	"	
2 "	"	
3 "	"	
4 "	"	
5 "	"	
1 "	"	
3 "	"	
4 "	"	T. de <u>G. lamblia</u>
3 "	"	
1 "	"	
8 meses	"	T. de <u>G. lamblia</u>
2 años	"	T. de <u>G. lamblia</u>
15 meses	"	
13 "	"	
2 años	"	
1 "	"	
4 "	"	T. de <u>G. lamblia</u>
3 "	"	

Tabla XVI. - Relación entre edad, diagnóstico y hallazgo de trofozoitos de G. lamblia, en el aspirado duodenal.

<u>Nº de niños</u> <u>Malabsorción intestinal</u>	<u>Trofozoitos de G. lamblia</u> <u>en aspirado duodenal</u>	<u>%</u> <u>_____</u>
27	7	25,92

Tabla XVII. - % de positividad de hallazgo de trofozoitos de G. lamblia, en niños afectados de malabsorción intestinal.

<u>Diagnóstico</u>	<u>Nº de quistes por g. de heces</u>	<u>Diagnóstico</u>	<u>Nº de quistes por g. de heces</u>
D. atópica	2×10^6	Asma b.	2×10^6
Urticaria	8×10^7	Rinitis	3×10^7
Asma b.	3×10^7	Asma b.	1×10^7
Asma b.	$7,4 \times 10^7$	Alergia medic.	$4,4 \times 10^6$
Asma b.	5×10^7	Asma b.	$1,5 \times 10^6$
Asma b.	$1,3 \times 10^7$	Asma b.	3×10^6
Asma b.	8×10^5	Asma b.	$3,1 \times 10^6$
Asma b.	2×10^5	P. alérgico	$2,4 \times 10^6$
Asma b.	7×10^6	Prurito	$1,1 \times 10^7$
P. alérgico	2×10^5	P. alérgico	3×10^5
Rinitis	$6,6 \times 10^6$	Fiebre eosinófila	2×10^5
Asma b.	2×10^5	Urticaria	$1,2 \times 10^7$
Asma b.	2×10^5	Urticaria crónica	1×10^7
Asma b.	2×10^6	Asma	$3,8 \times 10^6$
Asma b.	2×10^5	Asma	2×10^6
Asma b.	3×10^6	Asma	2×10^7
Asma b.	$3,3 \times 10^7$	Asma	2×10^7
Asma b.	$1,2 \times 10^6$	Asma	4×10^6
Asma b.	2×10^6	P. alérgico	2×10^6
Asma b.	$4,8 \times 10^7$	P. alérgico	1×10^5
P. alérgico	2×10^6		

Tabla XVIII. - Número de quistes de G. lamblia excretados por gramo de heces, en relación con distintas manifestaciones alérgicas.

<u>Diagnóstico</u>	<u>Nº de quistes por g. de heces</u>	<u>Diagnóstico</u>	<u>Nº de quistes por g. de heces</u>
Diarrea	6×10^7	Diarrea	2×10^5
Diarrea	$2,4 \times 10^6$	Diarrea	2×10^5
Diarrea	2×10^5	Diarrea	$\times 10^6$
Diarrea	$1,5 \times 10^8$	Diarrea	$4,5 \times 10^6$
Diarrea	5×10^6	Abdominalgias	2×10^7
Diarrea	$1,8 \times 10^7$	Abdominalgias	5×10^7
Diarrea	5×10^6	Abdominalgias	3×10^6
Diarrea	$6,4 \times 10^6$	Abdominalgias	2×10^6
Diarrea	2×10^6	Abdominalgias	$1,5 \times 10^7$
Diarrea	4×10^7	Abdominalgias	2×10^5

Tabla XIXII. - Número de quistes excretados de G. lamblia por gramo de heces, en relación con cuadros diarreicos y abdominalgias.

<u>Diagnóstico</u>	<u>Nº de quistes por g. de heces</u>	<u>Diagnóstico</u>	<u>Nº de quistes por g. de heces</u>
I. urinaria	$1,2 \times 10^6$	I. urinaria	3×10^5
Pielonefritis	1×10^6	Control	$5,2 \times 10^6$
Control	1×10^5	Leucosis	$7,3 \times 10^6$
Arritmia ventricular	4×10^5	Control	8×10^5
Control	$1,2 \times 10^6$	I. urinaria	$7,6 \times 10^6$
T. abdominal	$9,5 \times 10^6$	Diver. vesical	$2,4 \times 10^7$
Tumoración	2×10^5	Control	$1,2 \times 10^7$
Leucosis	1×10^5	Control	2×10^7
Control	1×10^5	C. hipotónicas	6×10^7
P. hematológico	$1,2 \times 10^6$	Control	3×10^5
Control	6×10^6	Control	$1,7 \times 10^6$
I. urinaria	5×10^7	Neuroblastoma	7×10^5
Hepatitis	5×10^7	Control	$4,2 \times 10^7$
Control	$1,1 \times 10^7$	Control	3×10^5
Control	8×10^6	Control	2×10^7
Control	2×10^6	Control	$3,1 \times 10^6$
Control	1×10^8	Control	2×10^5
Hipocrecimiento	4×10^6	Control	3×10^7
Control	2×10^5	Control	2×10^6
P. endocrinológico	$1,5 \times 10^7$		

Tabla XX. - Número de quistes de G. lamblia excretados por gramo de heces, en relación con sintomatología no específica.



Fig. 10. -Trofozoitos de G. lamblia, procedentes de aspirado duodenal.

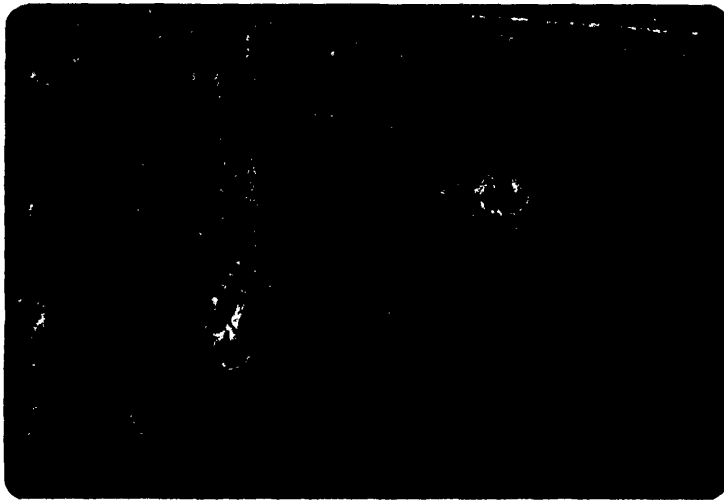


Fig. 11. -Trofozoitos de G. lamblia, teñidos con Giemsa.

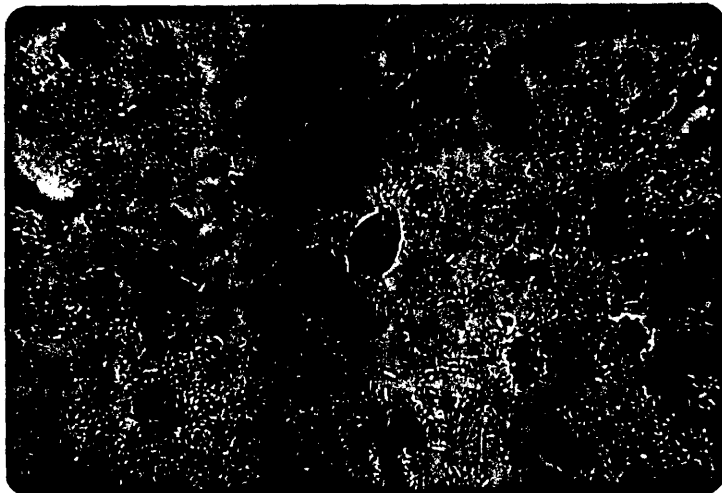


Fig. 12. -Trofozoito de G. lamblia, teñido con colorante tricrómico.

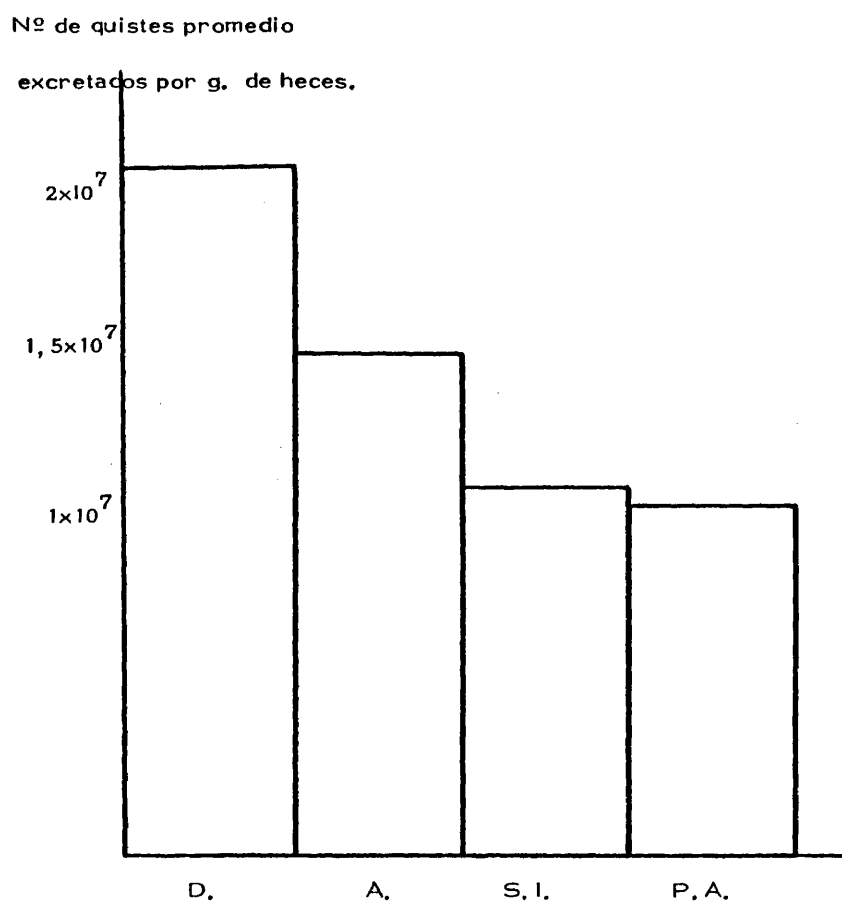


Fig. 13. - Promedio de quistes de Giardia lamblia excretados por gramo de heces, en relación con la sintomatología presentada. (D = diarrea. A = abdominalgias. S. I. = = sintomatología inespecífica, P. A. = procesos alérgicos).

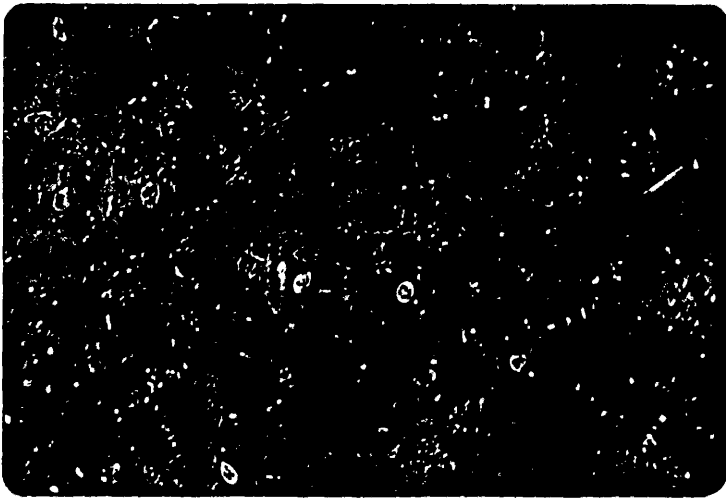


Fig. 14. - Quistes de *G. lamblia* eosina positivos (E+) y eosina negativos (E-).

PARTE IV

ASPECTOS INMUNOLOGICOS DE LA GIARDIASIS

1. - Introducción.
2. - Preparación de antígeno de G. lamblia
3. - Determinación de anticuerpos circulantes.
4. - Valoración de la serología (Títulos positivos y negativos).

1. - Introducción,

La parasitación por G. lamblia parece al menos en determinadas situaciones, estar relacionada con pacientes inmunodeficientes, lo que ha llevado a realizar investigaciones en este sentido.

La susceptibilidad a esta parasitación, está tal vez unida a una base inmunológica (7).

Sin embargo, el hallazgo de una función inmunológica normal, en pacientes con Giardia lamblia, pone en duda la asociación entre inmunodeficiencia y giardiasis (104, 159).

Parece no obstante, que los pacientes inmunodeficientes pueden tener una mayor frecuencia de parasitación por G. lamblia (202).

La deficiencia en IgA selectiva, no parece estar asociada con la giardiasis (9), sin embargo, los niveles de IgA yeyunal, fueron inferiores en un grupo de 10 pacientes con síntomas, cuando se les comparó con 10 sujetos control (225).

Es posible, que una reducción de IgA secretoria favorezca la infección, y así la giardiasis es común en niños con marasmo (151).

En niños australianos, se ha encontrado una mayor preponderancia del grupo sanguíneo A, en relación con la parasitación por G. lamblia (44).

Los mecanismos inmunes alterados, pueden ser un factor significativo en la susceptibilidad a la giardiasis (224).

Se han citado anomalías en las γ - globulinas, asociado con giardiasis (162, 201).

En la literatura revisada, aparecen escasas citas bibliográficas, que hagan referencia a los aspectos serológicos de la giardiasis.

Así en 1976, Ridley, publica un trabajo, donde menciona la respuesta serológica a Giardia lamblia (174). En este mismo año, Radulescu haciendo referencia al trabajo de Ridley, habla de su experiencia serológica en giardiasis. (175).

La respuesta serológica a Giardia lamblia, había sido estudiada en sus inicios, en 1946, por Halita e Isacu, demostrando que se producían anticuerpos capaces de fijar el complemento, en cuadros de giardiasis (100). También en 1949, Vinnikov, experimentó un test intradérmico en giardiasis, con resultados positivos (210).

Estos dos últimos autores, utilizaron como antígeno, trofozoitos de G. lamblia obtenidos de aspirado duodenal.

En 1974, Radulescu, utiliza la Inmunofluorescencia indirecta, como test serológico para la demostración de anticuerpos en giardiasis.

El antígeno que utiliza, está constituido por trofozoitos de Giardia muris y Giardia duodenalis, obtenidos de intestino delgado.

Estudia el suero de 31 enfermos, con giardiasis sintomática y encuentra en 28 pacientes, títulos positivos entre 1:50 y 1:200. (183).

En 1976, Ridley, utilizando el test de inmunofluorescencia indirecta y quistes de G. lamblia como antígeno, obtiene resultados positivos en 32 de 36 pacientes, con giardiasis y malabsorción.

En 10 pacientes de 34 con malabsorción, en los cuales no se pudo detectar G. lamblia en heces o biopsia, obtiene títulos positivos, especulando con la posibilidad de que estos enfermos presenten giardiasis crónicas. (174).

Parece ser que los anticuerpos detectados son inmunoglobulinas IgG.

