

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"**  
**CENTRO DE INVESTIGACIONES DIAGNÓSTICO Y**  
**REFERENCIA (CIDR)**

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**

**Aspectos epidemiológicos y relación de hallazgos moleculares  
con características clínicas en la giardiosis pediátrica.  
La Habana y Fomento, 2010-2013**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en  
Ciencias de la Salud**

**Autor: Lic. Luis Enrique Jerez Puebla, MSc.**

**La Habana, 2019**

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"**  
**CENTRO DE INVESTIGACIONES DIAGNÓSTICO Y  
REFERENCIA (CIDR)**  
**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**

**Aspectos epidemiológicos y relación de hallazgos moleculares  
con características clínicas en la giardiosis pediátrica.  
La Habana y Fomento, 2010-2013**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en  
Ciencias de la Salud**

**Autor: Lic. Luis Enrique Jerez Puebla, MSc.**

**Tutor: Dr. Fidel Ángel Núñez Fernández, DrC.**

**Asesores: Dr. Norbert Müller, DrC.**

**Dra. Lázara Rojas Rivero, DrC.**

**La Habana, 2019**

A mi madre y a la memoria de mi padre

La realización de esta tesis ha sido posible por la ayuda inestimable de muchas personas, las cuales desde un comienzo aportaron sus conocimientos, ayuda, deseos y soporte técnico para que el resultado de este trabajo fuera satisfactorio.

Gracias a mi tutor, Dr. Fidel Núñez, por su amistad, quien ha sido un paradigma en mi formación profesional y quien me ha guiado en el camino de la Ciencia.

Al Profesor Norbert Müller, excelente profesional y ser humano quien me acogió en la Universidad de Berna, y con el que tuve el honor de aprender de sus enseñanzas cada día.

A Dra. Lázara Rojas, por su confianza, ayuda y por ser ejemplo en las tareas que hace cada día para con todo el colectivo.

A Dra. Ana Montalvo, Dra. Hilda Hernández y Dra. Annia Alba, por su valioso ayuda a lo largo de todo el proceso de la Tesis, por sus importantes revisiones, sugerencias y apoyo en todo momento.

A Dr. Jorge Fraga Nodarse, ejemplar investigador, caracterizado por su modestia y excelencia en su trabajo, por sus importantes consideraciones y revisión del Documento de Tesis y siempre presto a ayudar y compartir su conocimiento.

A Dra. Belkis Galindo Santana, por su inestimable ayuda, preocupación y voluntad para que este documento y Tesis fuera exitosa.

A mis queridos profesores Raúl Cordoví, y Prof. Beltrán, y Prof. Carlos M. Finlay, con los que tuve el honor de compartir durante mi incorporación a la Sub dirección de Parasitología, y los cuales me han transmitido, sus experiencias, su cariño, amistad y consejos de la vida.

A Dra. Iraís Atencio Millán, sincera, noble, solidaria y humana persona, con la que unidos hemos llevado adelante el trabajo que se nos ha asignado. Por su sincera amistad en todo momento y por ser parte de este Resultado de la tesis.

A mis amigos y familia de IPK quienes han estado conmigo en el día a día del trabajo: Dra. Dora Ginorio, Dra. Elizabeht Sanler, Xiomara Castell, José Andrés González, Dra. Judith, Onelkis, Yanaika, Juan Luis, Edel, Carlos, Griselda, Pablo, Dr. Alexei Hernández, Laura, Yeisa y Yenisey Alfonso

A todos mis compañeros del Departamento de Parasitología, los cuales tenemos la importante misión de impulsar esta especialidad en nuestro país.

A la Dra. Isabel Martínez y Dra. Lucía Ayllón, por su amistad y por ser parte muy importante en los resultados obtenidos y a todo el colectivo de Parasitología del Hospital Pediátrico William Soler y al colectivo del Inhem que formó parte de esta investigación.

A Daniela Hayoz, Om Prakash, Pruthvi Iyengar, Isabel Hottlester, Jasmin Fallahi, Motiar, importantes amigos en mi estancia en Berna.

Al Departamento de Epidemiología, en especial al Dr. Manuel Díaz, Dr. Dickinson y Dr. Waldemar, por sus oportunas y valiosas sugerencias en todo momento. Al Departamento de Docencia, en especial a Dra. Clara Savón, Profesora Mariel Chao, Dra. Dennis Pérez y a Lazarito.

A Dra. Guadalupe Guzmán, quién ha hecho posible la integración entre los diferentes Departamentos de Investigación del IPK, y demostrado que en la Unión está La Fuerza.

**Y Muy en Especial:**

**A mi madre**, quien es el Resultado de mi desarrollo, de mis logros, por su infinito amor, ejemplo, constancia, nobleza, espíritu de lucha, valor y firmeza que me transmite cada día. Te quiero mucho.

**A la memoria de mi padre**, que sé, siempre me acompaña en cada momento.

**A mi familia**, por su afecto, cariño, y unidad, en especial a mi Tía Ana y Tío Rey.

**A todos mis amigos**, que son como familia igualmente

A todos los profesores que han tenido que ver con mi formación a lo largo de todos los niveles de enseñanza.

**A la Revolución Socialista Cubana**, que bajo la égida de nuestro Comandante en Jefe Fidel Castro Ruz, ha hecho posible todos los logros obtenidos.

**Al Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"**



## **ABREVIATURAS**

**5-NI:** 5- Nitroimidazol

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNr:** Ácido desoxirribonucleico ribosomal

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**ARNr:** Ácido ribonucleico ribosomal

**ATP:** adenosina trifosfato

**bg:**  $\beta$ -giardina

**dNTPs:** mezcla de desoxinucléotidos

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.

**ELISA:** Ensayo Inmunoenzimático sobre fase sólida

**FDA:** Siglas de la agencia reguladora de fármacos y alimentos en los Estados Unidos de Norteamérica. Del inglés, *Foods and Drugs Administration*

**gdh:** *Glutamato deshidrogenasa*

**HPD-WS:** Hospital Pediátrico Docente "William Soler"

**Ig:** Inmunoglobulina

**IGS-ADNr:** Secuencias intergénicas del ADNr

**IPK:** Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

**LNR-PI:** Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitismo Intestinal

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OR:** Oportunidad Relativa, razón de los productos cruzados, o razón de posibilidades. Del inglés *Odds Ratio*.

**ORF:** Marco de lectura

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PCR-RFLP:** Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción del producto amplificado mediante PCR



**PFOR:** Piruvato: Ferredoxina Óxido Reductasa

**RFLP:** Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción

**SDS:** Duodecil sulfato sódico.

**SSU-RNAr:** subunidad menor del ARNr

**TBE:** Tampón tris-borato-EDTA

**TE:** Solución de Tris-EDTA

**Th1:** Células T colaboradoras del tipo 1

**Th2:** Células T colaboradoras del tipo 2

***tpi:*** triosa fosfato isomerasa

**VSP:** Proteínas Variables de Superficie



## SÍNTESIS

*Giardia lamblia* representa uno de los parásitos intestinales más frecuentes en nuestro país, asociado principalmente con infecciones en niños. Se realizó un estudio de corte transversal en el periodo 2010-2013, con el objetivo de describir la infección de *G. lamblia*, en niños de La Habana y del municipio Fomento, y relacionar los resultados de la caracterización molecular de este protozoo intestinal mediante dos marcadores genéticos con variables clínicas recogidas en encuestas epidemiológicas. La infección por *G. lamblia* fue muy frecuente en los niños estudiados, con un riesgo incrementado en aquellos que tomaban agua no hervida y con tenencia de perros en el hogar. Los marcadores genéticos triosafosfato isomerasa (*tpi*) y las secuencias intergénicas del ADNr (IGS-ADNr) mostraron resultados idénticos de concordancia en la clasificación de los ensamblajes genéticos de *G. lamblia* y un mejor porcentaje de tipificación de las muestras de heces estudiadas. La identificación del ensamblaje B y de los sub ensamblajes AII y BIII de *G. lamblia* fue predominante en los niños infectados por este protozoo intestinal, en comparación con el ensamblaje A y mixto A+B y los sub ensamblajes AI y BIV. En los niños solo infectados con *G. lamblia* la infección por el ensamblaje genético B de *G. lamblia* estuvo asociado significativamente con diarrea o dolor abdominal o flatulencia, especialmente en niños menores de 5 años de edad.



<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>Pág</b>
1.1 Introducción	1
1.2 Hipótesis	5
1.3 Objetivos	5
1.3.1 Objetivo general	5
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 Novedad científica	6
1.5 Valor práctico	6
 <b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	
2.1 Antecedentes	7
2.2 Taxonomía	8
2.3 Agente etiológico	9
2.4 Ciclo de vida	10
2.4.1 Desenquistamiento	11
2.4.2 Enquistamiento	12
2.5 Epidemiología	13
2.6 Patogenia y fisiopatología	15
2.7 Inmunobiología de la infección por <i>G. lamblia</i>	17
2.8 Manifestaciones clínicas	19
2.9 Diagnóstico	20
2.9.1 Diagnóstico parasitológico	20
2.9.2 Inmunodiagnóstico	21
2.9.3 Diagnóstico molecular	22
2.10 Características generales de la genética molecular de <i>Giardia lamblia</i>	24
2.10.1 Genoma	24
2.10.2 Ensamblajes genéticos	25
2.10.3 Marcadores genéticos utilizados en los estudios moleculares en <i>G. lamblia</i>	26
2.11 Potencial zoonótico de <i>Giardia lamblia</i>	28
2.12 Tratamiento	30



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estudio transversal de la giardiosis en el periodo 2010-2013	32
3.1.1 Diseño general del estudio	33
3.2 Organización de la presente investigación	33
3.3 Universo y muestra de estudio	33
3.4 Criterios de inclusión y exclusión	34
3.4.1 Criterios de inclusión	34
3.4.2 Criterios de exclusión	35
3.5 Operacionalización de las variables	35
3.6 Técnica de recogida de información	40
3.7 Estudio parasitológico de las muestras de heces de niños	41
3.7.1 Examen directo con eosina y lugol parasitológico	41
3.7.2 Examen por concentración de formol-éter/etil acetato de Ritchie	42
3.7.3 Técnica de Willis modificada para huevos ligeros de helmintos	42
3.7.4 Coloración de Zielh Neelsen modificada para coccidias intestinales	43
3.8 Extracción y purificación del ADN	43
3.9 Caracterización molecular de los aislamientos de <i>G. lamblia</i>	44
3.9.1 PCR punto final- <i>tpi</i>	46
3.9.2 PCR anidada- IGS-ADNr	46
3.9.3 PCR a punto final <i>E1</i>	47
3.9.4. PCR-RFLP- <i>gdh</i>	47
3.9.5 Visualización de los productos de las PCR utilizadas en la caracterización genética de <i>G. lamblia</i>	49
3.10 Técnica de análisis y procesamiento de la información	49
3.11 Consideraciones éticas	50
3.12 Limitaciones de la presente investigación	50

### IV. RESULTADOS

4.1 Comportamiento de la giardiosis en La Habana y en el municipio de Fomento, Sancti Spíritus, 2010-2013	51
4.1.1 Estudio 1 en La Habana: Periodo 2010-2011	51
4.1.2 Estudio 2 en escolares de tres municipios de La Habana. Periodo enero-diciembre 2013	52



4.1.3 Estudio 3 en preescolares del municipio Fomento, Sancti Spíritus: Periodo enero-junio 2013	53
4.2 Caracterización molecular de aislamientos de <i>G. lamblia</i>	55
4.2.1. Concordancia de los métodos moleculares empleados. La Habana y Fomento, 2010-2013	57
4.2.1.1 Estudio 1: Genes <i>tpi</i> e IGS-ADNr	57
4.2.1.2 Estudio 2: Genes <i>tpi</i> y <i>E1</i>	58
4.2.1.3 Estudio 3: Genes <i>tpi</i> y <i>gdh</i>	58
4.3. Identificación de sub ensamblés de <i>G. lamblia</i>	60
4.4. Relación entre ensamblés de <i>G. lamblia</i> y manifestaciones clínicas en niños	61
4.4.1. Estudio 1: Relación entre ensamblés de <i>G. lamblia</i> y características clínicas en niños de la Habana, 2010-2011	62
4.4.2. Estudio 2: Relación entre ensamblés de <i>G. lamblia</i> y características clínicas en niños de la Habana, 2013	63
4.4.3. Estudio 3: Relación entre ensamblés genéticos de <i>G. lamblia</i> y características clínicas en niños preescolares de Fomento, Sancti Spíritus 2013	65
4.4.5 Relación entre ensamblés genéticos de <i>G. lamblia</i> y características clínicas en niños preescolares y escolares en los tres estudios realizados	66
<b>V. DISCUSIÓN</b>	
5.1 Comportamiento de la giardiosis en los diferentes periodos de estudio en La Habana y Fomento	68
5.2 Caracterización molecular de aislamientos de <i>G. lamblia</i>	72
5.3 Caracterización clínica de los niños infectados con <i>G. lamblia</i> : Relación con los ensamblés genéticos	79
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	84
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	85
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	86
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR</b>	109
<b>X. ANEXOS</b>	



## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### I.1 Introducción

La giardiosis es una infección de etiología parasitaria causada por el protozoo flagelado *Giardia lamblia* (sinonimia de *G. duodenalis* y *G. intestinalis*), que afecta al ser humano y a una amplia variedad de mamíferos (Huang y White, 2006; Feng y Xiao, 2011; Wegayehu *et al.*, 2017). Este parásito intestinal es uno de los más comunes que infecta al humano a nivel mundial, principalmente en áreas tropicales y subtropicales (Feng y Xiao, 2011; Asher *et al.*, 2014; Boughattas *et al.*, 2017; Zylberberg *et al.*, 2017). De hecho, se reportan anualmente más de 200 millones de casos sintomáticos en África, Asia y América Latina, y sumado a esto, cada año se registran 500 mil nuevos casos de infección por este flagelado patógeno (Júlio *et al.*, 2012; Begaydarova *et al.*, 2014; Jaran, 2017; Naguib *et al.*, 2018).

Las cifras de prevalencia de esta parasitosis en países desarrollados varían de 2 a 7% (Prystajeky *et al.*, 2014; Zylberberg *et al.*, 2017), mientras que en los países en vías de desarrollo alcanzan hasta 40%, especialmente en áreas donde las condiciones higiénico sanitarias son inadecuadas, y coexisten problemas nutricionales y de infecciones recurrentes (Choy *et al.*, 2014; Jaran, 2017; Feleke *et al.*, 2018). La emergencia de esta infección intestinal en estas regiones del mundo, y principalmente su impacto negativo en la salud de los niños constituyó el determinante para su inclusión en la iniciativa de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de las enfermedades olvidadas (del inglés, WHO's 'Neglected Diseases Initiative') (Savioli *et al.*, 2006).

Es por ello de suma importancia, el estudio clínico epidemiológico de *G. lamblia* en esta población, donde constituye una de las principales causas de enfermedad diarreica aguda, especialmente en niños lactantes y de 1 a 5 años, en los cuales se asocia además, con reinfecciones frecuentes (Plutzer *et al.*, 2010; Kiani *et al.*, 2016; Coulibaly *et al.*, 2018). A pesar de que este microorganismo se identificó hace más de tres siglos por van Leeuwenhoek, no se consideró patógeno hasta 1978 (Lebbad *et al.*, 2011). Desde inicios de este siglo, se ha corroborado el efecto negativo de esta infección, principalmente en niños, sobre el crecimiento y las funciones cognitivas en este grupo etario, y la tendencia a causar brotes (Al-Mekhlafi *et al.*, 2013; Al-Shehri *et al.*, 2016; Reses *et al.*, 2018).



Desde el punto de vista clínico, la giardiosis cursa con un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Si bien en zonas endémicas, esta parasitosis presenta un comportamiento asintomático en más de 80 % de la población infectada, 20% restante puede desarrollar un cuadro que fluctúa desde trastornos digestivos ligeros hasta un síndrome diarreico crónico y de malabsorción intestinal (Haque *et al.*, 2005; Keselman *et al.*, 2016). Entre los factores descritos que guardan relación con esta heterogeneidad clínica se encuentran: el estado inmunológico y nutricional del hospedero, la dosis infecciosa, la virulencia de las cepas e infecciones previas por este protozoo (Homan y Mank, 2001). Desde hace más de una década se postula que, además de los factores que dependen del hospedero, el ensamble genético de *Giardia* puede contribuir al desarrollo de los síntomas o a la severidad de la infección en el humano. Por ello, varias investigaciones se han centrado, en los últimos años, en correlacionar la sintomatología, principalmente en pacientes en edad pediátrica, con el ensamble genético de *G. lamblia* (Cacciò y Ryan, 2008; Ryan y Cacciò, 2013; Hussein *et al.*, 2017; Kasaei *et al.*, 2018).

La primera clasificación a nivel molecular de aislamientos de *G. lamblia* se realizó en 1985 por un grupo de investigadores australianos que, a través de la técnica de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (del inglés, RFLP), detectaron diferencias en antígenos de superficie en los trofozoitos (Nash y Keister, 1985). Desde entonces y con la implementación de las nuevas herramientas de biología molecular, en particular la Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés, PCR), permitió clasificar a *G. lamblia* en ocho ensambles o grupos genéticos, designados de la letra A a la H mediante la utilización de los genes que codifican para la subunidad menor del ARN ribosomal (SSU-ARNr), y para las enzimas  $\beta$ -giardina (*bg*), glutamato deshidrogenasa (*gdh*), y triosa fosfato isomerasa (*tpi*) (Cacciò y Ryan, 2008), (Ryan y Cacciò, 2013; Villalba-Vizcaíno *et al.*, 2018).

Estudios previos basados en el análisis enzimático y secuenciación del ADN de aislamientos de *Giardia* adaptados al crecimiento *in vitro* mostraron que los ensambles genéticos A y B podían ser subdivididos en 2 sub ensambles principales, los cuales han sido designados como AI y AII, y BIII y BIV (Monis *et al.*, 1999; Asher *et al.*, 2014; Skhal *et al.*, 2017). Adicionalmente, un sub ensamble AIII fue descrito, el cual es considerado estrictamente no zoonótico, debido a que se ha identificado solamente en animales ungulados salvajes (Lalle *et al.*, 2007; Wielinga y Thompson, 2007).



Dado que los ensamblajes genéticos A y B se pueden encontrar en otros mamíferos, como gatos, perros, ganado, roedores, primates, y otros animales salvajes (Thompson y Monis, 2012; Bouzid *et al.*, 2015; Gil *et al.*, 2017), se les considera ensamblajes zoonóticos, dada la posible transmisión que puede establecerse entre estos grupos, principalmente los perros, al humano (Ryan y Cacciò, 2013). Ya en 1979, la OMS había incluido la giardiosis en la lista de las enfermedades que podrían ser zoonóticas al identificar, en Norteamérica, un brote por transmisión hídrica a causa de este protozoo presumiblemente asociado a animales salvajes, específicamente castores (Thompson y Monis, 2012).

Estudios de correlación de los ensamblajes genéticos de *G. lamblia* que infectan al humano con factores clínico-epidemiológicos enfatizan sobre la importancia de conocer las características y variabilidad genéticas que presenta este protozoo intestinal (Al-Mohammed *et al.*, 2011; Skhal *et al.*, 2017). Sin embargo, no existe un consenso en cuanto a esta temática, ya que investigaciones realizadas en varios continentes evidencian dicha relación con uno u otro ensamblaje genético indistintamente y en otros no se ha reportado ninguna asociación (Yason y Rivera, 2007; Eligio-García *et al.*, 2008; Kohli *et al.*, 2008; Pelayo *et al.*, 2008; Molina *et al.*, 2011; Asher *et al.*, 2014; Anim-Baidoo *et al.*, 2016; Skhal *et al.*, 2017; Kasaei *et al.*, 2018).

