

ARTÍCULO ORIGINAL

Genotipos de *Giardia duodenalis* en muestras de niños de las guarderías del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar y de perros en Ibagué, Colombia

Victoria Rodríguez^{1,2}, Oneida Espinosa¹, Julio César Carranza¹, Sofía Duque³, Adriana Arévalo³, Jairo Alfonso Clavijo⁴, Daniel Alfonso Urrea¹, Gustavo Adolfo Vallejo¹

¹ Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

³ Grupo de Parasitología, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Departamento de Matemáticas y Estadística, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

Introducción. Se han descrito ocho genotipos de *Giardia duodenalis*, del A al H. Los genotipos A y B se han aislado de humanos y de una gran variedad de mamíferos; sin embargo, los genotipos del C al H han mostrado mayor especificidad de huésped.

Objetivo. Identificar los genotipos de *G. duodenalis* a partir de quistes obtenidos en heces de niños de las guarderías del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF) y de perros en Ibagué, mediante PCR-RFLP de los genes de la beta giardina y la glutamato deshidrogenasa.

Materiales y métodos. Los quistes de las muestras positivas para *G. duodenalis* fueron sometidos a concentración; se extrajo su ADN y se efectuó el análisis de PCR-RFLP de los genes de la beta giardina y de la glutamato deshidrogenasa. Como control positivo se utilizó la cepa MHOM/CO/04/G40 procedente del Grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud.

Resultados. De las muestras tomadas de niños, 11/23 (48 %) correspondieron al genotipo A y, 12/23 (52 %), al genotipo B. Cuatro muestras de perros presentaron los genotipos C y D, específicos de este huésped.

Conclusiones. En los niños solamente se encontraron los genotipos asociados a infecciones humanas (AII, BIII y BIV) y en los perros, los genotipos específicos para este huésped (C y D). Debido al reducido tamaño de las muestras analizadas provenientes de perros, y dado que estos no estuvieron en contacto con los niños de las guarderías del ICBF, no fue posible determinar una interacción entre el ciclo de transmisión de los humanos y el de los animales.

Palabras clave: *Giardia duodenalis*, glutamato deshidrogenasa, niño, perros.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.1713>

Giardia duodenalis genotypes found in the Instituto Colombiano de Bienestar Familiar day care centers and dogs in Ibagué, Colombia

Introduction: Eight *Giardia duodenalis* genotypes (A-H) have been described to date. Genotypes A and B have been isolated from humans and a wide range of mammals; however, genotypes C-H have shown greater host specificity.

Objective: Identifying *G. duodenalis* genotypes from cysts in faeces obtained from children attending the Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF) day care centres and from dogs in Ibagué by PCR-RFLP targeting both the β -giardin and glutamate dehydrogenase genes.

Materials and methods: Cysts from *G. duodenalis* positive samples were concentrated, DNA was extracted and the β -giardin and glutamate dehydrogenase genes were analysed by PCR-RFLP. The MHOM/CO/04/G40 strain was used as positive control (this was obtained from the Grupo de Parasitología at the Instituto Nacional de Salud).

Contribución de los autores:

Victoria Rodríguez, Oneida Espinosa y Julio César Carranza: recolección de muestras de campo, trabajo de laboratorio, análisis de datos y revisión de resultados

Sofía Duque y Adriana Arévalo: análisis de datos y revisión de resultados

Jairo Alfonso Clavijo: análisis estadístico y determinación del tamaño de la muestra a analizar

Daniel Alfonso Urrea: revisión de resultados

Gustavo Adolfo Vallejo: orientación del trabajo de campo y de laboratorio, análisis de datos y revisión de resultados

Todos los autores participaron en la elaboración del manuscrito.

Results: Of the total human samples, 11/23 (48%) were genotyped as A and 12/23 (52%) as B; PCR-RFLP revealed that four canine samples were genotypes C and D, these being host-specific.

Conclusions: Only genotypes associated with human infection (AII, BIII and BIV) were found in the children and host-specific genotypes were observed in canines (C and D). No interaction could be established between animal and human transmission cycles due to the small canine sample size and as the former did not come into contact with children attending ICBF day-care centres.

Key words: *Giardia duodenalis*, glutamate dehydrogenase, child, dogs.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.1713>

La giardiosis es una parasitosis de distribución cosmopolita causada por *Giardia duodenalis* (sinónimo, *Giardia intestinalis* y *Giardia lamblia*). Este protozoo flagelado coloniza el intestino de seres humanos y animales, produciendo una enfermedad que puede ser asintomática, aguda o crónica, con cuadros diarreicos de intensidad variable que puede llegar a ocasionar síndrome de mala absorción (1). Cerca de 200 millones de personas en Asia, África y América Latina presentan síntomas de giardiosis, con una incidencia de infección de 500.000 casos por año (2).

Giardia duodenalis ha sido descrita en seres humanos, así como en otros mamíferos domésticos y silvestres (3). En algunos estudios recientes se ha sugerido que esta especie debería considerarse como un complejo de especies cuyos miembros, aunque morfológicamente idénticos, presentan variaciones genéticas que han permitido dividirla en, al menos, ocho genotipos (del A al H) (4).

Se ha demostrado que en la mayoría de los casos solamente los genotipos A y B están asociados con la infección en seres humanos (5), aunque se han reportado casos de personas infectadas con los genotipos específicos del perro, el ganado y el gato (6-9). Los genotipos del C al H parecen ser específicos de huésped, pues el C y el D se han reportado principalmente en cánidos (domésticos y silvestres), el E está fuertemente relacionado con animales ungulados, el F y el G han sido detectados en gatos y ratas, respectivamente (3), y el genotipo H fue descrito recientemente en focas grises y en una gaviota austral (10).

La caracterización directa de los quistes de *G. duodenalis* mediante la técnica de PCR se ha utilizado para esclarecer el papel zoonótico de

los diferentes genotipos (11). El genotipo A puede dividirse en, por lo menos, tres subgrupos: el primero (AI), detectado en seres humanos y en animales, presenta un mayor potencial zoonótico; el segundo (AII), observado principalmente en seres humanos, y el tercero (AIII), aparentemente específico de especie, ha sido aislado de ungulados silvestres (12).