En seis casos con giardiasis, los anticuerpos séricos detectados por inmunofluorescencia fueron IgG, y los tests realizados con IgA e IgM fueron negativos. Aunque parece ser, que en los primeros estadios de la enfermedad hay una producción predominante de IgM (174).

Estos autores, piensan que, aunque la inmunodeficiencia pueda estar asociada a la giardiasis, la deficiencia de IgA, no es necesariamente la causa de la giardiasis, ya

que en una serie de sueros de enfermos con giardiasis, no seleccionados, donde se midieron las Inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM, se encontró que se hallaban dentro de los límites normales (174).

La demostración de anticuerpos en giardiasis, utilizando la técnica de Inmunodifusión y quistes de G. lamblia como antígeno, ha sido puesta de manifiesto por Vinakjak y colaboradores, en 1978. Este autor demuestra la presencia de precipitinas, en 10 casos de 11 enfermos con giardiasis (202).

La determinación de anticuerpos circulantes, en los casos de giardiasis, parece pues actualmente centrada en dos técnicas, por un lado la técnica de Inmunofluorescencia indirecta, y por otro la inmunodifusión pasiva. Ambas técnicas, conllevan la necesidad de disponer de un antígeno adecuado.

El hallazgo de una fuente adecuada de antígeno, sigue siendo un problema, dice Ridley, en 1976 (174). Y Vinayak en 1978, observa que el mantenimiento del antígeno con el

que realiza la inmunodifusión, es igualmente un problema y pierde su antigenicidad a las dos o tres semanas, incluso cuando lo almacena a -10°C .

La dificultad en la obtención de cultivos, a partir de los cuales se realicen preparaciones adecuadas, que sirvan como antígeno, es otra realidad.

Tal vez, el poder realizar determinación de anticuerpos circulantes, en casos de giardiasis, está en dependencia de la obtención de muestras fecales, con suficiente cantidad de quistes de Giardia lamblia.

Nuestra labor en este sentido, se ha desarrollado siguiendo la preparación de antígeno de G. lamblia, a partir de quistes del protozoo y realizando la técnica, en aquellos sueros de enfermos con sospecha de giardiasis.

La obtención de un método perfecto de preparación de antígeno no está completamente aclarada, aunque a medida que se perfeccionen los métodos de cultivo axénico de G. lamblia, será más fácil la determinación de anticuerpos circulantes, en aquellos pacientes afectados de probable giardiasis.

2. - Preparación de antígeno de G. lamblia.

La consecución de una fuente de antígeno de G. lamblia, lo suficientemente fácil de manejar, está quizás por resolver. Sin embargo, la posibilidad de preparar un antígeno, para la realización de pruebas serológicas, no presenta grandes dificultades.

Las fuentes fundamentales de antígeno de G. lamblia, son las siguientes:

- a) Trofozoitos de G. lamblia obtenidos de jugo duodenal.
- b) Secciones de biopsias de yeyuno, que contengan numerosos trofozoitos.
- c) Trofozoitos de G. lamblia, obtenidos a partir de cultivos.
- d) Quistes de G. lamblia, procedentes de las heces de enfermos con abundante parasitación.

Las tres primeras fuentes, representan mayor dificultad, en lo que se refiere a su obtención. La primera, requiere el aspirado duodenal del enfermo y que la muestra obtenida, sea lo suficientemente aceptable, para realizar pruebas serológicas.

La segunda fuente, conlleva además del sondaje del enfermo, la realización de la biopsia, con las mismas particularidades que en el caso anterior.

La obtención de trofozoitos a partir de cultivos, requiere la necesidad de cultivar Giardia lamblia, con los problemas que lleva consigo, o disponer de cultivos ya realizados, que puedan ser útiles, para la realización de pruebas serológicas.

La preparación de antígeno de G. lamblia, a partir de las heces de enfermos, con abundante o moderada parasitación, sólo requiere el disponer de heces de enfermos diagnosticados de giardiasis, que tengan moderada o gran cantidad de quistes de G. lamblia en sus heces.

En 1976, Moody (152), y Ridley (174), describen métodos de separación de quistes de G. lamblia, que luego son utilizados como fuente de antígeno, en las técnicas de diagnóstico serológico de la giardiasis.

Hemos utilizado, una modificación de la técnica de Moody de separación de quistes de G. lamblia, que consiste

en la eliminación de las fases del filtrado de los quistes de G. lamblia, obtenidos de las heces de los enfermos parasitados.

Esta modificación, no impide la detección de quistes de G. lamblia fluorescentes, pues aunque quedan restos bacterianos y otras partículas, la técnica no dificulta la buena lectura de inmunofluorescencia positiva, en aquellos casos donde se produce y tampoco la inmunofluorescencia negativa de los enfermos sin giardiasis. (152).

En cambio, en la técnica original, es fácil, la pérdida de quistes en los filtrados a que se someten las heces y esto conlleva problemas en la preparación de antígeno, con la consiguiente pérdida de tiempo, pues es necesario comenzar desde el principio todo el proceso e incluso algunas veces, se ha empleado todo el material fecal y no se puede preparar el antígeno.

Basándonos en estos hechos, hemos modificado la técnica de Moody, y esta modificación, es la que empleamos

como método de obtención de antígeno, para la determinación de anticuerpos séricos circulantes, de aquellos pacientes sospechosos de giardiasis.

Una vez comprobado que tenemos unas heces de un enfermo, con abundante parasitación por G. lamblia, la técnica que realizamos es como sigue:

- a) Añadir a 10 tubos de centrifugación, 5 ml. de H₂O destilada a cada uno.
- b) Colocar en cada tubo de 1 a 2 gramos de heces.
- c) Mezclar adecuadamente las heces en cada uno de los tubos.
- d) Filtrar cada una de las mezclas, por un filtro cuyo diámetro de poro, no sea superior a 1 mm.
- e) Recoger el filtrado de cada una de las mezclas y colocarlas en tubos de agitación.
- f) Añadir a estos tubos 3 ml. de éter etílico.
- g) Agitar las mezclas durante 15 segundos, en un agitador mecánico.
- h) Centrifugar cada uno de los tubos que contienen las mezclas, a 3.000 r. p. m. durante 2 minutos.

- i) Decantar el contenido de cada uno de los tubos.
- j) Preparar 9 ml. de una mezcla de 24 partes de Ficoll al 9% con 10 partes de Urografin al 33,9% (Urografin, a triiodic X-ray contrast medium, Schering Chemical Ltd), en un tubo de centrifugación.
- k) Añadir con cuidado a la parte superior del tubo de 9 ml. de Ficoll-Urografin, el concentrado de los 10 tubos que hemos decantado. (También se puede dividir el concentrado en dos partes y preparar dos tubos con 9 ml. de Ficoll-Urografin cada uno).
- l) Centrifugar este último tubo a 1.000 r.p.m., durante 3 minutos.
- m) Tomar el sobrenadante, que aparece en la parte superior del tubo centrifugado, con una pipeta Pasteur.
- n) Llevar el sobrenadante a un tubo con 9 ml. de P.B.S. (Phosphate Buffer Saline) y lavar de 3 a 4 veces, centrifugando a 1.000 r.p.m., durante 3 minutos cada vez.

- ñ) Comprobar después de cada lavado, en el microscopio óptico, la cantidad de quistes de G. lamblia por campo. Un buen número puede ser de 5 a 10 quistes por campo.
- o) Depositar 0,05 ml. del concentrado de quistes de G. lamblia en los distintos porta objetos, donde vaya a realizarse la técnica de inmunofluorescencia indirecta.
- p) Esperar a que se sequen los portas con los concentrados de quistes.
- q) Realizar previo fijado de los portas, la técnica completa de inmunofluorescencia indirecta, en cada uno de los sueros problema.

La preparación de portas donde hemos depositado quistes de G. lamblia, sirven para realizar pruebas serológicas de inmunofluorescencia y poder detectar la presencia de anticuerpos circulantes, en el suero del enfermo, a la vez que podemos titular el suero problema.

En los distintos pasos en la preparación de antígeno de G. lamblia, a partir de los quistes contenidos en las heces,

es necesario tener siempre presente, que estos quistes se encuentran allí, para lo cual conviene comprobar su presencia, colocando una gota del material procesado entre porta y cubre y observarlo al microscopio.

La utilización de la mezcla de Ficoll-Urografin, que tiene por finalidad el provocar un gradiente de centrifugación y que los quistes se sitúen en la parte superior del tubo, que constituye el sobrenadante, presenta el inconveniente, de que el Urografin es una mezcla oleosa, y por eso conviene realizar en las fases posteriores de la preparación de antígeno, unos lavados adecuados con fosfato bufer, para evitar la mezcla entre los quistes de G. lamblia y la sustancia oleosa.

La producción de una mezcla entre el concentrado de quistes de Giardia lamblia y la sustancia oleosa, conlleva frecuentemente a la pérdida de los quistes, que previamente habíamos fijado al porta objetos.

La preparación de antígeno de G. lamblia, para realizar técnica de inmunodifusión en agar, puede realizarse siguiendo a Vinayak (202).

Este autor, obtiene los quistes de G. lamblia, a partir de material fecal de sujetos con giardiasis y realiza la técnica de flotación en sulfato de zinc al 33%. (47).

Posteriormente, realiza lavados de los quistes con solución salina, ultrasonificación, y centrifugación en frío, para la obtención del antígeno, cuyo contenido en proteínas estima del orden de 2 mg/ml. (202).

Una vez obtenido el antígeno, la realización de la técnica de difusión en agar gel, es sencilla, y en los casos positivos se observa la presencia de bandas de precipitación.

El problema fundamental, estriba en la pérdida de la antigenicidad, a las dos o tres semanas de la obtención del antígeno por este método, incluso cuando éste es mantenido a -10°C . (202).

Pensamos que actualmente, la obtención de antígeno de Giardia lamblia, no presenta muchos problemas, desde el punto de vista de su aplicación al diagnóstico, en el medio

hospitalario, habida cuenta de que podemos obtener quistes de este protozoo intestinal, de todos aquellos pacientes que presentan en sus heces un número adecuado.

La realización de la técnica de obtención de este antígeno, a partir de las heces, no es complicada, y puede suponer, el disponer de un antígeno adecuado para determinar la presencia de anticuerpos circulantes, por Inmunofluorescencia indirecta, de todos aquellos pacientes sospechosos de giardiasis.

El antígeno preparado a partir de los quistes de las heces, puede conservarse en congelador (-20°C) en un período de tiempo que no sea superior a una semana. Desde el punto de vista ideal, lo mejor es preparar el antígeno el mismo día en que se van a realizar las pruebas serológicas, ya que esto evitará la posible pérdida de la antigenicidad de los quistes de Giardia lamblia fijados al portaobjetos.

Los porta objetos que contienen los quistes de G. lamblia y que se han fijado, pueden servir para realizar adecuadamente, pruebas serológicas de inmunofluorescencia indirecta, en un período que no sobrepase la semana, manteniendoles en congelador.

En nuestra rutina hospitalaria, para la realización de serología de G. lamblia, los quistes obtenidos de las heces de los enfermos, los hemos mantenido en congelador un tiempo no superior a una semana.

En aquellas circunstancias, en que hemos tenido quistes de G. lamblia, procedentes de heces de enfermos con abundante parasitación, las pruebas serológicas, las hemos realizado, en un tiempo no superior a una semana, después de preparado el antígeno.

3. - Determinación de anticuerpos circulantes.

La determinación de anticuerpos circulantes, se puede realizar fundamentalmente, utilizando dos técnicas, como son la inmunofluorescencia indirecta (183, 174, 129) y la inmunodifusión pasiva en agar gel (202).

La utilización de la inmunofluorescencia indirecta, ha sido preconizada como método de diagnóstico serológico, en los cuadros de malabsorción intestinal, donde se piensa que el protozoo G. lamblia, sino es causa absoluta, si al menos está jugando un papel importante en el desarrollo de la enfermedad.

El empleo de quistes de G. lamblia previamente extraídos, como fuente de antígeno, y la realización posterior a partir de este antígeno de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, se ha utilizado en el diagnóstico serológico de distintos enfermos con giardiasis confirmada, o con sospecha de padecer enfermedad.

Así se han encontrado anticuerpos circulantes contra G. lamblia, en el 89% de los sueros, de los enfermos con giardiasis, asociada a malabsorción intestinal (174).

La inmunodifusión pasiva en agar gel, también se ha utilizado en clínica humana, en pacientes con giardiasis y aunque el número de pacientes es aún pequeño (11 enfermos), en el 90,9% de los casos, los resultados fueron positivos. (202). Se ha iniciado pues, la posibilidad de utilizar esta técnica, como test serológico diagnóstico en los enfermos con giardiasis.

Nosotros realizamos la técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizando quistes de G. lamblia y encontramos títulos altamente significativos, en una niña con diarrea crónica de cuatro meses de duración. Esta niña curó de su proceso una vez instaurado tratamiento específico (129).

Rutinariamente, venimos realizando determinación de anticuerpos circulantes, contra G. lamblia, utilizando los quistes como antígeno y la inmunofluorescencia indirecta como técnica.

En todos aquellos enfermos, que el clínico sospecha giardiasis, puede enviar suero del paciente para la determinación de anticuerpos anti Giardia lamblia.

Una ventaja importante de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, es la posibilidad de captar pequeñas cantidades de anticuerpos y de titular el suero del enfermo.

Los títulos diagnósticos por inmunofluorescencia indirecta, se pueden establecer a partir de 1:10 en adelante.

El consiguiente seguimiento serológico del enfermo, una vez hecho el diagnóstico, también puede realizarse con esta técnica y así si partimos de un título serológico diagnóstico de 1:320, a medida que se vaya produciendo la curación del proceso, los títulos serológicos irán cayendo paulatinamente.

La subjetividad en todas las técnicas serológicas, es un hecho conocido, ya que el grado de fluorescencia, depende del ojo del observador, sobre todo a partir de determinados títulos. Pero sin embargo, la positividad en giardiasis

ofrece unas imágenes claras cuando el título sérico es positivo, y la imagen del quiste es claramente fluorescente.

Las imágenes de quistes con fluorescencia periférica, se interpretan como negativas y sólo son positivas aquellas, en que todo el quiste es completamente fluorescente.

La inmunofluorescencia negativa, aparece con imágenes de quistes con un fondo rojizo, cuando se utiliza el azul de Evans como contrateñidor.

La Inmunofluorescencia positiva da unos quistes completamente fluorescentes.

Hemos realizado inmunofluorescencia indirecta, utilizando quistes de G. lamblia obtenidos a partir de heces de enfermos con parasitación, en un total de 101 sueros, correspondientes a 101 pacientes, que estaban diagnosticados fundamentalmente de diarreas crónicas, manifestaciones alérgicas u otras sintomatologías. Y en 80 sujetos no afectados de cuadros diarreicos, alérgicos o sintomatología relacionada.

La preparación de antígeno, la realizamos como hemos expuesto anteriormente, mediante la modificación de la técnica de Moody (152).

Utilizamos porta objetos, que marcamos con tres círculos cada uno con la ayuda de un lápiz diamante.

Depositamos tres gotas de concentrado de quistes de G. lamblia en cada porta objeto, que nos servirán para realizar tres diluciones del suero problema. (Fig. 15).

Los sueros problemas son obtenidos a partir de la sangre de los enfermos, en los que se desea detectar la presencia de anticuerpos anti-Giardia.

