



## Prevalencia de genotipos A y B de *Giardia intestinalis* en escolares, familiares y mascotas con las que conviven, en zona urbana y rural de Sinaloa.

P.C. García-Cervantes<sup>a</sup>, M.C. De la Cruz-Otero<sup>a</sup>, S.P. Díaz-Camacho<sup>a</sup>, M.E. Báez-Flores<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidad Autónoma de Sinaloa, [patriciacgarcia.c@gmail.com](mailto:patriciacgarcia.c@gmail.com), [delacruzotero@hotmail.com](mailto:delacruzotero@hotmail.com), [spdiazc@gmail.com](mailto:spdiazc@gmail.com), [elenabf@uas.edu.mx](mailto:elenabf@uas.edu.mx)

### RESUMEN

*Giardia intestinalis* es el agente etiológico de la giardiosis, una enfermedad gastrointestinal que afecta a humanos y animales con impacto en la salud pública y veterinaria mundial. Este protozoo presenta ocho genotipos (A-H) morfológicamente indistinguibles con diferentes características genotípicas y una aparente especificidad de hospedero. En el humano, solo los genotipos A y B producen enfermedad. Dichos genotipos también se han identificado en otros mamíferos, sin embargo, el papel de los animales en la transmisión de la infección humana todavía no está claro. En este estudio se analizó la distribución de los genotipos A y B de *G. intestinalis* en 63 escolares, 10 familias y 5 mascotas de zonas urbana y rural de Sinaloa. Asimismo se realizó un análisis de correlación entre los genotipos y las características clínico-epidemiológicas de la infección en los escolares. En zona urbana se observaron los subgenotipos AI (81.3%), AII (11.6%) y la combinación de genotipos AI,B (6.9%) en escolares. En zona rural sólo se encontró el subgenotipo AI (100%). En el ambiente familiar (familiares y mascotas) de ambas poblaciones se identificó al subgenotipo AI, lo cual sugiere un posible comportamiento zoonótico del parásito. En el análisis de correlación se encontró una correlación positiva entre la presencia de manifestaciones clínicas y las infecciones mixtas (AI,B) y el subgenotipo AII, en zona urbana. Asimismo se observó un mayor número de casos asintomáticos relacionados con el subgenotipo AI. En relación con el género y la edad de los niños, no se encontró diferencia estadísticamente significativa con el genotipo del parásito. Los resultados de este estudio deben alertar a las autoridades sanitarias sobre la importancia de la giardiosis como enfermedad potencialmente zoonótica, relacionada con las medidas de higiene básicas y saneamiento ambiental.

### 1. INTRODUCCIÓN

*Giardia intestinalis* (*G. duodenalis*, *G. lamblia*) es un protozoo flagelado, enteropatógeno y cosmopolita que infecta un amplio rango de mamíferos: domésticos (perros y gatos), de explotación y al humano (Molina y cols., 2007; Robertson, 2009; Fonte y cols., 2010), causando en ellos la enfermedad denominada giardiosis (Thompson, 2004). Este parásito es muy frecuente en la población infantil, produciendo cuadros clínicos variados que pueden conducir a diarrea crónica con síndrome de malabsorción que impacta negativamente su crecimiento y desarrollo (Otero y cols., 2011). Es la principal causa de gastroenteritis epidémica a nivel mundial, considerada como una enfermedad infecciosa re-emergente y un problema de salud pública (Llane y Lloyd, 2002) que la OMS incluyó desde 2004 en el grupo de las "enfermedades desatendidas" (Savioli y cols., 2006). En Asia, África y América Latina cerca de 200 millones de personas están infectadas y se registran 500 000 casos nuevos por año. En los países desarrollados es el parásito intestinal más común encontrado en humanos (Thompson, 2008) y su prevalencia puede variar de 2-7%, mientras que en países en vías de desarrollo puede exceder el 30% (Fletcher y cols., 2012). En México existe una prevalencia del 3-50% en diferentes regiones del país (Sinaloa, Distrito Federal, Oaxaca y