El uso de herramientas de epidemiología molecular, particularmente herramientas de subtipificación, permite un mejor entendimiento de la dinámica poblacional de *Giardia*. Si bien no está estandarizado un esquema de genotipaje a utilizar en la caracterización de *G. lamblia*, sí se recomienda realizar un análisis multilocus con cebadores específicos de ensamblajes genéticos (Ryan y Cacciò, 2013). Al menos, se considera que deben ser evaluados los loci de la *gdh*, *tpi*, *bg* y las secuencias intergénicas del ADNr (IGS-ADNr) (Cacciò y Ryan, 2008, Cacciò *et al.*, 2010; Kasaei *et al.*, 2018), así como loci de mayor variabilidad para confirmar transmisión zoonótica, junto a herramientas que permitan tanto una mejor discriminación genética como la inferencia del origen de las fuentes de transmisión de *Giardia* (Ryan y Cacciò, 2013; Damitie *et al.*, 2018).

Las técnicas de secuenciación del genoma y genómica comparativa realizadas en cepas controles evidencian similitudes y patrones de expresión diferenciales entre los dos ensamblajes genéticos que infectan al hombre (A y B). Estas técnicas de avanzada ayudarán a comprender mejor la dinámica que presenta este protozoo en la interacción específica con su hospedero y la epidemiología molecular de *G. lamblia* (Emery *et al.*, 2016; Naguib *et al.*, 2018).



En nuestro país se han realizado diversos estudios epidemiológicos con el objetivo de determinar la prevalencia y los factores de riesgos asociados a la giardiosis, principalmente en niños (Núñez *et al.*, 1999; Mendoza *et al.*, 2001; Núñez *et al.*, 2003, Cañete *et al.*, 2012). De igual forma, en la última Encuesta Nacional de Parasitismo Intestinal, realizada en 2009, se corroboró que *G. lamblia* es el protozoo intestinal más frecuentemente diagnosticado en nuestro país (Rojas *et al.*, 2012). Si se tiene en cuenta que el modo de transmisión de *G. lamblia* es semejante a la mayoría de los protozoos y helmintos de importancia médica, resulta necesario una mejor comprensión y puesta en marcha de medidas higiénico sanitarias, aparejadas a un mejor saneamiento ambiental (Choy *et al.*, 2014; Reses *et al.*, 2018).

La provincia La Habana y el municipio de Fomento, en Sancti Spíritus, han desarrollado programas de vigilancia parasitológica y de intervención educativa en población pediátrica mediante proyectos de colaboración entre el Instituto Nacional de Higiene Epidemiología y Microbiología (INHEM), el Hospital Pediátrico Docente "William Soler" (HPD-WS) y el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Esto ha permitido conocer una panorámica general de las parasitosis intestinales y factores de riesgos asociados, así como de un número de aislamientos significativos para estudios moleculares en protozoos de importancia médica, especialmente *Giardia lamblia*.

Un acercamiento a la temática molecular en *G. lamblia* en nuestro país se llevó a cabo por Pelayo *et al* (2008). En este estudio, desarrollado en el municipio de Fomento, provincia Sancti Spíritus, de 95 muestras positivas a *G. lamblia* que fueron preservadas en etanol a 70%, solo 20 aislamientos pudieron ser caracterizados molecularmente. Se identificó una proporción semejante de ensamblajes A (9 casos, 45%) y B (11, 55%) mediante los genes *bg* y *gdh* y se evidenció una asociación estadísticamente significativa con infecciones sintomáticas causadas por el ensamblaje B de este protozoo intestinal.

Dado que para algunos autores *G. lamblia* pudiera ser considerado un complejo de especies (Ryan y Cacciò, 2013), en la cual los ensamblajes genéticos que infectan al hombre, A y B, presentan diferencias filogenéticas que sustentan esta hipótesis (Andrews *et al.*, 1989; Monis *et al.*, 2003; Cacciò *et al.*, 2010), resulta de gran importancia conocer la prevalencia en niños de esta parasitosis, así como las características genéticas de este protozoo intestinal en este grupo etario.



Esto permitiría dilucidar si diferencias en la sintomatología de la infección pudiera ser atribuido a uno de estos ensamblajes. Es por ello que teniendo en cuenta la importancia del abordaje de la caracterización molecular de *G. lamblia* en niños, y el estudio de la variabilidad genética asociada con características clínicas y epidemiológicas nos propusimos realizar una investigación en la que nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

## **I.2 Hipótesis de trabajo**

"La infección por los ensamblajes genéticos A y B de *Giardia lamblia* está asociada con diferencias en la epidemiología y la clínica de esta parasitosis en niños, dado la teoría del complejo de especies en este parásito intestinal"

## **I.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo general**

Determinar frecuencia de infección y factores de riesgos en esta parasitosis e identificar los ensamblajes genéticos de aislamientos de *G. lamblia* y su asociación con aspectos clínicos en niños infectados con este parásito.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

1. Describir el comportamiento de la giardiasis en población preescolar y escolar en La Habana y Fomento en cuanto a frecuencia y riesgo de infección en el periodo comprendido de 2010 a 2013.
2. Determinar los ensamblajes y sub ensamblajes de aislamientos de *G. lamblia* mediante varios marcadores y técnicas moleculares.
3. Evaluar marcadores genéticos y métodos moleculares para determinar los ensamblajes de *G. lamblia*.
4. Determinar la posible relación entre los ensamblajes genéticos de *G. lamblia* y las manifestaciones clínicas desarrolladas en niños parasitados.



#### **I.4 NOVEDAD CIENTÍFICA**

Se comprobó la existencia en Cuba por primera vez de los ensamblajes y sub ensamblajes de *G. lamblia* que infectan al humano, mediante el uso de varias técnicas moleculares y varios marcadores genéticos. Se realizó por primera vez en nuestro país, y en la región del Caribe, un estudio donde se reporta la relación entre las manifestaciones clínicas y la infección por los ensamblajes genéticos A y B, y mixto A+B de *G. lamblia* en niños preescolares y escolares. Se evidenció por primera vez en la región del Caribe, que la infección por el ensamblaje B de *G. lamblia* está más relacionado con diarrea o dolor abdominal o flatulencia en la clínica de esta parasitosis en niños preescolares y escolares.

#### **I.5 VALOR PRÁCTICO**

Los estudios moleculares realizados en aislamientos de *G. lamblia* permitieron la introducción de herramientas diagnósticas para la caracterización molecular de este protozoo intestinal en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitismo Intestinal del Departamento de Parasitología, del IPK. Además, se presenta una propuesta de la mejor combinación de marcadores genéticos y métodos moleculares a utilizar para determinar los ensamblajes genéticos de este protozoo intestinal en función de obtener un mayor número de muestras amplificadas, con una mayor concordancia de los resultados para futuros estudios de caracterización molecular.



## CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Antecedentes

Hace más de 333 años, el holandés Antony van Leeuwenhoek fue el primero en detectar una infección por un protozoo intestinal en humanos al examinar sus propias heces diarreicas en un microscopio artesanal de un solo lente (Dobell, 1920). En aquel entonces la descripción realizada de: microorganismos como "animáculos ovales más grandes que los eritrocitos", hacía referencia a la fase vegetativa de *Giardia lamblia*, el trofozoito. (Dobell, 1920). Después de las observaciones realizadas por van Leeuwenhoek, tomó cerca de 200 años antes de que se le diera un nombre a este microorganismo. El profesor Vilem Fedorovic Lambl en 1859 redescubrió a *G. lamblia* y la denominó *Cercomona intestinales*. Por su parte, en 1882 Kunstler estableció el nombre genérico *Giardia* para un flagelado (*Giardia agilis*) encontrado en un renacuajo (Adam, 2001).

En 1915 Charles Wardel Stiles creó la denominación binominal *Giardia lamblia*. Desde entonces y hasta la fecha, varios nombres de especies han sido propuestos para este parásito que infecta al humano: *Giardia lamblia*, *G. duodenalis*, y *G. intestinalis*. En la actualidad, estos tres nombres son utilizados indistintamente según preferencias regionales y personales (Adam, 2001).

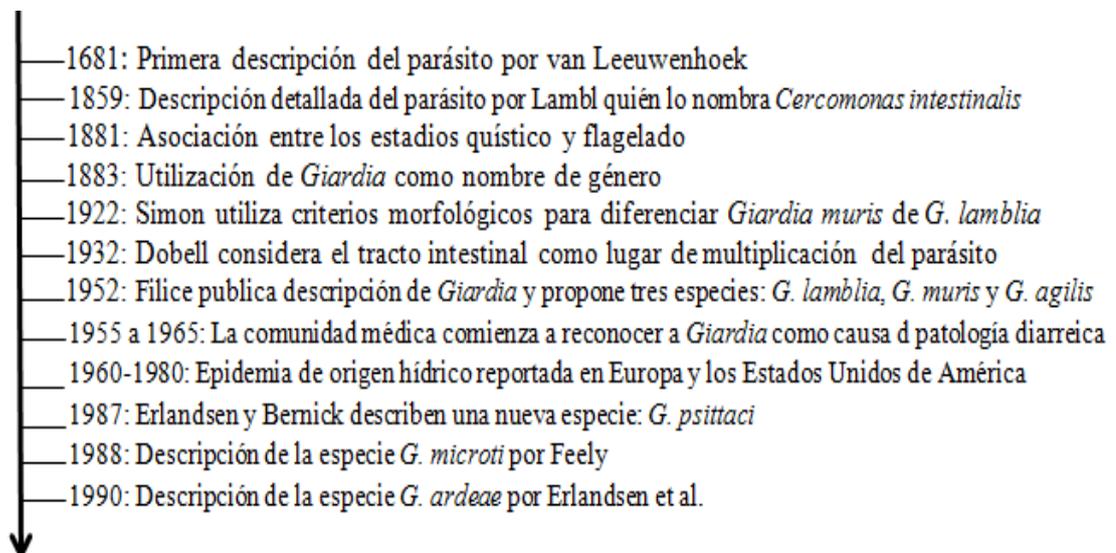


Fig.1. Principales hitos de estudios en *Giardia* (Adam, 2001; Erlandsen *et al.*, 1990; Gardner y Hill, 2001).



## 2.2 Taxonomía

*G. lamblia* es un protozoo flagelado eucariótico que ha sido ubicado taxonómicamente en el reino Protista. Aún cuando el Reino Archezoa, el cual agrupa a microorganismos desprovistos de mitocondrias, ha sido propuesto en los últimos años, se ha preferido mantener la clasificación de Levine, como se refiere a continuación (Adam, 2001; Lloyd y Williams, 2014):

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophora

Orden: Diplomonadida

Familia: Hexamitidae

Género: *Giardia*

Especie: *lamblia*

Cavalier-Smith y Chao (2006) en base al análisis del SSU-ARNr y a estudios morfológicos propuso una nueva clasificación en la cual *Giardia* no está ubicado en la familia Hexamitidae, sino en una subclase Diplozoa Diplomonadida, orden Giardiida, familia Giardiinae (Cavalier-Smith y Chao, 2006). No obstante, la mayor parte de los autores continúan utilizando la clasificación de *Giardia* dentro de la familia Hexamitidae (Makiuchi y Nozaki, 2014).

El orden Diplomonadida se considera como una reagrupación de eucariotas primitivos ya que los microorganismos que lo constituyen estarían desprovistos de organelos típicos de eucariotas, como mitocondrias y peroxisomas, y tendrían sistemas de endomembranas poco desarrollados (Morrison *et al.*, 2007; Gabaldón *et al.*, 2016). Además, este orden constituiría una ramificación precoz de Eucariota de acuerdo a la filogenia de algunos genes, como la subunidad menor del ARNr (Morrison *et al.*, 2007; Midlej *et al.*, 2016).



### 2.3. Agente etiológico

En el género *Giardia* se admiten diferentes especies, dependiendo de los criterios empleados por los diferentes autores. Según el criterio de especificidad del hospedero de Kulda y Nohýnková (1978) se han descrito 41 especies diferentes de *Giardia* (Kulda y Nohýnková, 1978); sin embargo, de acuerdo con el morfológico de Erlandsen (1990), el que tiene en cuenta la disposición de las estructuras microtubulares presentes en los cuerpos medios de los trofozoítos, se admiten tres grupos de especies: *Giardia agilis*, *Giardia muris* y *Giardia intestinalis* (*G. duodenalis* o *G. lamblia*). Existen dos especies adicionales que son indistinguibles de *G. lamblia* por el microscopio de luz: *G. ardeae* (garzas) y *G. psittaci* (aves del orden psittaciforme), las que se identificaron a partir de diferencias morfológicas mediante microscopía electrónica. De igual forma, la especie *G. microti*, aislada de ciertas especies de roedores (*Microtus* spp., *Ondatraza bethicus*), solo es posible diferenciarla de *G. lamblia* mediante características inherentes observadas en el microscopio electrónico en la forma de sus núcleos (Adam, 2001).

*G. lamblia*, la única especie patógena al humano, se presenta en dos formas o estadios: el trofozoito (la forma vegetativa) y el quiste (forma de resistencia) (Markova *et al.*, 2016).

Los quistes presentan una morfología entre redondos u ovals y miden 8 a 14  $\mu\text{m}$  de largo por 7 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho. Los quistes inmaduros o recién formados contienen dos núcleos y se denominan prequistes. Los quistes maduros presentan como característica distintiva la presencia de cuatro núcleos (Adam, 2001; Markova *et al.*, 2016). El citoplasma contiene axonemas flagelares, vacuolas, ribosomas y cuerpos medianos, los cuales se observan bien definidos en el trofozoíto (Lauwaet *et al.*, 2007; Pham *et al.*, 2017).

La composición, formación y arquitectura supramolecular de la pared del quiste no está del todo dilucidada. Actualmente, solo cuatro proteínas estructurales se han identificado. Tres de ellas son proteínas ricas en leucina, mientras que la cuarta, se asemeja a las proteínas variables de superficie que presentan los trofozoítos (Lauwaet *et al.*, 2007). En su conjunto, estas proteínas son concentradas en vesículas secretoras específicas de enquistación y transportadas hacia la pared del quiste en formación (Lauwaet *et al.*, 2007; Wampfler *et al.*, 2014; Einarsson *et al.*, 2016; Ortega-Pierres *et al.*, 2018).



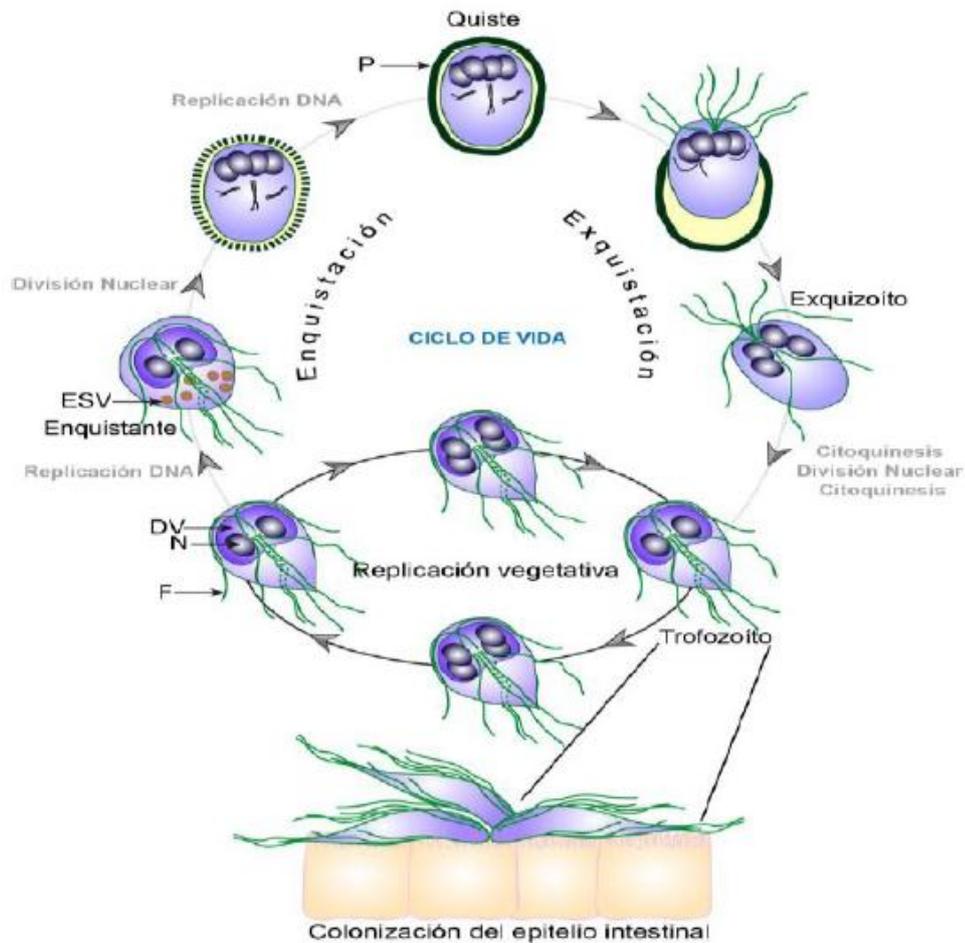
Los trofozoítos presentan simetría bilateral, miden 10 a 20  $\mu\text{m}$  de largo por 5 a 15  $\mu\text{m}$  de ancho. Presentan una forma de gota de lágrima cuando son vistos en sentido dorsal o ventral, en cambio son convexos en sentido dorsal y presentan un disco suctorial cóncavo en su porción ventral. Los trofozoítos tienen dos núcleos que son idénticos, ambos ovoides y con el endosoma central bien diferenciado. Los trofozoítos de *G. lamblia* poseen varias características atípicas, como la ausencia de peroxisomas y mitocondria, y el desarrollo regulado del retículo endoplasmático rugoso y del complejo de Golgi durante el proceso de enquistación (Faso *et al.*, 2013; Midlej *et al.*, 2016; Zamponi *et al.*, 2018).

Una de las características distintivas es la presencia de un complejo y único citoesqueleto. Presenta cuatro pares de flagelos dispuestos simétricamente; de ellos, dos son anterolaterales, y dos posterolaterales, dos ventrales y un par caudal, los que tienen su origen en ocho cuerpos parabasales colocados simétricamente en la línea media, a la altura del borde superior de los núcleos. Estos impulsan al trofozoíto en forma desigual, similar a la caída de una hoja. Además presentan dos axonemas y dos cuerpos medianos. (Adam, 2001; Ebnetter y Hehl, 2014, Horlock-Roberts *et al.*, 2017). El disco ventral de *G. lamblia*, es único dentro de los diplomonados. Éste presenta una estructura en forma hemisférica que modula la concavidad una vez se adhiere a la mucosa intestinal (Ebnetter y Hehl, 2014). Los cuerpos medianos constituyen la estructura microtubular menos definida, con una función no del todo conocida (Woessner y Dawson, 2012; McInally y Dawson, 2016, Horlock-Roberts *et al.*, 2017).

## 2.4 Ciclo de vida

El ciclo parasitario de *G. lamblia* es relativamente simple y está compuesto de dos estadios: el trofozoíto (forma vegetativa) cuyo hábitat es el intestino delgado, siendo responsable de las manifestaciones clínicas, y el quiste (forma infecciosa) responsable de la transmisión del parásito (Figura 2) (Adam, 2001).

La infección de un nuevo hospedero es causada por la ingestión de quistes viables presentes en el agua y/o alimentos, o a través de contacto directo (Adam, 2001). Los quistes de *G. lamblia* pueden permanecer viables en las heces de 7 a 18 días, en el suelo hasta siete semanas, y en el agua hasta un máximo de tres meses (Kinyua *et al.*, 2016; Horlock-Roberts *et al.*, 2017).



**Figura 2.** Esquema del ciclo de vida de *Giardia lamblia*. En la figura se observan las diferentes etapas del ciclo de vida del parásito. (P) Pared del quiste, (DV) Disco ventral, (ESV) vesículas específicas de enquistación, (F) flagelo y (N) núcleo. Tomado de Roxström-Lindquist *et al.*, 2006.

