

## Respuesta de anticuerpos IgG contra fracciones de *Giardia duodenalis* en individuos infectados.

IgG antibody response against fractions of *Giardia duodenalis* in infected individuals.

Maríafernanda De Candia<sup>1</sup>, Leonor Pocaterra<sup>2</sup>, Elsy Rojas<sup>2</sup>, Aurora Hernán<sup>2</sup>, Juan Carlos Jiménez<sup>1</sup>

### RESUMEN

La Giardiasis es una infección causada por *Giardia duodenalis*, transmitida por el agua o alimentos contaminados con quistes del parásito, principalmente en escolares que habitan zonas rurales. Se conoce poco sobre la respuesta de anticuerpos específicos, la identificación de antígenos permitirá el diseño de pruebas para evaluar seroprevalencia. En este estudio fueron identificadas proteínas para la respuesta IgG anti-Giardia por inmunodetección. Fueron evaluados ochenta individuos entre 4-80 años, de ambos sexos, de comunidades rurales, fueron clasificados según la presencia o ausencia de quistes del parásito en las heces. Las proteínas fueron obtenidas a partir de un extracto soluble y fracciones por centrifugación diferencial de la cepa WB, analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, transferidas a membranas de nitrocelulosa y probadas por Western Blot para la respuesta IgG anti-Giardia. Fue observada una prevalencia general entre 9 y 12% de parasitosis intestinales, con 22% de individuos positivos para *Giardia duodenalis*, 46% negativos en heces y 32% positivos para *Giardia duodenalis* y otras parasitosis. El perfil de proteínas reveló bandas entre 190-15kDa, donde fueron reconocidas para la respuesta específica de anticuerpos IgG, proteínas en la fracción 2 de 190, 176 y 51kDa, en la fracción 3 una proteína de 23kDa. La identificación de proteínas reactivas para la respuesta IgG en las fracciones 2 y 3 permitirá el diseño de pruebas serológicas más específicas para discriminar seropositivos de seronegativos.

**Palabras clave:** Giardiasis, Western Blot en giardiasis, anticuerpos IgG para *G. duodenalis*.

### ABSTRACT

Giardiasis is an infection caused by *Giardia duodenalis*, transmitted by consuming water or food contaminated with Giardia cysts, mainly in children living in rural areas. Little is known about proteins associated to the specific antibody response, the identification of specific antigens is necessary for studies of seroprevalence. The aim of this study was to select antigenic proteins from soluble extract or fractions of the parasite for the design of specific diagnostic tests. Were evaluated eighty individuals between 4-80 years, from rural communities were classified according to the presence or absence of cysts in the stool. The soluble extract and the fractions were obtained from WB (ATCC) strain of Giardia sp by differential centrifugation, analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes and finally tested by Western Blots for the IgG antibody response. The general prevalence was between 9-12%, and 22% of them were positive for *G. duodenalis*, 46% of individuals were negative in feces; and 32% were positive for *G. duodenalis* and other parasites. The protein profile revealed several bands from 190-15kDa; in which were recognized mainly proteins of 190, 176 and 51kDa in the fraction 2, and a protein of 23kDa in the fraction 3. The infection by *G. duodenalis* represents a human public health, and the identification of reactive proteins for the IgG response in the fractions 2 and 3, would allow us the design of serological test more specific, in order to discriminate the seropositive individuals from those seronegative.

**Key words:** Giardiasis, Giardiasis' Western Blot, *G. duodenalis* IgG-antibodies.

### INTRODUCCIÓN

La Giardiasis es una infección cuyo agente etiológico es el parásito intestinal, *Giardia duodenalis*. La Giardiasis puede cursar como enfermedad asintomática, la aparición de síntomas puede ser dependiente de varios factores como: el número de parásitos, virulencia del aislado, acidez gástrica, motilidad intestinal y la calidad de la respuesta inmune. En las formas agudas, la enfermedad suele ser de inicio brusco, heces líquidas y malolientes que tienden a flotar en el agua, además náuseas, distensión abdominal, vómitos, dolor tipo cólico en epigastrio; en la forma crónica hay períodos diarreicos y de constipación, heces pastosas, espumosas, presencia de flatulencia, meteorismo y malabsorción. La infección estimula una respuesta de tipo Th1 y Th2, sin embargo se conoce poco sobre las proteínas responsables de la respuesta de anticuerpos (1,2). La infección es transmitida por el consumo de agua o alimentos contaminados con quistes del parásito y que puede afectar a toda la población a nivel mundial, principalmente en las zonas

<sup>1</sup> Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás E. Bianco C." Caracas, Venezuela.