Yucatán), lo cual excede las cifras estimadas para los países en vías de desarrollo (Torres y cols., 2014). En los perros *G. intestinalis* es el protozoo más común, con una prevalencia del 10% en adultos, del 36 al 50% en cachorros y hasta el 100% en perros en situación de calle o criaderos (Traub y cols., 2005). Debido a la similitud morfológica de los quistes y trofozoítos de *G. intestinalis* obtenidos de heces de humanos y animales de compañía, se ha recurrido a técnicas moleculares para genotipificarlos y examinar su posible comportamiento zoonótico (Otero y cols., 2011). El empleo de estos procedimientos ha permitido encontrar diferencias genéticas entre aislamientos de este protozoo provenientes de diferentes hospederos y se ha demostrado que este parásito representa un complejo de especies que comprende al menos ocho genotipos (Adam y cols., 2013). El genotipo A (AI, AII) se encuentra en humanos, animales de compañía (perros y gatos), animales de granja (bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y equinos) y animales silvestres (castores, cuyos y loris); el genotipo B (BIII, BIV) en el hombre, perros, chinchilla, castores, ratas y loris; los genotipos C y D en caninos; el genotipo E en animales de granja; el genotipo F en felinos; el genotipo G en ratas (Cacciò y cols., 2010; Fonte y cols., 2010), y el genotipo H en lobos marinos (Frazén y cols., 2013). El objetivo de este estudio fue analizar la prevalencia de los genotipos A (AI y AII) y B en escolares sintomáticos y asintomáticos de zonas urbana y rural de Sinaloa, así como en sus familiares y mascotas. Asimismo determinar el posible potencial zoonótico de estos genotipos y evaluar si los hábitos higiénicos de los niños parasitados están relacionados con la transmisión de la giardiosis.

## 2. TEORÍA

Actualmente, una de las estrategias para generar conocimiento en epidemiología y transmisión de los parásitos, es el estudio molecular de sus genotipos poblacionales. Los estudios realizados de genotipificación de este protozoo han sido utilizados para evaluar su potencial zoonótico (Read y cols., 2004; Eligio y cols., 2005) y se ha establecido la posible transmisión entre animales domésticos y humanos de ciertos genotipos del parásito como el AI, AII y B (Lebbad y cols., 2008; Sprong y cols., 2009; Plutzer y cols., 2010). Dichos estudios han identificado al genotipo A como el principal causante de infecciones en América (Ravid; Souza; Volotão, 2007; Kohli; Minvielle, 2008). En México los estudios de genotipificación realizados obtienen sus muestras de portadores sintomáticos provenientes de instituciones de salud, además han identificado al genotipo A tanto en humanos como en caninos señalando a este genotipo como potencialmente zoonótico (Ponce y col, 2002; Cedillo y col, 2003; Lalle y col, 2005; Eligio y col, 2005). En 2002, se reportó un predominio absoluto del subgenotipo AII en aislados de humanos en la Ciudad de México (Ponce y cols., 2002). Posteriormente en la misma Ciudad, se reportó el subgenotipo AI como el causante de las infecciones en humanos (Cedillo y cols., 2003; Lalle y cols., 2005). En 2008 (a,b) Eligio y colaboradores reportan la mezcla de los subgenotipos AI, AII. En 2014 se reporta por vez primera en el sureste de México la presencia del genotipo B en seis aislados de humanos (Torres y cols.), a pesar de que alrededor del mundo existen prevalencias altas de este genotipo (Lebbad y cols., 2011; Ignatius y cols., 2012; Broglia y cols., 2013). En Sinaloa, estado del Noroeste de México, existe una elevada prevalencia (31%) del parásito principalmente en la población infantil (Quihui y cols., 2006). A pesar de ello, solo existe un estudio previo, que incluyó un número reducido de casos de giardiosis (12 de niños y 19 perros). Este estudio encontró una prevalencia similar entre los subgenotipos AI y AII en perros (AI 52.6% y AII 47.4%) y niños (AI 41.7% y AII 58.3%) (Eligio y cols., 2008a).