El genotipo B comprende dos subgrupos reconocidos, el BIII y el BIV, que se han asociado principalmente a los seres humanos, aunque también existen algunos reportes en animales (13,14). Sin embargo, comparado con el A, este genotipo presenta un gran polimorfismo, que lleva a pensar en la existencia de muchos más subtipos (15).

Se plantea la posibilidad de que los genotipos A y B correspondan a dos especies diferentes, pues los estudios genómicos han permitido observar que solamente existe 77 % de identidad de nucleótidos y 78 % de identidad de aminoácidos en regiones codificadoras, lo que corrobora las diferencias biológicas encontradas en las infecciones experimentales, en el crecimiento en cultivos y en los estudios citogenéticos (16).

Para esclarecer el potencial zoonótico de las infecciones con *G. duodenalis* en animales, es importante determinar si los seres humanos y otros huéspedes son vulnerables ante infecciones con formas genéticamente idénticas del parásito (3,17).

Dado que en Colombia se sabe poco sobre este aspecto, y que específicamente en Ibagué no se han efectuado estudios sobre la diversidad molecular de *G. duodenalis*, en este trabajo se determinaron los genotipos a partir de los quistes recuperados de las heces de los niños del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar y caninos, empleando la técnica PCR-RFLP de los genes de la beta giardina (*bg*) y de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*).

Materiales y métodos

Muestras y análisis coproparasitológico

Se recolectaron muestras de niños en edad preescolar (1 a 5 años) y de otras personas adultas en

Correspondencia:

Gustavo Adolfo Vallejo, Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia
Telefax: (578) 277 0192
gvallejo@ut.edu.co

Recibido: 27/06/13; aceptado: 06/03/14

once hogares infantiles empresariales y comunales adscritos al Instituto Colombiano de Bienestar Familiar en Ibagué entre febrero y junio del 2009.

Se determinó el tamaño de la muestra con un nivel de confianza de 95 % ($Z=1,96$), un valor p de 0,5 y un margen de error de 10 % (0,05). A partir de una población de 2.157 niños en edad preescolar en los hogares del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, se hizo la corrección por finitud del tamaño de la muestra estableciendo un mínimo de 327 niños. Para la selección de la muestra, se utilizó un muestreo probabilístico aleatorio simple. La prevalencia de niños en edad preescolar con giardiasis, se determinó calculando intervalos de confianza (IC) mediante la distribución por aproximación normal.

Al inicio del proyecto se consultó si los niños que asistían a los hogares del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar en Ibagué tenían mascotas en sus viviendas, y se encontró que solamente una proporción muy baja las tenía. Por esta razón, se decidió tomar las muestras de los perros en centros veterinarios y refugios animales. Consecuentemente, no se determinó un tamaño de muestra que fuera representativa de la población de perros de Ibagué. El diagnóstico coproparasitológico de niños y de perros se hizo mediante tinción con lugol y observación directa con el microscopio.

Concentración de quistes y obtención de ácidos nucleicos

Las muestras positivas para quistes se procesaron mediante flotación de Faust (18). Los quistes se suspendieron en solución tampón de lisis (NaCl 5M, EDTA 0,5M, SDS 10 %) y para su ruptura se sometieron a cinco ciclos de congelamiento y descongelamiento en nitrógeno líquido (15 minutos), y en baño serológico a 65 °C (15 minutos), respectivamente. Luego se incubaron con proteinasa K (200 µg/ml) a 37 °C durante toda la noche. Los ácidos nucleicos se extrajeron con el estuche QIAamp DNA Mini Kit® de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras que presentaron problemas en la amplificación debido a la baja cantidad de ADN, se concentraron con acetato de sodio 3M y etanol absoluto, se suspendieron de nuevo en 20 µl de TE (Tris-EDTA, pH 8,0) y se almacenaron a 4 °C hasta su posterior análisis. Como cepa de referencia para la extracción del ADN y el posterior análisis por medio de PCR-RFLP, se utilizó la cepa MHOM/CO/04/G40 mantenida en cultivo, procedente del Instituto Nacional de Salud.

PCR-RFLP del gen de la beta giardina

Se amplificó un fragmento de 753 pb del gen de la beta giardina usando los iniciadores G7 (5'-AA GCCCGACGACCTCACCCGAGTGC-3') y G759 (5'-GAGGCCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3') y se obtuvo un fragmento de 384 pb con una segunda reacción de PCR semianidada utilizando los iniciadores G376 (5'-CATAACGACGCCATCG CGGCTCTCAGGAA-3') y G759 (5'-GAGGCCG CCCTGGATCTTCGAGACGAC-3') (5). La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente: solución tampón 1X de la polimerasa ADN Taq, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de la mezcla de dNTP, 20 pmol de cada iniciador, 1U de polimerasa ADN Taq y 2 µl de ADN, para un volumen final de 20 µl. La reacción se efectuó en un termociclador Minicycler con una temperatura de desnaturalización de 94 °C durante cinco minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, a 65 °C durante 30 segundos, a 72 °C durante un minuto y un ciclo de extensión final a 72 °C durante siete minutos. Además, se incluyeron un control de reacción (mezcla de reacción sin ADN) y un control positivo para *G. duodenalis* de ADN extraído de trofozoítos cultivados en medio TYIS-33 (cepa MHOM/CO/04/G40) cedida para estudios de investigación por el Instituto Nacional de Salud.

Las alícuotas de 10 µl de los productos de PCR se digirieron con *Hae* III (para el fragmento de 753pb) y con *Hha* I (para el fragmento de 384 pb), utilizando dos unidades de la enzima en un volumen final de 20 µl durante cuatro horas a 37 °C. Los productos de digestión esperados se muestran en el cuadro 1.