<sup>2</sup> Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "Dr. José María Vargas", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

**Autor de Correspondencia:** Juan Carlos Jiménez

**E-mail:** jcyjimenez488@hotmail.com

**Recibido:** 28-09-2015 **Aprobado:** 28-06-2016

en donde las condiciones ambientales y socioeconómicas son favorables para el desarrollo y dispersión de la infección (1,2). Se presenta en personas de todas las edades pero es más común en niños en edad pre-escolar y escolar debido a sus hábitos de juegos y lugares concurridos como las guarderías y parques (1,2). En Venezuela y otros países Suramericanos se ha observado que las autoridades sanitarias, presionadas por otros problemas aparentemente de mayor gravedad o urgencia, tienden a desestimar las infecciones intestinales, principalmente por su baja mortalidad, por lo que no conceden suficientes recursos para su diagnóstico y control oportuno, motivo por el cual estas patologías constituyen una de las principales causas de morbilidad (3). Algunos estudios indican que las parasitosis intestinales se sitúan en tercer lugar de las infecciones más frecuentemente encontradas en los niños, precedida por las infecciones respiratorias agudas y las diarreas (4,5).

Diversos estudios han demostrado la prevalencia de las parasitosis intestinales en Venezuela en especial para *G. duodenalis*. Por ejemplo, un estudio realizado en el norte del estado Zulia, encontraron que *Entamoeba coli* fue el protozoario más frecuente (23.5%) y *G. duodenalis* fue el flagelado más frecuente (18%), (6). La Giardiasis puede ser identificada a través de la detección de quistes, y/o trofozoitos en heces, así como la detección de antígenos específicos del parásito en muestras fecales, pero es problemático debido a la falta de un método de referencia estándar (6). El quiste y el trofozoito es el patrón estándar aceptado actualmente a pesar de su sensibilidad inferior en comparación con la ELISA, particularmente cuando sólo una única muestra fecal es disponible para el análisis (7). Se han reportado varios estudios sobre la seroprevalencia en Giardia entre los cuales encontramos un estudio realizado en Guatemala, en un centro de cuidado diario, en el cual se estudiaron 48 niños, los cuáles fueron diagnosticados a través del examen simple de heces y una prueba de ELISA para confirmar el diagnóstico serológico de Giardiasis. En la semana 0, el 43.8% de los sujetos positivos para el coproantígeno de Giardia, se encontró con una prevalencia similar (44.7%) en la semana 4, siendo la concordancia diagnóstica por los métodos de detección (ELISA y microscopía) de 74.7% (8).

La importancia de este estudio se basa en la evaluación de la respuesta de anticuerpos IgG específicos contra *Giardia duodenalis* en niños y adultos de zonas rurales lo que permitiría la selección de antígenos para el diseño de pruebas diagnósticas más específicas, y estudios seroepidemiológicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Población y muestra de estudio.** La población evaluada estuvo constituida por 80 individuos, en edades comprendidas entre 4-80 años, de ambos géneros, de comunidades rurales del Estado Miranda. La muestra utilizada para evaluar la respuesta inmunológica fue el suero de estos individuos, con diagnóstico parasitológico.

**Aspectos éticos.** El presente estudio, fue aprobado por el comité de bioética del Instituto de Inmunología de la UCV. Los representantes legales de los niños fueron informados sobre el estudio y firmaron el consentimiento informado.

**Diagnóstico parasitológico.** Las muestras de heces fueron examinadas por observación directa en solución salina 0.85% y lugol, así como la aplicación de formol-tritón-éter, kato, técnicas de flotación y sedimentación para la identificación de parásitos intestinales, particularmente, trofozoitos y/o quistes de *Giardia duodenalis* (9). Los individuos fueron clasificados según el diagnóstico parasitológico en positivos en heces para *G. duodenalis* (Gd+), positivos para *G. duodenalis* y otras parasitosis (Gd+OP+) y los individuos sin parásitos en heces (NSOP).