### 2.4.1 Desenquistamiento

*In vitro*, el desenquistamiento ha sido obtenido mediante la imitación de las condiciones encontradas por los quistes en el tracto digestivo del hospedero. Este es un proceso rápido de quince a treinta minutos que permite la transformación del quiste en trofozoito. Diferentes estudios han evidenciado la importancia de las dos etapas por la que transita los quistes en el proceso de desenquistamiento; primero a nivel del estómago en un ambiente ácido (pH = 2) y después bajo la influencia de las condiciones más alcalinas de la parte superior del intestino delgado (Ebnetter *et al.*, 2016). Este proceso es sensible a estímulos ambientales que conllevan a una respuesta coordinada a nivel fisiológico, estructural y molecular (Ebnetter *et al.*, 2016; Coelho *et al.*, 2017).



Se ha comprobado que diez minutos después de iniciado este proceso ocurre la separación de la pared quística y son liberados por cada quiste un exquizoito en la parte superior del intestino delgado (Alvarado y Wasserman, 2010; Coelho *et al.*, 2017). El exquizoito es un estadio intermedio entre el quiste y el trofozoito y presenta 8 flagelos y 4 núcleos con una ploidía de 16N. Esta forma intermedia experimenta dos rondas de división celular sin replicación del ADN, generando, 4 trofozoitos con una ploidía de 4N. Esta amplificación celular explicaría la relativamente baja dosis infecciosa, de 10 a 100 quistes que presenta *G. lamblia* (Sulemana *et al.*, 2014).

Los trofozoitos de *Giardia* se dividen por fisión binaria en las criptas del duodeno y en la porción superior del yeyuno y no invaden, por lo general, las células epiteliales intestinales. Algunos trofozoitos pueden enquistarse en el íleon, posiblemente como resultado de la exposición a sales biliares o a la ausencia de elementos nutritivos como el colesterol (Roxström-Lindquist *et al.*, 2006). Las lectinas, son consideradas proteínas de gran importancia en el proceso de adhesión a los enterocitos y por causar acortamiento en las microvellosidades intestinales (Samuelson *et al.*, 2013; Mendez *et al.*, 2015).

#### 2.4.2 Enquistamiento

El enquistamiento de este protozoo intestinal es una etapa clave en su ciclo de vida ya que permitirá la transmisión fecal-oral en su nuevo hospedero por vía alimentaria, hídrica o por contacto directo (Adam, 2001).

La síntesis de una pared resistente es indispensable para la supervivencia de este protozoo intestinal fuera del hospedero. Contrariamente al proceso de desenquistamiento, éste es un proceso lento. La primera etapa consiste de unas diez horas aproximadamente, seguida de una segunda fase de 16 horas (Sulemana *et al.*, 2014). La baja concentración de colesterol provocaría una activación de la transcripción de los genes implicados en este proceso de enquistamiento (Lujan, 2011). Durante la primera fase se describen modificaciones a nivel de la división celular, metabolismo, ultraestructura, transporte de proteínas y de expresión de genes. Los trofozoitos devienen rápidamente en una forma redondeada y ocurre una fragmentación del disco ventral (Svärd *et al.*, 2003).



Después de transcurrida diez horas, los trofozoitos no utilizan más la glucosa exógena, y disminuyen ostensiblemente el consumo de oxígeno (Faso *et al.*, 2013; Salusso *et al.*, 2017). A partir de este momento, el aparato de Golgi es visible, así como las vesículas específicas de enquistamiento. Estas vesículas juegan un papel importante en el transporte y la diferenciación de proteínas y de carbohidratos que constituirán la pared quística. La actividad de las enzimas que intervienen en la síntesis de N-acetil-D-galactosamina aumentan significativamente en esta etapa (Faso *et al.*, 2013; Ebnetter *et al.*, 2016; Salusso *et al.*, 2017).

Durante la segunda fase de enquistamiento, las modificaciones se producen esencialmente a nivel nuclear. Después de transcurridas cuatro horas de su inducción, la mayoría de las células presentan una poliploidía de 8N. Estudios sugieren que el enquistamiento empezaría a partir de la fase G2 en la cual los trofozoitos contienen dos núcleos tetraploides, y 24 horas después y seguido de una división nuclear con una nueva replicación del ADN, la mayor parte de los quistes observados contienen cuatro núcleos tetraploides (Faso *et al.*, 2013; Ebnetter *et al.*, 2016; Salusso *et al.*, 2017).

## 2.5 Epidemiología

*G. lamblia* es reconocido por ser unos de los parásitos intestinales más prevalentes que infecta al hombre tanto en áreas tropicales como templadas a nivel mundial. La giardiosis ejerce un impacto negativo en la salud pública debido a su alta prevalencia, y a la tendencia de causar brotes y respuestas de emergencia, principalmente en países en vías de desarrollo (Coulibaly *et al.*, 2018). Es conocido además y comprobado la relación entre esta parasitosis y el retardo en el crecimiento y desarrollo cognoscitivo en los niños (Feng y Xiao, 2011; Thompson, 2013; Sánchez *et al.*, 2017). Además, su efecto trasciende el ámbito humano, ya que representa una enfermedad altamente prevalente en el ganado y en animales domésticos, de ahí lo importante de este tópico también en la medicina veterinaria (Feng y Xiao, 2011; Geurden *et al.*, 2014; Barbecho *et al.*, 2018).

Las tasas de prevalencia de la infección por *G. lamblia* en países desarrollados oscilan entre 2% a 7% en Europa, Estados Unidos de América, Canadá y Australia (Feng y Xiao, 2011). Un aumento en la incidencia de esta parasitosis en estos países ha conllevado a que



se le replantee como una enfermedad re emergente en estos escenarios (Savioli *et al.*, 2006; Thompson y Monis, 2012; Zylberberg *et al.*, 2017).

Esta parasitosis en países en vías de desarrollo representa un importante problema de salud (Thompson y Monis, 2012; Castro *et al.*, 2015). Las cifras de prevalencia pueden llegar hasta 40% de la población en zonas donde las condiciones higiénico sanitarias no son las propicias (Savioli *et al.*, 2006; Speich *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2015; Wegayehu *et al.*, 2017). Debido a esta gran emergencia y consecuencias negativas en el crecimiento y desarrollo cognoscitivo de los niños fue un factor decisivo para que la OMS incluyera a la giardiosis en la iniciativa de las "enfermedades olvidadas" (Savioli, *et al.*, 2006).

La transmisión de este parásito intestinal es fundamentalmente fecal oral directa. Puede producirse, además, por contacto con personas o animales infectados por *G. lamblia* y por transmisión fecal oral indirecta. El consumo de aguas, frutas, vegetales y alimentos contaminados con quistes de *Giardia* constituye el principal vehículo de la transmisión y suele ser el origen de brotes epidémicos (Al-Delaimy *et al.*, 2014; Fink *et al.*, 2017).

Esta parasitosis ocurre más frecuentemente en niños, con especial énfasis en los preescolares (Anim-Baidoo *et al.*, 2016; Fink *et al.*, 2017). En el caso de los lactantes, éstos parecen estar más protegidos, y esto pudiera deberse al efecto protector de la lactancia materna o a una menor probabilidad de ingerir quistes (Heusinkveld *et al.*, 2016). Se han documentado algunos casos de transmisión por este protozoo intestinal por vía sexual (Escobedo *et al.*, 2014), sobre todo en la población homosexual. Además, se ha señalado la importancia de algunos vectores como las moscas, las que pueden tener particular importancia en los mecanismos de diseminación de los quistes de este parásito (Conn *et al.*, 2007; Kevin *et al.*, 2013; Rivero *et al.*, 2018).

Algunas investigaciones han demostrado que el contacto directo con animales domésticos pudiera constituir un factor de riesgo para la infección por *G. lamblia* (Robertson *et al.*, 2010; Inpankaew *et al.*, 2014). La infección varía inversamente con el estatus socioeconómico y presenta una alta prevalencia en regiones donde el suministro de agua es limitado y en zonas donde los estándares sanitarios e higiénicos no tienen una gran cobertura (Thompson, 2011). En términos generales se considera como factores de riesgos importantes en la emergencia de *G. lamblia* el fecalismo al aire libre, la falta de agua potable en comunidades, unido a una inadecuada educación sanitaria y deficiente estado



constructivo de las viviendas, hacinamiento y una elevada densidad poblacional y de animales reservorios de la infección (Thompson, 2011; Tysnes *et al.*, 2014; Rivero *et al.*, 2018).

El reservorio fundamental de *G. lamblia* es el humano, sintomático o portador asintomático. Sin embargo, la infección por aislamientos de este protozoo intestinal es frecuente y está muy extendida entre animales domésticos (perros, gatos, pájaros, caballos, cabras, ovejas, vacas) y en un amplio rango de mamíferos salvajes y aves (Pallant *et al.*, 2015). En este sentido, y debido a la baja especificidad de hospedero que presenta este parásito en otros mamíferos, se ha postulado por numerosos autores el potencial zoonótico que presenta (Tysnes *et al.*, 2014; Thompson y Ash, 2016; Fink *et al.*, 2017).

## 2.6 Patogenia y fisiopatología

El mecanismo de la giardiosis no está del todo dilucidado aun cuando se postule que tenga una base multifactorial (Halliez y Buret, 2013). Una hipótesis inicial al respecto, sugirió que el parásito alteraba la función intestinal al actuar como una barrera mecánica al mecanismo de absorción intestinal (Farthing, 1997). No obstante, estudios posteriores demostraron que no era posible esta hipótesis debido a las dimensiones de este parásito intestinal (10-14 $\mu$ m), la dosis infecciosa (10-100 quistes) y el tiempo de generación (aproximadamente de 6 a 12 horas *in vitro*), teniendo en cuenta el área de absorción del intestino delgado (Roxström-Lindquist *et al.*, 2006; Keselman *et al.*, 2016; Vermathen *et al.*, 2018).

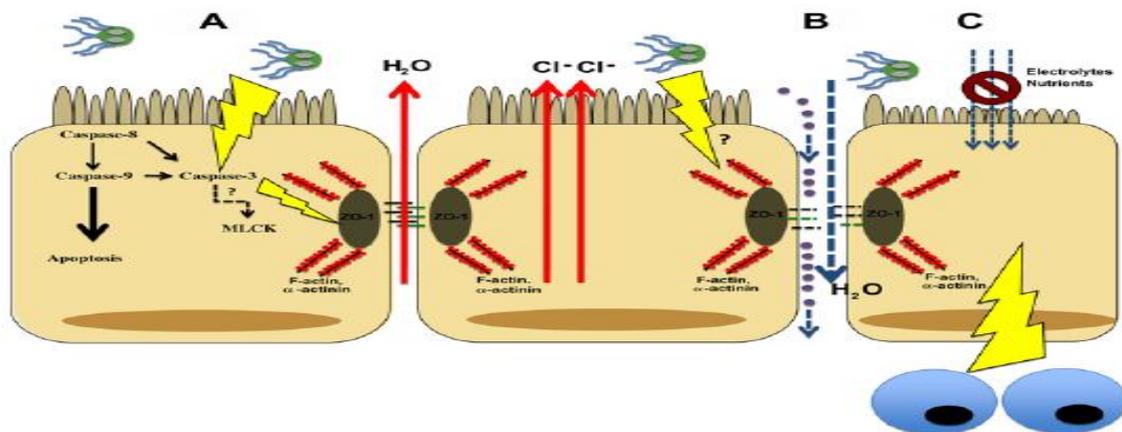
Los trofozoitos de *G. lamblia* se adhieren fuertemente a la superficie intestinal del intestino delgado mediante su disco adhesivo o ventral. Un número importante de moléculas de superficie de este parásito interactúan en esta estrecha unión con los enterocitos, como las giardinas (giardinas alfa, beta y gamma), y una compleja red de proteínas contráctiles que facilitan esta adhesión (Cotton *et al.*, 2011; Luther *et al.*, 2015). Actualmente se considera que los estados patofisiológicos involucran un aumento en la tasa de apoptosis de los enterocitos, disfunción de la barrera del intestino delgado, activación de linfocitos del hospedero, acortamiento de las microvelocidades intestinales con o sin atrofia de las vellosidades, deficiencias de disacaridasas, malabsorción intestinal, hipersecreción de aniones y una tasa incrementada en el peristaltismo intestinal (Cotton *et al.*, 2011; Luther *et al.*, 2015; Hjøllø *et al.*, 2018).



La enteropatía causada por la infección por giardias está caracterizada por una reducción variable en la altura de las vellosidades intestinales asociada a una respuesta hiperplásica de las criptas de Lieberkuhn, situadas entre ellas (Cotton *et al.*, 2011). En consecuencia, tiene lugar una reducción del índice vellosidad/cripta y un decrecimiento de la superficie de los segmentos proximales del intestino delgado (Luther *et al.*, 2015).

La atrofia de las vellosidades intestinales está asociada a cambios en la composición linfocitaria intraepitelial y de un incremento en la celularidad de la lámina propia. En ésta han sido identificados linfocitos B y células plasmáticas productoras de anticuerpos contra el parásito y, en menor medida, células T, sobre todo del fenotipo CD4+, además de linfocitos T con especificidad por antígenos de giardias, sobre todo del fenotipo CD8+ (Fonte y Almannoni, 2009; Hjøllø *et al.*, 2018).

El acortamiento del borde en cepillo inducido por este parásito pudiera causar, según varios estudios, una enfermedad diarreica mediante un proceso de malabsorción y de alteraciones en la digestión debido a la deficiencia de varias enzimas a nivel de esta localización anatómica (Castro *et al.*, 2015; Cotton *et al.*, 2015). Debido a que la absorción de electrolitos acoplada a nutrientes ocurre en las microvellosidades, un acortamiento de éstas traería consigo una deficiente absorción de agua, glucosa y electrolitos (Gomes *et al.*, 2012; Hjøllø *et al.*, 2018). Como consecuencia de este proceso de malabsorción de nutrientes se crearía un gradiente osmótico que conllevaría a un incremento en la salida de agua hacia el lumen intestinal resultando en una distensión y aumento de la peristalsis intestinal (Figura 3) (Cotton *et al.*, 2015).



**Fig. 3.** Manifestaciones patofisiológicas de la giardiasis. (A) Incremento en la apoptosis de enterocitos posiblemente por activación de las caspasas 9 y 3. Se ha evidenciado que la activación de la caspasa 8 pudiera tener el mismo efecto. (B) Incremento de la permeabilidad intestinal por alteraciones en los componentes del complejo de unión apical (actina F, ZO-1, claudina 1 y  $\alpha$ -actinina). (C) Acortamiento de las microvellosidades en borde de cepillo. Tomado de Cotton *et al.*, 2011.

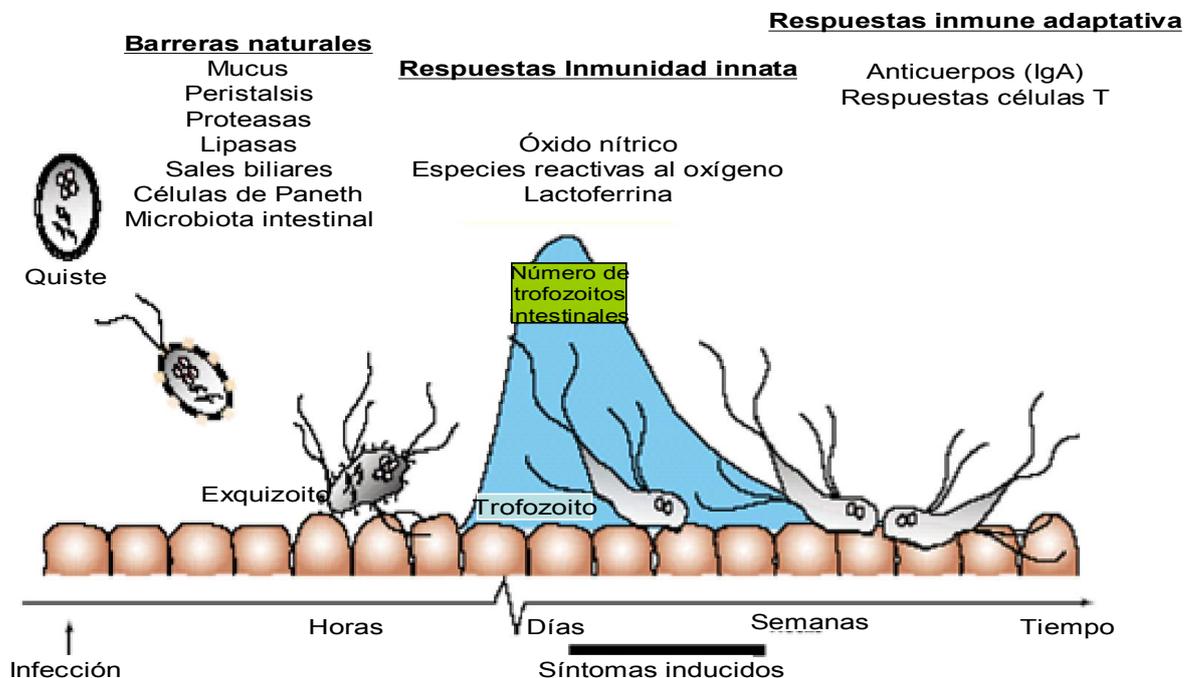


## 2.7 Inmunobiología de la infección por *G. lamblia*

Existen varios factores predisponentes que influyen la infección por *G. lamblia*. Los más importantes constituyen la edad, estado nutricional, composición de la microbiota intestinal, e inmunodeficiencias (Cotton *et al.*, 2015).

Se reporta que los niños menores de 5 años de edad, en los que generalmente el sistema inmunitario es aún inmaduro y que han tenido menos oportunidades de enfrentar previamente la infección por este protozoo intestinal, son más susceptibles a la giardiasis en comparación con las personas adultas, especialmente cuando existen niveles de desnutrición que favorecen la endemidad y morbilidad de la infección por *G. lamblia* (Fonte y Almannoni, 2009; Fink *et al.*, 2018).

Como parte de la inmunidad innata del hospedero, varios productos antimicrobianos son secretados en el epitelio intestinal los cuales contribuyen a mantener y proteger la barrera de la mucosa intestinal. De hecho, varios péptidos antimicrobianos como las defensinas, secretadas por las células de Paneth, y lactoferrinas participan en la defensa frente a este parásito intestinal (Figura 4) (Ochoa y Cleary, 2009).



**Fig.4.** Interacción de *Giardia lamblia* con los mecanismos de defensa inmune en el intestino humano. Tomado de Cotton *et al.*, 2011.



La capa de mucus que protege a los enterocitos de las enzimas digestivas del hospedero previene además de que este parásito tenga acceso al epitelio intestinal. Se ha evidenciado, en este sentido, de que las mucinas tiene un efecto negativo directo en la adhesión de *Giardia in vitro* (Roskens y Erlandsen, 2002; Yoshida *et al.*, 2011). Aunque las proteasas, lipasas y bilis eliminan la mayoría de los microorganismos en la parte superior del intestino delgado, se considera que las proteínas variables de superficie (VSP), ricas en cisteína, que recubren al trofozoito pudieran conferirle resistencia frente a las proteasas, y la bilis (de la Guardia *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2013).

La infección en humanos por *G. lamblia*, así como en ratones por *G. muris*, resulta en la producción de anticuerpos anti-*Giardia* en las secreciones mucosas y en el suero (Heyworth, 2014; Weatherhead *et al.*, 2017). En el humano, los anticuerpos séricos anti-*G. lamblia* encontrados pueden ser de las clases IgG, IgM e IgA, con independencia de la forma clínica de la infección. Estos anticuerpos permanecen circulando por periodos prolongados (excepto los anticuerpos de la clase IgM, que después de la adolescencia descienden rápidamente tras un episodio infeccioso) (Fonte y Almannoni, 2009; El-Gebaly *et al.*, 2012).