PCR-RFLP del gen de la glutamato deshidrogenasa

Un fragmento de 458 pb del gen de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*) se amplificó utilizando los iniciadores GDHeF: 5'-TCA ACGTYA AYC GYG GYT TCC GT-3' y GDHiR: 5'-GTT RTC CTT GCA CAT CTC C-3' y un segundo fragmento de 432 pb se obtuvo en una reacción de PCR semianidada, utilizando los iniciadores GDHiF: 5'-CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG-3' y GDHiR: 5'-GTT RTC CTT GCA CAT CTC C-3' (20). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una temperatura de desnaturalización de 94 °C durante cinco minutos, un ciclo de dos minutos a 94 °C, de un minuto a 56 °C, de dos minutos a 72 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, uno de 20 segundos a 56 °C, de 45 segundos a 72 °C y una extensión final a 72 °C durante siete minutos. La

Cuadro 1. Tamaño de los fragmentos esperados (pb) y perfil de las bandas para diagnóstico (pb) de los genotipos de *Giardia duodenalis* sometidos a PCR-RFLP a partir de un fragmento de 753 pb del gen de la beta giardina digerido con *Hae* III y un fragmento de 384 pb del mismo gen digerido con *Hha* I (5,19)

Genotipo	Tamaño del fragmento del gen amplificado	Enzima (número de sitios de restricción)	Tamaño de los fragmentos esperados (pb)	Perfil de las bandas para el diagnóstico de los genotipos (pb)
A	Beta giardina 753 pb	<i>Hae</i> III (4)	202, 201, 150, 126, 74	200, 200, 150, 130
B	Beta giardina 753 pb	<i>Hae</i> III (5)	202, 176, 150, 117, 84, 24	200, 180, 150, 120, 80
C	Beta giardina 753 pb	<i>Hae</i> III (6)	286, 150, 126, 102, 70, 15, 4	290, 150, 130, 100, 70
D	Beta giardina 753 pb	<i>Hae</i> III (3)	346, 286, 117, 4	350, 290, 120
A1	Beta giardina 384 pb	<i>Hha</i> I (3)	193, 104, 70, 17	190, 100, 70
All/AIII	Beta giardina 384 pb	<i>Hha</i> I (3)	210, 70, 70, 34	210, 70

Cuadro 2. Tamaño de los fragmentos esperados (pb) y perfil de las bandas para diagnóstico (pb) de los genotipos de *Giardia duodenalis* sometidos a PCR-RFLP de un fragmento de 432 pb del gen de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*) digerido con *Nla* IV y *Rsa* I (20)

Genotipo	Tamaño del fragmento del gen amplificado	Enzima (número de sitios de restricción)	Tamaño de los fragmentos esperados (pb)	Perfil de las bandas para el diagnóstico de los genotipos (pb)
A1	<i>gdh</i> 432 pb	<i>Nla</i> IV (5)	149, 123, 87, 39, 18,16	150, 120, 90
All	<i>gdh</i> 432 pb	<i>Nla</i> IV (6)	123, 87, 77, 72, 39, 16,18	120, 90, 80, 70
BIII	<i>gdh</i> 432 pb	<i>Nla</i> IV (2)	291, 123, 18	290, 120
BIV	<i>gdh</i> 432 pb	<i>Nla</i> IV (2)	291, 123, 18	290, 120
C	<i>gdh</i> 432 pb	<i>Nla</i> IV (4)	187, 123, 72, 31, 18	190, 120, 70
D	<i>gdh</i> 432 pb	<i>Nla</i> IV (3)	249, 126, 39, 18	250, 120
BIII	<i>gdh</i> 432 pb	<i>Rsa</i> I (2)	297, 133	300, 130
BIV	<i>gdh</i> 432 pb	<i>Rsa</i> I (1)	432	430

mezcla de la reacción de la PCR, los controles de la reacción, el control positivo y el termociclador, fueron los mismos empleados para la amplificación del gen de la beta giardina.

Las alícuotas de 10 µl del fragmento de 432 pb se digirieron con *Nla* IV (*Bsp* LI) y *Rsa* I, empleando dos unidades de la enzima en un volumen final de 20 µl durante tres horas a 37 °C. Los productos de digestión esperados se muestran en el cuadro 2.

Visualización de los productos de PCR-RFLP

Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 1 % coloreados con bromuro de etidio. Los productos de digestión se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 6 % y se colorearon con nitrato de plata o bromuro de etidio.

Aspectos éticos

En cada uno de los once hogares comunitarios del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar se efectuaron reuniones informativas sobre parasitismo intestinal, a las que asistieron los padres o responsables de los niños y las directoras de los hogares comunitarios, en las cuales se les invitó a participar voluntariamente en el estudio. Se les informó sobre los objetivos y beneficios del

estudio y, una vez obtenidos los consentimientos informados, se suministraron las cajas estériles para la recolección de las muestras fecales. Los resultados de los exámenes coprológicos se entregaron a las directoras de los hogares comunitarios con el fin de que enviaran a los niños a los centros de salud para someterlos a tratamiento en caso de ser positivos para *G. duodenalis* u otros parásitos intestinales.

El proyecto fue aprobado por el Comité Central de Investigaciones y Desarrollo Científico de la Universidad del Tolima después de verificar que los protocolos propuestos se ajustaran a las normas éticas para trabajos con la comunidad y con menores de edad, de conformidad con la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

Resultados

Prevalencia de *Giardia duodenalis*

Se analizaron 331 muestras fecales de niños, de las cuales, 174 correspondían a niños (52,57 %) y 157, a niñas (47,43 %). Treinta y siete muestras fueron positivas para *G. duodenalis*, 24 de niños (13,79 %; IC_{95%} 8,63-18,95 %) y 13 de niñas (8,28 %;

IC_{95%} 3,97-12,59 %); se estableció que para el 2009 la prevalencia de giardiosis en los niños del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar fue de 11,17 % (IC_{95%} 7,78-14,58 %) y que no hubo diferencias significativas entre sexos. Igualmente, se analizaron seis muestras de niños mayores de cinco años y de adultos, de las cuales, dos fueron positivas para el parásito.