**Parásito y preparación del extracto.** Trofozoitos de la cepa de referencia WB (ATCC, 30957) fueron cultivados in vitro en medio TYI-S-33 (10). Los trofozoitos fueron, lavados 3 veces en PBS y el sedimento lisado en tampón de lisis, centrifugados a 2.352 g x por 5 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante, para usarlo como el extracto soluble.

**Obtención de fracciones del extracto de Giardia duodenalis por centrifugación diferencial.** Las fracciones fueron obtenidas a partir del extracto crudo completo, el cual fue centrifugado inicialmente a 252 g x por 5 minutos a 4°C para obtener el primer sedimento (Fracción 1); el sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 504 g x por 5 minutos a 4°C para el segundo sedimento (Fracción 2). El sobrenadante fue centrifugado por tercera vez a 1.680 g x por 10 minutos a 4°C, para el sedimento 3 (Fracción 3). Finalmente, el sobrenadante fue centrifugado a 2.352 g x por 10 minutos a 4°C para obtener el cuarto sedimento (Fracción 4). Cada sedimento fue posteriormente solubilizado con 200µL de Tris-HCl, pH 8,0 Tritón X-100 al 0,2% y almacenados a -80°C hasta su uso.

**Análisis del extracto soluble y fracciones de Giardia duodenalis por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS).** Las proteínas del extracto soluble y las fracciones de *G. duodenalis* fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (11). Los geles se hicieron por duplicado y al finalizar la corrida, un gel fue usado para ser teñido con plata y el otro transferido a una membrana de nitrocelulosa (12). El valor de las masas moleculares de las proteínas fue estimado a partir de la comparación según el frente de migración de proteínas con pesos moleculares de referencia (PM).

**Identificación de fracciones inmunogénicas para la inmunoglobulina G (IgG) por Western Blot.** Las membranas fueron bloqueadas con tampón fosfato salino-albúmina de suero bovino (PBS-BSA) al 1%, incubadas en presencia de un grupo de sueros de individuos positivos en heces y un grupo individuos negativos en heces y no reactivos en el suero para la IgG, las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 20 0.1%, e incubadas con el

anticuerpo secundario anti-IgG humano acoplado a fosfatasa alcalina diluido (1/1.500) y revelado con nitrozol/5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/BCIP, Pierce).

**Análisis de datos o estadístico.** Se utilizó estadística descriptiva de datos, tales como: media, desviación estándar, frecuencia y porcentaje. Se utilizó el análisis estadístico con un intervalo de confianza del 95% y valor con significancia estadística de  $p < 0.05$ .

**RESULTADOS**

**Población estudiada.** La distribución de los individuos estuvo comprendida en 45 individuos del género femenino (56%) con un promedio de edad de 10+3,9 años y 35 del género masculino (44%) con un promedio de edad de 8+3,5 años. La distribución de individuos en las distintas comunidades rurales del Estado Miranda se observan en la Tabla 1. La prevalencia para *Giardia duodenalis* se encontró en 12% en relación a los individuos que presentaron quistes y/o trofozoitos de *Giardia duodenalis* en las heces.

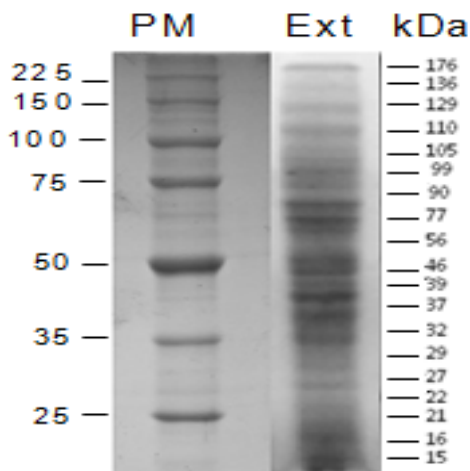
**Tabla 1.** Distribución de individuos de distintas comunidades del Estado Miranda.

Grupos	La Peica	El Guapo	Teleférico	La Represa	Total
Gd+	4	4	3	6	17
Gd+OP+	6	6	5	10	27
NSOP	8	8	6	14	36
Total	18	18	14	30	80

Se observa el total de individuos evaluados y el número de individuos infectados según la descripción de cada grupo. (Gd+: *G. duodenalis* +, Gd+OP+: *G. duodenalis*+ y otras parasitosis +), y NSOP: no se observaron parásitos en heces.