La cantidad de suero requerida es mínima, ya que realizamos de primera intención, solamente tres diluciones del suero problema y comenzamos a la dilución de 1:10.

Por consiguiente con 0,1 ml. de suero problema, en teoría tendríamos suficiente para realizar la prueba. Sin embargo, desde el punto de vista práctico, es necesario disponer de al menos 0,5 ml. de suero para realizar adecuadamente la técnica de Inmunofluorescencia indirecta.

Las diluciones que realizamos con cada suero problema son, 1:10, 1:20, y 1:40. Si la última dilución es claramente positiva, entonces realizamos diluciones a 1:80, 1:160 y 1:320.

Cada una de estas diluciones séricas, las efectuamos en buffer fosfato salino (P. B. S.).

La técnica de inmunofluorescencia indirecta que utilizamos es como sigue:

- a) Fijar los porta objetos que contienen el antígeno de G. lamblia con acetona, durante 5 minutos.
- b) Diluir los sueros problema a títulos 1/10, 1/20, y 1/40.
- c) Añadir 0,05 ml. de los respectivos sueros problema, a los respectivos círculos del porta objetos, que contienen el antígeno de G. lamblia fijado con acetona.
- d) Incubar estos porta objetos, con la mezcla de suero y antígeno en una cámara húmeda, durante 30 minutos.
- e) Lavar los porta objetos en buffer fosfato salino (P. B. S.) durante 30 minutos, realizando dos cambios en el P. B. S.

- f) Dejar secar los porta objetos.
- g) Hacer una dilución al 1:30 de antiglobulina humana marcada con fluoresceína (Fluorescein labelled anti-human globulin serum, Wellcome) en P. B. S.
- h) Colocar 0,05 ml. de la globulina marcada con fluoresceína, en cada círculo del porta objetos.
- i) Incubar los porta objetos en cámara húmeda, durante 30 minutos.
- j) Llevar los porta objetos a una solución de azul de Evans (1:50.000), durante 5 minutos.
- k) Lavar los porta objetos durante 10 minutos, en P. B. S.
- l) Dejar secar los porta objetos y añadir 0,05 ml. de Glicerina tamponada (Glycerine tamponnée-B-D-Merieux) en cada círculo del porta objetos.
- m) Situar un cubre objetos encima del porta objetos.
- n) Proceder al examen en un microscopio de Inmunofluorescencia, con un objetivo de 40 x.

Los resultados que hemos obtenido del estudio de los 101 sueros, correspondientes a igual número de enfermos, han sido positivos en 20 pacientes diagnosticados de giardiasis, diarrea crónica, malabsorción intestinal, etc., y los títulos séricos obtenidos han variado desde 1:10 hasta 1:320 (Tabla XXI).

Si consideramos títulos positivos, aquellos que sean iguales o superiores a 1:10 (1:10), nos encontramos con que la mayor parte de los sueros positivos, han correspondido al título 1:20, encontrándonos en 5 pacientes un título de 1:10, en dos pacientes un título de 1:40, en un paciente un título de 1:80, en dos de 1:160 y en uno de 1:320. En el grupo control estudiado, es decir, enfermos que no estaban diagnosticados de diarreas, malabsorción intestinal, manifestaciones alérgicas o sintomatología asociada con *G. lamblia*, encontramos en todos títulos negativos (Tabla XXII).

En aquellos pacientes donde encontramos títulos séricos positivos para *Giardia lamblia*, todos presentaban cuadros

patológicos intestinales o manifestaciones alérgicas. Distintos niños diagnosticados de giardiasis, presentaron diversos títulos serológicos (Tabla XXIII).

De 11 enfermos diagnosticados de giardiasis, 6 tenían títulos séricos positivos a 1:20, 3 a 1:40, 1 a 1:10 y 1 a 1:80. Estos datos son comparados con un grupo control de 80 sujetos, que no estaban diagnosticados de trastornos intestinales, manifestaciones alérgicas o cuadros patológicos relacionados con G. lamblia (Tabla XXII).

Los pacientes diagnosticados de diarrea crónica, fueron 4, y los títulos séricos obtenidos fueron de 1:10, 1:20, 1:40 y 1:320.

Un enfermo diagnosticado de malabsorción intestinal, presentó un título sérico positivo a 1:160 y un paciente diagnosticado de hiperplasia nodular linfoide presentó un título de 1:20 (Tabla XXIV). Tres fueron los enfermos diagnosticados de manifestaciones alérgicas, cuyos títulos fueron de 1:10, 1:20 y 1:80 (Tabla XXV).

En aquellos sueros que fueron positivos, correspondientes a 20 enfermos, se realizó la búsqueda de G. lamblia en las heces. Encontrándose este protozoo en 16 pacientes. En un caso, junto con los quistes de G. lamblia se vieron trofozoítos en las heces.

En un caso no se realizó la búsqueda en heces.

En tres casos, aún realizándose la búsqueda de G. lamblia, no se encontró en las heces de los enfermos y en un paciente fueron hasta siete veces negativas. Sin embargo, este enfermo presentó un título claramente positivo al título de 1:160.

La correlación entre los títulos séricos para G. lamblia y el hallazgo o no de quistes en las heces se expresa en la Tabla XXVI.

En aquellos casos donde se encontraron títulos séricos positivos se buscó la correlación entre el diagnóstico clínico y el hallazgo de G. lamblia en las heces de los enfermos (Tabla XXVII).

La determinación de anticuerpos circulantes para G. lamblia, nos parece un método sencillo, que requiere el disponer de quistes de enfermos parasitados por G. lamblia, de unos productos químicos existentes en la mayoría de los laboratorios microbiológicos, y de un microscopio de inmunofluorescencia.

Si la técnica de inmunodifusión pasiva, para determinar anticuerpos circulantes para G. lamblia, se desarrolla más ampliamente, también puede ser un método diagnóstico adecuado, que en cierto modo excluiría la necesidad de un microscopio de inmunofluorescencia. Para que esto ocurra, es también necesario que la consecución de un antígeno adecuado sea una realidad, ya que para la Inmunofluorescencia indirecta, los quistes de G. lamblia obtenidos a partir de las heces de enfermos parasitados, constituyen una fuente adecuada de antígeno.

Pensamos pues, que la determinación serológica para G. lamblia, se puede realizar sin grandes problemas técnicos.

4. - Valoración de la serología. Títulos positivos y negativos.

La serología puede ser un método útil, en la investigación de aquellos pacientes con malabsorción intestinal (174).

Sin embargo, existe un porcentaje de enfermos que muestran serología negativa, aún presentando un cuadro de giardiasis con malabsorción intestinal. Así de 36 enfermos diagnosticados de giardiasis con malabsorción, 32 dieron títulos positivos, pero 4 pacientes mostraron títulos negativos (174).

De 31 pacientes con giardiasis sintomática, 28 dieron títulos positivos, pero 3 presentaron títulos negativos (175).

En 11 pacientes con giardiasis, en 1 no se demostró precipitinas al realizar inmunodifusión en agar gel (202).

Cuando se realiza técnica de Inmunofluorescencia indirecta y se utilizan quistes de G. lamblia como antígeno, se pueden dar títulos positivos aquellos que se presentan a partir de 1:10.

Los 28 enfermos estudiados por Radulescu, que muestran títulos positivos por inmunofluorescencia lo son entre 1:50 y 1:200 (183).

Los pacientes estudiados por Ridley, muestran títulos positivos por inmunofluorescencia indirecta, a partir de 1:10 (174).

Nosotros partimos de la dilución sérica de 1:10, 1:20 y 1:40 y con estas titulaciones realizamos el test serológico, en aquellos pacientes que se investiga la presencia de anticuerpos circulantes para G. lamblia.

Los títulos positivos, son aquellos que muestran una inmunofluorescencia clara y que cubre todo el quiste de G. lamblia (Fig. 16).

La serología negativa, se presenta en los sujetos que no tienen relación con la parasitación por G. lamblia. Los títulos negativos, son aquellos en que los quistes no aparecen fluorescentes (fig. 17).

Los títulos serológicos positivos, dependen de la presencia de anticuerpos circulantes anti-Giardia, y así en una parasitación más patológica, el título obtenido es más alto. Es decir, en aquellos casos donde G. lamblia ha presentado y facilitado la elaboración de anticuerpos, como en determinados cuadros de malabsorción intestinal, donde G. lamblia está jugando un papel patógeno importante.

Hemos tenido ocasión de diagnosticar títulos de 1:320, que se acompañaban de malabsorción intestinal y que una vez que se trata al paciente, la titulación sérica, disminuye.

De igual forma, en una niña, que había sido diagnosticada desde hacía meses de giardiasis, con diarrea crónica, los títulos fueron subiendo desde 1:10 hasta 1:40.

La utilización de la serología, para el seguimiento del enfermo, es otra importante aplicación de esta técnica.

Cuando los sujetos son tratados adecuadamente, el cuadro clínico mejora, y el título serológico, que en un principio era elevado, va cayendo a medida que el enfermo mejora.

Así de títulos de 1:320 se llegan a títulos de 1:40 (129).

Por consiguiente, nos parece de gran utilidad la realización de test serológicos, en todos aquellos sujetos afectos de giardiasis, para valorar la presencia de anticuerpos séricos circulantes.

Es pues un método diagnóstico alternativo, ya que en determinadas situaciones, la búsqueda de G. lamblia, tanto en heces como en el aspirado intestinal, resulta infructuosa.

Tal vez, su aplicación práctica más importante sea en los cuadros de malabsorción intestinal, donde un título positivo, puede ayudar claramente en el diagnóstico del enfermo.

<u>Diagnóstico</u>	<u>Título sérico</u>	<u>Diagnóstico</u>	<u>Título sérico</u>
Giardiasis	1/20	Giardiasis	1/20
"	1/20	Diarrea crónica	1/10
"	1/20	Giardiasis	1/40
Diarrea crónica	1/320	"	1/10
D. atópica	1/20	"	1/10
Urticaria	1/80	H. nodular I.	1/20
Giardiasis	1/160	D. atópica	1/10
"	1/20	Giardiasis	1/10
"	1/20	Malabsorción	1/160
Diarrea crónica	1/20	Diarrea crónica	1/40

Tabla XXI. - Serología positiva para G. lamblia en los distintos pacientes.

<u>Nº de enfermos</u>	<u>Título sérico</u>
80 (Grupo Control)	NEGATIVO
5	1:10
9	1:20
2	1:40
1	1:80
2	1:160
1	1:320

Tabla XXII. - Títulos séricos obtenidos para G. lamblia, en diferentes pacientes, comparados con un grupo control.

<u>Diagnóstico</u>	<u>Edad</u>	<u>Título sérico</u>
Giardiasis	7	1:20
"	8	1:20
"	5	1:20
"	6	1:160
"	2	1:20
"	1	1:20
"	1	1:20
"	2	1:40
"	3	1:10
"	2	1:10
"	6	1:10

Tabla XXIII. - Niños diagnosticados de Giardiasis
y títulos séricos obtenidos.

<u>Diagnóstico</u>	<u>Edad</u>	<u>Título sérico</u>
Diarrea crónica	17 meses	1:320
" "	1 año	1:20
" "	2 años	1:10
" "	5 años	1:40
Hiperplasia n. l.	34 años	1:20
Malbsorción	21 años	1:160

Tabla XXIV. - Enfermos diagnosticados de diarrea crónica, hiperplasia nodular linfoide y malbsorción intestinal, edad y títulos séricos obtenidos.

<u>Diagnóstico</u>	<u>Edad</u>	<u>Título sérico</u>
D. atópica	2 años	1:20
Urticaria	30 años	1:80
D. atópica	6 años	1:10

Tabla XXV. - Enfermos diagnosticados de manifestaciones alérgicas. Edad y títulos séricos obtenidos.

<u>Título sérico</u>	<u>G. lamblia</u> <u>en heces</u>	<u>Título sérico</u>	<u>G. lamblia</u> <u>en heces</u>
1:20	+	1:20	+
1:20	+	1:10	+
1:20	+	1:40	+
1:20	+	1:10	+
1:160	+	1:10	+
1:80	+	1:10	-
1:20	+	1:10	+
1:20	+	1:20	-
1:320	+	1:160	-
1:20	?	1:40	+

Tabla XXVI, - Correlación entre los títulos séricos positivos para G. lamblia y el hallazgo de este protozoo en heces.

<u>Diagnóstico</u>	<u>Título sérico</u>	<u>Hallazgo de G. lamblia en heces</u>
Giardiasis	1:20	POSITIVO
Giardiasis	1:20	POSITIVO
Giardiasis	1:20	POSITIVO
Diarrea crónica	1:320	POSITIVO
Dermatitis atópica	1:20	POSITIVO
Urticaria	1:80	POSITIVO
Giardiasis	1:160	POSITIVO
Giardiasis	1:20	POSITIVO
Diarrea crónica	1:20	NEGATIVO
Giardiasis	1:20	POSITIVO
Giardiasis	1:20	POSITIVO
Diarrea crónica	1:10	POSITIVO
Dermatitis atópica	1:10	POSITIVO
Giardiasis	1:40	POSITIVO
Giardiasis	1:10	POSITIVO
Giardiasis	1:10	POSITIVO
Hiperplasia n. l.	1:20	NO INVESTIGADO
Giardiasis	1:10	NEGATIVO
Malbsorción	1:160	NEGATIVO
Diarrea crónica	1:40	POSITIVO

Tabla XXVII. - Correlación entre el diagnóstico clínico, el título sérico para G. lamblia y su hallazgo en heces.

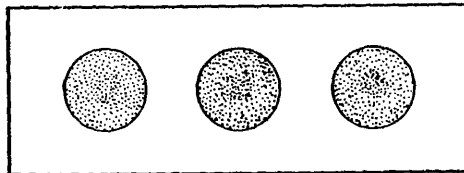


Fig. 15. - Porta objetos conteniendo antígeno de G. lamblia para la realización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Cada círculo indica una dilución del suero problema desde 1:10 hasta 1:40).

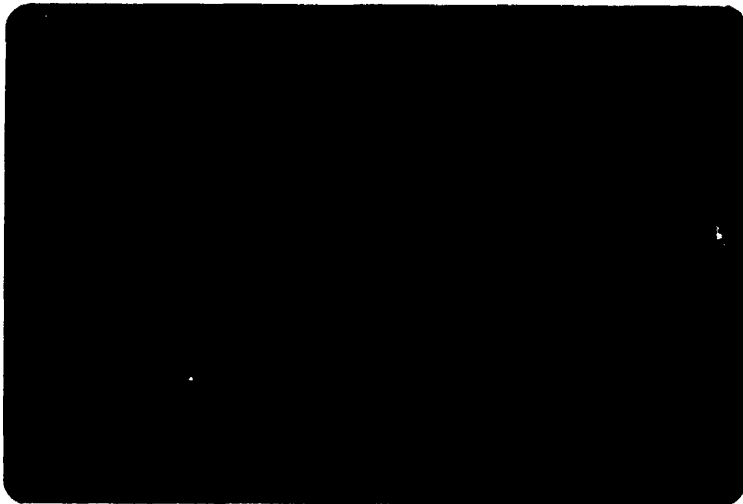


Fig. 16. -Imágenes de quistes de G. lamblia, que muestran Inmunofluorescencia positiva.