Se postula que el funcionamiento del sistema inmunitario a nivel de mucosa en la infección por *G. lamblia* incluyen (Abdul-Wahid y Faubert, 2008; Fonte y Almannoni, 2009; Lee *et al.*, 2014; Weatherhead *et al.*, 2017):

- Mastocitos en la lámina propia, posiblemente estimulando la producción de IL-5 e IL-6 por linfocitos T CD4+, participan en el control de la infección por *G. lamblia*.
- Linfocitos T CD4+ en la lámina propia, posiblemente mediante la producción de IL-5 e IL-6, participan en el control de la infección al estimular la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de IgA contra el parásito.
- Linfocitos B en la lámina propia, mediante su diferenciación a células plasmáticas productoras de IgA contra *G. lamblia*, participan de manera protagónica en el control de la infección por éstas.
- Linfocitos T CD8+intraepiteliales, están implicados en el mal funcionamiento de la mucosa intestinal que caracteriza a la fase aguda de la infección murina.



- El control de la infección durante las fases latente y aguda (primeras dos semanas), que es menos eficaz que el que tiene lugar en la fase de eliminación, es independiente de células B.

## 2.8 Manifestaciones clínicas

Si bien hace más de 330 años van Leeuwenhoek describió este parásito, no fue hasta 1978 que *G. lamblia* se consideró un microorganismo patógeno teniendo en cuenta las observaciones de varios síntomas como la malabsorción y la patología de la parte superior del intestino delgado en pacientes infectados por este flagelado intestinal (Faubert, 2000). En sí, no fue hasta 1987 que se evidenció en voluntarios inoculados con aislamientos de *G. lamblia* el cumplimiento de los postulados de Koch (Nash *et al.*, 1987).

La infección por este parásito generalmente se asocia con diarrea, no obstante ésta puede transcurrir de forma asintomática en un gran porcentaje de la población, tanto mayor si la endemidad de esta parasitosis en un área o país es elevada; o presentar un amplio rango de espectro clínico, variando de una forma aguda a una infección crónica (Begaydarova *et al.*, 2014). El período de incubación de esta enfermedad es de una a dos semanas, y el promedio de la duración de los síntomas en todos los grupos de edades es de alrededor de tres semanas (Begaydarova *et al.*, 2014; Escobedo *et al.*, 2018).

La diarrea puede progresar a un síndrome de malabsorción, y resulta el síntoma característico de la giardiosis aguda en 90 % de las personas sintomáticas, además otros síntomas comunes incluyen en 70%, náusea, vómitos y flatulencia (Begaydarova *et al.*, 2014). Esta parasitosis es una causa importante de pérdida de peso, principalmente en niños, debido a los procesos de malabsorción de azúcares (xilosa, disacáridos), grasas, y vitaminas liposolubles (por ejemplo, vitaminas A y E) (Al-Mekhlafi *et al.*, 2013; Evans-Osses *et al.*, 2017). Esta forma aguda se puede observar en todas las zonas geográficas y en todos los grupos de edades, pero su incidencia es mayor entre las personas que adquirieron la infección y no residen en áreas endémicas (Begaydarova *et al.*, 2014).

Las manifestaciones extraintestinales son poco comunes, pero ocasionalmente esta parasitosis puede estar asociada a lesiones de tipo urticariano, una lesión del epitelio pigmentado de la retina que los oftalmólogos la denominan en “sal y pimienta”, la glositis



y la artritis reactiva son las cuatro mejor estudiadas (Krupa *et al.*, 2010). El desarrollo de las manifestaciones clínicas en los pacientes infectados dependerá de la carga parasitaria, la virulencia del aislamiento, y la respuesta inmune del hospedero. La presencia de síntomas extraintestinales resultaría de una activación del sistema inmune a causa del mimetismo molecular de este parásito con algunas células hospederas (Robertson *et al.*, 2010).

La giardiosis crónica se desarrolla en aquellos individuos en los cuales se presentan factores predisponentes y cursa la infección sin un tratamiento antiparasitario (Barbosa *et al.*, 2014). Esta patología se caracteriza por diarrea, malabsorción intestinal, resultando en esteatorrea, deficiencia de lactasa, así como de vitamina A, B12, y folato (Zarebavani *et al.*, 2012). El desarrollo de la giardiosis crónica pudiera deberse a la relación que se establece entre el parásito y el hospedero en cuanto a: (i) factores del hospedero como la edad, estatus inmune, historia previa de infección, dieta, y microbiota intestinal concomitante; (ii) factores del parásito, asociados probablemente con el ensamble genético, tasa de multiplicación, proteínas variables de superficie, resistencia a los antiprotozoarios y capacidad para evadir la respuesta inmune (Cotton *et al.*, 2014).

## 2.9. Diagnóstico

### 2.9.1 Diagnóstico parasitológico

El diagnóstico de la giardiosis está basado principalmente en la detección de trofozoitos y/o quistes mediante el examen directo de muestras de heces. Si bien este constituye un método práctico y efectivo para establecer el diagnóstico, debido a que la eliminación de quistes puede ser intermitente, esta técnica pudiera conllevar a resultados falsos negativos. La observación microscópica de una sola muestra por paciente se asocia a más de 50 % de resultados falsos negativos. Es por ello que se recomienda la realización de exámenes de heces seriados para aumentar la sensibilidad diagnóstica (Singhal *et al.*, 2015; Parčina *et al.*, 2018).

Los métodos parasitológicos de concentración, como el método de Ritchie (formol-éter/acetato de etilo), o el método de Faust (sulfato de zinc), se utilizan para concentrar quistes de protozoos y huevos y larvas de helmintos, pero no son adecuados para la



observación de trofozoitos; a pesar de ello, la sensibilidad diagnóstica del examen parasitológico aumenta considerablemente (Ortega y Adam, 1997). Es de notar que algunas sustancias tales como el bario, antiácidos, laxantes oleosos y enemas, pueden interferir en los resultados de los exámenes de heces (Ortega y Adam, 1997; Singhal *et al.*, 2015).

En aquellos casos de alta sospecha clínica, en los cuales los exámenes seriados son negativos, es recomendado realizar un estudio del contenido duodenal por sondaje o intubación directa. La sensibilidad de estas técnicas por visualización endoscópica, biopsias o por el empleo menos invasivo de la cápsula del Entero-Test® puede alcanzar 100%. No obstante, estos métodos, si bien aumentan la sensibilidad del examen resultan molestos e invasivos para el paciente, además de ser pruebas costosas (Ortega y Adam, 1997; Singhal *et al.*, 2015).

### 2.9.2 Inmunodiagnóstico

Desde la década del 80 del pasado siglo, el diagnóstico inmunológico se desarrolló en base a la detección de anticuerpos anti-*Giardia* y antígenos de este parásito en muestras de heces (Bashir *et al.*, 2014; Hijjawi *et al.*, 2018). En países donde esta parasitosis resulta endémica, no existe una buena correlación entre los títulos de anticuerpos y la presencia de una infección activa por *G. lamblia*, por lo que actualmente se utiliza con más frecuencia algunos ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida (ELISA) para la detección de antígenos de este protozoo intestinal. Estos métodos detectan antígenos solubles de este parásito en heces, como el que emplea anticuerpos contra el antígenos GSA-65 de *G. lamblia*. Aunque estas técnicas demuestran una elevada sensibilidad y especificidad, resultan extremadamente caras para los países en vías de desarrollado (Ortega y Adam, 1997; Singhal *et al.*, 2015; Hijjawi *et al.*, 2018).

Otras técnicas serodiagnósticas por antígenos o anticuerpos utilizadas para el diagnóstico de la giardiosis incluyen la inmunodifusión doble y la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). La sensibilidad y especificidad de las mismas dependen, fundamentalmente, del tipo de antígeno utilizado (trofozoitos intactos, extracto de trofozoitos o proteínas purificadas de *Giardia*), del isotipo de inmunoglobulina estudiado y de la prevalencia de la infección en una determinada área de población (áreas endémicas o no) (Singhal *et al.*, 2015; Hijjawi *et al.*, 2018).



### 2.9.3 Diagnóstico molecular

La introducción de las técnicas moleculares, particularmente aquellas basadas en la amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos, permiten la amplificación selectiva de secuencias específicas de ADN para el diagnóstico de la giardiosis. Esto ha permitido una mejor comprensión de la taxonomía, genética poblacional y la epidemiología molecular de la giardiosis en el humano y en animales domésticos (Feng y Xiao, 2011; Wegayehu *et al.*, 2017). Las herramientas moleculares más modernas permiten la diferenciación de este protozoo a nivel de especie, ensamble y sub ensamble genéticos a partir de muestras clínicas y ambientales (Ryan y Cacciò, 2013).

El gen que codifica para la subunidad menor del ARNr es muy útil en la identificación molecular de *Giardia*, al poseer una baja variación de secuencias intraespecífica y una relativamente alta variación de secuencias interespecífica (Feng and Xiao, 2011). Otros marcadores genéticos, más polimórficos, que se utilizan para la detección y caracterización moleculares de *G. lamblia* a nivel de ensamble y sub ensamble, basados en PCR ensambles específicos o mediante análisis de secuencias son, los genes *tpi*,  $\beta$ -giardina, *gdh* (Dacal *et al.*, 2018). Estos últimos genes han sido utilizados, con frecuencia combinados con el SSU-ARNr, en investigaciones de sistemática de *Giardia*, proporcionando las bases de la actual clasificación de los miembros de este género (Ryan y Cacciò, 2013).

De igual forma, los espaciadores transcritos internos (ITS) del ADNr son muy útiles para evaluar la variabilidad genética en *Giardia lamblia*, debido a la alta variabilidad intraespecífica de las secuencias en comparación con las regiones del ARNr (Cacciò *et al.*, 2010).

El empleo de la técnica del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción del producto amplificado mediante PCR (PCR-RFLP) resulta eficiente en la clasificación genética de aislamientos de *G. lamblia* (Thompson y Ash, 2016; Dacal *et al.*, 2018). Aunque esta técnica es muy provechosa, el método analítico pudiera no detectar todas las secuencias dianas, sino un pequeño número de sitios potencialmente variables, por lo que pudiera conducir a una digestión enzimática incompleta de los amplicones y/o variaciones en la secuencia en un mismo amplicón, y por ende a posibles resultados discordantes en los patrones de RFLP (Ryan y Cacciò, 2013).



En países desarrollados se utiliza con frecuencia en el diagnóstico molecular la secuenciación directa del ADN del producto de la PCR y el análisis comparativo de los datos de secuencia el cual se considera el patrón de oro para la detección de variaciones genéticas o polimorfismos, y puede ser aplicado a genes unicopias y multicopias. La secuencia de ADN obtenido tiene el valor agregado de ser provechosa para investigaciones filogenéticas y de genética comparativa (Koehler *et al.*, 2014; Thompson y Ash, 2016; Dacal *et al.*, 2018).

En los últimos años se potencian, de igual forma, nuevas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para detectar el ADN de *Giardia*. Dentro de éstas resulta muy novedosa la amplificación isotérmica mediada por lazo (del inglés, LAMP), desarrollada por Notomi (2007) la cual permite la amplificación del ADN en condiciones isotérmicas, sin necesidad de un termociclador, y la observación visual de los productos amplificados (Notomi *et al.*, 2015). Esta técnica se utiliza exitosamente en la detección e identificación de otros protozoos patógenos al hombre, como *Trypanosoma*, *Plasmodium falciparum*, *Cryptosporidium* y *Toxoplasma gondii* (Notomi *et al.*, 2015).

La técnica de PCR en tiempo real o PCR cuantitativo (qPCR) (Higuchi *et al.*, 1992) se utiliza para el diagnóstico molecular y estudios de epidemiología molecular. Esta técnica novedosa permite el monitoreo de la amplificación del ADN que ocurre *in vitro*, lo cual presenta ventajas prácticas sobre la PCR convencional (Koehler *et al.*, 2014). Esta técnica de PCR en tiempo real se utiliza de igual forma para la detección específica de *G. lamblia* y sus ensamblajes (Almeida *et al.*, 2010; Incani *et al.*, 2017). Esta PCR puede ser acoplada a análisis de alta resolución de fusión, la cual permite medir la tasa de disociación de ADN de doble cadena mediante la reducción en la fluorescencia en el tiempo. Varios estudios han utilizado el PCR para la detección específica y diferenciación de los ensamblajes A y B de *G. lamblia* utilizando principalmente los marcadores genéticos *gdh* y *tpi* (Almeida *et al.*, 2010; Incani *et al.*; 2017; Hijjawi *et al.*, 2018). Sus principales aplicaciones son la detección de mutaciones, polimorfismos y alteraciones epigenéticas en muestras de ADN bicatenario (Koehler *et al.*, 2014; Dacal *et al.*, 2018).

Es importante tener en cuenta que tan importante es realizar una PCR eficaz como las técnicas de aislamiento del ADN a partir de muestras biológicas, particularmente muestras de heces, con el objetivo de remover efectivamente los constituyentes que son inhibitorios



para la PCR (Babaei *et al.*, 2011). Varios métodos eficaces como los pretratamientos con ciclos de congelación-descongelación, sonicación seguido de extracción mediante método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico o utilizando kits comerciales como el QIAamp (Qiagen, Estados Unidos de América) minimizan la presencia de agentes inhibidores que pueden afectar la eficacia de la PCR (Babaei *et al.*, 2011; Incani *et al.*, 2017).

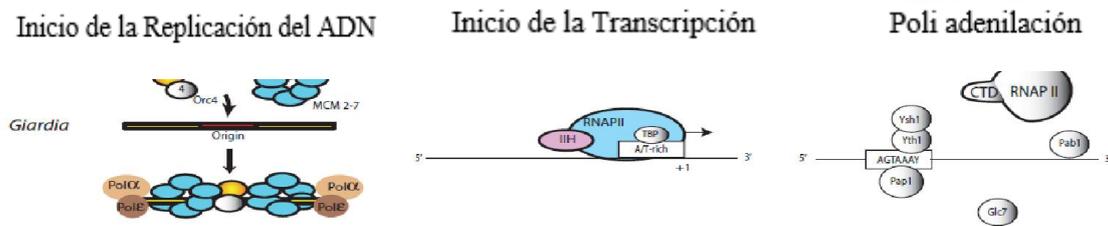
## 2.10 Características generales de la genética molecular de *Giardia lamblia*

### 2.10.1 Genoma

Dado el gran interés en la genómica de este protozoo intestinal en los últimos años se realizaron grandes avances en el estudio del Proyecto del Genoma de *G. lamblia* (Best *et al.*, 2004). Actualmente, se encuentran disponibles las secuencias de todo el genoma de varios aislamientos, lo cual ofrece una gran oportunidad para una mejor comprensión de la especificidad de hospedero y la patogénesis en esta parasitosis (Heyworth, 2016; Emery-Corbin *et al.*, 2018).

El genoma del clon WB C6 de *G. lamblia* (cepa de referencia ATCC 50803) muestra una talla de aproximadamente 12 megabases, distribuidos en 5 cromosomas. Se identificaron 6470 marcos abiertos de lectura con una distancia intergénica promedio de 372 pares de base y con 46% de contenido de GC (Guanina-Citosina) (Morrison *et al.*, 2007; Alvarado *et al.*, 2018).

La síntesis y transcripción del ADN, así como el procesamiento del ARN y la maquinaria del ciclo de vida son relativamente simples, y comparables con el reino Archae (Figura 5) (Makiuchi y Nozaki, 2014). La presencia de solo dos complejos de proteínas de reconocimiento de origen (Orc4 y Orc1/Cdc6) en *Giardia* y la ausencia de proteínas reguladoras del proceso de iniciación de la transcripción evidencia la poca complejidad de este proceso. Además, este protozoo presenta tres ADN polimerasas replicativas tipo B (Pol  $\alpha$ , Pol  $\epsilon$  y Pol  $\delta$ ), de las cuales el complejo Pol $\alpha$ /primasa está presente en varios eucariontes, mientras que la composición de las otras dos polimerasas se asemejan a las polimerasas presentes en Archae (Morrison *et al.*, 2007; Alvarado *et al.*, 2018).



**Fig. 5.** Representación esquemática de los mecanismos de replicación, transcripción y poliadenilación del ADN en *G. lamblia*. Tomado de Morrison *et al.*, 2007.

### 2.10.2 Ensamblajes genéticos

Los estudios realizados en los últimos años en el campo de la genómica en este parásito intestinal muestran que *G. lamblia* debe de ser considerado como un complejo de especies (Ryan y Cacciò, 2013). Si bien todos los miembros de este complejo muestran poca variación morfológica entre ellos, sí presentan diferencias en cuanto a características genéticas y de especificidad de hospedero, por lo cual se clasifican en ocho ensambles o grupos genéticos en base al polimorfismo del ADN y de proteínas (Tabla 1) (Monis *et al.*, 2009).

**Tabla1.** Clasificación de los ensambles genéticos de *G. lamblia*

Ensamble genético	Sub ensamble genético	Hospedero	Nombre de especie propuesta
A	AI	Humanos y animales	<i>Giardia duodenalis</i>
	AII		
B	BIII	Humanos y animales	<i>Giardia enterica</i>
	BIV		
C		Perros	<i>Giardia canis</i>
D		Perros	<i>Giardia canis</i>
E		Rumiantes y caballos	<i>Giardia bovis</i>
F		Gatos	<i>Giardia felis</i>
G		Roedores	<i>Giardia simondi</i>
H		Pinnípedos	(No ha sido asignado todavía nombre de especie)



Los ensamblajes genéticos A y B de *G. lamblia* presentan una mayor especificidad de hospedero ya que se identifica en el humano, y en otros mamíferos (Monis *et al.*, 2009). El ensamblaje A se encuentra con mayor frecuencia en el ganado (vacas, búfalos de agua, ovejas, carneros, alpacas y cerdos) y en animales domésticos (perros, gatos y caballos). Por su parte el ensamblaje B, en general, presenta menor frecuencia de infección en animales domésticos y en el ganado, pero sí se le identifica en un mayor porcentaje en animales salvajes, como castores, y ratas almizcleras (Feng y Xiao, 2011; Ryan y Cacciò, 2013; Emery-Corbin *et al.*, 2018). Debido a que ambos ensamblajes infectan tanto al humano como a varias especies de mamíferos, se consideran ensamblajes zoonóticos (Ryan y Cacciò, 2013; Naguib *et al.*, 2018).

Estudios previos basados en el análisis enzimático y secuenciación del ADN de aislamientos de *G. lamblia* evidencian una subestructuración dentro del ensamblaje A, que permite subdividirlo en dos subgrupos o sub ensamblajes principales, AI y AII (Liu *et al.*, 2014). De forma general, el sub ensamblaje AI presenta un mayor rango de hospedero que el AII, el cual se encuentra principalmente en humanos, según Sprong y colaboradores (2009). Un tercer sub ensamblaje, AIII, se describe también, el cual se considera estrictamente no zoonótico, debido a que se identificó solamente en animales salvajes ungulados (Lalle *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2014). De forma similar, en humanos los aislamientos del ensamblaje B tienden a formar dos clústers, BIII y BIV, si bien el polimorfismo en este ensamblaje es superior al reportado en el ensamblaje A, por lo que nuevas variantes y subtipos identificados no tienen aún una clasificación establecida (Feng y Xiao, 2011; Thompson y Ash, 2016; Emery-Corbin *et al.*, 2018).

### 2.10.3 Marcadores genéticos utilizados en los estudios moleculares en *G. lamblia*

Los marcadores genéticos más utilizados en los ensayos de PCR en *G. lamblia* son esencialmente genes eucarióticos conservados: SSU-ARNr, *gdh*, *tpi*, factor de elongación1- $\alpha$ ) (Monis *et al.*, 1999) o genes asociados únicamente con el parásito ( $\beta$ -giardina) (Lalle *et al.*, 2005; Naguib *et al.*, 2018).