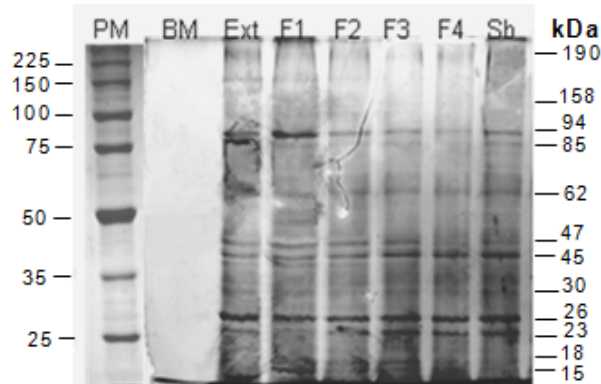
**Perfil electroforético del extracto de *Giardia duodenalis*.**

Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie, donde fueron detectados un mínimo de 33 proteínas visibles en el extracto soluble de distintos pesos moleculares entre 190 y 15kDa. Se observaron principalmente proteínas de 190, 176, 143, 136, 110, 105, 90, 77, 39, 37, 32, 27, 22, 21 y 15kDa como se muestra en la (Fig. 1).



**Fig. 1.** Perfil electroforético del extracto de *Giardia duodenalis*. A la izquierda: PM: patrón de peso molecular de referencia. A la derecha Ext: extracto, con las bandas visibles de 176 a 15kDa, por coloración Azul de Coomassie. Los pesos moleculares son representados en kilodaltons (kDa).

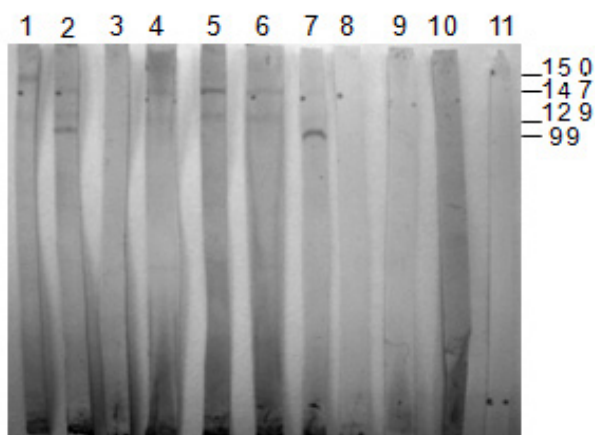
Por otra parte, las fracciones fueron marcadas con tinción de plata, detectándose al menos 15 proteínas distribuidas en todas las fracciones. Se destacan las proteínas de 190,158,94,85,62,47,45,30,26, 23, 18 y 15 kDa presentes en todas las fracciones (Fig. 2).



**Fig. 2.** Perfil electroforético del extracto y las fracciones de *Giardia duodenalis* teñidas con plata. A la izquierda: PM patrón de peso molecular de referencia, BM tampón de muestra, las proteínas visibles en el extracto Ext y las fracciones F 1, 2, 3, 4, y Sb (sobrenadante): Se visualizan proteínas de 190 a 15 kDa.

**Reactividad sérica contra las proteínas del extracto de *Giardia duodenalis* para la respuesta IgG en el suero de individuos negativos en heces.**

En la Figura N° 3, se muestra la inmunodetección de los individuos no parasitados para determinar los sueros no reactivos al extracto de *G. duodenalis* para la respuesta IgG y negativos en heces como controles. Fue observado que los individuos 3, 8 y 9 no reaccionaron al extracto. Estos sueros fueron utilizados posteriormente como sueros negativos en las subsiguientes pruebas. Algunos de los sueros (1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 y 10) a pesar de ser negativos en heces, reaccionaron para algunas proteínas del extracto para la respuesta IgG.