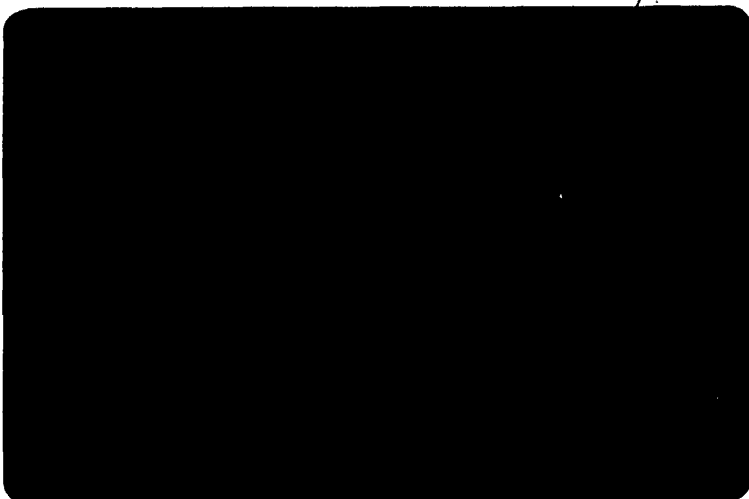


Fig. 17. -Inmunofluorescencia negativa de quistes de G. lamblia.

PARTE V

CULTIVO DE GIARDIA LAMBLIA

1. - Historia.
2. - Técnicas de cultivo.
3. - Exquistamiento de G. lamblia.
4. - Experiencia personal en el cultivo
de G. lamblia.

1. - Historia.

Es relativamente fácil encontrar en tratados de Parasitología, la idea de que G. lamblia es un protozoo intestinal, que no se cultiva con facilidad (28).

Giardia es difícil de cultivar y sólo recientemente ha sido cultivado in vitro, dice Meyer (130).

En 1960 Karapetyan, cultivó Giardia de un hombre durante siete meses en un medio complejo, que contenía Candida guilliermondi y fibroblastos de pollo (109).

En 1962 Karapetyan, cultivó Giardia en un medio complejo donde incluía Saccharomyces cerevisiae, pero no fibroblastos de pollo (108).

En 1965, Meyer y Pope, refieren que no son capaces de establecer cultivos de Giardia a partir de conejos, utilizando el método de Karapetyan. Sin embargo, realizando modificaciones, son capaces de cultivar Giardia de chinchilla, durante dieciocho meses (131).

En 1968, Roux y Ecalte, son capaces de mantener Giardia de conejo in vitro, durante once semanas, utilizando el método de Karapetyan (178).

En 1970, Meyer, cultiva trofozoitos de Giardia a partir de conejo, chinchilla y gato, describiendo los métodos por los cuales es capaz de separar las levaduras que ha utilizado en el cultivo, y estableciendo un cultivo axénico durante más de un año (130).

En 1976, Meyer, describe los métodos usados para establecer cultivos de trofozoitos de G. lamblia, a partir de hombre, en presencia de hongos intestinales, separar los protozoos de los hongos y cultivar axenicamente este protozoo más de un año (133).

En 1979, Bingham, demuestra el exquistamiento in vitro de Giardia lamblia, inducido por soluciones ácidas, y establece el cultivo de los trofozoitos exquistados (20).

Todo este bosquejo histórico en el cultivo de Giardia lamblia, ha conducido a cambiar la idea de que este protozoo flagelado no se cultiva. Sin embargo, las

dificultades en la realización del cultivo son evidentes, y así, el intento de cultivar G. lamblia, no es siempre todo lo fácil que se espera.

Los diferentes autores que han trabajado en el cultivo de Giardia, han sido conscientes de las dificultades que existen en la instauración y mantenimiento de un cultivo de este protozoo.

Es necesario pues admitir, que G. lamblia es un protozoo flagelado intestinal que se cultiva, pero que sus condiciones de crecimiento no son fáciles, ni están perfectamente aclaradas.

Todavía está por resolver el cultivo axénico de G. lamblia en un primer aislamiento, es decir, sin la adición de levaduras al cultivo. Y así no se cultiva Giardia a partir de aspirados intestinales, que contienen trofozoitos, aunque el aspirado tenga levaduras, que se utilizan para los cultivos in vitro. (133).

Diferentes factores se encuentran en estudio, con respecto a su influencia, en el establecimiento de un cultivo

de Giardia lamblia, y así es problemático, cuándo hay que añadir las levaduras, para la instauración del cultivo y no se sabe exactamente el papel importante que juega el suero humano, empleado en distintos medios de cultivo (133).

Todos estos datos, llevan al convencimiento de que es posible el cultivo de Giardia lamblia, a partir de los aspirados intestinales, de enfermos sospechosos de giardiasis.

2. - Técnicas de cultivo.

Los distintos autores, han realizado diferentes técnicas, para la consecución del establecimiento y mantenimiento de los cultivos de G. lamblia.

Los primeros trabajos sobre cultivo de este protozoo, se publican en 1960, en que Karapetyan, cultiva Giardia en un medio complejo, que contiene Candida quillermondi y fibroblastos de pollo. Giardia no es capaz de sobrevivir y multiplicarse si no se añade al medio Candida viable. Sin embargo, los fibroblastos de pollo, no parecen ser necesarios, una vez que se ha establecido el cultivo de Giardia (109).

Dos años más tarde, (1962), este mismo autor, describe el método que ha usado para cultivar Giardia a partir de conejo.

Este método, no requiere fibroblastos de pollo, e incluye la inoculación de Giardia y Saccharomyces cerevisiae en un medio complejo (108).

El medio número 1 de Karapetyan, contiene suero humano, un extracto de carne, extracto de embrión de pollo y solución de Hanks.

La técnica de cultivo de Karapetyan, es utilizada, en 1968 por Roux y Ecalle, manteniendo Giardia de conejo, in vitro, durante once semanas. (178).

Karapetyan, intentó repetidamente, pero sin éxito el cultivo de Giardia, sin la adición de *S. cerevisiae*.

El fallo en el intento de cultivo de Giardia de conejo, utilizando la técnica de Karapetyan, lleva a Meyer y Pope, a realizar modificaciones. (131).

La técnica de cultivo para G. lamblia de Meyer, incluye la utilización del medio M-3 (130).

Este medio consiste en un componente A, un componente B y una solución reductora. El componente A consta de:

- a) 140 ml. de la solución de Hanks.
- b) 2 g. de extracto de levadura.
- c) 0,2 g. de hidrocloreuro de (L.I). Cisteína
- d) 1 g. de agar.

Este componente se autoclava a 121°C durante 15 minutos.

El componente B consta de:

- a) 10 ml. de NCTC-109 Medio (Gibco).
- b) 50 ml. de suero humano filtrado e inactivado a 50°C, durante 30 minutos.
- c) 1 ml. de Penicilina G. potásica (100.000 U. /ml.).
- d) 0,6 ml. de Estreptomicina (0,34 g. /ml.).

Los componentes A y B se mezclan en un recipiente estéril y se añade bicarbonato sódico al 0,75% hasta conseguir un pH de 6,6. Se almacena a 4°C.

La solución reductora consta de:

- a) 0,1 g. de glutatión reducido
- b) 0,1 g. de hidrocloreuro de (L-) Cisteína.
- c) 10 ml. de solución de Hanks.

Se ajusta el pH a 9 y se almacena la solución a 4°C.

La solución reductora se añade al Medio M-3, cuando se vaya a utilizar este medio, en la proporción de 0,3 ml. de la solución reductora por 7 ml. del medio.

Utilizando este medio, al que se añade Saccharomyces cerevisiae y trofozoitos de Giardia de gato, se consigue el cultivo.

Se añade 2 ml. del medio M-3; 0,1 ml. de Inóculo de Giardia y 0,2 ml. de suspensión de levaduras a un tubo de cultivo de tejido de Leighton. Este cultivo se incuba a 37°C.

Diariamente, se saca 1,5 ml. del cultivo y se añade igual cantidad de medio M-3.

La obtención de trofozoitos de Giardia libres de S. cerevisiae se realiza mediante la utilización de un tubo en U de cristal, que consta de un diámetro interno de 3,5 mm, unos brazos de 50 mm. y una base de 100 mm. En los extremos del tubo se colocan tapones de goma, que permiten cambiar el medio con una aguja y jeringa (Fig. 18).

Se llena este tubo en U con medio M-3 y se inocula el brazo izquierdo del tubo con 0,25 ml. del cultivo de Giardia y Saccharomyces, que se encuentra incubado en medio M-3.

Se incuba el tubo en U a 37°C y a las 24 horas se procede a su examen, que realizado en un microscopio invertido, revela la presencia de Giardia y levaduras en la base del tubo en el lado izquierdo.

Los trofozoitos de Giardia, que son móviles, pasan y emigran al lado derecho del tubo en U y de aquí pueden ser obtenidos libres de levaduras.

Cada dos días se añade 1 ml. del medio M-3, al brazo derecho del tubo en U y se saca 1 ml. del cultivo líquido del brazo izquierdo.

Estos mecanismos de paso de los trofozoitos de Giardia, de un lado al otro del tubo, ocurren gracias a la capacidad de estos microorganismos, para adherirse al cristal, debido a la adhesividad de sus discos suctionarios.

El tiempo que tarda en cruzar el trofozoito, de un lado a otro del tubo, puede ser de unas cuatro semanas por término medio.

El aislamiento y cultivo axénico de los trofozoitos de G. lamblia propuesto por Meyer, es un paso importante

dentro de las técnicas de cultivo de este protozoo flagelado.

Una vez cultivado axénicamente, las posibilidades de estudio, desde el punto de vista de su fisiología, son mayores.

El método empleado en esta técnica, que utiliza el tubo de cristal en forma de U, no es nuevo y ha sido usado por otros Investigadores para separar distintos microorganismos, que crecen mezclados con otros (130). Este método de cultivo prepara el protozoo G. lamblia, para adaptarse a vivir en condiciones axénicas, lo cual puede servir para estudios ulteriores.

La iniciación y establecimiento de un cultivo de trofozoitos de G. lamblia partiendo de los condicionantes que hemos detallado anteriormente, se llevó a cabo a partir de conejo, chinchilla y gato.

Las técnicas de cultivo de G. lamblia, a partir de trofozoitos humanos, se realiza también por Meyer en 1976. (133).

A partir de los trofozoitos de G. lamblia del aspirado duodenal, de una mujer, con una historia clínica de diarrea de ocho años de duración, en la que se habfan visto quistes de G. lamblia en sus heces.

Los métodos de cultivo empleados por este autor presentan alguna modificación, con respecto a los que empleara en 1970, al realizar el cultivo de trofozoitos de G. lamblia a partir de animales.

Los medios de cultivo que emplea, son los que denomina HSP-1 y HSP-2.

La composición del medio HSP-1, consta de un caldo de cultivo, antibióticos y suero humano.

El medio HSP-1 se prepara de la siguiente forma:

- a) Phytone peptone (B. B. L.) 1 g.
- b) Hidrocloruro de L-cisteina 0,01 g.
- c) Glucosa 0,05 g.
- d) Solución de Hanks 85 ml.

Estos componentes se autoclavan a 121°C, durante 10 minutos. El caldo de cultivo obtenido, se almacena a 4°C, durante un mes.

El día que se requiere para su uso, se toman 85 ml. de caldo de cultivo y se añaden 15 ml. de suero humano (filtrado asépticamente e inactivado, durante 30 minutos a 56°C). También se añaden 50.000 U de Penicilina G. potásica y 0,05 g. de sulfato de Estreptomicina.

Así este medio HSP-1, queda a un pH entre 6,8 y 7.

El medio HSP-2, se consigue añadiendo asépticamente a 100 ml. de HSP-1, los siguientes ingredientes estériles:

- a) 7,5 ml. del medio NCTC-135 (Gibco).
- b) 2,5 ml. de solución reductora (130).

La técnica de cultivo, consiste en añadir a un tubo de cultivo, que contiene el medio HSP-1 preparado, el aspirado duodenal, donde se encuentran los trofozoitos de G. lamblia, con S. cerevisiae e incubar a 37°C. Cada tubo lleva 5 ml. de HSP-1 y 2 ml. de inóculo (aspirado duodenal con trofozoitos de G. lamblia) y S. cerevisiae.

Los tubos se tapan con tapones de goma y se incuban inclinados a 37°C. Cada día, el contenido de cada tubo, se

examina en un microscopio invertido y se reemplaza con 7 ml. de medio fresco, calentado previamente a 37°C. A partir de aquí, se pueden realizar subcultivos.

Se realiza la separación de trofozoitos de G. lamblia y levaduras de S. cerevisiae, mediante un tubo en U de los que ya hemos descrito (Fig. 18), que contiene el medio HSP-2.

A partir del décimo día de cultivo, se pueden realizar subcultivos. Generalmente, la presencia en estos cultivos de bacterias en números muy pequeños, causan una disminución marcada en la multiplicación de Giardia (133).

Estos trofozoitos pueden ser preservados por congelación y mantenidos en presencia de glicerol al 7% (132).

Se han mostrado viables, después de estar almacenados a 40°C, durante catorce meses (33).

Teniendo en cuenta estos estudios, se plantean interrogantes, en el sentido de saber cuando es el momento adecuado de añadir levaduras viables, al inicio del esta-

blecimiento de cultivo de G. lamblia, ya que parece claro, que las levaduras juegan un papel importante, en el crecimiento de este protozoo.

Otra interrogante importante, es el saber el papel que desarrolla el suero humano, en el establecimiento de los cultivos. Determinados sueros humanos, son capaces de facilitar el establecimiento del cultivo, sin embargo, otros sueros humanos utilizados no favorecen el cultivo (133).

Estas técnicas de cultivo que hemos expuesto, presentan aún importantes fallos, que serán solucionados a medida que el estudio del cultivo de los protozoos sea más perfecto.

De momento, es importante saber que el cultivo de G. lamblia es un hecho difícil, pero cierto.

3. - Exquistamiento de G. lamblia.

Los ensayos experimentales acerca del exquistamiento del protozoo G. lamblia, se remontan a hace unos cincuenta años, en que Hegner y otros (93, 94, 95, 57), iniciaron el estudio. Sin embargo, las condiciones para la inducción del proceso de transformación, de quiste de Giardia en trofozoitos (exquistamiento), no fueron claramente definidas.

En 1979, Bingham y Meyer, demuestran el exquistamiento de Giardia en soluciones ácidas, las secuencias de salida del trofozoito durante el exquistamiento y el establecimiento in vitro de cultivos axénicos de G. lamblia, a partir de los trofozoitos exquistados (22).

Estos autores, obtienen quistes de Giardia a partir de las heces de hombres y animales, purifican los quistes y los almacenan en agua a 8°C. Posteriormente, los quistes son expuestos a un jugo gástrico sintético, luego a un medio de cultivo y por último se examinan al microscopio.

El exquistamiento, comienza dentro de los primeros cinco minutos, de la exposición de los quistes a las soluciones

ácidas, ya que es a partir de este tiempo, cuando comienzan a verse trofozoitos exquistándose.