Es importante notar que existen diferencias en cuanto a la variabilidad genética de estos marcadores ya que si bien los genes que codifican para el SSU-ARNr, y el factor de elongación1- $\alpha$  son altamente conservados, solo permiten la identificación a nivel de ensamblaje, no así para la diferenciación entre éstos (Wielinga y Thompson, 2007). No



obstante debido a la naturaleza multicopia del SSU-ARNr, este locus presenta una gran sensibilidad y se utiliza para la detección de *G. lamblia* a partir de varias fuentes naturales (muestras ambientales, heces de humano y de animales) (Minetti *et al.*, 2015; Naguib *et al.*, 2018).

El gen SSU-ARNr se caracterizó por primera vez por Edlind y Chakraborty (1987), y los resultados de este trabajo dilucidó algunas características innatas de este gen en *G. lamblia*, como son: su pequeña talla comparado con otros eucariontes y secuencias ricas en GC (Edlind y Chakraborty, 1987). Debido a su naturaleza multicopia, este gen es uno de los más ampliamente utilizados en la detección y tipaje de este parásito intestinal (Forsell *et al.*, 2016).

La utilidad del gen *tpi* en la caracterización molecular de este protozoo intestinal, se demostró inicialmente por Baruch (1996), en aislamientos axénicos provenientes de humanos y otros mamíferos (Baruch *et al.*, 1996). Debido al alto grado de polimorfismo de este gen, algunos autores plantean que tiene el poder de resolución comparado a un análisis multilocus, por lo que debiera de ser implementado en todo esquema de genotipaje en *G. lamblia* (Sulaiman *et al.*, 2003; Ryan y Cacciò, 2013; Ghieth *et al.*, 2016).

El ADNr de *G. lamblia* está presente en este parásito de 60 a 130 estructuras repetidas. Como en otros eucariontes, cada estructura repetida está formada por una subunidad menor (SSU, del inglés, Small SubUnit) y otra mayor (LSU, del inglés Large SubUnit) y divididas por espaciadores internos no traducibles (Lee *et al.*, 2006). Los espaciadores intergénicos (IGS) se encuentran entre cada unidad repetida, y están compuestos por regiones variables que permiten poder diferenciar los distintos ensamblajes (A y B) de *G. lamblia*, además de su naturaleza multicopia lo que redundante en su utilidad en la genotipificación de este protozoo intestinal (Hussein *et al.*, 2017).

El gen *gdh* se ha utilizado extensivamente como herramienta de genotipaje por investigadores a nivel mundial (Skhal *et al.*, 2017). Este gen fue caracterizado originalmente por Monis (1996) en un panel de aislamientos de *G. lamblia* conservados de humanos procedentes de varios continentes y establecidos en cultivos *in vitro* (Monis *et al.*, 2003). El análisis de secuencias de este gen permitió desarrollar variantes de la PCR, como la PCR-RFLP, la cual permite distinguir los ensamblajes A y B (Monis *et al.*, 1996; Read *et al.*, 2004), así como los principales sub ensamblajes de *G. lamblia* (Read *et al.*,



2004). Si bien este gen tiene un menor grado de polimorfismo que el gen *tpi*, su utilización resulta importante en el genotipaje exitoso de muestras humanas y de animales domésticos (Ryan y Cacciò, 2013).

Las giardinas son proteínas estructurales de aproximadamente 29–38 kDa. Estas proteínas se localizan en los microrribones, los cuales son parte del disco ventral de los trofozoitos. (Cacciò *et al.*, 2002). La ventaja de utilizar los genes de las giardinas como marcadores moleculares para la detección de *Giardia*, radica en que son consideradas como únicas en este parásito (Faubert, 2000). Este gen se utilizó como marcador molecular por Mahbubani *et al.* (1992) para la detección de quistes de este parásito a partir de muestras ambientales. Con la metodología de la PCR-RFLP implementada por Cacciò (2002) la diferenciación de los ensamblajes A y B de *G. lamblia* es altamente discriminatorio (Ryan y Cacciò, 2013). Este gen es relativamente conservado, y la mayoría de las mutaciones reportadas son sinónimas, no obstante los análisis de secuencias han identificado varios subtipos dentro de cada ensamble (Ryan y Cacciò, 2013; de Lucio *et al.*, 2016).

En los últimos años se han adicionado nuevos marcadores genéticos en los estudios moleculares de esta parasitosis, tales como los genes que codifican para la  $\alpha$ -tubulina, chaperonina 60, ferredoxina y actina (Feng y Xiao, 2011; Ryan y Cacciò, 2013).

Aunque no existe un consenso en cuanto a los loci a utilizar en el esquema de genotipaje se recomienda realizar estudios que incluyan más de un locus genético para aumentar el poder discriminatorio (Cacciò *et al.*, 2008). Es por ello que varios autores proponen que al menos, deben estudiarse los genes que codifican para la *tpi*, *gdh*, y  $\beta$ -giardina (Cacciò *et al.*, 2008; Feng y Xiao, 2011; Ryan y Cacciò, 2013).

### **2.11 Potencial zoonótico de *Giardia lamblia***

En 1979 la OMS decidió incluir la giardiosis en la lista de enfermedades que podrían ser zoonóticas, siendo esta hipótesis tomada en base a la ocurrencia de varios brotes por transmisión hídrica ocurridos en América del Norte, en los cuales varios animales salvajes estuvieron presumiblemente implicados (WHO, 1979). No obstante, en la actualidad no está del todo dilucidado la posible transmisión zoonótica de aislamientos de *G. lamblia* procedentes de animales al humano (Lee *et al.*, 2017).



Los animales domésticos pueden albergar tanto ensamblajes de *G. lamblia* específicos de hospederos, como ensamblajes zoonóticos, por lo que son necesarias herramientas sensibles de tipificación molecular para investigar la transmisión que pudiera existir entre los animales domésticos y el humano (Feng y Xiao, 2011; Tůmová *et al.*, 2018).

La infección de *G. lamblia* en animales domésticos, principalmente en perros, constituye un problema importante en la Salud Pública, aún cuando se considere que el impacto en perros y gatos deba ser mínimo (Thompson *et al.*, 2008). La mayoría de las infecciones por *G. lamblia* en perros resultan asintomáticas, no obstante, este protozoo flagelado puede causar en los cánidos, diarreas de curso agudo y crónico, pérdida de peso, malabsorción, vómitos y anemia (García-Cervantes *et al.*, 2017). Aunque los ensamblajes C y D de *G. lamblia* son específicos de los cánidos, los ensamblajes A y B se detectan también en perros y en otros animales (Itagaki *et al.*, 2005; Cacciò y Ryan, 2008; Ballweber *et al.*, 2010). De hecho, los grupos genéticos A y B se reconocen como ensamblajes genéticos zoonóticos (Ballweber *et al.*, 2010), por lo que su identificación en perros resulta muy importante para la salud pública desde el punto de vista epidemiológico, por la posible transmisión al humano que pudiera existir (Gil *et al.*, 2017).

Se sugiere que pueden existir dos ciclos de transmisión en ambientes urbanos domésticos relacionados con los perros. Estos involucrarían la transmisión de ensamblajes específicos de hospedero (ensamblajes C y D) entre los perros y la posible transmisión de los ensamblajes A y B entre éstos y el humano. La transmisión de los ensamblajes genéticos C y D pudiera estar favorecida por el íntimo contacto entre un gran número de perros que normalmente habitan en grupos, y por lo tanto solaparía la transmisión de otros ensamblajes genéticos. Por el contrario, en los perros que conviven con el humano la transmisión de estos ensamblajes específicos de hospedero entre los perros pudiera ser menor, y por consecuencia la infección con ensamblajes potencialmente zoonóticos (A y B) sería más probable que persistiera en estos cánidos (Claerebout *et al.*, 2009; García-Cervantes *et al.*, 2017).



## 2.12 Tratamiento

Los medicamentos anti-giardíacos actúan contra los trofozoítos y, en general, son menos capaces de penetrar la pared de los quistes. La eliminación de los quistes de las heces después de un tratamiento se debe a la acción del medicamento empleado sobre las formas trofozoíticas que los originan y no a un efecto directo sobre ellos (Fonte y Almannoni, 2009).

Varios agentes antimicrobianos, en particular aquellos de la clase de los 5-nitroimidazoles (5-NI), son utilizados comúnmente en el tratamiento de la giardiosis. Cuatro drogas de este grupo han mostrado categóricamente actividad anti-giardíaca: metronidazol, tinidazol, secnidazol y ornidazol. Esta clase fue descubierta en 1955 y en aquel entonces mostró una alta efectividad frente a varias infecciones causadas por protozoos (Gardner y Hill, 2001).

Éstos compuestos, los cuales contienen un grupo nitro en la posición 5 del anillo imidazólico, son profármacos que requieren su activación mediante las reductasas microbianas. La reducción del grupo nitro es el primer paso hacia la formación de un grupo de radicales libres, los que se unen y dañan a la molécula diana microbiana. La activación del fármaco es necesaria para la actividad antimicrobiana, y es muy específica para *G. lamblia* debido a sus reacciones de bajo potencial redox. Además del metronidazol, el fármaco que con mayor frecuencia se utiliza, se encuentran en el mercado el tinidazol, ornidazol y el secnidazol, con patrones de actividad similares al metronidazol, pero con mayores valores de vida media en el suero (Müller *et al.*, 2013).

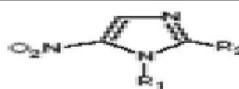
Desde inicios de 1950 el metronidazol y otros imidazoles han sido utilizados como terapia de elección contra la giardiosis, sin embargo la falla terapéutica se reporta en todos los agentes anti-giardíacos que se utilizan comúnmente, incluyendo el metronidazol, quinacrina, furazolidona y albendazol (Escobedo y Cimerman, 2007). Aunque el metronidazol y los otros nitroimidazoles son capaces de eliminar eficientemente las células de *G. lamblia*, el empleo de estos fármacos con frecuencia se asocia con recurrencia de los síntomas en los pacientes infectados por este parásito. Si se tiene en cuenta que la resistencia a los fármacos antiprotozoarios es una de las causas del fallo terapéutico, en ocasiones es difícil discriminarlo con los fenómenos de cura parasitológica seguida de una reinfección, y otros efectos como la intolerancia a la lactosa (Barbosa *et al.*, 2014).



A mediados de la década de 1990, se desarrolló otro grupo nitro, los tiazoles, dentro del cual se encuentra la nitazoxanida, con efectividad frente a *G. lamblia*. Similar a los fármacos 5-NI, requiere su activación mediante las reductasas microbianas, pero puede tener pequeñas diferencias en cuanto a los requerimientos de activación y dianas celulares, como lo demuestran experimentos en los que líneas de *Giardia* resistentes al metronidazol y resistencia cruzada a otros fármacos del grupo 5-NI, presentan en menor grado resistencia a la nitazoxanida (Müller *et al.*, 2013; Waddington *et al.*, 2018).

Dos miembros de la clase de los benzimidazoles, el albendazol y el mebendazol, se utilizan en el tratamiento de la giardiosis. Los benzimidazoles ejercen su efecto tóxico sobre *G. lamblia* al unirse al citoesqueleto del parásito. Esta unión trae consigo la inhibición de la polimerización del citoesqueleto y un desbalance en el consumo de glucosa (Cañete, 2013). Estos compuestos son poco absorbidos en el tracto gastrointestinal, por lo que se recomienda que se tomen con comidas ricas en grasa para aumentar su absorción (Cañete, 2013). Tres hechos han motivado su empleo en el tratamiento de la giardiosis: su relativa alta eficacia anti-giardiasica, la baja frecuencia de reacciones colaterales asociada a su uso y su probada capacidad para el control de las geohelminosis, lo que los hace muy útiles en condiciones de poliparasitismo (Figura 6) (Müller *et al.*, 2013; Waddington *et al.*, 2018).

Otros fármacos que se utilizan, aunque en menor proporción, son la quinacrina, que se utiliza casi exclusivamente, en casos de fallos terapéuticos reiterados con otros medicamentos, la furazolidona, paromomicina y bacitracina-zinc (Müller *et al.*, 2013; Waddington *et al.*, 2018).

Clase de compuesto	Estructura	Modo de acción propuesto
5-Nitroimidazoles (metronidazol)		Inactivación de proteínas y del ADN
5-Nitrofuranos (Furazolidona)		Inactivación de proteínas y del ADN
5-Nitrotiazoles (Nitazoxanida)		Inactivación de proteínas y del ADN
Acridinas (Quinacrina)		Inhibición de la síntesis del ADN
Benzimidazoles (Albendazol)		Interferencia con el citoesqueleto

**Fig. 6.** Estructura y modo de acción de las principales clases de compuestos anti-giardiasicos.



## CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Estudio transversal de la giardiosis en el periodo 2010-2013

#### 3.1.1 Diseño general del estudio

##### **Tipo de estudio: Estudio de corte transversal que abarcó tres estudios**

La presente investigación abarcó un horizonte temporal de 4 años (2010-2013) e incluyó tres estudios que comprendieron el análisis de los factores de riesgo de la giardiosis en población pediátrica y la relación de la caracterización molecular de aislamientos de *Giardia lamblia* con manifestaciones clínicas en los niños infectados con este protozoo intestinal de importancia médica, en tres escenarios diferentes: 1) niños con sintomatología gastrointestinal atendidos en el HPD-WS y niños provenientes de tres círculos infantiles de La Habana 2) niños escolares de cuatro municipios de La Habana y 3) niños preescolares del municipio Fomento, provincia Sancti Spíritus.

#### 3.2. Organización de la presente investigación

Para una mejor comprensión del hilo conductor de los estudios realizados, se expone a continuación, un esbozo de los mismos:

##### **Horizonte temporal:** 1ro de enero 2010-31 de diciembre 2013

- ❖ **Estudio 1:** Periodo 1ro de marzo 2010- 31 de Octubre 2011: 452 niños, divididos en 289 preescolares y escolares de la Habana remitidos al HPD-WS por síntomas gastrointestinales, y 163 de círculos infantiles de los municipios Arroyo Naranjo y Boyeros, como parte del programa de pesquisa parasitológica.
- ❖ **Estudio 2:** Periodo 1ro de enero a 31 de diciembre de 2013: 639 niños escolares de cuatro escuelas primarias procedentes de los municipios Plaza de la Revolución, Playa y Boyeros. Pesquisa parasitológica.
- ❖ **Estudio 3:** Periodo 1ro de enero a 30 de junio de 2013: 417 niños preescolares del municipio Fomento, Sancti Spíritus. Pesquisa parasitológica.

La lógica de las investigaciones fue la siguiente:

- ❖ Describir el comportamiento de la giardiosis en niños escolares y preescolares de La Habana y preescolares de Fomento (Estudios 1-3).



- ❖ Análisis de factores de riesgo para esta parasitosis en niños escolares de La Habana y preescolares de Fomento (Estudios 1-3).
- ❖ Caracterización molecular de aislamientos de *G. lamblia* mediante dos marcadores moleculares ensamble específicos (Estudios 1-3).
- ❖ Evaluación de marcadores y métodos moleculares para determinar los ensambles de *G. lamblia* y análisis de la concordancia mediante el índice de kappa (Estudios 1-3).
- ❖ Asociación entre los ensambles de *G. lamblia* y características clínicas en niños infectados por este protozoo intestinal (Estudios 1-3).

### 3.3 Universo y muestra de estudio

**Estudio 1: Universo:** 452 niños, divididos en 289 preescolares y escolares de la Habana remitidos al HPD-WS por síntomas gastrointestinales, y 163 procedentes de círculos infantiles de los municipios Arroyo Naranjo y Boyeros. **Muestra:** 103 niños infectados por *G. lamblia*

**Estudio 2: Universo:** 639 niños escolares de los municipios Plaza de la Revolución, Playa y Boyeros. **Muestra:** 76 niños escolares infectados por *G. lamblia*

**Estudio 3: Universo:** 417 niños preescolares procedentes del municipio Fomento, provincia Sancti Spíritus. **Muestra:** 45 niños preescolares infectados por *G. lamblia*

En el primer estudio se incluyeron a todos los niños preescolares y escolares remitidos a consulta externa del HPD-WS con sintomatología gastrointestinal. Este hospital ubicado en el suroeste de la capital, Referencia Nacional en la investigación y tratamiento de varias patologías en niños, atiende a una población superior a los 380 mil habitantes, provenientes principalmente de los municipios Boyeros y Arroyo Naranjo.

Como parte de la pesquisa parasitológica que se realiza en población preescolar en La Habana, se seleccionaron además por criterio de expertos, teniendo en cuenta la cercanía al HPD-WS y al IPK, tres círculos infantiles, correspondientes a los municipios Boyeros (Casita de Chocolate), Arroyo Naranjo (Florecitas del Naranjo) y La Lisa (Pioneritos del Futuro), en las proximidades del HPD-WS y del IPK, respectivamente.



El segundo estudio de giardiosis llevado a cabo en niños de edad escolar, se seleccionaron por criterio de expertos, como parte de la pesquisa parasitológica que se realiza en escuelas primarias de todos los municipios de la capital, cuatro escuelas: dos del municipio Boyeros (República Popular de Angola y Argenis Burgos), una del municipio Playa (Vo Thi Thang) y otra del municipio Plaza de la Revolución (Combatientes de Bolivia).

Para el tercer estudio se seleccionó, por criterio de expertos, el municipio de Fomento, de la provincia Sancti Spíritus, debido a que este municipio en el año 2004 reportó cifras elevadas de prevalencia de infecciones parasitarias intestinales (Wordemann *et al.*, 2006), y posteriormente, como parte de un proyecto de trabajo del INHEM y el IPK en población preescolar se trabajó en la disminución de las parasitosis intestinales mediante trabajos de intervención educativa.

Se incluyeron en los tres estudios realizados, a aquellos niños cuyos padres o tutores aceptaran participar voluntariamente. Una autorización escrita fue obtenida de las madres, padres o tutores de los niños, antes de comenzar el estudio, por lo que se confeccionó un modelo de consentimiento informado (Anexo 1).

Todos los niños infectados por *G. lamblia* y/u otro protozoo o helminto de importancia médica fueron tratados con fármacos antiparasitarios de elección por los médicos especialistas en Parasitología y/o Pediatras según esquemas terapéuticos previamente establecidos en el HPD-WS (Kappagoda *et al.*, 2011.; Keiser *et al.*, 2011). A todos se les realizó un seguimiento post tratamiento para verificar la cura parasitológica mediante el análisis de muestras de heces, una semana después de finalizado el tratamiento.

### **3.4 Criterios de inclusión y exclusión**

#### **3.4.1 Criterios de inclusión**

- Todo niño cuyo padre o tutor diera su consentimiento informado voluntario (Anexo 1) para este estudio.
- Todo niño que no se encontrarse bajo tratamiento antiparasitario.



### 3.4.2 Criterio de exclusión

- Padres o tutores que no dieran su consentimiento a participar voluntariamente en el estudio.
- Niños que fuesen medicados en un periodo anterior de 3 meses con fármacos antiparasitarios.

### 3.5. Operacionalización de las variables

En la tabla 2 se exponen las variables que se analizaron en la encuesta confeccionada para recoger datos clínico-epidemiológicos de interés (Anexo 2).

**Tabla 2.** Variables a estudiar en las encuestas realizadas en niños de La Habana y de Fomento, 2010-2013.

<b>Variables sociodemográficas</b>			
<b>Nombre de la variable</b>	<b>Naturaleza</b>	<b>Operacionalizaciones</b>	<b>Mediciones</b>
Edad	Cuantitativa discreta	Tiempo en meses o años desde nacimiento	Números absolutos, Medidas de tendencia central y de dispersión.
Sexo	Cualitativa nominal dicotómica	M (masculino) F (femenino)	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Peso	Cuantitativa continua	Medida antropométrica expresada en kilogramos	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Talla	Cuantitativa continua	Medida antropométrica expresada en centímetros	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Años de vida	Cualitativa ordinaria	Coinciden con la descripción ofrecida por los círculos infantiles	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.



