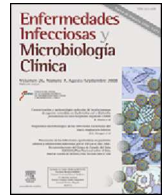


Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Caracterización genética por reacción en cadena de la polimerasa de *Giardia intestinalis* en muestras de humanos y perros del Caribe colombiano

Bárbara Arroyo-Salgado^{a,*}, Yaleyvis Buelvas-Montes^b,
Vivian Villalba-Vizcaíno^c y Octavio Salomón-Arzuza^b

^a Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia

^b Grupo de Microbiología Clínica y Ambiental, Facultad de Biología, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia

^c Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 27 de agosto de 2012

Aceptado el 16 de julio de 2013

On-line el 18 de octubre de 2013

Palabras clave:

Zoonosis

Giardiasis

Protozoarios

Genotipos

Giardia sp.

R E S U M E N

Introducción: *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*) es un protozooario causante de enfermedad diarreica y síndrome de malabsorción en humanos y otros mamíferos. Presenta alta diversidad genética evidenciada en el reconocimiento de 7 genotipos (A-G). Los genotipos A y B están comúnmente asociados a humanos y a animales domésticos como perros. El objetivo de este trabajo fue realizar la primera caracterización genética preliminar de *G. intestinalis* en muestras fecales de humanos y perros de 2 ciudades de la costa Caribe colombiana.

Métodos: Para la toma de muestras humanas fueron seleccionadas algunas zonas con altas cifras de enfermedad diarreica aguda, recolectando muestras de heces en niños menores de 7 años con diagnóstico coprológico positivo para *G. intestinalis*. Las muestras de heces de perros fueron recolectadas en las zonas donde residían los niños incluidos en el estudio. Los quistes fueron purificados por gradiente de sacarosa y posteriormente se obtuvo el ADN por extracción con solventes orgánicos. La caracterización molecular se realizó amplificando el gen triosa fosfato isomerasa (*tpi*) por PCR-semianidada.

Resultados: Fueron obtenidas 202 en total; de estas, 111 (13 de perros y 98 de niños) fueron positivas en el examen coprológico. La distribución de los genotipos en las muestras positivas fue: el 5,1% pertenecieron al genotipo A presente solo en humanos y el 92,3% al genotipo B. El genotipo B tuvo presencia en humanos y animales.

Conclusiones: El genotipo más frecuente tanto en muestras de humanos como animales fue el B, con lo cual podría especularse un ciclo de transmisión zoonótica.

© 2012 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Genetic profiling of *Giardia intestinalis* by polymerase chain in human and dogs samples of Colombian Caribbean Coast

A B S T R A C T

Introduction: *Giardia intestinalis* (*G. Intestinalis*) is a protozoan that causes diarrheal disease and malabsorption syndrome in humans and other mammals. It presents a high genetic diversity evidenced in the recognition of 7 genotypes (A-G). Genotypes A and B are commonly associated to humans and domestic animals such as dogs. The aim of this study was to conduct a preliminary genetic characterization of *G. intestinalis* in humans and dogs from two cities on the Caribbean coast of Colombia.

Methods: Sampling areas were selected according to the highest numbers of acute diarrheal disease. Stool samples were collected from children under 7 years old, with positive medical tests for *G. intestinalis*. Cysts were purified by sucrose gradient and DNA samples were isolated by extraction with organic solvents. Molecular characterization was performed by amplifying the gene triose phosphate isomerase (*tpi*) by using a semi-nested PCR.

Keywords:

Zoonosis

Giardiasis

Protozoa

Genotypes

Giardia sp.

* Autora para correspondencia.

Correo electrónico: barroyos@unicartagena.edu.co (B. Arroyo-Salgado).

Results: A total of 202 samples of DNA were obtained; of these, 111 were positive in coproparasitological analysis (13 dogs and 98 children). Genotype distribution in positive samples was: 5.1% belonged to genotype A and 92.3% to genotype B. Genotype B was present in humans and animals.

Conclusions: The most common genotype in both human and animal samples was genotype B, suggesting a zoonotic transmission cycle.

© 2012 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Giardia intestinalis (*G. intestinalis*) es un parásito intestinal flagelado que tiene la capacidad de infectar a una amplia diversidad de hospedadores. Tiene una distribución mundial y es el agente causal de la giardiasis, una de las enfermedades intestinales más comunes en los humanos^{1–3}. El análisis de esta parasitosis, utilizando genes específicos como marcadores moleculares, ha permitido determinar la alta variabilidad genética de *G. intestinalis*, estableciendo 7 genotipos (A–G) de los cuales los genotipos A y B están asociados con infecciones en humanos y otros mamíferos mientras que los restantes (C y G) muestran una especificidad elevada con el huésped (mamíferos no humanos)⁴.