Los métodos utilizados por estos autores, se resumen de la siguiente forma:

- a) Tomar un volumen de la solución de quistes purificados.
- b) Añadir a este volumen, al menos diez volúmenes de la solución de exquistamiento (jugo gástrico sintético, que tenga un pH de 2).
- c) Incubar la mezcla a 37°C durante una hora.
- d) Centrifugar esta mezcla a 600 g. durante cinco minutos a temperatura ambiente.
- e) Resuspender en agua el sedimento y volver a centrifugar.
- f) El sedimento lavado se añade a 0,5 ml. de medio HSP-3 y se incuba a 37°C.

- g) Tomar un porta objetos excavado, depositar esta última mezcla en la concavidad, y sellar con un cubre-objetos con vaselina o parafina.
- h) Incubar este porta objetos Invertido a 37°C durante 1 hora.
- i) Observar en un microscopio invertido el exquistamiento que se produce.

A partir de estos estudios, se concluye que existe una relación entre el pH de la solución exquistadora y los porcentajes de exquistamiento. El pH = 2, parece ser el que favorece el exquistamiento en mayores porcentajes.

Por consiguiente, el exquistamiento de G. lamblia, parece ser un proceso, que se inicia en condiciones ácidas, ya que es pH-ácido dependiente, condiciones por otra parte, que se encuentra en el paso de los quistes por el jugo gástrico, cuando se produce la ingesta de estos protozoos, mediante el mecanismo de contagio.

Teniendo en cuenta estos hechos; se ha podido mantener en cultivo trofozoitos de G. lamblia durante meses, utilizando el exquistamiento y el posterior mantenimiento de los trofozoitos exquistados en medio HSP-3 (20).

El exquistamiento, ha sido recientemente considerado, como método de determinación de viabilidad de los quistes de G. lamblia, comparado con la aceptación o no de la eosina, como colorante determinante de esta viabilidad.

La exclusión de la viabilidad de los quistes de G. lamblia utilizando la eosina, indicó mayor cantidad de quistes viables, que los que pudo demostrarse in vitro utilizando el método de exquistamiento (20).

Hemos realizado el exquistamiento de G. lamblia siguiendo a estos autores (20). Partiendo de una suspensión de quistes de G. lamblia, cuya viabilidad era del 90% es decir, 90% (E-) y 10% (E+); los mantuvimos en nevera (4°C), durante cinco días. Utilizamos

Jugo gástrico, preparado de forma artificial (96). Incubando a 37°C, durante dos horas, el porta objetos excavado, que lleva el soporte de medio de cultivo y los quistes de G. lamblia, que se han puesto en contacto con el jugo gástrico, y todo se incubaba de forma invertida y se observa en microscopio invertido, a partir de las dos horas de incubación.

Imágenes de quistes de G. lamblia que inician el exquistamiento pueden observarse en la figura 19.

Imágenes de trofozoitos de G. lamblia, que ya se han exquistado, se observan en la figura 20.

La realización del cultivo de Giardia a partir del exquistamiento, requiere quizás un mayor perfeccionamiento en su técnica.

4. - Experiencia personal en el cultivo de G. lamblia.

Teniendo en cuenta los trabajos realizados sobre el cultivo de G. lamblia por Karapetyan y Meyer, fundamentalmente (108, 109, 130, 133). Hemos iniciado el cultivo de este protozoo, basándonos en los conocimientos aportados hasta ahora, en lo referente a condiciones mínimas necesarias, para la multiplicación de los trofozoitos de Giardia.

El primer intento de cultivo, lo realizamos a partir de trofozoitos obtenidos de aspiración duodenal, procedentes de un niño de siete años de edad, diagnosticado de malabsorción intestinal e hipocrecimiento.

Los trofozoitos de G. lamblia obtenidos del aspirado duodenal, eran muy escasos en número, aunque su movilidad era completamente normal.

Cultivamos dos ml. de jugo duodenal en el medio HSP-1, al que añadimos tres centímetros cúbicos de suero humano y Saccharomyces cerevisiae en el momento de la incubación. Esta se realizó a 37°C.

Al día siguiente de hacer el cultivo, realizamos visión microscópica, pero no observamos ningún trofozoitos. Los días posteriores, hasta cinco días después, no mostraron ninguna imagen de trofozoito vivo.

Esta primera experiencia, nos sirvió para obtener conocimientos, que posteriormente nos han sido útiles, ya que nos han facilitado la realización de un cultivo posterior.

Es necesario tener dispuestos los medios adecuados para el cultivo de este protozoo, y justo en el momento que una aspiración intestinal, tenga abundantes trofozoitos de G. lamblia, entonces proceder a su cultivo inmediatamente.

Queremos decir con esto, que no siempre que se tienen preparados los medios adecuados para el cultivo de este protozoo, se nos ofrecen aspiraciones duodenales con abundantes trofozoitos de G. lamblia.

Es pues necesario, tener todo a punto, para un determinado momento, en que a partir de una aspiración Intestinal, con abundantes trofozoitos de Giardia, se pueda intentar el cultivo.

La primera experiencia negativa en el cultivo de G. lamblia, la obtuvimos en el mes de marzo del año 1979.

En junio de 1979, tuvimos una aspiración duodenal procedente de una niña de tres años de edad, diagnosticada de diarrea crónica. Esta aspiración mostraba en su visión microscópica, abundantes trofozoitos de G. lamblia.

Procedimos a su cultivo utilizando los siguientes medios y métodos:

a) Medio HSP-3 (20) que consta de:

- 85 ml. de caldo phytone-Hanks.
- 20 ml. de suero humano, esterilizado por filtración e inactivado a 50°C, durante treinta minutos.
- 7,5 ml. del medio NCTC-135 (Gibco).

- 1,5 ml. de CO_3HNa 1 M.
- 200.000 U. de penicilina G. potásica
- 0,01 g. de sulfato de estreptomina
- 0,01 g. de sulfato de gentamicina.

El pH final de este medio es de 7.

- b) Un porta objetos excavado en el centro.
- c) Un cubre objetos.
- d) Una sustancia, que sirva para pegar al porta-objetos excavado, el cubre objetos. Nosotros utilizamos esmalte de uñas como sustancia selladora.

La solución de Hanks, consta de una serie de compuestos químicos y su preparación puede realizarse así:

Parte A.

- Cloruro potásico 4,0 g.
- Fosfato sódico 0,6 g.
- Fosfato dihidrogeno potásico 0,6 g.
- Cloruro sódico 43,6 g.
- Rojo fenol q. s.

Parte B

- Cloruro cálcico 1,4 g.
- Sulfato magnésico 1,0 g.
- Cloruro magnésico 1,0 g.
- Glucosa 10,0 g.
- Cloruro sódico 36,4 g.

Se disuelve el contenido de estos productos en 1 litro de H₂O desionizada, cada parte (A y B) y se esterilizan a 121°C, durante quince minutos.

Se añaden 100 ml. de la solución A, más 100 ml. de la solución B y 800 ml. de H₂O desionizada estéril.

Se pesan 1,4 g. de CO₃HNa y se llevan a 100 ml. de H₂O destilada estéril (1,4 g. %).

A cada litro de las soluciones A y B, se le adicionan 25 ml. del CO₃HNa preparado.

Tenemos pues preparada una solución de Hanks bufferada. Esta solución se encuentra comercializada en sus componentes químicos (Oxoid) y su preparación es sencilla.

El caldo phytone-Hanks, se prepara añadiendo a 85 ml. de la solución de Hanks, los siguientes preparados:

- Phytone peptone (B. B. L.) 1 g.
- Glucosa 0,05 g.
- L-hidrocloruro de cisteína 0,10 g.

Así pues, se puede preparar el medio HSP-3, que servirá como caldo de cultivo, de los trofozoítos de G. lamblia.

Este medio, puede conservarse en nevera (4°C) durante un mes, pero cuando se va a realizar el cultivo, es necesario colocar el medio a 37°C, para que los trofozoítos sean distorsionados lo menos posible, en la realización del cultivo.

El cultivo de los trofozoítos lo realizamos de la siguiente forma:

Tomamos 0,5 ml. del aspirado duodenal, que presentaba abundante cantidad de trofozoítos. Utilizamos un porta objetos excavado, donde colocamos 0,5 ml. de medio

HSP-3, mantenido a 37°C y al que añadimos los 0,5 ml. del aspirado duodenal, y pequeña cantidad de Saccharomyces cerevisiae.

Colocamos un cubre objetos, encima del porta objetos, y le sellamos con esmalte de uñas. Conseguimos así, una microcámara de cultivo (Fig. 21).

Esta microcámara, la invertimos y colocamos en una placa de Petri, donde a su vez hemos situado dos cintas adhesivas, que nos servirán de soporte para realizar la colocación de la microcámara (Fig. 22).

Incubamos este dispositivo en estufa a 37°C.

El cultivo se realiza a las once de la mañana, del día trece de junio, de 1979. Los resultados que obtenemos son los siguientes:

- . A las cuatro horas y media de incubación a 37°C, realizamos la observación con un microscopio invertido y con un aumento de 40x. Las imágenes que observamos son de trofozoitos vivos, junto con gran cantidad de Saccharomyces. (Fig. 23).

. A las seis horas de incubación, las imágenes son similares a las observadas en el tiempo anterior, y en algunos campos microscópicos se ven hasta cinco trofozoitos de G. lamblia juntos (Fig. 24).

. A las veinticinco horas de incubación, se ven imágenes clarísimas de trofozoitos vivos, que se mueven activamente.

En algunos campos microscópicos, aparecen juntos dos o tres o incluso más trofozoitos como unidos por los flagelos. (Fig. 25).

En estas primeras veinticinco horas de cultivo, no hay una observación evidente, de que se hayan multiplicado los trofozoitos, pero da la impresión de que se van a multiplicar.

. A las 46 horas de cultivo, se ven muchos trofozoitos de G. lamblia en determinadas zonas de la microcámara de cultivo.

Tengo la impresión de que se han multiplicado.

En este período se realiza una filmación del cultivo para la constatación del hecho.

- . A las 72 horas de cultivo, el número de trofozoitos parece haber disminuido con respecto al día anterior, aunque gran parte se mantienen vivos.
- . A las 96 horas de cultivo, la proliferación de levaduras aumenta y parecen verse bacterias. Los trofozoitos, no en gran número, siguen vivos.
- . A los cinco días de cultivo, se observan escasos trofozoitos inmóviles, gran número de levaduras, e imágenes de probables bacterias contaminantes. Tenemos la impresión de que han muerto los trofozoitos.

Hemos tenido por consiguiente, un cultivo realizado in vitro, que hemos mantenido durante cinco días. Es necesario hacer notar, que los flagelos de los trofozoitos de G. lamblia, necesitan una superficie donde poder adherirse y por ello el cubre objetos les sirve como soporte.

Un microscopio invertido, es necesario, para la observación de estos cultivos.

La creación de una microcámara, es de vital importancia para obtener un habitat adecuado, donde G. lamblia puede multiplicarse, y así nos parece que puede ser de extraordinaria utilidad práctica, el empleo de los porta objetos excavados, para iniciar el cultivo de los trofozoitos de G. lamblia.

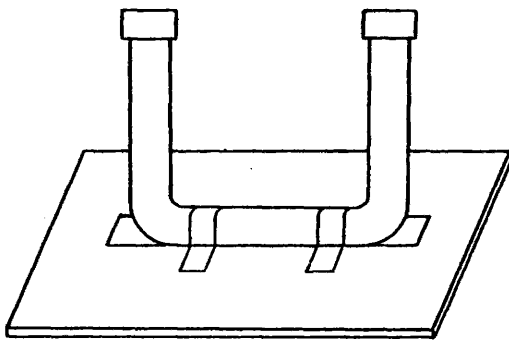


Fig. 18. - Tubo en U, utilizado para obtener trofozoitos de Giardia libres de S. cerevisiae.



Fig. 19. - Quiste de G. lamblia iniciando el exquistamiento.

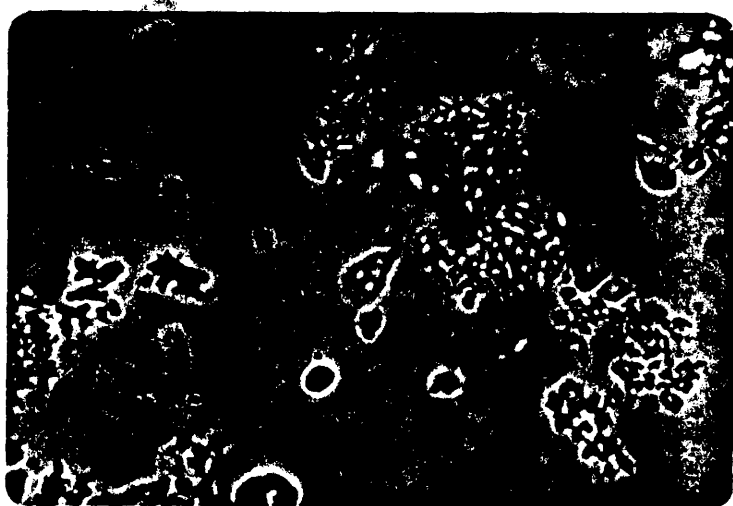


Fig. 20. - Trofozoito de G. lamblia exquistado.

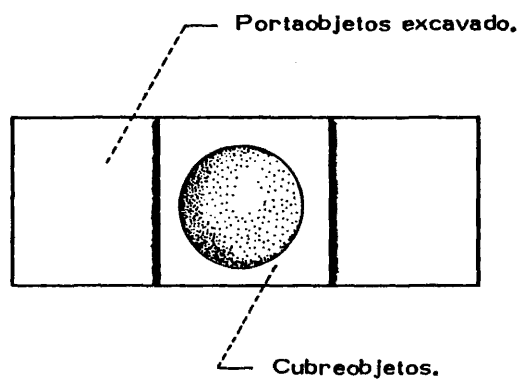


Fig. 21. - Microcámara de cultivo, realizada en un portaobjetos excavado, que lleva colocado encima de la concavidad un cubreobjetos .

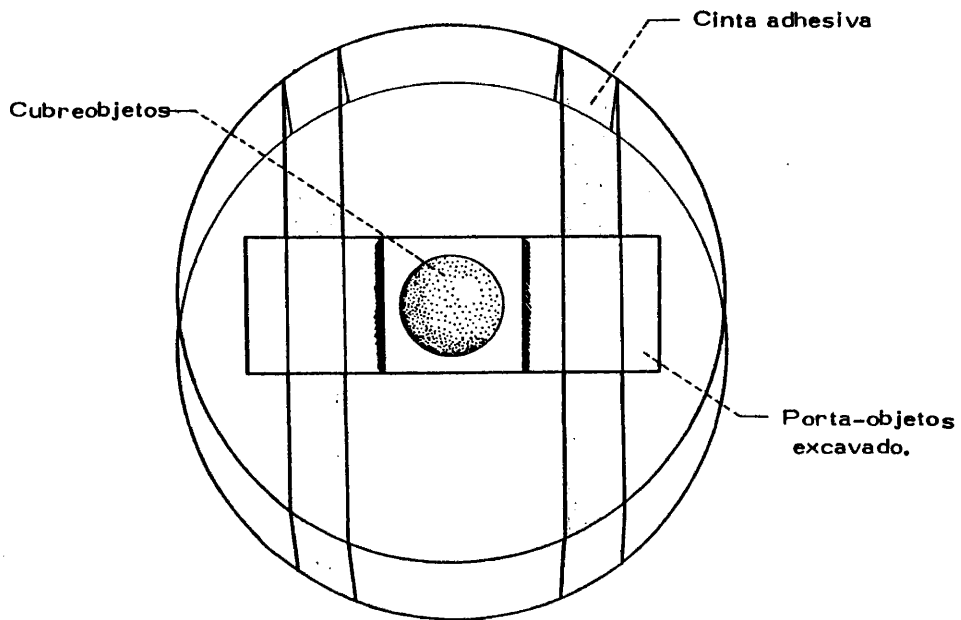


Fig. 22. - Placa de Petri, que lleva dos cintas adhesivas, como soporte de la microcámara de cultivo, que se encuentra colocada de forma invertida.