Con relación a las muestras fecales de perros, se recolectaron 119 muestras, 26 de cachorros (21,85 %) y 93 de adultos (78,15 %); de estas, el 14,28 % (17/119) fue positivo para *G. duodenalis*.

Genotipificación mediante PCR-RFLP del gen de la beta giardina

Se logró la amplificación de los fragmentos de 753 pb y de 384 pb en la primera y segunda rondas de PCR en 22 de las 37 muestras positivas de niños y de un adulto.

Los perfiles de restricción de *Hae III* a partir del fragmento de 753 pb de la beta giardina, permitieron discriminar los genotipos A, B, C y D (figura 1). Por otro lado, los perfiles de restricción de *Hha I* a partir del fragmento de 384 pb, permitieron discriminar los genotipos AI, AII y AIII (figura 2). La cepa de referencia MHOM/CO/04/G40 de *G. duodenalis*, cedida por el Instituto Nacional de Salud, correspondió al genotipo AI de acuerdo con el perfil de restricción descrito por

Cacciò, *et al.* (5). El tamaño de los fragmentos de restricción esperados se muestra en el cuadro 1. Se designó un perfil de diagnóstico para cada enzima redondeando el tamaño de los fragmentos para simplificar el análisis de los geles. Los fragmentos de menos de 50 pb no se incluyeron, dado que no migran fuera del gel y porque los genotipos se pueden distinguir sin necesidad de analizar las bandas de menos de 50 pb, según los reportes de Cacciò, *et al.* (5), Lebbad, *et al.* (19) y Read, *et al.* (20).

Entre los aislamientos humanos, 11/23 (47,82 %) correspondieron al genotipo A (subgrupo AII /AIII) y 12/23 (52,17 %) presentaron el perfil del genotipo B (figuras 1 y 2).

Del total de las muestras de origen canino obtenidas de la unidad de refugio animal o coso municipal y del Centro Veterinario de la Asociación Ibagüereña Protectora de Animales, se pudo hacer la genotipificación de 3/17 (17,84 %) de las muestras positivas, y se encontraron los genotipos específicos de huésped C (1/3) y D (2/3) (figura 1).

Genotipificación mediante PCR-RFLP del gen de la glutamato deshidrogenasa

El gen *gdh* se amplificó en 20/37 (54,05 %) de las muestras fecales positivas para *G. duodenalis* tomadas de niños en edad preescolar, de un niño de edad desconocida y de un adulto.

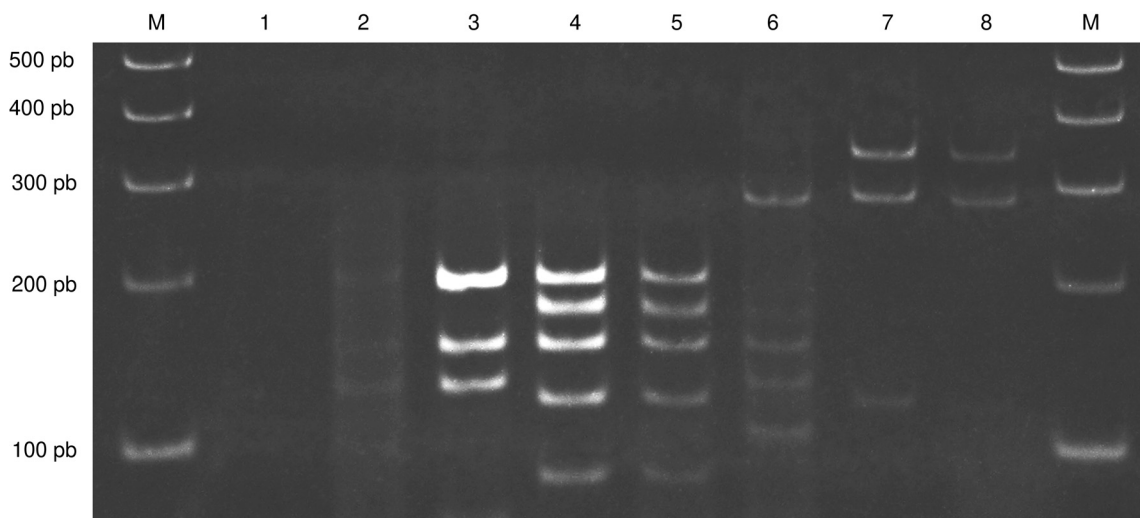


Figura 1. Gel de poliacrilamida al 6 % teñido con bromuro de etidio que muestra los fragmentos de restricción del producto de 753 pb del gen de la beta giardina con la enzima de restricción *Hae III*

M: marcador de tamaño molecular de 100 pb; 1: control de reacción; 2: cepa de referencia MHOM/CO/04/G40 (genotipo A: 200, 150, 130 pb); 3: H292 (genotipo A: 200, 150, 130 pb); 4: H018 (genotipo B: 200, 180, 150, 120, 80 pb); 5: H355 (genotipo B: 200, 180, 150, 120, 80 pb); 6: perro 113 (genotipo C: 290, 150, 130, 100 pb); 7: perro 17 (genotipo D: 350, 290, 120 pb); 8: perro 16 (genotipo D: 350, 290, 120 pb)

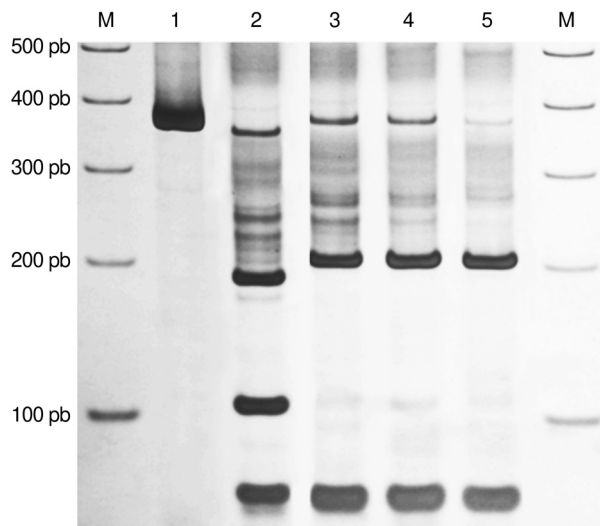


Figura 2. Gel de poliacrilamida al 6 % teñido con nitrato de plata que muestra los fragmentos de restricción del producto de 384 pb del gen de la beta giardina con la enzima de restricción *Hha* I