La prevalencia de esta enfermedad es mayor en países de economías emergentes que en países industrializados y la Organización Mundial de la Salud estima que alrededor de 200 millones de personas de Asia, África y América Latina presentan giardiasis sintomática y cada año se diagnostican alrededor de 500.000 nuevos casos⁵. En Colombia, se estima que la frecuencia de giardiasis es aproximadamente del 28% en la población infantil, siendo esta la más afectada por el parásito⁶. A nivel del Caribe colombiano solo se conoce un registro de *G. intestinalis* reportado en el 2008 en el municipio Loma de Piedra, departamento de Bolívar. Este estudio reporta 67 casos que representan el 17% de la población en general, pero no se conoce el genotipo circulante⁷.

La infección por *Giardia* tiene un gran impacto en la salud pública dada la relación que existe entre la ocurrencia de esta parasitosis y los hábitos y condiciones socioeconómicos de las poblaciones afectadas. Adicionalmente, han sido reportados genotipos comunes infectando a animales domésticos y a humanos en la misma área geográfica, razón por la que se postula que estos genotipos tienen potencial zoonótico, sin embargo, no existe suficiente información al respecto. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue iniciar la identificación y caracterización genotípica de los parásitos en muestras de heces de niños y perros en 2 ciudades del Caribe colombiano.

Este estudio aporta información al conocimiento de la biología de la infección en el Caribe colombiano, actualmente muy escasa o inexistente. Este tamizaje facilitará el conocimiento de genotipos presentes en humanos y sus mascotas que puedan tener relación zoonótica, a la vez que contribuye al cumplimiento y mejora del plan territorial del departamento de Bolívar, Colombia.

Métodos

Este estudio fue realizado entre julio de 2008 y julio de 2009 en las ciudades de Cartagena de Indias y Sincelejo. Cartagena pertenece al departamento de Bolívar, norte de Colombia, posee 895.400 habitantes aproximadamente (censo DANE 2005) y está localizada a 10° 26' latitud norte–75° 33' longitud oeste y 2 m sobre el nivel del mar. Sincelejo es una ciudad del departamento de Sucre. Está ubicada al noroeste del país, en la Costa Caribe colombiana de 9° 18' latitud norte, 75° 23' latitud oeste y 213 m sobre el nivel del mar (fig. 1).

Inicialmente se realizó una encuesta epidemiológica, a partir de la cual se eligieron como sitios de muestreo las áreas de

Tabla 1

Número de muestras incluidas en el estudio y origen de procedencia

Ciudad	Muestras de <i>Canis familiaris</i>	Muestras de niños	Total
Sincelejo	25	46	71
Cartagena	79	52	131
Total	104	98	202

las ciudades que presentaron la mayor incidencia de quistes de *G. intestinalis*. La información y las muestras de materia fecal humana de niños menores de 7 años infectados fueron obtenidas del Centro de Atención Primaria de la Esperanza y del Hospital Infantil Napoleón Franco Pareja para la ciudad de Cartagena donde se tomaron 52 muestras de niños. El Hospital Regional de Sincelejo y el Centro de Salud la Campiña permitieron la obtención de 46 muestras de niños en la ciudad de Sincelejo. Se realizó una visita a las localidades de procedencia de los niños incluidos en el estudio, seleccionando los hogares que tuvieran perros como mascotas y se tomó la muestra de heces del animal; un total de 104 muestras fueron obtenidas en ambas ciudades (tabla 1). Las normas éticas para los humanos y los animales fueron aplicadas, y se obtuvo el consentimiento de los padres y propietarios de los perros para el uso de las muestras en el estudio.

Las muestras colectadas fueron almacenadas en formol tamponado para el análisis coprológico y molecular. Los quistes fueron purificados y se rompieron por el método de Polverino, con algunas modificaciones⁸.

El ADN genómico fue aislado utilizando la técnica de extracción con solventes orgánicos: fenol, cloroformo, alcohol isoamílico (25:24:1)⁹. La calidad y cantidad del ADN fueron verificadas con la lectura espectrofotométrica y electroforesis en geles de agarosa.