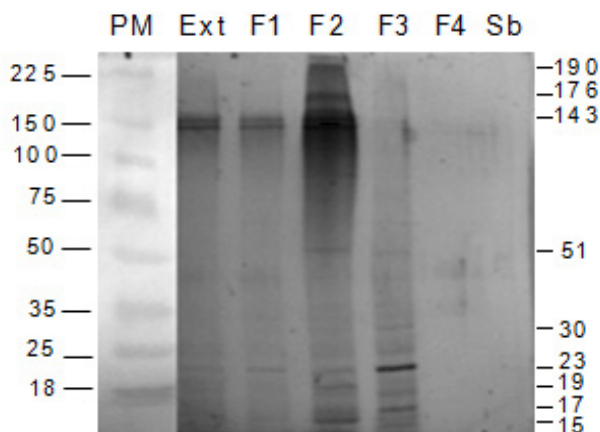


**Fig. 3.** Reactividad para IgG en el suero de individuos negativos en heces al extracto de *G. duodenalis* por inmunodetección. Algunos individuos negativos en heces presentaron reactividad a proteínas de 150, 147, 129 y 99 kDa (1, 2, 4, 5, 6, 7, y 10). Los sueros 3, 8 y 9 no fueron reactivos. La tira número 11 representa la muestra sin anticuerpo primario para validar la reactividad del anticuerpo secundario.



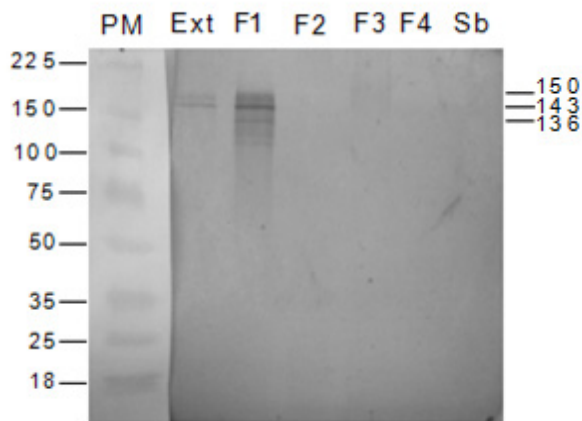
### Reactividad a proteínas para IgG anti-Giardia en extracto y fracciones de *Giardia duodenalis* en individuos infectados.

Se probó un grupo de sueros de individuos positivos en heces para *G. duodenalis* (figura, 4A) y un grupo de sueros de individuos negativos en heces y no reactivos probados por Western Blots para la respuesta IgG del experimento anterior (figura, 4B). Los sueros positivos reaccionaron al extracto y la fracción uno, con una proteína de 143kDa respectivamente. La fracción dos mostró el mayor número de bandas reactivas de 190, 176, 143, 51, 30, 19, 17 y 15kDa respectivamente. En la fracción tres, fue reconocida fuertemente una proteína de 23kDa. Sin embargo, en la fracción cuatro y el sobrenadante no hubo reconocimiento de los antígenos por los sueros (Figura. 4A).



**Figura 4A.** Reactividad serológica de individuos infectados para la respuesta IgG anti-Giardia, a las fracciones. (A). Reactividad en una mezcla de sueros de niños infectados por *Giardia duodenalis* reconociendo proteínas de 190, 176, 143, 51, 30, 23, 17 y 15kDa.

El grupo de sueros negativos reconocieron inespecíficamente en el extracto y en la fracción uno, proteínas de aproximadamente entre 150 y 136kDa. Las fracciones 2, 3, 4 y el sobrenadante no fueron reconocidas por los sueros de individuos negativos (Figura. 4B).



**Figura 4B.** Reactividad serológica de individuos negativos en heces para la respuesta IgG anti-Giardia que reconocieron las proteínas de 150, 143 y 136 kDa en el extracto y fracción 1. PM: Peso molecular de referencia, Ext: extracto del parásito. F: fracciones (1-4) y Sb: sobrenadante.