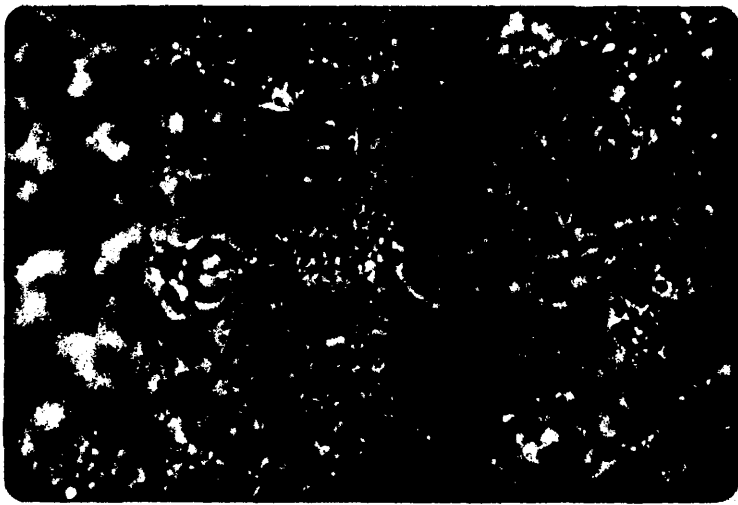


Fig. 23. - Trofozoitos vivos junto con S. cerevisiae.



Fig. 24. - Trofozoitos de G. lamblia en división.

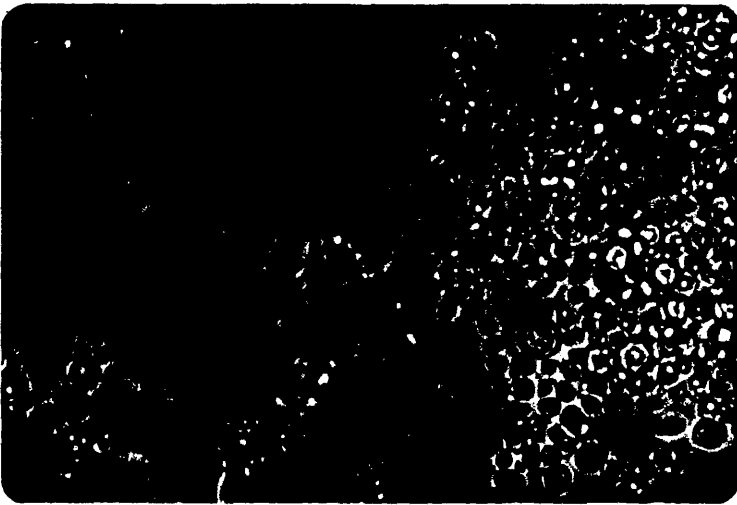


Fig. 25. - Trofozoitos de G. lamblia, mantenidos en cultivo con S. cerevisiae.

CONCLUSIONES

El trabajo realizado, para la elaboración de la presente tesis doctoral, nos ha llevado a las siguientes conclusiones:

1. - Giardia lamblia es un protozoo flagelado intestinal, que puede causar patología en el ser humano.
2. - Los métodos diagnósticos, para la búsqueda de este protozoo, son fundamentalmente cuatro:
 - a) Búsqueda en heces.
 - b) Búsqueda en aspiraciones duodenales.
 - c) Búsqueda en biopsias de intestino delgado.
 - d) Demostración indirecta, mediante técnicas serológicas, que detecten la presencia de anticuerpos circulantes.
3. - La búsqueda en heces de G. lamblia, debe realizarse en distintas muestras fecales, obtenidas en días separados.
4. - La giardiasis es una parasitación distribuida prácticamente por todo el mundo.

5. - El porcentaje de parasitación por G. lamblia, después de la realización de 5.600 muestras fecales, ha sido en nuestra estadística, del 7,35%.
6. - Las principales fuentes de infección son:
- a) El agua
 - b) Las comidas contaminadas.
 - c) El contacto interpersonal.
7. - Giardia lamblia es un protozoo flagelado, capaz de producir epidemias.
8. - La parasitación por G. lamblia es más frecuente en niños, que en adultos.
9. - De 279 pacientes en los que encontramos G. lamblia en sus heces, el mayor % de positividad correspondió a niños de edad inferior a los 14 años (89,24% de los hallazgos positivos).
10. - El porcentaje de parasitación por G. lamblia en adultos, fué del 10,75% de los hallazgos positivos.

11. - G. lamblia se encontró en las heces de 22 niños, de un grupo de 146 niños, diagnosticados de asma bronquial (13,41%). Un grupo control de 75 niños, sólo presentó positividad en 2 casos (2,66%).
12. - Encontramos G. lamblia en las heces de 11 niños de un grupo de 37 niños, Inmunodeprimidos (29,72%). Un grupo control de 60 niños, sólo fué positivo en 2 casos (3,33%).
13. - Si consideramos de 2 a 3 las determinaciones realizadas de parásitos en heces, obtuvimos un 66,66% de positividad en niños Inmunodeprimidos y un 6,66% en un grupo de niños control.
14. - G. lamblia es un protozoo flagelado, capaz de producir diarrea aguda y crónica.
15. - De 270 pacientes en los que encontramos G. lamblia en sus heces, 72 presentaron cuadros diarreicos (26,66%).
16. - De 49 enfermos con diarrea, donde encontramos G. lamblia en sus heces, 32 eran niños y 17 adultos.

17. - De 27 niños diagnosticados de malabsorción intestinal, en los que se realizaron aspiraciones duodenales, encontramos trofozoitos de G. lamblia en 7 niños (25,92%).
18. - La sintomatología más frecuentemente asociada con el hallazgo de G. lamblia en heces, fué de Diarrea (26,66%). Asma bronquial (25,18%). Abdominalgias (19,62%). Urticaria (7,03%). Rinitis (3,33%). Catarro (2,22%). Prurito anal (1,85%). Prurito generalizado (1,11%). Fiebre (1,11%). Dermatitis atópica (0,74%). Eosinofilia (0,74%). Hepatitis (0,74%). Enuresis (0,74%).
19. - La sintomatología menos frecuentemente asociada, con el hallazgo de G. lamblia en heces, fué de hipocrecimiento, obesidad, pielonefritis, forunculosis, estenosis aórtica, crisis hipotónica, vómitos,neumonía, alergia medicamentosa, atrofia muscular, anemia ferropénica, úlcera de recto y pancreatitis crónica. En estos procesos solo encontramos G. lamblia en uno de ellos, de 270 pacientes estudiados (0,37%).

20. - Giardia lamblia, debe buscarse en procesos diarreicos, alérgicos y del aparato digestivo en general (Colecistitis, pancreatitis etc).

21. - Como promedio, aquellos sujetos afectos de diarrea, mostraron mayor cantidad de quistes excretados por gramo de heces, que los afectos de abdominalgias, manifestaciones alérgicas o sintomatología no específica.

22. - La viabilidad de los quistes de G. lamblia, puede apreciarse utilizando eosina al 0,1%, o provocando el exquistamiento de los quistes.

23. - Los mecanismos inmunológicos alterados, pueden facilitar la parasitación por Giardia lamblia.

24. - La detección de anticuerpos circulantes, en los pacientes con giardiasis, puede realizarse por:

- a) Inmunofluorescencia indirecta.
- b) Inmunodifusión pasiva.

25. - La obtención de antígeno de G. lamblia, para la realización de pruebas serológicas, puede hacerse fundamentalmente por:
- a) Utilización de trofozoitos, a partir de aspirados duodenales o cultivos.
 - b) Utilización de quistes, a partir de las heces de enfermos parasitados.
26. - Hemos realizado la determinación de anticuerpos circulantes, utilizando quistes de G. lamblia, procedentes de heces de enfermos parasitados y empleando la inmunofluorescencia indirecta.
27. - La técnica empleada, para la detección de anticuerpos circulantes, nos ha servido en algunos casos, para diagnosticar procesos de malabsorción intestinal, donde G. lamblia jugaba un papel importante.
28. - Esta misma técnica, es de utilidad en el seguimiento serológico del enfermo, una vez instaurado tratamiento específico.

29. - Consideramos títulos serológicos positivos, aquellos que son iguales o superiores a 1/10.
30. - Es de utilidad, la realización de anticuerpos circulantes, en todos aquellos enfermos, que presenten diarreas crónicas, acompañadas o no de malabsorción intestinal.
31. - Giardia es un protozoo flagelado intestinal que puede cultivarse.
32. - El cultivo de Giardia se citó en 1960, pero otros autores, no pudieron realizar este cultivo, cuando emplearon las mismas técnicas.
33. - El cultivo axénico de Giardia se ha citado en 1976, pero empleando hongos en el primer cultivo.
34. - El exquistamiento de Giardia y posterior cultivo se ha citado en 1979.
35. - Hemos realizado el cultivo de Giardia lamblia, procedente de los trofozoitos del aspirado duodenal, de una niña diagnosticada de diarrea crónica.

36. - La utilización de una microcámara, en el cultivo de Giardia, es de gran ayuda en la consecución del mismo.
37. - La adición de levaduras, al intento de cultivo de Giardia, es necesaria para establecer este cultivo.
38. - Los intentos de cultivar Giardia sin la adición de levaduras, resultan infructuosos.
39. - Hemos mantenido el cultivo de Giardia lamblia, en una microcámara, durante cinco días.
40. - La adición de suero humano, para el establecimiento del cultivo de G. lamblia, resulta necesario, pero no está claro el papel exacto que desempeña.
41. - El cultivo de Giardia procedente de humanos es una realidad, que requiere estudios más profundos y constantes, que hagan posible la consecución de un método sencillo, para el cultivo de este protozoo flagelado intestinal.

BIBLIOGRAFIA

1. - Ansari. (1952). Contribution a l'étude du genre *Giardia* Kunstler. 1882. (Mastigophora, Octomitidae). I. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 27:421-479.
2. - Abraham, R. (1962). On two new species of *Giardia* parasitic in Indian mammals. Parasitology. 52: 59-164.
3. - Antia, F.P. et al. (1966). Giardiasis in adults; Incidence, sintomatology and absorption studies. Indian Journal of Medical Science. 20: 471-477.
4. - Alp, M.H. and Hislop. I.G. (1969). The effect of *G. lamblia* infestation on the gastrointestinal tract. Australian Annals of Medicine. 18: 232-237.
5. - Allen, A.V.H. and Ridley D.S. (1970). Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. J. Clin. Pathology 23: 545-546.
6. - Anderson T.F. et al. (1977). Outbreak of giardiasis: Effect of a new anti-flagellate drug, tinidazole, British. Med. Journal. 2: 449-451.
7. - Ament, M.E. and Rubin. C.E. (1972). The relation of giardiasis to abnormal intestinal structure and functions in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. Gastroenterology, 62: 216-226.
8. - Ament, M.E. (1972). Giardiasis and vitamin B₁₂ malabsorption. Gastroenterology, 63: 1085.

9. - Ament, M.E. et al. (1973). Structure and function on the gastrointestinal tract in primary immunodeficiency syndromes; a study of 39 patients. *Medicine (Balt)*, 52: 227-248.
10. - Aust Kettis, A. and G. Thoren (1974). Inter and Intra-familial distribution of *Giardia lamblia* infection. *Scand. J. Infect. Dis.* 6: 349.
11. - Ayad el Masry N. et al. (1978). Treatment of Giardiasis with Tinidazole. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 201-202.
12. - Albrecht, R.M et al. (1975). Cultured and free living cells, Principles and Techniques of Scanning Electron Microscopy. Vol. 3. Edited by MA Hayat. New York. Van Nostrand Reinhold, pp. 101-153.
13. - Amini, F. (1963). Giardiasis and steatorrhea. *J. trop. Med. Hyg.* 66: 190-192.
14. - Albrecht, R.M. et al. (1978). Demonstration of *Giardia* in duodenal fluid by scanning electron microscopy. *The New England Journal of Medicine.* 299:1255.
15. - Bemrick, W.J. (1962). The host specificity of *Giardia* from laboratory strains of *Mus musculus* and *Ratus norvegicus*. *J. Parasitol.* 48: 287-290.
16. - Boeck, W.C. (1917). Mitosis in *Giardia microti*. *Univ. Calif. Berkeley Publ. Zool.* 18: 1-26.

17. - Bingham, A.K. and Meyer E. A. (1979). *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. *Nature*. 277:301-302.
18. - Brandborg, et al. (1967), Histological demonstration of mucosal invasion by *G. lamblia* in man. *Gastroenterology*. 52:143-150.
19. - Bloch, C. and Tuchman, L.R. (1967). Diffuse small intestinal abnormality due to *G. lamblia* with roentgen and clinical reversibility after therapy. Case report. *J. Mt. Sinai. Hosp.* 34: 116-120.
20. - Bingham, A.K. and Meyer, E. A. (1979). *Giardia* excystation can be induced "in vitro" in acid solutions. *Nature*. 277: 301-303.
21. - Bemrick, W.J. (1963). Observations on dogs infected with *Giardia*. *J. Parasitology*. 49: 1031-1032.
22. - Bingham, A.K. et al. (1979). *Giardia* sp.: physical factors of excystation in vitro, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Experimental Parasitology*. 47:284-291.
23. - Beal C.B. et al. (1970). A new technique for sampling duodenal contents. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 19: 349-352.
24. - Bezjak, B. (1972). Evaluation of a new technique for sampling duodenal contents in parasitologic diagnosis. *Am. J. Dig. Dis.* 17: 848.

25. - Bock, H.E. (1947), Lobervergrösserung bei oder infolge Lambliosis und Amöbiasis. *Klin. Wschr.* 24-25: 331-337.
26. - Boe, J. and Rinvik, R. (1943). Infection with lamblia intestinalis in children: Its clinical significance and treatment. *Acta. paediat.* 31:125-146.
27. - Boe, J. (1943). The occurrence of human intestinal protozoa in Norway with special reference to *Entamoeba histolytica* and *Lamblia intestinalis* and their clinical significance. *Acta. med. Scand.* 113: 321-327.
28. - Brumpt, L y Brumpt, V. *Parasitología práctica*. Toray-Masson, S.A. Barcelona. (1969). pp. 213.
29. - Benke, H. (1931). Der Infect des Menschen mit *Lamblia intestinalis*, seine klinik und Therapie. *Ergebn. Inn. Med. Kinderheilk.* 39: 175-215.
30. - Brady et al. (1974). Waterborne giardiasis. *Annals of Internal Medicine.* 81:498-499.
31. - Bryan, F.L. (1975). Diseases transmitted by foods. DHEW. Publication No. CDC 75-8237. Atlanta. Center for Diseases Control, 1975. p. 21.
32. - Black, R. E. et al (1977). Giardiasis in day-care centers-evidence of person-to-person transmission. *Pediatrics.* 60:486.