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

Se realizó un estudio transversal, prospectivo, observacional, descriptivo y correlacional con muestreo aleatorio, en escolares de zonas urbana y rural de Sinaloa. A los escolares parasitados con *G. intestinalis* se les realizó una encuesta clínico-epidemiológica para obtener datos sobre las manifestaciones clínicas, hábitos higiénicos y de convivencia con animales domésticos. Además se



relacionaron las observaciones clínicas con el origen de las muestras y los resultados moleculares. También se analizaron las heces de los familiares y mascotas de los escolares que presentaron el parásito. La significancia estadística fue calculada mediante el test *Ji-Cuadrada de Pearson* con el paquete estadístico Stata Intercooled versión 13.1. En el periodo de junio de 2013 a junio de 2014 se recolectaron muestras en escuelas primarias. Se colectó un total de 1185 muestras (tres de cada niño) que correspondieron a 274 escolares de zona urbana y 121 de zona rural de Sinaloa. Después de identificar los casos de giardiosis, se procedió a la recolección de heces de familiares y mascotas. En este proceso participaron 15 familiares de zona urbana y siete de zona rural, se analizaron 180 heces de 60 familiares y 63 heces de 21 mascotas (perros). La presencia de *G. intestinalis* se analizó por dos métodos de concentración Faust (1938) y Ritchie (1948). Todas las muestras positivas se conservaron en refrigeración para continuar con la concentración y purificación de quistes mediante el método descrito por Minvielle y cols., (2008). El ADN genómico fue aislado utilizando el estuche UltraClean Fecal DNA Kit (MO BIO) siguiendo las especificaciones del fabricante. Mediante PCR multiplex se amplificaron fragmentos del gen de una proteína variante de superficie (*vsp* 417) (Ey y cols., 1993) y utilizando PCR anidada se amplificó un segmento del gen de la enzima glutamato deshidrogenasa (*gdh*) (Monis y cols., 1996; Read y cols., 2004) para la asignación de genotipos. La subgenotipificación se realizó mediante el análisis de restricción de los productos de PCR. La digestión de los productos de amplificación del fragmento del gen *vsp* 417 con la enzima *Pst* I se realizó durante tres horas a 37 °C. Las bandas esperadas para el subgenotipo AI eran de un peso molecular de aproximadamente 520, 350 y 170 pb; mientras que para el genotipo AII se esperaban bandas con un peso aproximado de 520, 370, 330, 190 y 150 pb (Ey y cols., 1993). Para el producto de PCR del gen *gdh* se realizó la digestión enzimática con *Nla* IV durante tres horas a 37 °C. El peso molecular esperado para las bandas del subgenotipo AI eran de 150, 120 y 90 pb; mientras que para el subgenotipo AII las bandas tenían un peso molecular esperado de 120, 90, 80 70 pb y para el genotipo B se esperaban bandas de 290 y 120 pb (Read y cols., 2004). En este estudio se identificaron parásitos como *G. intestinalis*, *E. histolytica*/*E. dispar*, *B. hominis*, *E. vermicularis*, *H. nana*, *S. stercoralis* y casos de poliparasitismo. Sin embargo, es *G. intestinalis* el parásito detectado con mayor prevalencia tanto en escolares (18% zona urbana, 20% zona rural), sus familiares (12.2% zona urbana, 33.3% zona rural) como en sus mascotas (20% zona urbana, 33.3% zona rural). Se encontraron prevalencias de 81.3% y 11.6% de los subgenotipos AI y AII, respectivamente y de 6.9% de la combinación de genotipos AI,B en escolares de zona urbana. El 100% de los escolares de zona rural presentaron infección por el subgenotipo AI. Los casos de giardiosis de familiares y mascotas de ambas zonas pertenecieron al subgenotipo AI, lo que sugiere la transmisión zoonótica del parásito. En zona urbana se encontró correlación positiva entre las manifestaciones clínicas y las infecciones con genotipos mixtos (AI,B) y el subgenotipo AII. El 57.5% de los casos de dolor abdominal se relacionaron con el subgenotipo AI. El genotipo AII y las infecciones mixtas (AI,B) se presentaron principalmente en mujeres. El subgenotipo AI afectó principalmente a escolares con un promedio de 8 años.