<b>Factores relacionados con la vivienda</b>			
Nombre de la variable	Naturaleza	Operacionalizaciones	Mediciones
Localización de la vivienda	Cualitativa nominal dicotómica	U (urbana) R (rural)	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
No. miembros núcleo familiar	Cuantitativa discreta	Expresada en números	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
No. de habitaciones en la vivienda	Cuantitativa discreta	Expresada en números	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
<b>Factores higiénicos-dietéticos del niño</b>			
Nombre de la variable	Naturaleza	Operacionalizaciones	Mediciones
Consumo de agua hervida	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Succión digital o del tete	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Lavado de manos después de ir al baño	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Lavado de manos antes y después de ingerir alimentos	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Lavado de frutas y verdura antes de ingerirlas	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Contacto estrecho con animales	Cualitativa nominal politómica	Perros (Pe) Gatos (G) Caballos (Ca) Pájaros (Páj)	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.



		Palomas (Pa) Pollos (Po) Cerdos (Ce) Reses (R)	
Lactancia materna	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Procedencia del agua de consumo	Cualitativa nominal politómica	Acueducto (A) Pozo (Po) Hervida (He) Pipa (Pi)	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Antecedentes personales de parasitismo	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
<b>Síntomas y signos digestivos y otros</b>			
Nombre de la variable	Naturaleza	Operacionalizaciones	Mediciones
Dolor abdominal	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Vómitos	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Náuseas	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Pérdida de peso	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Prurito anal	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.



Pérdida del apetito	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Fatiga	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Flatulencia	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Fiebre	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Ronchas	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Cefalea	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Diarreas	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
<b>Características entre los que tengan diarreas</b>			
Nombre de la variable	Naturaleza	Operacionalizaciones	Mediciones
Duración (No. de días)	Cuantitativa discreta	Medida expresada en número de días	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Frecuencia (No. de diarreas en 24 h)	Cuantitativa discreta	Medida expresada en número de diarreas	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Tratamiento antiparasitario	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.



<b>Relacionadas con el examen macroscópico</b>			
Consistencia de las heces	Cualitativa nominal politómica	Moldeada (M) Semipastosa (Sp) Pastosa (P) Semilíquida (Sl) Líquida (L)	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Color de las heces	Cualitativa nominal politómica	Amarillo-marrón (Am) Rojo-marrón (Rm) Naranja (N) Verdosa (V) Negruzca (N)	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Presencia de sangre en las heces	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Presencia de moco en las heces	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Presencia de restos alimentarios en las heces	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
Presencia de helmintos adultos en las heces	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.
<b>Relacionadas con el examen microscópico</b>			
Nombre de la variable	Naturaleza	Operacionalizaciones	Mediciones
Parásitos	Cualitativa nominal politómica	<i>Trichuris trichiura</i> , <i>Enterobius vermicularis</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Hymenolepis nana</i> , <i>H. diminuta</i> ,	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.



		<i>Entamoeba coli</i> , <i>E. histolytica/ E.dispar</i> , <i>Taenia spp.</i> , <i>Giardia duodenalis</i> <i>Blastocystis spp.</i> , ancylostomídeos, <i>Strongyloides stercoralis</i> , <i>Cryptosporidium spp.</i> , <i>Cyclospora cayetanensis</i> , <i>Cystoisospora belli</i>	
Parasitados	Cualitativa nominal dicotómica	Sí  No	Números absolutos, porcentajes, tasas específicas.

### 3.6 Técnica de recogida de información

A todos los casos les llenó una encuesta previamente confeccionada para recoger datos clínico-epidemiológicos de interés (Anexo 2), que se ha empleado por el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitismo Intestinal del IPK (LNR-PI-IPK) en otras investigaciones similares (López *et al.*, 1993). Las variables relacionadas con los síntomas y signos causados por la infección con *G. lamblia* se concibieron sobre la base del cuadro clínico reportado por la literatura médica como posibles para la giardiosis (Procop, 2001). Los principales síntomas recogidos en el cuestionario fueron: diarrea, dolor abdominal, pérdida de peso, vómito, falta de apetito, cefalea, entre otros. La definición de síntomas y signos se realizó de acuerdo a la definición de criterios semiológicos clásicos (Llanio *et al.*, 1991).

A todos los niños que presentaron al menos un síntoma gastrointestinal (dolor abdominal, vómito, náusea, flatulencia, diarrea, pérdida de peso, pérdida de apetito) se clasificó como sintomático. La diarrea fue definida como la eliminación de tres o más deposiciones líquidas en un periodo de 24 horas (Procop, 2001). Se consideraron niños asintomáticos a todos aquellos que no presentaron ningún síntoma específico de infección gastrointestinal en el momento de recogida de la muestra de heces.

Las variables epidemiológicas recogidas estuvieron divididas en hábitos higiénico-sanitarios y variables demográficas, consideradas como posibles favorecedoras del riesgo de exposición. En el primer grupo de variables analizadas estuvieron el lavado de



manos antes de comer y después de defecar, hábito de hervir agua, presencia de animales domésticos en la casa, lavado de frutas y alimentos, entre otros.

### 3.7. Estudio parasitológico de las muestras de heces de niños

A todos los niños que formaron parte de la presente investigación, se les tomaron tres muestras de heces para estudio parasitológico, en días alternos. Las muestras fueron recogidas en frascos limpios y etiquetados y procesadas en el Laboratorio de Parasitología del HPD-WS (Estudio 1), en el LNR-PI-IPK (Estudio 2), y en el Centro Provincial de Higiene y Microbiología de Fomento, Sancti Spiritus (Estudio 3).

Las muestras de heces se analizaron mediante los métodos de examen directo con lugol y eosina, y la técnica de concentración de formol-éter de Ritchie para la búsqueda de quistes y trofozoitos de *G. lamblia*. Además se realizaron las técnicas de Willis modificado, específica para huevos ligeros de helmintos, y de Zielh-Neelsen modificada para la detección de coccidias intestinales (García, 2001).

Tras la realización de las técnicas coproparasitológicas, se adicionó a todos los frascos con muestras de heces positivas a *G. lamblia*, el preservante dicromato de potasio a 2,5% y se conservaron en el LNR-PI-IPK a 4°C.

#### 3.7.1 Examen directo con eosina y lugol parasitológico (Núñez y Cordoví, 2007)

Para el examen directo se tomaron pequeños fragmentos de heces de la superficie y que se diluyeron, sobre una lámina, en una gota de eosina y de lugol, respectivamente. Se observó al microscopio con lente ocular 10X y con objetivo 10X primero para el diagnóstico de larvas y huevos de helmintos, y posteriormente a 40X para observar los protozoos intestinales. Los trofozoitos y quistes de protozoos se destacaron como elementos nacarados translúcidos sobre el fondo rosado de eosina. En cuanto a la tinción con lugol, esta permitió la coloración de estructuras internas, tales como núcleos y vacuolas de glucógenos, importantes en la diferenciación de protozoos intestinales.



### **3.7.2 Examen por concentración de formol-éter/etil acetato de Ritchie (Núñez y Cordoví, 2007)**

A una porción de la materia fecal sólida se le agregaron 10 mL de solución salina fisiológica (NaCl a 0,9%) y se mezcló hasta que quedase líquida. A las muestras líquidas se le adicionó a completar directamente dicho volumen. Cada muestra se filtró a través de una gasa doble y húmeda y se centrifugó a 600-800 g, por 2 min. Se decantó el sobrenadante, se diluyó el sedimento en solución salina, se centrifugó nuevamente y, al sedimento obtenido, se le agregaron 10 mL de formol a 10%. Se adicionaron 3 mL de acetato de etilo, y se agitó la mezcla vigorosamente durante 30 segundos. Una última centrifugación a 800 g por 2 min, permitió la concentración de los parásitos intestinales en el sedimento.

### **3.7.3 Técnica de Willis modificada para huevos ligeros de helmintos (Núñez y Cordoví, 2007)**

En un vasito plástico o de cristal de no más de 30 mL de capacidad, preferentemente cilíndrico o cónico con el extremo inferior más estrecho, se vertieron de 10 a 15 mL de la solución de alta densidad a base de sal, azúcar y una pequeña cantidad de formol en las siguientes proporciones: 180 g de Cloruro de sodio, 500 g de azúcar, 20 mL de Formo a 40 % y 1200 mL de agua corriente. Esta solución debe dar una densidad de 1200.

Se disolvieron aproximadamente 2 gr. de las heces con un aplicador de madera o plástico desechable. Una vez llenado el vasito con la misma solución hasta el borde sin que rebosase, se colocó un portaobjetos de manera que el líquido contactara con la superficie del portaobjeto y se mantuvo así de 15 a 20 minutos. Pasado ese tiempo, se tomó el portaobjetos con un movimiento de volteo rápido de manera que el líquido no se escurriera de la lámina y se trasladó al microscopio para su observación con ocular 10X y objetivo 10X, recorriendo toda la lámina con ese aumento.



### 3.7.4 Coloración de Zielh Neelsen modificada para coccidias intestinales (Núñez y Cordoví, 2007)

Esta técnica de coloración constituye el método de referencia para el diagnóstico de certeza de los coccidios intestinales: en especial, *Cryptosporidium* spp., y *Cyclospora cayetanensis*.

A las muestras de heces líquidas se les realizó una extensión en lámina portaobjeto. Cada extendido se fijó en metanol durante cinco minutos y posteriormente se realizó el secado de las mismas a temperatura ambiente. Se colocaron las láminas durante una hora en una solución de fucsina fenicada, y lavadas con agua corriente, una vez transcurrido este tiempo. La decoloración de los extendidos se llevó a cabo con solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2% durante 20 seg. Tras el lavado de las láminas con agua corriente se colorearon con solución de verde malaquita a 5% durante 5 minutos. Se observaron las láminas al microscopio con objetivo 40X.

### 3.8 Extracción y purificación del ADN

A todas las muestras de heces que presentaron quistes y/o trofozoitos de *G. lamblia* en los estudios parasitológicos, se les realizó la técnica de extracción del ADN mediante el método del fenol-cloroformo (Maniatis *et al.*, 1992). El precipitado obtenido luego de la purificación de los quistes, fue resuspendido en 300 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH8, EDTA 25 mM, NaCl 25 mM, SDS a 1%) y 100 µg/mL de proteinasa K (Boehringer Mannheim, Alemania), incubándose 2 horas a 56 °C. Posteriormente se realizaron dos extracciones de proteínas con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v) con sus respectivas centrifugaciones a 8000 g por 10 minutos. El material genético se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y 30 µL de acetato de sodio (0,3 M pH 5,3) durante 30 minutos a -20 °C. El precipitado, que se obtuvo por centrifugación a 10 000 g durante 20 minutos, se lavó con etanol a 70 % y se secó a temperatura ambiente, para resuspenderse finalmente en 50 µL de tampón Tris-EDTA (TE; Tris-HCl 1 mM EDTA 1 mM, pH 8,0) y se conservó a -20 °C. En cada etapa del proceso se incluyó un control de extracción de 50 µL de solución tamponada, en vez de ADN del parásito.



### 3.9 Caracterización molecular de los aislamientos de *G. lamblia*

Dada las características particulares del genoma diploide de este parásito intestinal y la heterogeneidad de secuencias alélicas que se identifican entre los diferentes aislamientos, se precisa de un análisis de al menos dos marcadores genéticos (Ryan y Cacciò, 2016). Es por ello que la amplificación del ADN de *G. lamblia* se llevó a cabo mediante el gen *tpi*, uno de los más utilizados en *Giardia*, en combinación con los genes IGS-ADNr (Estudio 1), *E1* (Estudio 2 y *gdh* (Estudio 3), respectivamente, utilizando métodos moleculares (PCR a punto final, PCR anidada y PCR-RFLP) para la identificación de los ensamblajes A, B y A+B y/o sub ensamblajes (Figura 7). Especificar que en el Estudio 1 se pudo determinar los sub ensamblajes AI, AII, mientras que en el Estudio 3 fue posible identificar tanto los sub ensamblajes AI y AII como los sub ensamblajes BII y BIV (Tabla 3).



**Tabla 3.** Relación de los blancos genéticos y los métodos moleculares empleados en los estudios de caracterización molecular de *G. lamblia*. La Habana y Fomento, periodo 2010-2013.

<u>Método molecular</u>	<u>Gen</u>	<u>Cebador</u>	<u>Secuencia 5'-3'</u>	<u>Especie/Ensamble/ Sub ensamble</u>	<u>Tamaño del amplión (pb)</u>	<u>Referencia bibliográfica</u>																																																																									
PCR a punto final	<i>Tpi</i>	<i>tpiA-F</i>	GGAGACCGACGAGCAAAGC	<i>Giardia lamblia/ A</i>	148	Bertrand <i>et al.</i> , 2005																																																																									
		<i>tpiA-R</i>	CTTGCCAAGCGCCTCAA						<i>tpiB-F</i>	AATAGCAGCACARAACGTGTATC	<i>Giardia lamblia/ B</i>	81	<i>tpiB-R</i>	TG CCCATGTCCAGCAGCATC	PCR anidada	IGS-ADNr	GLF	GACCGTCGTGAGACAGGTTAG	<i>Giardia lamblia</i>	560	Lee <i>et al.</i> , 2006	GSR	CCTGCTGCCGTCCTTGGATG			GA1F	GGTTTGCCGTGATATGCA	<i>Giardia lamblia/ A/ AI</i>	176	GA2F	CCCTCCAGAGCAGMRTGAGA	<i>Giardia lamblia/A/AII</i>	261			GBF	GRCAGGGTGCTCAGGTG	<i>Giardia lamblia/ B</i>	319			GABR	AGCACCTTGTCTATAYAGT			PCR a punto final	<i>EI</i>	Afor	AAAGAGATAGTTCGCGATGTC	<i>Giardia lamblia/ A</i>	165	Vanni <i>et al.</i> , 2012	Arev	ATTAACAAACAGGGAGACGTATG			Bfor	GAAGTCATCTCTGGGGCAAG	<i>Giardia lamblia/ B</i>	272			Brev	GAAGTCTAGATAAACGTGTCGG	PCR-RFLP	<i>gdh</i>	GDHeF	TCAACGTYAAYCGYGGYTTCCGT	<i>Giardia lamblia</i>	432	Read <i>et al.</i> , 2004			GDHiF	CAGTACAACCTCYGCTCTCGG				
		<i>tpiB-F</i>	AATAGCAGCACARAACGTGTATC	<i>Giardia lamblia/ B</i>	81																																																																										
		<i>tpiB-R</i>	TG CCCATGTCCAGCAGCATC				PCR anidada	IGS-ADNr	GLF	GACCGTCGTGAGACAGGTTAG	<i>Giardia lamblia</i>	560	Lee <i>et al.</i> , 2006	GSR			CCTGCTGCCGTCCTTGGATG			GA1F		GGTTTGCCGTGATATGCA	<i>Giardia lamblia/ A/ AI</i>	176	GA2F	CCCTCCAGAGCAGMRTGAGA	<i>Giardia lamblia/A/AII</i>	261			GBF	GRCAGGGTGCTCAGGTG	<i>Giardia lamblia/ B</i>	319			GABR	AGCACCTTGTCTATAYAGT			PCR a punto final	<i>EI</i>	Afor	AAAGAGATAGTTCGCGATGTC	<i>Giardia lamblia/ A</i>	165	Vanni <i>et al.</i> , 2012	Arev	ATTAACAAACAGGGAGACGTATG				Bfor	GAAGTCATCTCTGGGGCAAG	<i>Giardia lamblia/ B</i>	272			Brev	GAAGTCTAGATAAACGTGTCGG	PCR-RFLP	<i>gdh</i>	GDHeF	TCAACGTYAAYCGYGGYTTCCGT	<i>Giardia lamblia</i>	432	Read <i>et al.</i> , 2004			GDHiF		CAGTACAACCTCYGCTCTCGG					GDHiR	GTRTCCTTGCACATCTCC	AI/AII/BIII/BIV
PCR anidada	IGS-ADNr	GLF	GACCGTCGTGAGACAGGTTAG	<i>Giardia lamblia</i>	560	Lee <i>et al.</i> , 2006																																																																									
		GSR	CCTGCTGCCGTCCTTGGATG																																																																												
		GA1F	GGTTTGCCGTGATATGCA	<i>Giardia lamblia/ A/ AI</i>	176																																																																										
		GA2F	CCCTCCAGAGCAGMRTGAGA	<i>Giardia lamblia/A/AII</i>	261																																																																										
		GBF	GRCAGGGTGCTCAGGTG	<i>Giardia lamblia/ B</i>	319																																																																										
		GABR	AGCACCTTGTCTATAYAGT																																																																												
PCR a punto final	<i>EI</i>	Afor	AAAGAGATAGTTCGCGATGTC	<i>Giardia lamblia/ A</i>	165	Vanni <i>et al.</i> , 2012																																																																									
		Arev	ATTAACAAACAGGGAGACGTATG						Bfor	GAAGTCATCTCTGGGGCAAG	<i>Giardia lamblia/ B</i>	272			Brev	GAAGTCTAGATAAACGTGTCGG	PCR-RFLP	<i>gdh</i>	GDHeF	TCAACGTYAAYCGYGGYTTCCGT	<i>Giardia lamblia</i>	432	Read <i>et al.</i> , 2004			GDHiF	CAGTACAACCTCYGCTCTCGG					GDHiR	GTRTCCTTGCACATCTCC	AI/AII/BIII/BIV																																													
		Bfor	GAAGTCATCTCTGGGGCAAG	<i>Giardia lamblia/ B</i>	272																																																																										
		Brev	GAAGTCTAGATAAACGTGTCGG																																																																												
PCR-RFLP	<i>gdh</i>	GDHeF	TCAACGTYAAYCGYGGYTTCCGT	<i>Giardia lamblia</i>	432	Read <i>et al.</i> , 2004																																																																									
		GDHiF	CAGTACAACCTCYGCTCTCGG																																																																												
		GDHiR	GTRTCCTTGCACATCTCC	AI/AII/BIII/BIV																																																																											

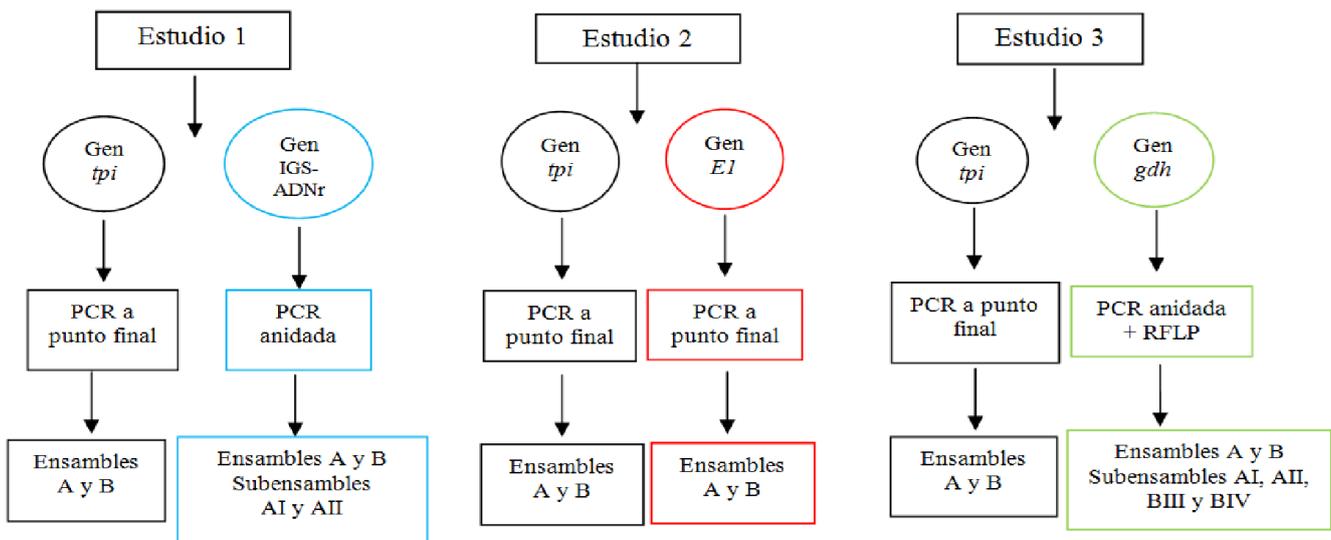


Figura 7. Diagrama de los métodos moleculares empleados en la presente investigación de La Habana y Fomento 2010-2013.