33. - Belding, D.L. *Textbook of Parasitology*, ed. 3. New York. Appleton-Century-Crofts, 1965, pp. 124-125.
34. - Brodsky, R.E. et al. (1974). Giardiasis in travelers to the Soviet Union. *J. Infect. Diseases*. 130: 319-323.
35. - Boeck, W.C. (1927). Giardiasis in man. Its prevalence and relation to diarrhoea and to gallbladder disease. *Arch. Intern. Med*, 39: 134-158.
36. - Böttner, H. (1950). Lambilosis, Biologie und Klinik. *Med. Klin*. 45: 1015-1021.
37. - Barbour, A.G. et al. (1976). An outbreak of giardiasis in a group of campers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25: 384.
38. - Brown, E. H. (1948). *Giardia lamblia*. The incidence and results of infestation of children in residential nurseries. *Arch. Dis. Childhood*. 23: 119-128.
39. - Brown, B.M. (1948). *Arch. Dis. Childhood*. 23: 114.
40. - Bassett, M.L. et al. (1978). Giardiasis and peripheral neuropathy. *British Medical Journal*. 2:19.
41. - Bommartini, F. and Soprana M. (1971). Un caso di giardiasi epatobiliare in età geriatrica. Contributo clinico e rassegna bibliografica. *Minerva. Gastroenterol.* 17: 45-51.
42. - Blanco Rabassa, E. et al. (1975). Malabsorción por *Giardia lamblia*. *Revista Cubana de Pediatría*. 47: 247-263.

43. - Bopp, K. P. und Bleiching, E. P. (1958). Beitrag zur Klinik der Lambliasis. Münch. med. Wschr. 100: 298-299.
44. - Barnes, G. L. and Kay, R. (1977). Blood groups in giardiasis. Lancet. 1: 808.
45. - Cameron, A. H. et al. (1962). Duodeno-Jejunal biopsy in the investigation of children with coeliac disease. Quart. J. Med. 31: 125-140.
46. - Court, J. M. and Stanton, C. (1959). The incidence of *Giardia lamblia* infestation of children in Victoria. Med. J. Aust. 46: 438-440.
47. - Craig and Faust. (1970). Clin. Parasitology. 8 th. edit. pp. 951-52. Philadelphia Lea and Febiger.
48. - Carrol, M. E. et al. (1961). Giardiasis and uveitis. Arch. Ophthalm. 56: 775-778.
49. - Cortner, J. A. (1959). Giardiasis, a cause of celiac syndrome. J. Dis. Child. 98: 311-316.
50. - Cain, C. D. et al. (1968). Malabsorption associated with *G. lamblia* infestation. Sth. med. J. 61: 532-534.
51. - Cantor, D. et al. (1967). Small intestine studies in Giardiasis. Amer. J. Gastroenterol. 47: 134-141.
52. - Carnot, P. et al (1940). Lambliase pancreatique. Arch. Mal. Appar. dig. 29: 1017-1020.
53. - Cheissen, E. M. (1964). Ultrastructure of *Lambliia duodenalis*. I. Body surface, Sucking disc and median bodies. J. Protozool. 11: 91-98.

54. - Cheissen, E.M. (1965). Ultrastructure of *Lambliia duodenalis*. 2. The locomotory apparatus, axial rod and other organelles. *Arch. Protistenkd.* 108: 8-18.
55. - Chandler, C.A. y Clark, P.R. (1965). *Introducción a la Parasitología*. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.
56. - Chaudhuri, R.N. (1943). A note on giardiasis with steatorrhoea. *Indian med. Gaz.* 78: 284-285.
57. - Deschiens, R. (1929). Chimisme gastrique et infections parasitaires du tube digestif. *Annales de L'Institut Pasteur.* 43: 1353-1369.
58. - Dellamonica, P. (1976). Dysenteric syndrome and urticaria in giardiasis. *Nouvelle. Presse. Medical.* 5: 30.
59. - Dobell, C. (1920). Discovery of intestinal protozoa in man. *Proc. Roy. Soc. Med.* 13: 1-15.
60. - Da Silva et al. (1964). Histopathologic findings in giardiasis: A biopsy study. *Amer. J. dig. Dis.* 9: 355-356.
61. - Das Gupta, N.C. et al. (1944). Fulminating types of giardiasis simulating Asiatic cholera and acute bacillary dysentery. *J. Indian.med. Ass.* 13: 317-318.
62. - David, C.H. and Tullish, M.B. (1970). Bronchial asthma and intestinal parasites. *N. Engl. J. Med.* 284: 370.
63. - De Muro, P. (1939). Clinical aspects of Giardiasis. *Acta med. Scand.* 99: 78-116.

64. - Dunn, H. G. (1952), Acute Infections lymphocytosis.
Report on a group of cases in a day nursery. Brit. med.
J. 1: 78-83.
65. - Daecke, K. (1952). Lamblien-Infektionen als Ursache
unklaren Bauchschmerzen und hepatopathien bei Kindern.
Maschr. Kinderheilk. 100: 479-484.
66. - Drenckhan, C.H. (1943). Jaundice associated with Giardia
lamblia infestation. Illinois. med. J. 83: 119-121.
67. - Erlandsen, S.L. (1974). Scanning electron microscopy of
intestinal giardiasis: lesions of the microvillous border of
villous epithelial cells produced by trophozoites of giardia,
Scanning. Electron Microscopy. Edited by O Johari, I
Corvin, Chicago, IITRI, 1974. pp. 775-782.
68. - Eastham, E. J. et al (1976). Diagnosis of Giardia lamblia
infection as a cause of diarrhoea. The Lancet. 2: 950-951.
69. - Filice, F.P. (1952). Studies on the cytology and life history
of a Giardia from the laboratory rat. Univ. Calif. Berkeley.
Publ. Zool. 57: 53-143.
70. - Friend, D.S. (1966). The fine structure of Giardia muris.
J. Cell. Biol. 29: 317-332.
71. - Faust, E. C. and Russel, P.F. (1964). Clinical Parasitolo-
gy. Lea and Febiger, Philadelphia.
72. - Feldaker, M. (1954). Giardiasis. Missouri. Med. 51: 109-
112.

73. - Fantham, H.B. and Porter, A. (1916). The pathogenicity of *Giardia (lamblia) intestinalis* to men and to experimental animal. *British Medical Journal*, 2: 139-140.
74. - Fraser, J.F. and Taylor, R. (1945). Diarrhoea due to *Giardia lamblia*. *Brit. med. J.* 2: 184-185.
75. - Grant, D.R. and Woo P. T. K. (1978). Comparative studies of *Giardia* spp. in small mammals in southern Ontario. I. Prevalence and identity of parasites with taxonomic discussion of genus. *Canadian Journal of Zoology*, 56: 1348-1359.
76. - Gregor, O. and Senkupova, K. (1958). Lambliasis in der Internem Praxix. *Dtsch. Z. Verdau. u. Stoffwechselkr.* 18: 60-67.
77. - Gleason, N.N. et. al. (1970). A stool survey for enteric organisms in Aspen, Colorado. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* 19: 480-484.
78. - Glogner, P. and Kaufmann, W. (1965). Schüttelfröste bei lambliasis. *Med. Welt*, 46: 2605-2606.
79. - Goldstein, F. et. al. (1978). Biliary tract dysfunction in Giardiasis. *The American Journal of Digestive Diseases*, 23: 559-560.
80. - Gondar, L. (1964). Lamblase et voies billaries. *Rev. Med.* 79: 193-202.

81. - Grott, J. W. (1956). Pancreatitis lamblia latens. *Wiad. Parazyt.* 2 supp. 69.
82. - Grant, D. R. and Woo P. T. K. (1978). Comparative studies of *Giardia* s.p.p. in small mammals in Southern Ontario. II. Host specificity and infectivity of stored cysts. 56: 1360-1366.
83. - Hegner, R. W. (1922). The Systematic relationship of *Giardia lamblia*. Stiles, 1915, from man and *Giardia agilis* Kunstler, 1882, from the tadpole. *Am. J. Hyg.* 2: 435-441.
84. - Holberton, D. V. (1973). Fine structure of the ventral disc apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. *J. Cell. Sci.* 13: 11-41.
85. - Haiba, M. H. (1954). The pH of the alimentary tract in normal and giardia-infected culture mice. *Parasitology.* 44: 387-391.
86. - Hegner, R. W. (1930). Host-parasite specificity in the genus *Giardia*. In *Problems and methods of research in protozoology*. Edited by R. W. Hegner and J. Andrews. The Macmillan Company, New York, N. Y., U. S. A. pp. 143-153.
87. - Hoskins, L. C. et al. (1967). Clinical giardiasis and intestinal malabsorption. *Gastroenterology*, 53: 265-279.
88. - Haiba, M. H. (1956). Further study on the susceptibility of murines to human giardiasis. *Parasitenk.* 17: 339-345.
89. - Haas, J. and Bücken, E. W. (1967). Zum Krankheitswert der Lamblien-Infektion. *Dtsch. med. Wschr.* 92: 1869-1871.

90. - Hauswirth, C. (1957). Zur Klinik und Therapie der Lambliasis. *Acta gastroenter, belg*, 20: 967-979.
91. - Halstead, S.B. and Sadun, E.H. (1965). Allimentary hipersensivity induced by *Giardia lamblia*. Report of a case of acute meat intolerance. *Ann. Intern. Med.* 62: 564-569.
92. - Harris, R.H. and Mitchell, J.H. (1949). Chronic urticaria due to *Giardia lamblia*. *Arch. Derm. Syph.* 59: 587-589.
93. - Hegner, R. (1927). Excystation and infection in the rat with *Giardia lamblia* from man. *Am. J. Hyg.* 7: 433-441.
94. - Hegner, R. (1927). Excystation in vitro of human intestinal protozoa. *Science.* 65: 577-578.
95. - Hegner, R. (1925). Excystation in *Giardia lamblia* from man. *Am. J. Hyg.* 5: 250-257.
96. - Hirschowitz, B.I. (1967). *Handbook of Physiology. Vol. 2* (eds. Heidel. Waud Code, C.F.) 897 (American Physiological Society). Washington. 1967).
97. - Hartman, H.R. and Kayser F. A. (1941). Giardiasis and its treatment. *A clinical Study.* 116: 2835-2839.
98. - Hermans P.E. et. al. (1966). Dysgammaglobulinemia associated with nodular lymphoid hyperplasia of the small intestine. *Amer. J. Med.* 40: 78-89.

99. - Holden, R. et. al. (1968). Giardiase lambliaze et Insuffisance pancreatique. Acta gastro-ent belg. 31: 155-167.
100. - Halita, M. and Isaicu, L. (1946). Reactia de fixare a complementului in lambliaza intestinala. Ardeal. med 6: 154.
101. - Ingram, V. G. et. al. (1966). Diarrhoea in children of west Pakistan: Occurrence of bacterial and parasitic agents. Amer. J. trop. Med. Hyg. 15: 743-750.
102. - Jameson, J. E. (1941). Notes on cases of chronic diarrhoea and vogue ill health, apparently due to the flagellate *Giardia lamblia*. J. roy. Army. med. Cps. 77: 320-323.
103. - Jokipii, A. M. M. and Jokipii, L. (1977). Prepatency of Giardiasis. The Lancet. 2: 1095-1097.
104. - Jones, E. G. and Brown, W. R. (1974). American Journal of Digestive Diseases. 19: 791-796.
105. - Kofoid, C. A. and Sweezy. (1922). Mitosis and fission in the active and encysted phases of *Giardia entericum* (Grassi) of man, with a discussion of the method of origin of bilateral symmetry in the polymastigote flagellates. Univ. Calif. Berkeley. Publ. Zool. 20: 199-234.
106. - Knight, R. et. al. (1973). Progress. Report. Intestinal Parasites. Gut. 14: 145-168.

107. - Kilma, M. et al. (1977). Electron microscopy in the diagnosis of giardiasis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 101: 133-135.
108. - Karapetyan, A.E. (1962). In vitro cultivation of *G. duodenalis*. *Journal of Parasitology*. 48: 337-340.
109. - Karapetyan, A.E. (1960). A method of cultivation of *Giardia*. *Tsitologiya* 2: 379-384.
110. - Kamath, K.R. et al. (1974). A comparative study of four methods for detecting *G. lamblia* in children with diarrheal disease and malabsorption. *Gastroenterology*. 66: 16-21.
111. - Kidney, W. and Holland, P.D.J. (1967). Giardiasis in children. *Journal. Irish. med. Ass.* 60: 375-381.
112. - Keystone, J.S. et al. (1978). Person-to-person transmission of *Giardia lamblia* in day-care nurseries. *The Canadian Medical Association Journal*. 119: 241-248.
113. - Kapoor, S.C. and Mody, G.D. (1968). Clinical features of giardiasis. *Journal of the Association of Physicians of India*. 16: 431-433.
114. - Kayhan, B, et al. (1978). Bronchial asthma associated with intestinal parasites. *American Journal of Gastroenterology*. 69: 605-606
115. - Knight, R. and Wright, S.G. (1978). Progress. report. Intestinal protozoa. *Gut*, 19: 940-953.

116. - Kraemer, M. and Asher, M. (1934). The role of *Giardia* in the duodenum. *Med. Rec.* 140: 676-678.
117. - Keading, A. (1961). Lambliasis. *Gastroenterologia.* 96: 115-119.
118. - Khosla, S.N. et al. (1978). Malabsorption in *Giardia*-sis. *American Journal of Gastroenterology.* 69: 694-700.
119. - Katsampes, C.P. et al. (1944). Vitamin A. absorption test in cases of giardiasis. *Amer. J. Dis. Child.* 67: 189-193.
120. - Kotcher, E. et al. (1966). Intestinal malabsorption and helminthic and protozoan infections of the small intestine. *Gastroenterology.* 50: 366-371.
121. - Lambi. (1859). Mikroskopische Untersuchungen der darmexkrete. *Prag. Vschr. prakt. Heild.* 61:51.
122. - Levine, N.D. (1973). Protozoan parasites of domestic animals and of man. 2nd. edn. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota, U.S.A.
123. - Lavier, G. (1939). Le mode de division des formes végétatives dans le genre *Giardia*. *C.R. Soc. Biol.* 120: 198-200.
124. - Leegaard, O.F. (1971). Giardiasis. En oversigt og et tilfaelde af importert diare og infektion med *Giardia intestinalis*. *Ugeskr. Laeg.* 133: 1503-1509.
125. - Lund, E. (1943). Om forekomsten av *Lambliia intestinalis* i Kanmark. Forelopig meddelelse. *Nord. Med.* 19: 1240.