M: marcador de tamaño molecular de 100 pb; **1:** control sin digerir; **2:** cepa de referencia MHOM/CO/04/G40 (genotipo AI: 190, 100, 70 pb); **3-5:** aislamientos de seres humanos (genotipo AII / AIII: 210, 70, 70 pb)

Los perfiles de restricción de la *Nla* IV a partir del fragmento de 432 pb de la glutamato deshidrogenasa, permitieron discriminar los genotipos AI, AII, B, C y D (figura 3). Utilizando esta estrategia, la cepa de referencia MHOM/CO/04/G40 de *G.*

duodenalis, cedida por el Instituto Nacional de Salud, correspondió al genotipo AI, de acuerdo con el perfil de restricción descrito por Read, et al. (20). Por otro lado, los perfiles de restricción de la *Rsa* Ia a partir del fragmento de 432 pb, permitieron discriminar los genotipos BIII y BIV (figura 4). El tamaño de los fragmentos de restricción esperados se muestra en el cuadro 2. Se designó un perfil de diagnóstico para cada enzima redondeando el tamaño de los fragmentos para simplificar el análisis de los geles. Los fragmentos de menos de 50 pb no se incluyeron en el análisis dado que no migran fuera del gel y porque, de conformidad con los reportes de Cacciò, et al. (5) y de Read, et al., los genotipos de *G. duodenalis* se pueden distinguir sin necesidad de analizar las bandas de menos de 50 pb (20).

Entre los aislamientos de humanos, 10/22 (45,45 %) correspondieron al genotipo A (subgrupo AII), y 12/22 (54,55 %), al genotipo B (cuatro al BIII, dos al BIV, cinco a la mezcla de BIII y BIV y uno que no se pudo determinar) (figuras 3 y 4). Los genotipos A y B se distribuyeron equitativamente entre niños y niñas; el único adulto, una mujer, presentó el genotipo B (cuadro 3).

Se hizo la genotipificación de 4/17 muestras fecales de perros de los centros veterinarios ya mencionados (figura 3), en las cuales se encontraron los genotipos específicos del huésped C (2/4) y D (2/4).

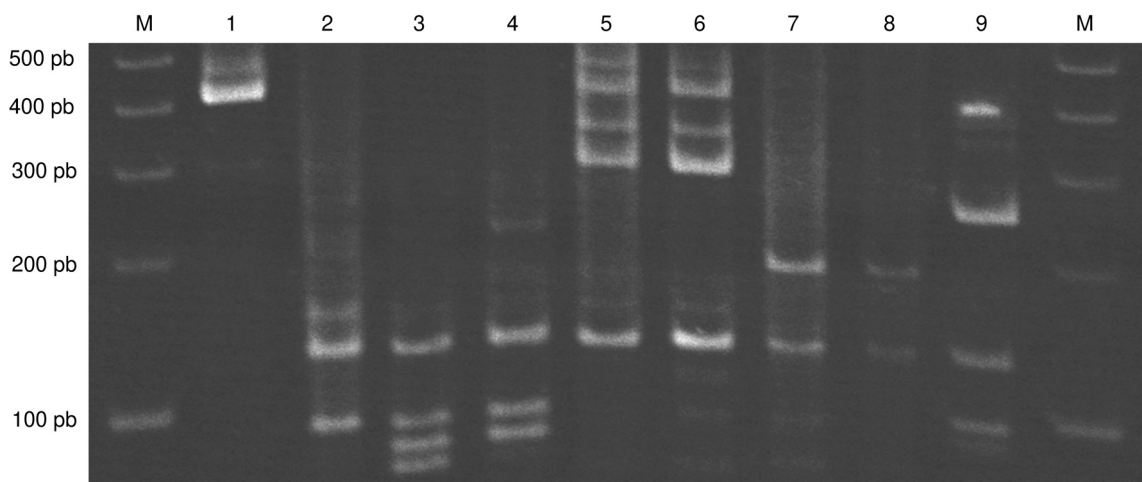


Figura 3. Gel de poliacrilamida al 6 % teñido con bromuro de etidio que muestra los fragmentos de restricción del producto de 432 pb del gen de la glutamato deshidrogenasa con la enzima de restricción *Nla* IV

M: marcador de tamaño molecular de 100 pb; **1:** control sin digerir; **2:** cepa de referencia MHOM/CO/04/G40 (genotipo AI: 150, 120, 90 pb); **3:** H292 (genotipo AII: 120, 90, 80, 70 pb); **4:** H323 (genotipo AII: 120, 90, 80, 70); **5:** H018 (genotipo B: 290, 120 pb; las bandas de más de 290 pb constituyen productos de digestión parcial); **6:** H355 (genotipo B: 290, 120 pb; las bandas de más de 290 pb constituyen productos de digestión parcial); **7:** perro 113 (genotipo C: 190, 120, 70 pb); **8:** perro 20 (genotipo C: 190, 120, 70 pb); **9:** perro 17 (genotipo D: 250, 120 pb)

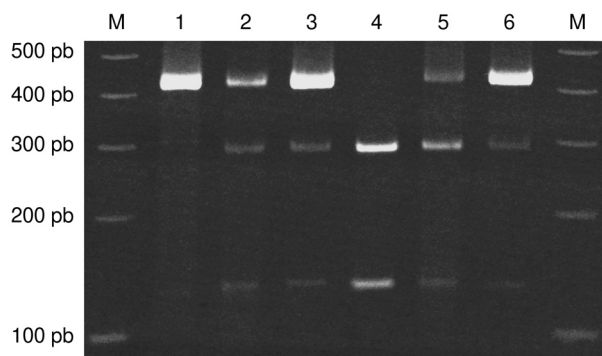


Figura 4. Gel de poliacrilamida al 6 % teñido con bromuro de etidio que muestra los fragmentos de restricción del producto de 432 pb del gen de la glutamato deshidrogenasa con la enzima de restricción *Rsa* I