Para la amplificación del gen triosa fosfato isomerasa (*tpi*) de *G. intestinalis*, se realizaron 2 pruebas de PCR-semianidada, con cebadores específicos para los genotipos A y B^{10,11} más algunas modificaciones. Inicialmente se realizó una primera reacción con una mezcla de cebadores para amplificar simultáneamente los 2 genotipos usando un cóctel de reacción de buffer de PCR 1x, 3 mM Cl₂Mg, 0,25 mM de cada cebador en ambas direcciones, DMSO al 2,5% y 0,625 U/μl de Taq ADN polimerasa Techno Scientific® y 4 μl del ADN extraído de los quistes, con un volumen final de reacción de 25 μl. Las condiciones de la amplificación fueron desnaturalización a 94 °C por 4 min, seguida de 30 ciclos de temperatura iniciando con 94 °C (30 s), 52 °C (30 s) y 72 °C (60 s), con extensión final a 72 °C durante 10 min. La segunda PCR fue realizada con el fin de amplificar los genotipos de *G. intestinalis* por separado, empleando los cebadores específicos para cada genotipo con el mismo cóctel de reacción mencionado anteriormente. Para cada prueba fueron incluidos 2 controles negativos (agua destilada y ADN de *Entamoeba histolytica*) y un control positivo (ADN de la cepa universal WB Clon 6; donación del Doctor Moisés Wasserman del grupo de Investigación en Ciencias Básicas Bioquímicas de la Universidad Nacional de Colombia). Por último, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y una tinción con bromuro de etidio a una concentración de 5 μg/ml para comprobar la amplificación del gen de interés. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa Gradpha Prisma.

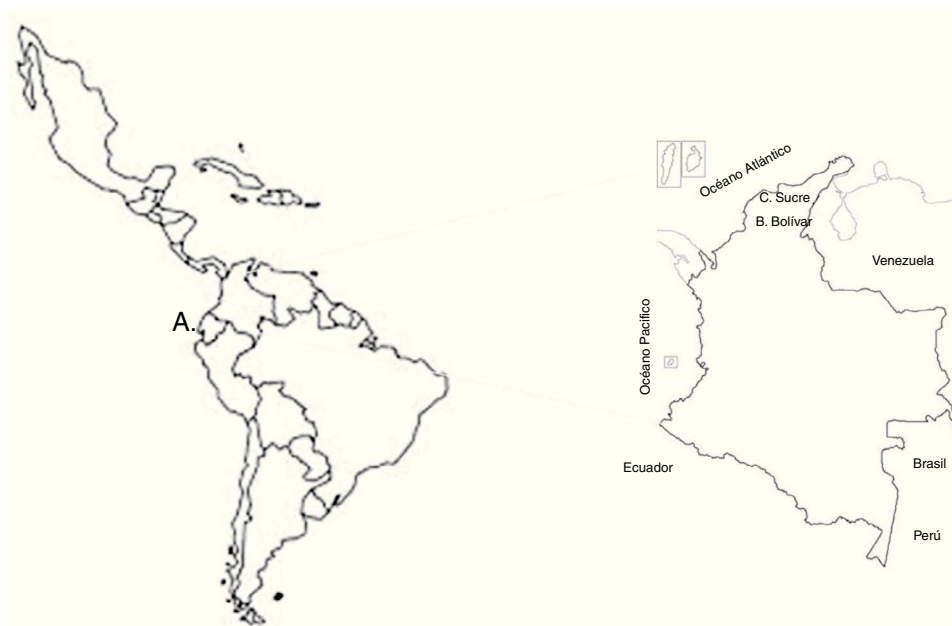


Figura 1. Mapa de Colombia que muestra la localización geográfica de zonas de muestreo. A. Suramérica B. Cartagena de Indias, Bolívar. C. Sincelejo, Sucre.

Resultados

Un total de 202 muestras de heces fueron recogidas, 98 de las cuales provenían de niños menores de 7 años, todas positivas para la presencia de *G. intestinalis*; y 104 provenían de perros que cohabitaban con los niños infectados, siendo positivas para el parásito solo 13 muestras. La prevalencia de *G. intestinalis* en perros fue del 11,9%.

A partir del ADN aislado de las muestras se lograron amplificar en total 65 muestras positivas, 61 de las cuales pertenecían a humanos y 4 a perros. Los resultados de la genotipificación del parásito utilizando el gen *tpi* mostraron que el 5,1% de las muestras tuvieron genotipo A, todas provenientes de humanos, y que el 92,3% de las muestras presentaron genotipo B, tanto en humanos como en perros (tabla 2).