126. - Ligny, G. et al. (1965). Contribution à l'étude de la lamblase de l'adulte. *Acta Gastro-Enterologica Belgica*. 28: 219-248.
127. - Lyons, B.B.V. and Swain, W.A. (1925). Giardiasis: Its frequency, recognition, treatment and certain clinical factors. *Amer. J. med. Sce.* 170: 348-361.
128. - Ligny, G. (1961). Jejuno-ileitis, mixtes à lamblas staphylocoques. *Arch. Mal. Appar. Dig.* 50: 1162.
129. - López-Brea et al. (1979). *Giardia lamblia* associated with bronchial asthma and serum antibodies in a child with chronic diarrhoea. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 73 (5): 600.
130. - Meyer, E.A. (1970). Isolation and axenic cultivation of *Giardia* trophozoites from the rabbit, chinchilla and cat. *Exp. Parasitol.* 27: 179-183.
131. - Meyer, E.A. and Pope, B.L. (1965). Culture *in vitro* of *Giardia* trophozoites from the rabbit and chinchilla. *Nature* 207: 1417-1418.
132. - Meyer, E.A. and Chadd, J.A. (1967). Preservation of *Giardia* trophozoites by freezing. *Journal of Parasitology*. 53: 1108-1109.
133. - Meyer, E.A. (1976). *Giardia lamblia*: Isolation and Axenic Cultivation. *Experimental Parasitology*. 39: 101-105.

134. - Mackee, A.E. et al. (1978). Scanning electron microscopic study of murine giardiasis. Scanning Electron Microscopy. Vol. 2. Edited by O'Johan, R.P. Becker. O'Hare, Illinois. Scanning Electron Microscopy 1978. pp. 321-326.
135. - Moore G.T. et al. (1969). Epidemic giardiasis at a ski resort. N. Engl. J. Med. 281: 402-407.
136. - Morb. Mortal. Wkly. Rep. (1975). 24: 366.
137. - Matthews, J.R. and Smith, A.M. (1918). The spread and incidence of intestinal protozoal infections in the population of Great Britain. I. Civilians in Liverpool Royal infirmary. II. Army recruits. Ann. trop. Med. Parasit. 12: 349-359.
138. - Matthews, J.R. and Smith, A.M. (1919). The spread and incidence of intestinal protozoal infections in the population of Great Britain. IV. Asylum patients. V. University and School cadets. Ann. trop. Med. Parasit. 13: 91-94.
139. - Maxcy, K.F. (1921). Bull. Johns. Hop. Hosp. 36: 166.
140. - Mac Gill. (1922). J. Amer. med. Ass. 78: 179.
141. - Monat, H.A. and McKinney, W.L. (1946). Giardiasis: Question of pathogenicity. U.S. nav. med. Bull. 46: 1204-1205.
142. - Marsden, P.D. (1960). Clinical trials with entamide furoate, entamide piperazine sulphate and emetin bis-muth iodide. Trans. roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 54: 396-399.

143. - Mohr, W. (1957). Die Protozoeninfektionen des menschlichen Dünndarms. Verh. dtsh. Ges. Inn. Med. 63: 573-579.
144. - Mayoral, L. G. et al. (1966). Intestinal malabsorption and parasitic disease: The role of protein malnutrition. Gastroenterology. 50: 856-857.
145. - Mears, T. and Zinneman, H. H. (1969). Giardia lamblia as parasite in humans. Minn. Med. 52: 1107-1110.
146. - Miller, R. (1926). Lambliasis as a cause of chronic enteritis in children. Arch. Dis. Child. 1: 93-98.
147. - Morecki, R. and Parker, J. G. (1967). Ultrastructural studies of the human Giardia lamblia and subjacent mucosa in a subject with steatorrhoea. Gastroenterology. 52: 151-164.
148. - Mahalanabis, D. et al. (1979). Malabsorption of water miscible vitamin A in children with giardiasis and ascariasis. The American Journal of Clinical Nutrition. 32: 313-319.
149. - Mac Gowan, J. M. et al. (1948). Cholecystitis due to Giardia lamblia in a left-sided gallbladder. Ann. Surg. 128: 1032-1037.
150. - Maris, E. P. and Bushong, S. (1942). The diagnosis of Giardia intestinalis infestation by means of intestinal intubation. Penn. med. J. 45: 724-726.

151. - Mata, L. J. et al. (1972). Gastrointestinal flora in children with protein-calorie malnutrition, . American Journal of Clinical Nutrition 25: 1118-1126.
152. - Moody, A. H. (1976). Improved method for the pure preparation of faecal cysts for use as antigen. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 7-: 338.
153. - Navarathnam, E. S. (1969). Description of a new species of *Giardia* from the Indian goat *Capra hircus*. Riv. Parasitol. 30: 1-6.
154. - Noc, F. (1909). Observations sur le cycle évolutif de *Lambliia intestinalis*. Bull. Soc. Pathol. Exot. 2: 93-97.
155. - Nutter, P. B. et al. (1941). *Giardia lamblia* infection in man J. Amer. med. Ass. 116: 1631-1632.
156. - Naik, S. R. y Cols (1978). A comparative evaluation of examinations of three stool samples, jejunal aspirate and jejunal mucosal impression smears in the diagnosis of giardiasis. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 72: 491-492.
157. - Notis, W. M. (1972). Giardiasis and vitamin B₁₂ malabsorption (letter). Gastroenterology, 63: 1085.
158. - Naik, S. R. y Cols. (1978). Prevalence of *Candida albicans* in normal and *G. lamblia* infected human jejunum. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 72: 493.

159. - Naik, S. R. y Cols. (1979). Immunological studies in giardiasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 73: 291-292.
160. - Overton, R. W. and Hertko, E. J. (1963). Giardiasis: Report of a case with intermittent fever of 11 years duration. *J. Amer. med. Ass.*: 13: 1040-1041.
161. - Ormiston, G. y Cols. (1942). Enteritis in a nursery home associated with *Giardia lamblia*. *Brit. med. J.* 2: 151-154.
162. - Palumbo, P. J. et al. (1962). Relationship of infestation with *G. lamblia* to intestinal malabsorption syndromes. *Proc. Mayo. Clin.* 37: 589-598.
163. - Padchenko I. K. et al. (1969). On the possible circulation of lamblia in nature. *Progr. Protozool.* 3: 311-312.
164. - Petersen, H. (1972). Giardiasis (Lambliasis). *Scand. J. Gastroenterology*, 7, suppl. 14. pp. 1-44.
165. - Pettersson, T. (1975). Single-dose Tinidazole therapy for Giardiasis. *British Medical Journal*. 1:395.
166. - Paine, T. F. and Gluck, F. W. (1976). A puzzling case of giardiasis *J. A. M. A.* 236: 2425.
167. - Palmer, R. C. (1977). Giardiasis. Manifestations and diagnosis. *J. A. M. A.* 237: 1078.
168. - Powell, E. D. (1956). Giardiasis. *Irish. J. med. Sci.* 34: 510-517.

169. - Payne, F. J. y cols. (1960). Association of *Giardia lamblia* with disease. *J. Parasit.* 46: 742.
170. - Peterson, G. M. (1957). Intestinal changes in *Giardia lamblia* infestation. *Amer. J. Roentgenol.* 77: 670-677.
171. - Papke, W. (1940). Die bedeutung der lamblien für erkrankungen des duodenums, der gallenwege und der gallenblase. *Dtsch. med. Wschr.* 66: 629-633.
172. - Rossi-Espagnet, A y Picardo, M. G. (1957). Osservazioni su alcune structure morfologiche e morfofunzionali di *Giardia intestinalis stridiatu* al microscopio elettronico. *Riv. Parassit.* 18: 213-217.
173. - Rendtorff, R. C. (1954). The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. IV. Attempts to transmit *Endamoeba coli* and *G. lamblia* cysts by water. *Amer. J. Hyg.* 60: 327-338.
174. - Ridley M. and Ridley D. S. (1976). Serum antibodies and jejunal histology in giardiasis associated with mabsorption. *J. Clin. Pathology.* 29: 30-34.
175. - Radulescu, S. et al. (1976). Serum antibodies in giardiasis. *J. Clin. Path.* 29: 863.
176. - Read, C. P. (1957). Comparative studies on the physiology of trichomonad protozoa. *J. Parasitol.* 43: 385-394.
177. - Reichenow, E. (1931). Die pathogenetische Bedeutung der Darmprotozoen des Menschen. *Zbl. Bakt.* 122: 195-212.

178. - Roux, G. and Ecalle, R. (1968). Influence du sac pancréatique sur la prolifération in vitro du *Giardia duodenalis*. Comptes Rendus Hebdomadaires des seances de L'Académie des Sciences; D: Sciences Naturelles (Paris). 266: 2434-2436.
179. - Rendtorff, R. C. (1954). The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II: *Giardia lamblia* cysts given in capsules. Amer. J. Hyg. 59: 209-210.
180. - Rissman, E. F. (1942). Ueber die Lambliasis intestinalis in Generalgouvernement. Med. Klin. 38: 532-534.
181. - Reiner, E. B. and Petterson, M. (1966). Intestinal disaccharidase content. Sth. med. J. 59: 311-314.
182. - Reza, M. J. (1978). Giardiasis and intestinal malabsorption Report of a case. Diseases of the colon and Rectum. 21: 372-373
183. - Radulescu, S y Cois. (1974). Some aspects of the immune response in giardiasis. Third International Congress of Parasitology. Munich.
184. - Sheffield, H. G. and B. Bjorvatn (1977). Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 23-30.
185. - Simon, C. E. (1921). *Giardia enterica*: a parasitic intestinal flagellate of man. Am. J. Hyg. 1: 440-491.
186. - Solovjev, M. M. (1975). Biometrical studies of the trophozoites of *lamblia* from mammals in regards to the taxonomy of the genus *lamblia*. Parassitologia (Rome). 9: 449-455.

187. - Solov. E. V. and Chentsov I. (1976). Study of trophozoites of *lamblia intestinalis* from culture by scanning electron microscopy. *Med. Parazitol (Mosk)* 45: 650-654.
188. - Svenson, R. (1935). Studies on human intestinal protozoa. *Acta. med. Scand. Suppl.* 70: 1-115.
189. - Schultz, M.G. (1975). Giardiasis. *J. A. M. A.* 233: 1383-1384.
190. - Shaw, P.K. y Cols (1977). A communitywide outbreak of giardiasis with evidence of transmission by a municipal water supply. *Annals of Internal Medicine.* 87: 426-432.
191. - Smithies, F. (1928), Parasitosis of the bile passage and gall bladder. A report upon 37 instances of protozoiasis and one instance of infestation by *necator americanus*. *Amer. J. med. Soc.* 176: 225-253.
192. - Shrivastav, J.B. (1960). Incidence and epidemiology of intestinal parasites with special reference to intestinal amoebiasis and giardiasis. *Ann. Biochem.* 20 (suppl): 529-544.
193. - Schneider, J.D. (1973). Cholezystis und Cholangio-Hepatitis bei Lambliasis im Kindesalter. *Klin. Pediatr.* 185: 70-74.
194. - Soto, J.M. and Drelling D.A. (1977). *Giardia lamblia*. A case representation of chronic cholecystitis and duodenitis. *Am. J. Gastroenterology.* 67: 265-269.
195. - Sterner, G. et al. (1973). Outbreak of *G. lamblia* infections in a tourist-group, treatment with tinidazole. *Infection.* 1: 133-136.

196. - Spears, M.M. (1939). The role of giardia in gastro-intestinal symptoms. *Rev. Gastroent.* 6: 512-516.
197. - Thomas, G.E., et al. (1974). Use of the Enterotest duodenal capsule in the diagnosis of giardiasis a preliminary study. *South African Medical Journal.* 53: 2219-2220.
198. - *The Medical Letter* (1976). Treatment of Giardiasis. 9: 39-40.
199. - Tewari, S.G. and Tandon, B.N. (1974). Functional and histological changes of small bowel in patients with *Giardia lamblia* infestation. *Indian Journal of Medical Research.* 62: 689-695.
200. - Tomkins, A.M. y et al. (1978). Bacterial colonization of jejunal mucosa in giardiasis. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.* 72: 33-35.
201. - Uszynski, M. (1962). A case of hypogammaglobulinemia and secondary infantilism in a patient with chronic infection with *lamblia intestinalis*. *Wiad. Parazyt.* 8: 469-473.
202. - Vinayak, V.K. y et al. (1978). Demonstration of antibodies in giardiasis using the immunodiffusion technique with *Giardia* cysts as antigen. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 72: 581-582.
203. - Von Dellen, R.G. and Thompson J.H. Jr. (1971). Absence of intestinal parasites in asthma. *N. Engl. J. Med.* 285: 146.

204. - Veghelyi, P. (1938). Giardiasis in children. Amer. J. Dis. Child. 56: 1231-1241.
205. - Veazie, L. (1969). Epidemic giardiasis N. Engl. J. Med. 281:853.
206. - Veghelyi, P. (1939). Cellac disease imitated by giardiasis. Amer. J. Dis. Child, 57: 894-899.
207. - Veghelyi, P. (1939). Absorption studies in children with *Giardia lamblia* infection. Arch. Dis. Child. 14: 155-158.
208. - Veghelyi, P. (1940). Giardiasis. Amer. J. Dis. Child. 59: 793-804.
209. - Veghelyi, P. and Lancos, F. (1949). Avitaminosis A in giardiasis Amer. J. Dis. Child. 78: 257-259.
210. - Vinnikov, M.E. (1949). Lambliosis. Sovet. med. 13: 18-20.
211. - Wolfe, M. S. (1978). Current concepts in Parasitology: Giardiasis. The New England Journal of Medicine. 298: 319-321.
212. - Walzer, P. D. y Cols (1971). Giardiasis in Travelers. J. Infect. Dis. 124: 235-237.
213. - Wolfe, M. S. (1975). Giardiasis. J. A. M. A. 233: 1362-1365.
214. - Webster, A. D. B. (1976): The gut and immuno-deficiency disorders. Clinics in Gastroenterology. 5: 323-340.
215. - Webster, B. H. (1958). Human infection with *Giardia lamblia* Amer. J. dig. Dis. 3: 64-70.

216. - Wilhelm, R.E. (1957). Urticaria associated with *Giardia lamblia*. *J. Allergy*. 28: 351-353.
217. - Westphal, K. and Georgi (1923). Ueber die Beziehungen der *Lambia intestinalis* zu Erkrankungen der Gallenwege und Leber. *Munch. Med. Wochenschr.* 70: 1080-1084.
218. - Wahlin, S. (1971). Giardiasis hos uterlandsresenarer. *Lakartidn.* 68: 125-128.
219. - Wright, S.G. et al. (1977). Giardiasis: Clinical and therapeutic aspects. *Gut*. 18: 343-350.
220. - Walenz, H. (1942). Ein Beitrag zur Lambien-Infektion im Kindesalter. *Kinderarztl. Prax.* 17: 387-392.
221. - Welch, P.B. (1943). Giardiasis with unusual clinical findings. Preliminary report. *Amer. J. dig. Dis.* 10: 52-55.
222. - Weisman, B.L. (1979). Urticaria and *Giardia lamblia* infection. *Annals of Allergy*. 42: 91.
223. - Yardley, J.H. et al. (1964). Epithelial and other mucosal lesions of the Jejunum in giardiasis. Jejunal biopsy studies. *Bull. Johns. Hopk. Hosp.* 115: 389-406.
224. - Yardley, J.H. et al. (1967). Giardiasis. *Gastroenterology*. 52: 301-304.
225. - Zinneman, H.H. and Kaplan, A.P. (1972). The association of giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A. *American Journal of Digestive Disease*. 17: 793-797.
226. - Zamcheck, N. et al. (1963). Histology and ultrastructure of the parasite and the intestinal mucosa in human giardiasis. Effects of atabrine therapy. *Gastroenterology*. 44: 860.