M: marcador de tamaño molecular de 100 pb; **1:** control sin digerir, 432 pb; **2:** H227 (mezcla de BIII y BIV); **3:** H275 (mezcla de BIII y BIV); **4:** H159 (genotipo BIII: 300, 130 pb); **5:** H004 (mezcla de BIII y BIV); **6:** H355 (mezcla de BIII y BIV)

Discusión

Los estudios de prevalencia de giardiasis en Colombia demuestran que las condiciones higiénicas están estrechamente relacionadas con la persistencia del protozoario. En el 2002 se reportó en Armenia una prevalencia de 60,4 % en niños

afectados por el terremoto de ese año que habitaban albergues temporales (21). Años más tarde, en esa misma ciudad se reportó que la prevalencia había descendido a 13 % en niños que tenían mejores condiciones de estudio y vivienda (22). En el último estudio sobre parasitismo intestinal en niños llevado a cabo en Ibagué (1988 a 1989), se reportó una prevalencia de 41,4 % de *G. duodenalis* (23). No se encontraron registros sobre el tema de los siguientes 20 años, por lo cual el presente trabajo brinda la información más reciente que se tiene sobre giardiasis en preescolares entre 1 y 5 años de edad.

La prevalencia de giardiasis encontrada en los 331 niños en edad preescolar incluidos en la muestra de este trabajo fue de 11,17 % (IC_{95%} 7,78-14,58), considerablemente inferior a la registrada hace 20 años (23). Esto podría indicar que las condiciones higiénico-sanitarias han mejorado, así como el control y el tratamiento de esta parasitosis. De acuerdo con Thompson (24) y Santos, *et al.*, (25) la alta prevalencia en hogares infantiles sugiere un patrón similar al observado en infecciones entéricas bacterianas, las cuales aparecen en un niño, se difunden rápidamente y permanecen en el ambiente como fuentes de infección.

Cuadro 3. Genotipos de *Giardia duodenalis* determinados mediante PCR-RFLP de los genes de la beta giardina y la glutamato deshidrogenasa

Código aislado	Huésped	Sexo	Edad (años)	Genotipo <i>bg</i>	Genotipo <i>gdh</i>
H004	Humano	M	1	B	BIII-BIV
H018	Humano	F	2	B	BIII
H022	Humano	F	2	All	All
H033	Humano	F	2	B	BIII
H050	Humano	M	2	B	BIII-BIV
H055	Humano	M	2	B	B
H068	Humano	M	2	B	BIII
H101	Humano	F	3	All	All
H104	Humano	F	3	All	All
H159	Humano	M	3	B	BIII
H170	Humano	M	3	B	BIV
H186	Humano	M	3	All	All
H195	Humano	M	3	All	All
H227	Humano	F	4	B	BIII-BIV
H246	Humano	F	4	B	BIV
H275	Humano	M	4	B	BIII-BIV
H292	Humano	M	4	All	All
H308	Humano	M	4	All	All
H323	Humano	M	4	All	All
H326	Humano	M	4	All	All
H342	Humano	M	ND	All	All
H355	Humano	F	Adulto	B	BIII-BIV
Perro 16	Perro	ND	Cachorro	D	D
Perro 17	Perro	ND	Cachorro	D	D
Perro 20	Perro	ND	Cachorro	ND	C
Perro 113	Perro	ND	Adulto	C	C

ND: no determinado

Al comparar los datos con los de otras naciones de Suramérica, la prevalencia de infección registrada en el presente trabajo resultó inferior a la reportada en países como Brasil en 1991 (26) y Venezuela en el 2007 (27), con valores entre 27,7 y 26,73 %, respectivamente. En la mayoría de los hogares del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar analizados en Ibagué (10/11), siempre se encontró, al menos, a un niño con giardiosis, sin importar su estrato o ubicación, lo cual indica que las fuentes de infección del parásito se encuentran dispersas en la ciudad.

La prevalencia de giardiosis en perros fue de 14,28 %, inferior a lo que se ha reportado en países desarrollados como Italia (20,5 %) (28) y Bélgica (43,9 %) en perros mantenidos en condiciones de hacinamiento (29). En América Latina, en algunos estudios de perros domésticos se encontraron prevalencias menores a las reportadas en nuestro trabajo, que fluctuaban entre 0,9 % en Huila, Colombia, (30) y 9,3 % en Perú (31).

La caracterización del parásito mediante PCR fue exitosa en 58,97 % (23/39) de las muestras humanas positivas para *G. duodenalis*; esta disminución en la sensibilidad de la PCR con respecto al método parasitológico pudo deberse a que los blancos de amplificación eran de copia única, al bajo número de quistes o a la presencia de inhibidores de la PCR debida a las características de las muestras.

El análisis de los perfiles de RFLP para ambos genes reveló que las muestras de los niños se agruparon dentro de los genotipos zoonóticos A (11/23=47,83 %) y B (12/23=52,17 %). Este resultado concuerda con lo observado en otros países americanos, como Nicaragua, Brasil, Perú y Argentina (19,26,31,32), en donde se han encontrado también los dos genotipos circulando entre los aislamientos provenientes de las personas analizadas, con valores equiparables a los hallados en Cuba, con nueve aislamientos del genotipo A (45 %) y 11 del genotipo B (55 %) (33).