Discusión

El conocer y entender los diferentes ciclos de vida de los parásitos que presentan algún tipo de relación zoonótica resulta de gran interés para crear y desarrollar estrategias de control eficaces. Una de las formas de conocer la epidemiología y transmisión de los parásitos es el estudio a nivel molecular de sus genotipos poblacionales.

Los estudios de caracterización genética de esta enfermedad han sido usados para evaluar el papel de los animales en la epidemiología de la infección humana, esclarecer el ciclo biológico del parásito, determinar los reservorios animales de *G. intestinalis* y desarrollar herramientas que permitan esclarecer la fuente de infección^{12,13}. Por ejemplo, se conoce que los quistes de *G. intestinalis* se transmiten de humanos a animales y de animales a humanos, lo que ha establecido una posible transmisión zoonótica entre ciertos genotipos como el A y el B; sin embargo, esta hipótesis ha sido debatida por muchos autores como Plutzer et al.¹⁴, mientras que otros han establecido que el riesgo zoonótico está presente con algunos genotipos específicos como el A^{15,16}.

A través de la caracterización molecular de *G. intestinalis* se han descrito múltiples estrategias con el fin de facilitar el diagnóstico efectivo del patógeno y aplicar así controles fitosanitarios

particulares para cada cepa. Las técnicas desarrolladas para la caracterización de *G. intestinalis* tienen en común algunos procedimientos generales como la purificación de los quistes^{5,17} y técnicas eficaces para la obtención de un ADN de quistes de calidad que permita una excelente amplificación. De forma general, el ADN de parásitos extraído de las muestras fecales ha sido difícil de amplificar debido a la presencia de un alto nivel de ADN no específico o a la cantidad de inhibidores tales como polen, azúcares, bilirrubina, sales biliares y detritos en general⁵. En nuestro estudio estos inconvenientes fueron superados utilizando el gradiente de sacarosa para la separación, purificación y concentración de quistes de *G. intestinalis* eliminando la mayoría de los detritos de las muestras y obteniéndose una buena cantidad de quistes, superando técnicas convencionales como la flotación con sulfato de cinc⁸. La extracción de ADN fue optimizada implementando un pretratamiento a los quistes de *G. intestinalis*, ciclos de congelación-descongelación y efecto mecánico con arena de mar; esto permitió una rotura de la pared quística del parásito^{5,18} y obtener un ADN con buena pureza, lo que hizo posible la amplificación del gen *tpi* de *G. Intestinalis*, logrando establecer la presencia de los genotipos A y B de *G. intestinalis* en el Caribe colombiano.

A pesar de que los datos reportados en la literatura en relación con la presencia de genotipos A y B en humanos y en perros son contradictorios, nuestros resultados muestran la presencia del genotipo A (5,1%) solo en humanos, mientras que el genotipo B se encuentra indistintamente en perros (30,7%) y humanos (59,1%), lo cual concuerda con otros estudios¹⁹. Estos resultados nos permiten especular que pudiera asociarse a un posible ciclo de transmisión zoonótica para el genotipo B, en el Caribe colombiano, sin embargo, teniendo en cuenta la limitación del número de muestras utilizado en este estudio para los perros, no podemos obviar la existencia de otras posibles vías de transmisión de este genotipo. Además de este hallazgo, la amplificación del genotipo B en las muestras de Cartagena y Sincelejo se constituyen en el primer registro del genotipo para el país, resultados que concuerdan con otros estudios realizados en América Latina, en países tales como Nicaragua, Argentina y Guatemala^{11,15,20}.

Estudios en humanos han revelado que el genotipo B presenta mayor especificidad por el huésped que el genotipo A, presentándose este último tanto en humanos como en perros en proporciones

Tabla 2Muestras positivas por coprología y distribución de genotipos A y B de *Giardia intestinalis* en muestras de humanos y *Canis familiaris*

Ciudad	Muestras positivas por coprología <i>Canis familiaris</i>	Genotipo		Muestras de niños	Positivas por coprología	Genotipo	
		A	B			A	B
Sincelejo	4	0	1	46	46	0	25
Cartagena	9	0	3	52	52	5	31
Total	13	0	4	98	98	5	56

similares. Según los datos obtenidos en esta investigación, en el Caribe colombiano el genotipo más frecuente es el B, lo cual concuerda con datos epidemiológicos encontrados en otros países como Holanda, Francia y Bangladesh^{16,21}. Sin embargo, estudios desarrollados en zonas de Cundinamarca, Boyacá y Amazonas mostraron una mayor frecuencia del genotipo A en humanos²².