#### 4. CONCLUSIONES

Estos resultados sugieren al subgenotipo AI como un genotipo potencialmente zoonótico y causante de infecciones sintomáticas. Además, en este estudio se reporta por primera vez la presencia del genotipo B y de infecciones mixtas (AI,B) en el noroeste del país.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Adam RD, Dahlstrom EW, Martens CA, Bruno DP, Barbian KD, Ricklefs SM, Hernandez MM, Narla NP, Patel RB, Porcella SF, Nash TE. Genome Sequencing of *Giardia lamblia* Genotypes A2 and B Isolates (DH and GS) and Comparative Analysis with the Genomes of Genotypes A1 and E (WB and Pig). *Genome Biol Evol* 2013, Vol. 5 (12), 2498-2511.



2. Broglia A, Weitzel T, Harms S, Cacciò M. Molecular typing of *Giardia duodenalis* isolates from German travellers. *Parasitol Res* 2013, Vol. 112, 3449-3456.
3. Cacciò SM, Sprong H. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp. Parasitol* 2010, Vol. 124, 107-12.
4. Cedillo R, Darby J, Enciso J, Ortega G, Ey P. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. *Parasitol Res* 2003, Vol. 90 (2), 119-23.
5. Eligio L, Cortés A, Cota S, Gaxiola S, Jiménez E. Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using beta-giardin restriction gene. *Vet Parasitol* 2008a, Vol. 156 (3-4), 205-209.
6. Eligio L, Cortés A, Jiménez E. Classification of *Giardia intestinalis* isolates by multiple polymerase chain reaction (multiplex). *Parasitol Res* 2008b, Vol. 103 (4), 797-800.
7. Eligio L, Cortes A, Jiménez E. Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasitol Res* 2005, Vol. 97(1), 1-6.
8. Ey P, Darby J, Andrews R, Mayrhofer G. *Giardia intestinalis*: Detection of major genotypes by restriction analysis of gene amplification products. *International Journal for Parasitology* 1993, Vol. 23 (5), 591-600.
9. Faust CE. Un estudio crítico de la clínica de laboratorios para el diagnóstico de quistes de protozoos y huevos de helmintos en las heces I. Comunicación preliminar. *American Journal of Medicina Tropical* 1938, Vol.18, 169-183.
10. Fletcher S, Stark D, Harkness J, Ellis J. Enteric Protozoa in the Developed World: a Public Health Perspective. *Clin. Microbiol. Rev* 2012, Vol. 25(3), 420-439.
11. Fonte L, Ali S. Giardiasis ¿Una zoonosis?. *Rev. Cubana de Higiene y Epidemiología* 2010, Vol. 48(2), 108-113.
12. Franzén O, Jerlström-Hultqvist J, Einarsson E, Ankarklev J, Ferella M, Andersson B, Svärd SG. Transcriptome Profiling of *Giardia intestinalis* Using Strand-specific RNA-Seq. *PLoS Comput Biol* 2013, Vol. 9(3), e1003000.
13. Ignatius R, Gahutu JB, Klotz C, Steiniger C, Shyirambere C. High Prevalence of *Giardia duodenalis* Assemblage B Infection and Association with Underweight in Rwandan Children. *PLoS Negl Trop Dis* 2012, Vol. 6 (6), e1677.
14. Kohli A, Bushen O, Pinkerton R, Houpt E, Newman R, Sears C. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008, Vol. 102 (7), 718-25.
15. Lalle M, Jimenez E, Cacciò S, Pozio E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. *Journal Parasitol* 2005, Vol. 91(1), 203-205.
16. Lebbad M, Ankarklev J, Tellez A, Leiva B, Andersson JO, Svärd S. Dominance of *Giardia* assemblage B in Leon, Nicaragua. *Acta Trop* 2008, Vo. 106, 44–53.
17. Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, Botero S, Andersson J, Svenungsson, Svärd S. Multilocus Genotyping of Human *Giardia* Isolates Suggests Limited Zoonotic Transmission and Association between Assemblage B and Flatulence in Children. *PLoS Negl Trop Dis* 2011, Vol. 5 (8), e1262.
18. Llana S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol* 2002, Vol. 28(2), 123-47.
19. Minvielle MC, Molina N, Polverino D, Basualdo J. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South América. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro* 2008, Vol. 103, 98-103.
20. Molina N, Polverino D, Minvielle M, Basualdo J. PCR amplification of triosephosphate isomerase gene of *Giardia lamblia* in formalin-fixed feces. *Rev Latinoam Microbiol* 2007, Vol. 49(1-2), 6-11.