No obstante, los resultados encontrados en este estudio contrastan con la revisión hecha por Torres, *et al.* (34) quienes reportaron que México y Colombia eran los únicos países de América en los cuales no se había encontrado el genotipo B en infecciones en seres humanos, debido a que en el único estudio de análisis genético de aislamientos de *G. duodenalis* mediante RAPD publicado en el país se reportaba la presencia de aislamientos del genotipo A (35). Por otra parte, los reportes sobre la genotipificación de aislamientos de *G.*

duodenalis de muestras humanas provenientes de Risaralda y Quindío, confirman la presencia de ambos genotipos circulando en el ambiente (A: 84,4 % y B: 4,4 %) (Lora-Suárez, *et al.* La genotipificación directa de los aislamientos de *Giardia duodenalis* por PCR [reacción en cadena de la polimerasa] específico para grupos A y B en Colombia. Memorias, XIV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Biomédica. 2009;29(Supl.1):368-9).

Todas las muestras pertenecientes al genotipo A se agruparon en el subgenotipo AII/AIII (subgrupos diferenciables solo por secuenciación) para *bg* o AII para *gdh*, el cual es más frecuente que el subgrupo AI y está relacionado con aislamientos de muestras de seres humanos (14). Este subgrupo también se halló en todos los aislamientos del genotipo A en Nicaragua y Argentina (19,32), en contraste con lo reportado en Brasil, donde las muestras positivas para el genotipo A pertenecían al subgrupo AI (26).

De acuerdo con los resultados determinados solamente mediante genotipificación con el gen *gdh*, los aislamientos que presentaron el perfil característico del genotipo B se agruparon en los subgrupos BIII (4/12), BIV (2/12) y en la mezcla del BIII y BIV (5/12), lo cual coincide con otros estudios que reportan frecuencias variables en ambos subgrupos. Además, aunque el genotipo B se ha encontrado en algunos animales silvestres y en bovinos, se ha asociado con mayor frecuencia a infecciones en seres humanos (14).

Los genotipos A y B se encontraron con frecuencias de distribución similares según el sexo y la edad de los niños estudiados. Durante nuestro estudio no se tuvo en cuenta la sintomatología del paciente, por lo cual no se pudo hacer una correlación entre el genotipo y las manifestaciones clínicas, como sí lo han hecho otros autores (36,37).

De las muestras positivas para *G. duodenalis* tomadas en los perros, se hizo la genotipificación de 4/17 (23,53 %), y se encontró que estas muestras pertenecían a los genotipos C y D específicos de huésped. Estos resultados difieren de lo observado en la mayoría de los estudios de genotipificación de aislamientos de perros en América, en 60 % de los cuales se reporta la presencia del genotipo A, en 10 %, la del genotipo B, y solo en 30 %, los genotipos específicos de huésped C y D (34).

El hallazgo de estos genotipos específicos de huésped en nuestro estudio puede deberse al tipo de perros analizados, los cuales se encontraban

hacinados en refugios y centros de protección de animales. Ya se ha reportado que cuando los perros están agrupados, como sucede en las perreras, es más frecuente la transmisión directa entre los perros y, por lo tanto, predominan los genotipos adaptados a tal tipo de huésped. Por el contrario, en los cachorros domésticos hay una menor probabilidad de transmisión de perro a perro y las infecciones con el genotipo A son más frecuentes (38).

Estos resultados difieren de los obtenidos en Quindío y Risaralda (Lora-Suárez, *et al.* Genotipificación directa de los aislamientos de *G. duodenalis* por PCR [reacción en cadena de la polimerasa] específico para grupos A y B en Colombia. Memorias XIV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Biomédica. 2009;29(Supl.1):368-9). Estos autores encontraron el genotipo A (86,1 %) tanto en las muestras de *Giardia* tomadas de seres humanos como de animales domésticos (perro y gato), lo cual muestra una diferencia en la distribución de genotipos en Colombia e indica un posible riesgo zoonótico de los animales domésticos en estos departamentos que presentan el genotipo zoonótico AI.

La utilización de la técnica de PCR-RFLP de dos genes diferentes y el hecho de que la identificación de los fragmentos de restricción fue compatible con los fragmentos esperados de los genotipos reportados por Cacciò, *et al.* (5), Lebbad, *et al.* (19) y Read, *et al.* (20), apoyan en su conjunto la validez de los resultados del presente trabajo, en el cual se observó que en los hogares comunitarios del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar de Ibagué predominó durante el estudio un ciclo de transmisión de persona a persona, pues se encontraron los genotipos AI y B que tienen baja frecuencia en animales. Por otro lado, no fue posible confirmar la participación de los perros en la transmisión de *G. duodenalis* a los seres humanos porque los genotipos (C y D) específicos de perros se detectaron en cuatro individuos procedentes de perreras y no en perros domésticos.

Por las razones mencionadas, en Ibagué y en otras regiones del país, se recomienda hacer estudios de prevalencia y de genotipificación de *G. duodenalis* en niños y animales domésticos que estén en contacto, para determinar si existe transmisión directa entre estos y así contribuir al conocimiento del papel que juegan los animales como reservorios potenciales de los genotipos zoonóticos de este parásito. Además de la genotipificación a partir de quistes

de *G. duodenalis*, también es importante hacer nuevos aislamientos en cultivos para identificarlos por secuenciación de los genes de la beta giardina (*bg*), la glutamato deshidrogenasa (*gdh*) y otros, lo que permitiría organizar una genoteca de los diferentes genotipos de *G. duodenalis* de origen humano o animal que circulan en el país.

Agradecimientos

Al Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, seccional Ibagué, así como a los donantes, las madres comunitarias y los veterinarios que colaboraron en la recolección de las muestras.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos no haber tenido conflictos de intereses durante el desarrollo y la publicación de este trabajo.

Financiación

Este trabajo fue financiado por el Fondo de Investigaciones, proyecto No. 40207, y por la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima.