### DISCUSIÓN

Este trabajo se enfocó en la selección de antígenos específicos del parásito *Giardia intestinalis* para el diseño de ensayos inmunoenzimáticos más sensibles y específicos con gran valor para el diagnóstico y la seroepidemiología. En las guarderías además de la forma tradicional de transmisión de *Giardia intestinalis* también se ha demostrado una forma directa de persona a persona debido a la falta de hábitos de higiene de los niños a esta edad y a factores relacionados con el ciclo del parásito que favorecen su transmisión (13, 14). Diversos estudios han identificado varias proteínas relacionadas con el desarrollo de anticuerpos contra el parásito. Por ejemplo, mediante electroforesis en dos dimensiones y espectrometría de masas han sido identificadas proteínas asociadas a componentes del citoesqueleto como la tubulina, giardina y enzimas metabólicas, proteínas de choque térmico y proteínas del ciclo celular; todas relacionadas con el funcionamiento del parásito (15). Otros investigadores utilizaron proteómica para identificar proteínas del parásito, como la ferredoxina piruvato oxidoreductasa, la dipeptidil aminopeptidasa, el factor de elongación EF-1 $\gamma$ , y la ornitina carbamiltransferasa (OCT) respectivamente (16). Así mismo se han reportado Variantes de Proteínas de Superficie específicas (VSP), descritas como una familia de múltiples genes en *Giardia* que se encuentran en el telómero de los cromosomas, pudiendo relacionar el tamaño de los cromosomas con la expresión y/o patogénesis de las VSP (17). En un estudio realizado en Haití comparando la prevalencia de diferentes protozoarios intestinales (*E. histolytica*, *C. parvum* y *G. duodenalis*) a través de un examen simple de heces, tanto en niños como adultos, durante 9 años donde estudiaron la respuesta IgG y se compararon con pacientes en la India y Canadá, evidenciando que la respuesta ante los antígenos para VSP de *G. duodenalis*, la cual se encuentra en la pared de los quistes y trofozoitos, a medida de que ocurre una reexposición al parásito la respuesta va aumentando, hasta alcanzar un período de meseta y luego va descendiendo. Asimismo evidenciaron que los antígenos van cambiando entre un país y otro y que la respuesta será más alta cuando el área no se encuentra en un país endémico y que esta respuesta se encuentra relacionada con las condiciones sanitarias, el tipo de agua consumida (18). En un ensayo múltiple fueron usados 3 fragmentos de la cepa A y tres fragmentos de la cepa B de *Giardia* de las proteínas variables de superficie y un antígeno estructural como  $\alpha$ -1 giardina para detectar simultáneamente anticuerpos IgG contra *Giardia*. El 60% de las muestras fueron positivas y fueron reconocidos por inmunodetección una banda de 30kDa y otra de 22kDa similares a las reconocidas en el presente trabajo, considerando la posibilidad de una prueba de múltiples antígenos que podría ser usada para análisis epidemiológicos en esta infección (19). En un estudio fueron generados 9 anticuerpos monoclonales específicos para proteínas de *Giardia* donde el isotipo IgG2b reconoció a la proteína 5G8, además fue reconocida por el suero de ratones infectados y reinfectados (20). En el presente

trabajo se realizó el análisis de la respuesta de anticuerpos contra extractos y fracciones obtenidas por centrifugación diferencial para la identificación de proteínas reactivas en el suero de individuos que habitan en comunidades rurales. El suero de individuos expuestos a *G. intestinalis* reconocieron varias proteínas de peso molecular entre 190 y 17 kDa, estas proteínas podrían estar relacionadas con proteínas estructurales del parásito y proteínas de excreción/secreción ya reportadas. Fueron detectadas en la fracción 3 proteínas de 30 y 23kDa que están relacionadas con proteínas estructurales del parásito. Además se identificó la proteína de 77kDa que pudiera ser la proteína 5G8 que a pesar de tener un peso molecular aproximado de 56 kDa, en los geles de SDS-Page es mayor (aproximadamente 72kDa). En el caso de las fracciones, la mezcla de sueros de los niños infectados reaccionó a proteínas de la fracción 2 de peso molecular de 190, 176, 143, 51, 30, 17 y 15kDa. Además, fue reconocida fuertemente en la fracción 3 una proteína de 23kDa. Estos resultados sugieren que las fracciones podrían ser evaluadas para la selección de proteínas útiles para el diseño de pruebas para el diagnóstico ya que poseen una fuerte reactividad. Por otra parte, el grupo de individuos negativos que reaccionaron al extracto y fracción 1, podría deberse a una posible exposición previa de alguno de estos individuos al parásito, generando una respuesta de anticuerpos de memoria para la respuesta IgG, por lo que estas proteínas no serían usadas para evaluar la respuesta de anticuerpos específica contra el parásito en individuos de zonas endémicas. La utilización de fracciones a partir del extracto completo permitió la identificación de proteínas antigénicas asociadas a la respuesta de anticuerpos específicos IgG útiles para ser evaluadas como antígenos candidatos para el diseño de pruebas inmunológicas que sirvan para estudios de seroprevalencia de la giardiasis en nuestro país.