Los datos obtenidos en este estudio permiten mostrar una prevalencia importante de *G. intestinalis* en nuestra región, lo cual representa un problema de salud pública por la amplia distribución del parásito y las deficientes técnicas de higiene, hábitos y condiciones socioeconómicas de nuestra población, por lo que se requieren estudios adicionales con diagnóstico molecular que incluya técnicas de fragmentos de restricción de longitud polimórfica y análisis de secuenciación para diferenciar minuciosamente los genotipos y subtipos del parásito que faciliten aclarar el potencial zoonótico de cada genotipo.

Financiación

Universidad de Cartagena. Facultad de Medicina. Departamento de Posgrado de la Facultad de Medicina. Maestría Microbiología.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A la Universidad de Cartagena, Centro de Atención Primaria de la Esperanza, Hospital Infantil Napoleón Franco Pareja Cartagena, Hospital Regional de Sincelejo y Centro de Salud la Campiña por la disponibilidad de las muestras de este proyecto.

Bibliografía

- Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev. 2001;14:447–75.
- 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.
- Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. Mol Biochem Parasitol. 2008;160:75–80.
- Xiao L, Fayer RF. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. Int J Parasitol. 2008;38:1239–59.
- Babaei Z, Oormazdi H, Rezaie S, Rezaeian M, Razmjou E. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. Exp Parasitol. 2011;128:159–62.
- 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.
- Agudelo López S, Gómez-Rodríguez L, Coronado X, Orozco A, Valencia Gutiérrez C, Restrepo Betancur L, et al. Prevalencia de parasitosis intestinales y factores asociados en un corregimiento de la costa atlántica colombiana. Rev Salud Pública. 2008;10:633–42.
- Polverino D, Molina NB, Minvielle MC, Lozano ME, Basualdo JA. Técnicas de purificación y ruptura de quistes de *Giardia* spp. Rev Arg Microbiol. 2004;36:97–100.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual. 5.^a ed. Spring C: Press HL; 2003.
- Amar C, Dear PH, Pedraza-Díaz S, Looker N, Linnane EJM. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. J Clin Microbiol. 2002;40:446–52.
- Molina N, Poverino D, Minvielle MJB. PCR amplification of triosephosphate isomerase gene of *Giardia lamblia* in formalin-fixed feces. Rev Latinoam Microbiol. 2007;49:6–11.
- Thompson RC. Giardiasis as a re-emerging disease and its zoonotic potential. Int J Parasitol. 2000;30:1259–67.
- 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.
- Plutzer J, Ongerth J, Karanisc P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions [revisión]. Int J Hyg Environ Health. 2010;213:321–33.
- Lebbad M, Ankarklev J, Tellez A, Leiva B, Andersson JO, Svard S. Dominance of *Giardia* assemblage B in Leon, Nicaragua. Acta Trop. 2008;106:44–53.
- Sprong H, Caccio S, van der Giessen J. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3:12.
- Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: Towards a taxonomic revision of the genus. Trends Parasitol. 2009;25:93–100.
- Hussein AI, Yamaguchi T, Nakamoto K, Iseki M, Tokoro M. Multiple-subgenotype infections of *Giardia intestinalis* detected in Palestinian clinical cases using a subcloning approach. Parasitol Int. 2009;58:258–62.
- Ballweber LR, Xiao L, Bowman DD, Kahn G, Cama VA. Giardiasis in dogs and cats: Update on epidemiology and public health significance. Trends Parasitol. 2010;26:180–9.
- Aldana GP, Clavel A, Cancinos de Orantes B, Buera BL. Identificación de genotipos de *Giardia duodenalis* en niños del área urbana de Guatemala. Rev Ibero-Latinoam Parasitol. 2011;70:25–8.
- Lalle M, Jimenez-Cardosa E, Caccio SM, Pozio E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. J Parasitol. 2005;91:203–5.
- Ravid Z, Duque S, Arévalo A, Nicholls R, Wasserman M. Genetic diversity of *Giardia intestinalis* populations in Colombia. Biomedica. 2007;27:34–41.