Se incluyó en cada experimento de la PCR un control positivo para los ensamblajes genéticos A y B de *G. lamblia*, los que fueron tomados de muestras de pacientes caracterizadas en ensamblajes genéticos A y B todos procedentes del Laboratorio Regional de Salud Pública, de Enschede, Holanda. De igual forma, se utilizaron controles positivos para los sub ensamblajes AI (*G. lamblia* WB) y AII (*G. lamblia* K1) y para los sub ensamblajes BIII (*G. lamblia* RD 25) y BIV (*G. lamblia* CA 14) donados por el Laboratorio de Parasitología de la Universidad de Berna, Suiza. Se incluyó igualmente un control negativo en cada experimento, conteniendo H<sub>2</sub>O destilada estéril en lugar de ADN molde de *G. lamblia*.

### 3.9.1 PCR punto final- *tpi*

Se analizaron todas las muestras con los dos juegos de cebadores por separados para identificar de manera independiente los ensamblajes A y B de *G. lamblia*. La mezcla de reacción para la amplificación del ADN se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL teniendo en cuenta las condiciones de amplificación descritas por Bertrand *et al.*, (2005), conteniendo 2,5 µL de tampón TopTaq Master Mix Kit (Tris-HCl 670 mmol/L pH=8,8; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 160 mmol/L; Tween 20 0,1%) (Qiagen, Alemania), 5µL de solución Q, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada uno de los dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) (Applied Biosystem, USA), 0,4 µM del cebador oligonucleótido, 1U de Taq Polimerasa (Qiagen, Alemania) y 5 µL del molde de ADN.

La reacción transcurrió en un termociclador (MJ Research, Estados Unidos de América (EUA)) con el siguiente perfil de amplificación: desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C.

### 3.9.2 PCR anidada- IGS-ADNr

La amplificación de los espaciadores intergénicos del ADNr de *G. lamblia* se realizó mediante la técnica de PCR anidada descrita por Lee *et al.*, (2006).

La mezcla de reacción para la primera amplificación del ADN se llevó a cabo con los cebadores GLF y GSR en un volumen final de 25 µL conteniendo 2,5 µL de tampón TopTaq Master Mix Kit (Tris-HCl 670 mmol/L pH=8,8; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 160 mmol/L; Tween 20 0,1%) (Qiagen, Alemania), 5µL de solución Q, 200 µM de cada uno de los



dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) (Applied Biosystem, EUA), 0.4  $\mu$ M del cebador oligonucleótido, 2,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,5U de Taq Polimerasa (Qiagen, Alemania), y 5  $\mu$ L del molde de ADN. Posteriormente 2  $\mu$ L del ADN molde de esta primera reacción se adicionaron a los tres juegos de PCR, GA1F/GABR (Sub ensamble AI), GA2F/GABR (Sub ensamble AII) y GBF/GABR (Ensamble B), respectivamente, para la segunda PCR.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (MJ Research, EUA) con el siguiente perfil de amplificación para las dos PCR: desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C y 60 segundos a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C.

### 3.9.3 PCR a punto final *E1*

Se utilizó la PCR-*E1* para diferenciar los ensamblados A y B de *G. lamblia* en muestras de heces, según protocolo descrito por Vanni *et al.*, (2012).

La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ L y contuvo 2,5  $\mu$ L de tampón *GeneAmp*® 10X (tris-HCl 100 mM pH 8,3;  $MgCl_2$  15 mM, KCl 500 mM, gelatina a 0,01%) (Applied Biosystem, Estados Unidos de América, (EUA)), 200  $\mu$ M de cada uno de los dNTP (Applied Biosystem, EUA), 0,4  $\mu$ M de cada uno de los cebadores, 2, 1U de GoTaq® DNA Polimerasa (Applied Biosystems, EUA), y 5  $\mu$ L de ADN molde.

El programa utilizado en el termociclador (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, EUA) para la amplificación fue: desnaturalización inicial de 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 30 segundos a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C.

### 3.9.4 PCR-RFLP- *gdh*

Se realizó una PCR semi anidada siguiendo el protocolo descrito por Read *et al.*, (2004). La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L conteniendo 2,5  $\mu$ L de tampón *GeneAmp*® 10X (Applied Biosystem, EUA) (tris-HCl 100 mM pH 8,3;  $MgCl_2$  15 mM, KCl 500 mM, gelatina a 0,01%), 200  $\mu$ M de cada uno de los dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) (Applied Biosystem, EUA), 0,4 $\mu$ M del



cebador oligonucleótido, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U de AmpliTaq® DNA Polimerasa (Applied Biosystem, EUA) y 5 µL de ADN.

La reacción transcurrió en un termociclador (MJ Research, EUA) con el siguiente perfil de amplificación: desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos, seguido de 55 ciclos de: 2 minutos a 94°C, 1 minuto a 56°C y 2 minutos a 72°C, con una extensión final de 7 minutos a 72°C para la primera ronda de la PCR utilizando los cebadores GDHeF y GDHiR. Para la segunda ronda de la PCR se utilizaron los cebadores GDHiF y GDHiR con el siguiente programa: 55 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 20 segundos a 56°C y 45 segundos a 72°C, con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Los productos obtenidos de la PCR fueron digeridos con la enzima de restricción *Nla* IV (New England Biolabs, EUA) a 37°C durante 4 horas, siguiendo el método de Read *et al.*, (2004) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Talla esperada de la digestión de los productos de la PCR- *gdh* con la enzima de restricción *Nla* IV (Read *et al.*, 2004).

Productos esperados con la digestión de la enzimas <i>Nla</i> IV de los productos de la PCR- <i>gdh</i>	
Ensamblaje	Talla del fragmento en pares de base (pb)
AI	90 pb, 120 pb y 150 pb
AII	70 pb, 80 pb y 120 pb
BIII	120 pb y 290 pb
BIV	120 pb y 290 pb
C	70 pb, 120 pb y 190 pb
D	120 pb y 250 pb
E	80 pb, 100 pb y 220 pb

Para aquellos aislamientos de *G. lamblia* cuyos patrones de bandas correspondieran al ensamble genético B se utilizó 2U de la enzima de restricción *Rsa* I a 37°C durante 3 horas (New England Biolabs, EUA) para diferenciar los sub ensambles BIII y BIV. En



el primer caso (sub ensamble BIII) se obtuvo patrones de 130 pb y 300 pb, mientras que para el sub ensamble BIV el fragmento esperado fue de 430 pb.

### **3.9.5 Visualización de los productos de PCR y la digestión utilizadas en la caracterización genética de *G. lamblia***

Para la detección de todos los productos obtenidos mediante las distintas PCR se analizaron 10  $\mu$ L de cada mezcla resultante en electroforesis en gel de agarosa al 2 %, preparando un tampón tris borato EDTA (TBE 0,5x) con bromuro de etidio 0,5 $\mu$ g /mL. El marcador de peso molecular utilizado fue Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder (MBI, Fermentas, St Leon-Rot, Alemania). La corrida electroforética se realizó con la fuente (Eurogentec Mupid exU, Seraing, Bélgica), aplicando las muestras a 120V por 30 minutos. La lectura del patrón de bandas de los productos obtenidos de la PCR-RFLP se realizó en electroforesis en gel de agarosa a 3 %, utilizando tampón tris borato EDTA (TBE 0,5x) con bromuro de etidio 0,5 $\mu$ g /mL. La corrida electroforética se realizó, de igual forma, con la fuente (Eurogentec Mupid exU, Seraing, Bélgica), aplicando las muestras a 3,5V/cm por 2 horas. La visualización de los productos de amplificación y de digestión se llevaron a cabo mediante luz ultravioleta en un equipo para la visualización de geles, U: Genius (Syngene, Reino Unido).

### **3.10 Técnica de análisis y procesamiento de la información**

Toda la información recogida se almacenó en una base de datos en Microsoft Excel versión 2007, con los datos de identificación, clínicos y epidemiológicos y procesados en el paquete de programas EPIINFO versión 6.04.

Para el análisis de las variables cualitativas se emplearon las pruebas de comparación de proporciones,  $\chi^2$  de Independencia y la prueba exacta de Fisher cuando el número de casos fue escaso. Se confeccionaron tablas 2 X 2 para estimar la razón de prevalencia como medida de asociación de los factores de riesgo que se estudiaron, para lo cual se tuvo en cuenta el intervalo de confianza (IC) con una confiabilidad de 95%.

Se utilizaron modelos univariados para determinar si cada variable epidemiológica estudiada estaba relacionada significativamente con la infección por *G. lamblia*. En todos los casos fueron considerados significativos los valores de  $P < 0,05$ .



Se utilizó el índice *Kappa* para el análisis de la concordancia de los resultados en la identificación de los ensambles genéticos de *G. lamblia* mediante dos marcadores genéticos ensamble específicos en los estudios 1, 2 y 3. Para la interpretación de este índice se utilizó la escala de valoración propuesta por Landis y Koch (1977): 0: sin acuerdo; 0-0,2: insignificante; 0,2-0,4: bajo; 0,4-0,6: bueno; 0,6-0,8: muy bueno; 0,8-1: excelente.

Los análisis se realizaron usando los paquetes de programas GraphPad Prism versión 4.02, SPSS versión 11 (Bryman, 2001) , y EPIINFO, versión 6.04 (Dean *et al.*, 1994).

### **3.11 Consideraciones éticas**

El protocolo fue revisado y aprobado por la Comisión Científica Especializada en Parasitología y por el Comité de Ética del IPK (Referencia CEI-IPK-15-13), y fue justificado desde el punto de vista ético al cumplir con la Declaración de Helsinki (World Medical Association, 2000) y las guías operacionales expuestas por los Comités de Ética que revisan investigaciones biomédicas (WHO, 2000).

### **3.12 Limitaciones de la presente investigación**

En el presente estudio no fue posible utilizar la misma batería de marcadores y métodos moleculares para determinar ensambles y sub ensambles genéticos que permitiera un análisis global para determinar una mejor correlación, sin sesgos, de los ensambles y sub ensambles del parásito con las manifestaciones clínicas.

En el año 2012, no pudo ser posible tener aislamientos de *Giardia lamblia* en el proyecto de investigación con el Hospital "William Soler", dado las obras reconstructivas que se llevaron a cabo en el Laboratorio de Parasitología y otras áreas de dicho Hospital Docente.

Dado el número limitado de aislamientos de *G. lamblia* identificados como ensamble A en los Estudios 2 y 3, no pudo ser posible realizar análisis estadístico entre los ensambles A y B y mixto A+B, por lo que se realizó un agrupamiento del grupo genético B y grupo no B para analizar la posible asociación estadística en la relación de las variables clínicas con la infección por el ensamble B de este parásito intestinal.



## CAPÍTULO IV. RESULTADOS

### 4.1. Comportamiento de la giardiosis en La Habana y en el municipio de Fomento, Sancti Spíritus, 2010-2013

#### 4.1.1. Estudio 1 en La Habana: Periodo 2010-2011

Se analizaron muestras seriadas de heces de 452 niños, de los cuales 103 (22,8%) resultaron positivos a la infección por *G. lamblia*. La mayoría de los casos infectados por este protozoo de importancia médica, procedían de niños con sintomatología gastrointestinal (95/103; 92,2%), en parte debido al diseño del presente estudio, en el cual 64% (289/452) de los casos procedían de la consulta externa del HPD-WS. No se evidenció asociación estadística entre las variables analizadas con la infección por *G. lamblia*, si bien los niños menores de 5 años de edad y aquellos que tenían perros en el hogar presentaron una mayor frecuencia de infección que sus contrapartes (Tabla 5).

**Tabla 5.** Características socio demográficas y epidemiológicas, según factores de riesgos de la infección por *G. lamblia*. Hospital Pediátrico "William Soler" y círculos infantiles de La Habana, 2010-2011.

Características	Número de examinados (n= 452)	Número de infectados (n = 103)	% infectados	Razón de Prevalencia	Valor de P
<u>Sexo</u>					
Masculino	238	58	24,4	1,16 (0,82-1,63)	0,46
Femenino	214	45	21,0	1	
<u>Grupo de estudio</u>					
Hospitalizados	45	6	13,3	1	
Consulta Externa	244	89	36,5	0,37 (0,17-0,78)	0,004*
Pesquisa	163	8	4,9	2,71 (0,99-7,43)	0,10
<u>Grupo de edad</u>					
< 5 años	208	55	26,4	1,34 (0,96-1,89)	0,11
>5 años	244	48	19,7	1	
<u>Área de residencia</u>					
Urbana	387	90	23,3	1,16 (0,69-1,95)	0,68
Rural	65	13	20,0	1	



<u>Consumo de agua</u>						
Agua hervida	421	95	22,6	0,87 (0,47-1,63)	0,85	
Agua no hervida	31	8	25,8	1		
<u>Lavado de manos después de defecar</u>						
Sí	438	100	22,8	1,06 (0,39-2,95)	0,84	
No	14	3	21,4	1		
<u>Presencia de perros en el hogar</u>						
Sí	197	54	27,4	1	0,05	
No	255	49	19,2	0,70 (0,50-0,98)		

\*Estadísticamente significativo. Test Chi cuadrado

#### 4.1.2. Estudio 2 en escolares de tres municipios de La Habana. Periodo enero-diciembre 2013

Se estudiaron 639 niños procedentes de cuatro escuelas primarias de tres municipios de La Habana. Del total de niños evaluados, 76 (11,9%) presentaron quistes y/o trofozoitos de *G. lamblia*. El análisis de los datos recogidos en las encuestas epidemiológicas mostró que la presencia de perros en el hogar estuvo estadísticamente asociada con la presencia de la infección en estos niños, comparado con aquellos que no presentaron perros en el hogar. Para las demás variables socio demográficas y epidemiológicas analizadas no se encontró asociación (Tabla 6).

**Tabla 6.** Características socio demográficas y epidemiológicas según factores de riesgos de la infección por *G. lamblia* en niños de tres municipios de la Habana. Enero-diciembre 2013

Características	Número de examinados (n= 639)	Número de infectados (n= 76)	% infectados	Razón de prevalencia	Valor de P
<u>Sexo</u>					
Masculino	357	42	11,8	0,98 (0,64-1,49)	0,99
Femenino	282	34	12,1	1	
<u>Área de residencia</u>					
Urbana	558	69	12,4	1,43 (0,68-3,00)	0,43
Rural	81	7	8,6	1	



<u>Grupo de edad</u>					
< 5 años	162	27	14,1	1,62 (1,05-2,51)	0,06
>5 años	477	49	10,3	1	
<u>Fuente de agua</u>					
Agua hervida	601	75	12,5	4,75 (0,68-33,2)	0,12
Agua no tratada	38	1	2,6	1	
<u>Lavado de manos después de defecar</u>					
Sí	621	74	11,9	1,07 (0,29-4,03)	0,79
No	18	2	11,1	1	
<u>Presencia de perros en el hogar</u>					
Sí	331	51	15,4	1	0,007*
No	308	25	8,1	0,52 (0,34-0,83)	

\*estadísticamente significativo, Prueba de Chi cuadrado

#### **4.1.3. Estudio 3 en preescolares del municipio Fomento, Sancti Spíritus: Periodo enero-junio 2013**

Se estudiaron 417 niños del municipio Fomento, provincia Sancti Spíritus de los cuales 45 (10,8%) estuvieron infectados por *G. lamblia*. La mayoría de los niños (67,9%) provenían de la comunidad rural de Sopimpa de dicho municipio. El consumo de agua no hervida, sin clorar, proveniente de pozos y la tenencia de mascotas (perros) en el hogar estuvieron estadísticamente asociados a la infección por este parásito intestinal como muestra la tabla 7.



**Tabla 7.** Características socio demográficas y epidemiológicas, según factores de riesgos en la infección por *G. lamblia*. Municipio Fomento, provincia Sancti Spíritus, enero-junio de 2013

Características	Número de examinados (n= 417)	Número de infectados (n= 45)	% infectados	Riesgo de prevalencia	Valor de P
<u>Sexo</u>					
Masculino	221	25	11,3	1,11 (0,64-1,93)	0,84
Femenino	196	20	10,2	1	
<u>Área de residencia</u>					
Urbana	134	15	11,2	1,06 (0,59-1,89)	0,99
Rural	283	30	10,6	1	
<u>Grupo de edad</u>					
0-2	103	13	12,6	0,66 (0,33-1,34)	0,35
3-4	135	17	12,6	0,66 (0,34-1,68)	0,30
5	179	15	8,4	1	
<u>Fuente de agua</u>					
Agua hervida	388	37	9,5	0,35 (0,18-0,67)	0,007*
Agua no tratada	29	8	27,6	1	
<u>Lavado de manos después de defecar</u>					
Sí	319	32	10,0	0,76 (0,41-1,38)	0,47
No	98	13	13,3	1	
<u>Presencia de perros en el hogar</u>					
Sí	225	33	14,7	1	0,009*
No	192	12	6,3	0,43 (0,23-0,80)	

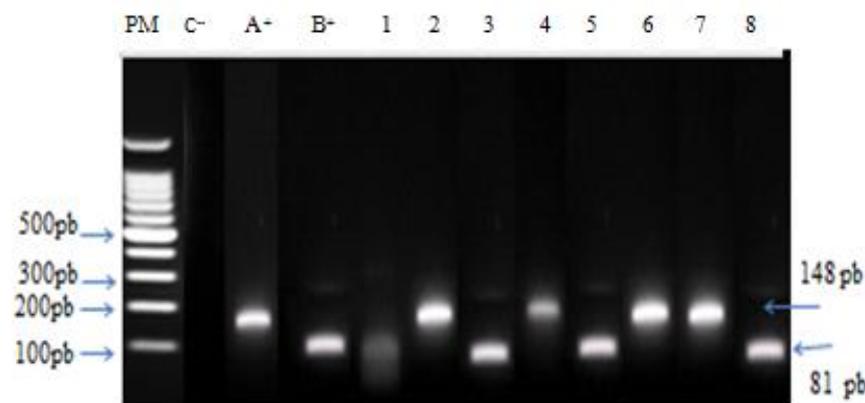
\*estadísticamente significativo, Prueba de Chi cuadrado



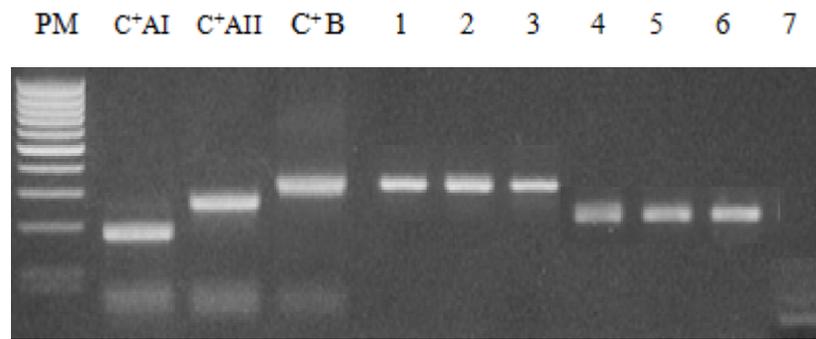
#### 4.2. Caracterización molecular de aislamientos de *G. lamblia*

Todos los PCR utilizados en los diferentes estudios amplificaron y permitieron diferenciar los ensamblajes de *G. lamblia* a partir de muestras de heces conservadas. La PCR-*tpi* a punto final descrita por Bertrand *et al.*, (2005) permitió diferenciar los ensamblajes genéticos de *G. lamblia* (Figura 8) en los tres estudios realizados. De igual forma, la PCR-IGS-ADNr tuvo la ventaja de además de diferenciar los ensamblajes A y B de este protozoo intestinal, permitir la diferenciación de los sub ensamblajes AI y AII de *G. lamblia*. (Figura 9).