**Agradecimiento.** Nuestro especial agradecimiento a las comunidades la Peica, El Guapo, El Teleférico y la Represa del Estado Miranda por la colaboración prestada en la evaluación clínica de los niños. Este trabajo fue co-financiado por el proyecto Misión Ciencia número 2007001425 y el Proyecto de Grupo del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV, número PG-09-8180-2011/1.

## REFERENCIAS

1. Markell E, Voge M, John T. Editorial Interamericana. Novena Parasitología Médica. Edición. Madrid-España. 2010
2. Flisser A., Pérez R.. Editorial ETM. Aprendizaje de la parasitología basada en problemas. Primera Edición. 2006
3. Botero D, Restrepo M. Parasitosis Humanas. Quinta Edición. Medellín, Colombia. Corporación para Investigaciones Biológicas. 2012. p. 30-160.
4. Tedesco M, Camacaro Y, Morales G, Amaya I, Blanco Y, Devera R. Parásitos intestinales en niños de hogares de cuidado diario comunitario de Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela 2012; 24:142-150.
5. Miller Sa, Rosario CI, Rojas E, Scorza JV. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centres in Trujillo, Venezuela. Trop. Med. Int. Health 2003; 8:342-347.
6. Rivero Z, Maldonado A, Bracho A, et al. Enteroparasitosis en indígenas de la comunidad Japrena, Edo Zulia, Venezuela. Interciencia 2007; 32: 270-273.
7. Weitzel T, Dittrich S, Mohl I, Adusu E, Jelinek T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. Clin Microbiol Infect 2006; 12:656-659.
8. Duffy T-L, Montenegro-Bethancourt G, Solomons N-W, Belosevic M, Clandinin T. Prevalence of Giardiasis in Children Attending Semi-urban Daycare Centres in Guatemala and Comparison of 3 *Giardia* Detection Tests. J H Pop Nut. 2013; 31:290-293.
9. Hanson KL, Cartwright CP. Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. J Clin Microbiol 2001; 39 :474-477.
10. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983; 77: 487-488.
11. Laemmli. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680 – 685.
12. Towbin H, Staehelin T & Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sc. USA 1979; 76:4350-4354.
13. Chacón N., Jiménez J. Giardiasis como causa de Diarrea en el viajero. Antibióticos e Infección 2010; 16:15-24.
14. Giraldo-Gómez J, Lora F, Henao L, Mejía S, Gómez-Marín J. Prevalencia de Giardiasis y Parásitos Intestinales en Preescolares de Hogares atendidos en un programa estatal en Armenia, Colombia. Rev Salud Pública 2005; 7: 327-338.
15. Kim J, Bae S-S, Sung M-H, Lee K-H, Park S-J. Comparative proteomic analysis of trophozoites versus cysts of *Giardia lamblia*. Parasitol Res 2009; 104: 475-479.
16. Jerlstrom-Hultqvist J, Stadelmann B, Birkesdtedt S, Hellman U, Svard S. Plasmid Vectors for Proteomic Analyses in *Giardia*: Purification of Virulence Factors and Analysis of Proteasome. Eukariotic Cell 2012; 11:864.
17. Ankarklev J, Franzén O, Peirasmaki D, Jerlström-Hultqvist J, Lebbad M, Andersson J, Andersson B, Svård SG. Comparative genomic analyses of freshly isolated *Giardia intestinalis* assemblage A isolates. BMC Genomics. 2015; 15: 16:697.
18. Moss DM, Priest JW, Hamlin K, Derado G, Herbein J, Petri WA Jr, Lammie PJ. Longitudinal evaluation of enteric protozoa in Haitian children by stool exam and multiplex serologic assay. Am J Trop Med Hyg 2014, 90: 653-660.
19. Priest J, Moss D, Visvesvara G, Jones C, Li A, Isaac-Renton J. Multiplex Assay Detection of Immunoglobulin G Antibodies That Recognize *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* Antigens Clin Vac. Immunol 2010; 17: 1695-1707.
20. Quintero J, Figueroa DC, Barcelo R, Breci L, Astiazaran-García H, Rascon L, Robles-Zepeda R, Garibay-Escobar A, Velázquez z-Contreras E, Ávila GL, Hernández, Velázquez. Identification of an immunogenic protein of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies generated from infected mice. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013; 108: 616-622.