Referencias

1. **Botero D, Restrepo M.** Parasitosis humanas, Cuarta edición. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2004.
2. **World Health Organization.** The World Health Report 1996. Fighting disease, fostering development. Geneva: World Health Organization; 1996.
3. **Cacciò SM, Ryan U.** Molecular epidemiology of giardiasis. Mol Biochem Parasitol. 2008;160:75-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.04.006>
4. **Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, Botero-Klieven S, Anderson JO, Svenungsson B, et al.** Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. PLOS Negl Trop Dis. 2011;5:1-10. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001262>
5. **Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E.** Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int J Parasitol. 2002;32:1023-30. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00068-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00068-1)
6. **Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM.** Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. Acta Trop. 2007;102:92-9.
7. **Foronda P, Barges MD, Abreu-Acosta N, Periago MV, Valero MA, Valladares B, et al.** Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. Parasitol Res. 2008;103:1177-81. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-008-1113-2>
8. **Traub R, Inpankaew T, Reid SA, Sutthikornchai C, Sukthana Y, Robertson ID, et al.** Transmission cycles

- of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in temple communities in Bangkok – A critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Trop.* 2009;111:125-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.03.006>
9. **Soliman RH, Fuentes I, Rubio JM.** Identification of a novel assemblage B subgenotype and a zoonotic assemblage C in human isolates of *Giardia intestinalis* in Egypt. *Parasitol Inter.* 2011;60:507-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.09.006>
 10. **Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML.** The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Inter J Parasitol.* 2010;40:1063-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.02.015>
 11. **Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D; Cacciò SM.** Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Inter J Parasitol.* 2005;35:207-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.022>
 12. **Cacciò SM, Beck R, Almeida A, Bajer A, Pozio E.** Identification of *Giardia* species and *Giardia duodenalis* assemblages by sequence analysis of the 5.8S rDNA gene and internal transcribed spacers. *Parasitology.* 2010;137:919-25. <http://dx.doi.org/10.1017/S003118200999179X>
 13. **Thompson RC.** The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol.* 2004;126:15-35.
 14. **Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen J, ZOOPNET network and partners.** Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLOS Negl Trop Dis.* 2009;3:1-12. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000558>
 15. **Feng Y, Xiao L.** Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24:110-40. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00033-10>
 16. **Jerslöm-Hultqvist J, Ankarklev J, Svärd SG.** Is human giardiasis caused by two different *Giardia* species? *Gut Microbes.* 2010;1:379-82. <http://dx.doi.org/10.4161/gmic.1.6.13608>
 17. **Thompson RC, Palmer CS, O'Handley R.** The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J.* 2008;177:18-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.09.022>
 18. **Faust EC, D'Antoni JS, Odon V, Miller MJ, Peres C, Sawitz W, et al.** A critical study of clinical laboratory techniques for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. *Am J Trop Med Hyg.* 1938;18:169-83.
 19. **Lebbad M, Ankarklev J, Téllez A, Leiva B, Andersson JO, Svärd S.** Dominance of *Giardia* assemblage B in León, Nicaragua. *Acta Trop.* 2008;106:44-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.01.004>
 20. **Read CM, Monis PT, Thompson RC.** Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol.* 2004;4:125-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2004.02.001>
 21. **Lora-Suárez F, Marín-Vásquez C, Loango N, Gallego M, Torres E, González MM, et al.** Giardiasis in children living in post-earthquake camps from Armenia (Colombia). *BMC Public Health.* 2002;2:5. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-2-5>
 22. **Giraldo-Gómez JM, Lora F, Henao LH, Mejía S, Gómez-Marín JE.** Prevalencia de giardiasis y parásitos intestinales en preescolares de hogares atendidos en un programa estatal en Armenia, Colombia. *Rev Salud Pública.* 2005;7:327-38. <http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642005000300008>
 23. **Trujillo de Vallejo F, Vargas-Bonilla N, Vallejo GA.** Parasitismo intestinal y desnutrición en lactantes y preescolares de estrato social bajo en Ibagué-Tolima. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas.* 1991;5:64-75.
 24. **Thompson RC.** Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol.* 2000;30:1259-67. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00127-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00127-2)
 25. **Santos CK, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, et al.** Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in Southeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106:473-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.05.011>
 26. **Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, Brandão 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;102:10-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.02.010>
 27. **Rivero de RZ, Maldonado A, Bracho A, Castellanos M, Torres Y, Costa-León L, et al.** Prevalencia de enteroparásitos, rotavirus y adenovirus en niños aparentemente sanos. *Kasmera.* 2009;37:62-73.
 28. **Scaramozzino P, Di Cave D, Berrilli F, D'Orazi C, Spaziani A, Mazzanti S, et al.** A study of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting kennelled dogs. *Vet J.* 2009;182:231-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.07.003>
 29. **Claerebout E, Casaert S, Dalemans AC, De Wilde N, Levecke V, Vercruyse J, et al.** *Giardia* and other intestinal parasites in different dog populations in Northern Belgium. *Vet Parasitol.* 2009;161:41-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.024>
 30. **Abril A, Penagos JA.** Determinación de parásitos gastrointestinales potencialmente zoonóticos en caninos de cinco municipios del departamento del Huila y riesgos para la salud pública (tesis). Bogotá: Universidad de la Salle; 2004.
 31. **Araujo W, Chávez A, Casas E, Falcón N.** Prevalencia de *Giardia* sp. en *Canis familiaris* de los distritos de la provincia constitucional del Callao. *Rev Inv Vet Perú.* 2004;15:145-50.
 32. **Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA.** First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:98-103. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000100015>
 33. **Pelayo I, Núñez FA, Rojas L, Furuseth E, Gjerde B, Wilke H, et al.** *Giardia* infections in Cuban children: The

- genotypes circulating in a rural population. *Ann Trop Med Parasitol.* 2008;102:585-95. <http://dx.doi.org/10.1179/136485908X355247>
34. **Torres G, Zapata M, Restrepo M, Ríos L.** Investigación científica sobre genotipificación y distribución de *Giardia intestinalis* en humanos y caninos de América. *Salud Uninorte.* 2011;27:49-62.
 35. **Ravid Z, Duque S, Arévalo A, Nicholls RS, Wasserman M.** Genetic diversity of *Giardia intestinalis* populations in Colombia. *Biomédica.* 2007;27:37-41.
 36. **Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC.** Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Inter J Parasitol.* 2002;32:229-31. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00340-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00340-X)
 37. **Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, et al.** *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102:718-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.002>
 38. **Feng Y, Xiao L.** Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24:110-40. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00033-10>