21. Monis PT, Mayrhofer G, Andrews RH, Homan WL, Limper L. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology* 1996, Vol. 112(1), 1-12.
22. Otero JJ, Ibarra F, Martínez MN, Ponce M. Prevalence of *Giardia intestinalis* and zoonotic genotype predominance in small scale sheep and cattle farms in five states of the Mexican Republic. *Vet. Méx.* 2011, Vol. 42(3), 219-226.
23. Plutzer A, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *Int J Hyg Environ Health* 2010, Vol. 213 (5), 321-333.
24. Ponce M, Martínez M, Bermúde R, Salazar P, Ortega G, Ey P. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *Int J Parasitol* 2002, Vol. 32 (9), 1201-2.
25. Quihui L, Valencia ME, Crompton DWT, Phillips S, Hagan P, Morales G, Díaz SP. Role of the employment status and education of mothers in the prevalence of intestinal parasitic infections in Mexican rural schoolchildren. *BMC Public Health* 2006, Vol. 6, 225.
26. Ravid Z, Duque S, Arévalo A, Nicholls R, Wasserman M. "Genetic diversity of *Giardia intestinalis* populations in Colombia." *Biomédica* 2007;27(1):34-41.
27. Read CM, Monis PT, Thompson RCA. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* 2004, Vol. 4, 125-130.
28. Ritchie L. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull US Army Med Dept* 1948, Vol. 8, 326-327.
29. Robertson LJ. *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: a review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. *Epidemiol Infect* 2009, Vol. 137, 913-921.
30. Savioli I, Smith h, Thompson a. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the neglected diseases initiative. *Trends Parasitol* 2006, Vol. 22, 203-208.
31. Souza S, Gennari S, Richtzenhain L, Pena H, Funada M, Cortez A. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Vet Parasitol* 2007, Vol. 149 (3-4), 258-64.
32. Sprong H, Caccio SM, van der Giessen JWB. Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2009, Vol. 3(12), e558.
33. Thompson RC, Monis PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol* 2004, Vol. 58, 69-137.
34. Thompson RC, Palmer CS, O'Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The Veterinary Journal* 2008, Vol. 177, 18-25.
35. Torres JC, Euan AJ, Benito N, Padilla N, Huchin C, Lara J, Cedillo R. Intestinal parasites and genotyping of *Giardia duodenalis* in children: first report of genotype B in isolates from human clinical samples in Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 2014, Vol. 109(3): 388-390.
36. Traub R, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson R. Canine gastrointestinal parasitic zoonoses in India. *Trends in parasitology* 2005, Vol. 21(1), 42-8.
37. Volotao, AC, Costa LM, Haddad FS, Brandao A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop* 2007, Vol. 102, 10-19.