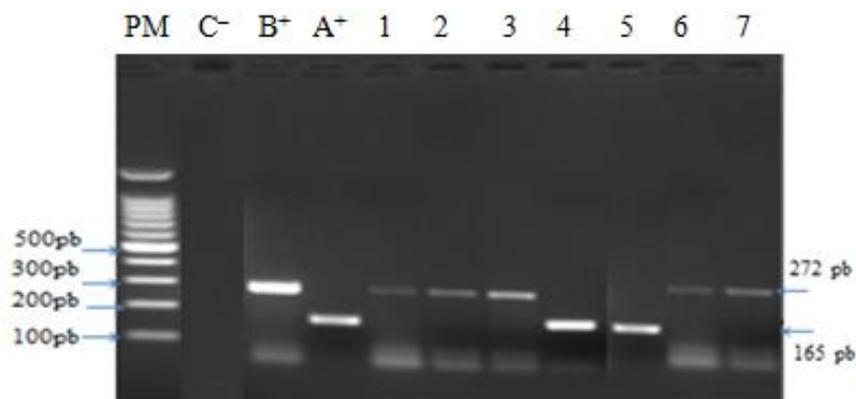
La PCR-*E1* a punto final, diseñada por Vanni *et al.*, (Vanni *et al.*, 2012), se empleó en la caracterización molecular de *G. lamblia* en el Estudio 2 para diferenciar los ensamblajes A y B de este protozoo intestinal (Figura 10). En el Estudio 3, la PCR-*gdh* permitió amplificar un fragmento conservado de 432 pares de base en todas las muestras de ADN amplificadas (Figura 11). Con la implementación de la PCR-RFLP para este gen se pudo identificar y diferenciar los ensamblajes de A y de B, además de los sub ensamblajes AI y AII, después de digestión enzimática con la enzima de restricción (*Nla* IV), según protocolo descrito por Read *et al.*, (2004) (Figura 12).



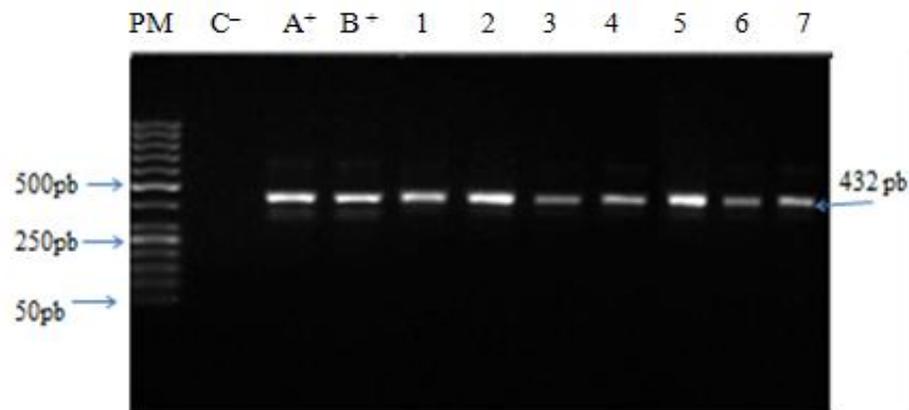
**Fig.8.** Patrón de amplificación obtenido al emplear la PCR-*tpi* A y PCR-*tpi* B. PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder, MBI, Fermentas, St Leon-Rot, Alemania); C<sup>-</sup>: Control Negativo; A<sup>+</sup>: Control positivo para ensamble A (*G. lamblia* WB-C6); B<sup>+</sup>: Control positivo para ensamble B (*G. lamblia* GS); carriles 1,3,5,8: muestras positivas representativas de ensamble B de *G. lamblia*; carriles 2,4,6,7: muestras positivas representativas de ensamble A de *G. lamblia*



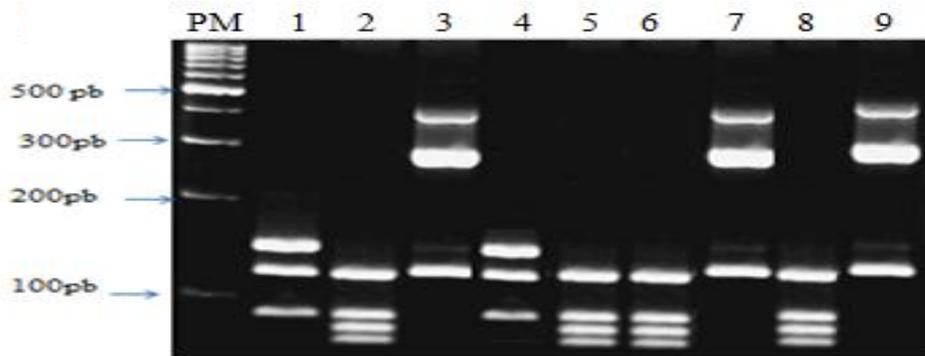
**Fig.9.** Patrón de amplificación obtenido al emplear la PCR-IGS-ADNr. PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder, MBI, Fermentas, St Leon-Rot, Alemania); C<sup>+</sup>AI: Control Positivo sub ensamble AI (*G. lamblia* WB); C<sup>+</sup>AII: Control Positivo sub ensamble AII (*G. lamblia* K1), C<sup>+</sup>B: Control Positivo ensamble B (*G. lamblia* GS); carriles 1, 2,3: muestras positivas representativas de ensamble B de *G. lamblia*; carriles 4,5,6: muestras positivas representativas de ensamble A de *G. lamblia* (sub ensamble AII); 7: Control negativo.



**Fig. 10** Productos de la PCR-E1 específicos para los ensambles A y B de *G. lamblia*. PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder, MBI, Fermentas, St Leon-Rot, Alemania); C<sup>-</sup>: Control Negativo; B<sup>+</sup>: Control positivo para ensamble B (*G. lamblia* GS); A<sup>+</sup>: Control positivo para ensamble A (*G. lamblia* WB-C6); carriles 1, 2, 3, 6 y 7: muestras positivas representativas para ensamble B de *G. lamblia*; carriles 4, 5: muestras positivas representativas de ensamble A de *G. lamblia*.



**Fig. 11.** Patrón de amplificación obtenido al emplear la PCR-*gdh* (432pb). PM: Marcador de Peso Molecular de 50 pb (Gene Ruler™ 50 bp DNA ladder, MBI, Fermentas, St Leon-Rot, Alemania); C<sup>-</sup>: Control Negativo; A<sup>+</sup>: Control positivo para ensamble A (*G. lamblia* WB-C6); B<sup>+</sup>: Control positivo para ensamble B (*G. lamblia* GS); 1-7: muestras positivas representativas de la PCR-*gdh*.



**Fig. 12.** Patrón de digestión enzimática con la enzima *Nla* IV (carriles 1-9) del producto amplificado en la PCR-*gdh* (432pb) para diferenciar los ensambles A y B de *G. lamblia*. PM: marcador de Peso Molecular de 100 pb (Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder, MBI, Fermentas, St Leon-Rot, Alemania); carril 1: Control positivo para ensamble A (*G. lamblia* WB-C6) (sub ensamble AI); carriles 2,4, 5, 6 y 8: muestras positivas representativas de ensamble A de *G. lamblia*; carril 3: Control positivo para ensamble B (*G. lamblia* GS); carriles 7 y 9: muestras representativas de ensamble B de *G. lamblia*.

#### 4.2.1. Concordancia de los métodos moleculares empleados. La Habana y Fomento, 2010-2013

##### 4.2.1.1 Estudio 1: Genes *tpi* e IGS-ADNr

De los 103 aislamientos de *G. lamblia* que se identificaron en los estudios parasitológicos correspondiente al Estudio 1 (La Habana, 2010-2011), se identificó ADN del parásito en 90 (87,4%) de ellos mediante ambos PCR, coincidiendo los resultados negativos mediante ambos marcadores genéticos. Al 100% (90/90) de las muestras que se detectó ADN de *G. lamblia* se pudo clasificar en ensambles genéticos de este parásito. La distribución de los ensambles



genéticos de *G. lamblia* fue la siguiente: 38 ensamblajes B (42,2%), 36 ensamblajes A (40,0%) y 16 infecciones mixtas A+B (17,8%). La concordancia en la identificación de los ensamblajes de *G. lamblia* mediante ambos marcadores genéticos (*tpi* e IGS-ADNr) fue perfecta (índice  $kappa= 1$ ), con un porcentaje de tipificación mediante ambos marcadores moleculares de 100% (Tabla 8).

#### 4.2.1.2 Estudio 2: Genes *tpi* y *E1*

En este estudio se identificaron 76 aislamientos de *G. lamblia*, de los cuales 63 (82,9%) pudieron ser amplificados con el gen *tpi*, y 58 (76,3%) con el gen *E1*, y 11 muestras resultaron negativas mediante ambas PCR. La identificación en ensamblajes de *G. lamblia* con el gen *tpi* arrojó los siguientes resultados: 7 ensamblajes A (11,1%), 30 ensamblajes B (47,6%) y 26 infecciones mixtas A+B (41,3%). Por su parte, la distribución de ensamblajes genéticos de este parásito intestinal con el empleo del gen *E1* fue: 5 ensamblajes A (8,6%), 39 ensamblajes B (67,2%) y 14 infecciones mixtas A+B (24,2%).

La concordancia de ambas PCR se obtuvo en 43 aislamientos, dando el siguiente patrón de identificación: 4 ensamblajes A (9,3%), 28 ensamblajes B (65,1%) y 11 infecciones mixtas A+ B (25,6%). Los índices  $kappa$  para los ensamblajes A, B y A+B utilizando los dos marcadores genéticos empleados en este estudio fueron de 0,64 (IC al 95%: 0,31-0,96); 0,56 (IC al 95%: 0,37-0,74) y 0,39 (IC al 95%: 0,18-0,60, respectivamente (Tabla 8). No obstante, en 22 muestras se obtuvieron resultados discordantes para 28,9%, y obtuvo un porcentaje de tipificación de la combinación de ambos marcadores moleculares de 56,6% (43/76).

#### 4.2.1.3 Estudio 3: Genes *tpi* y *gdh*

Del total de 45 muestras positivas a *G. lamblia* se pudo amplificar el ADN de este parásito en 36 muestras (80,0%) mediante el gen *tpi*, y 39 (86,7%) con el empleo del gen *gdh*.

El patrón obtenido de ensamblajes genéticos de *G. lamblia* utilizando el gen *tpi* fue de 4 ensamblajes A (11,1%), 19 ensamblajes B (52,8%) y 13 infecciones mixtas A+ B (36,1%); en cambio, con el gen *gdh* se identificaron 8 ensamblajes A (20,5%), 15 ensamblajes B (38,5%) y 16 ensamblajes A+B (41,0%).

En resumen, se obtuvo una concordancia en los resultados de ambas PCR en la identificación de 4 ensamblajes A, 15 ensamblajes B y 13 ensamblajes A+B para un índice de  $kappa$  de 0,62 (IC al 95%: 0,29-0,95); 0,81 (IC al 95%: 0,64-0,98) y 0,85 (IC al 95%: 0,68-1,0), respectivamente



(Tabla 8). Solo se obtuvieron cuatro resultados discordantes (8,9%) mediante ambos marcadores moleculares y se obtuvo un porcentaje de tipificación de la combinación de ambos marcadores moleculares de 71,1% (32/45).

**Tabla 8.** Resultados de la concordancia en los métodos moleculares empleados en los diferentes estudios de caracterización molecular de aislamientos de *G. lamblia*, La Habana y Fomento, 2010-2013

Resultados	Concordancia de los resultados en las métodos moleculares utilizados		
	<b>PCR <i>tpi</i> y PCR IGS-ADNr</b>		
<b>Índice Kappa (IC al 95%)</b>	<b>Ensamble A</b> 1,0 (1,0-1,0)	<b>Ensamble B</b> 1,0 (1,0-1,0)	<b>Ensamble A+B</b> 1,0 (1,0-1,0)
<b>Error estándar</b>	0	0	0
<b>PCR <i>tpi</i> y PCR <i>E1</i></b>			
<b>Índice Kappa (IC al 95%)</b>	<b>Ensamble A</b> 0,64 (0,31-0,96)	<b>Ensamble B</b> 0,56 (0,37-0,74)	<b>Ensamble A+B</b> 0,39 (0,18-0,60)
<b>Error estándar</b>	0,17	0,56	0,11
<b>PCR <i>tpi</i> y PCR <i>gdh</i></b>			
<b>Índice Kappa (IC al 95%)</b>	<b>Ensamble A</b> 0,62 (0,29-0,95)	<b>Ensamble B</b> 0,81 (0,64-0,98)	<b>Ensamble A+B</b> 0,85 (0,68-1,0)
<b>Error estándar</b>	0,10	0,09	0,08
<b>Prueba de homogeneidad de kappas (<math>X^2</math>)</b>	18,92; $P= 0,001$	5,073; $P= 0,079$	34,26; $P= 0,000$

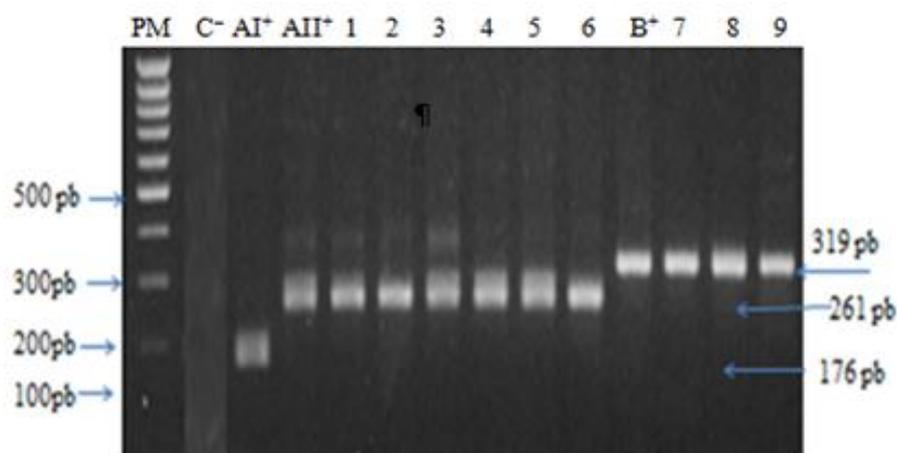


### 4.3. Identificación de sub ensamblés de *G. lamblia*

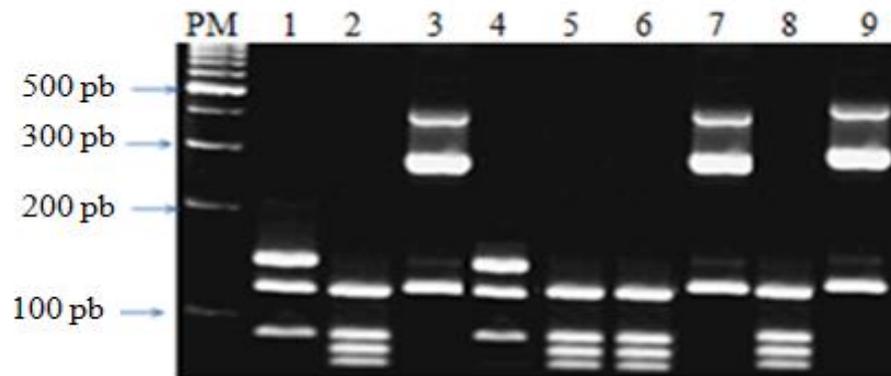
La identificación de sub ensamblés genéticos de este parásito intestinal fue posible en los Estudios 1 y 3, utilizando variantes de la PCR: PCR anidada y PCR-RFLP, según protocolos descritos por Lee *et al.*, (2006) y Read *et al.*, (2004). En el estudio 2, las PCR utilizadas, en su variante de punto final, solo permitió la identificación de ensamblés genéticos de *G. lamblia*.

En el Estudio 1 utilizando la PCR anidada con el gen IGS-ADNr, se identificó el sub ensamblé AII en 45 (86,5%) de las 52 muestras en las que fue detectado el ensamblé A. El sub ensamblé AI, en menor proporción, se detectó en solo 4 muestras para 7,7% y la infección mixta AI +AII se identificó en 3 niños (5,8%) (Figura 13).

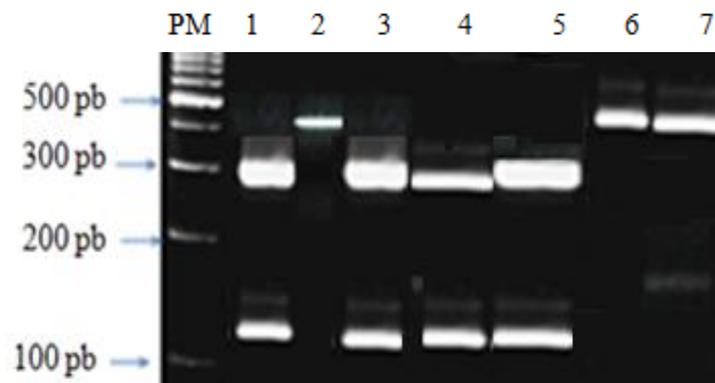
En el Estudio 3, la PCR-RFLP que tuvo como blanco genético el gen *gdh*, permitió diferenciar los sub ensamblés de *G. lamblia* después de la digestión enzimática con dos enzimas de restricción (*Nla* IV y *Rsa* I), según protocolo descrito por Read *et al.*, (2004) (Figuras 14 y 15). Este marcador genético permitió identificar un predominio de las infecciones causadas por el sub ensamblé BIII en 24 (85,7%) de los 28 aislamientos en los que se identificó el ensamblé B de este parásito intestinal sobre el sub ensamblé BIV que se detectó en solo 4 casos (14,3%). De igual forma, se constató la mayor distribución del sub ensamblé AII en 15 de 17 casos (88,2%), el cual fue mayoritario sobre el sub ensamblé AI (2 casos, 11,8%).



**Fig. 13.** Patrón electroforético de los productos de la PCR-IGS-ADNr. PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, MBI, Fermentas, St Leon-Rot, Alemania); C<sup>-</sup>: Control Negativo; AI<sup>+</sup>: Control positivo para sub ensamblé AI (*G. lamblia* WB) (176 pb); AII<sup>+</sup>: Control positivo para sub ensamblé AII (*G. lamblia* K1) (261 pb); B<sup>+</sup>: Control positivo para ensamblé B (*G. lamblia* GS); carriles 1- 6: , muestras representativas de sub ensamblé AII de *G. lamblia*; carriles 7-9: muestras representativas del ensamblé B de *G. lamblia* (319 pb).



**Fig. 14.** Patrón de digestión enzimática con las enzimas *Nla IV* del producto amplificado en la PCR-*gdh* (432pb). PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, MBI, Fermentas, St Leon-Rot, Alemania); carril 1: cepa control de *G. lamblia* WB (sub ensamble AI); carril 2: Control positivo de sub ensamble AII (*G. lamblia* K1); carril 3: Control positivo de *G. lamblia* ensamble B; carril 4: muestra representativa de sub ensamble AI de *G. lamblia*; carriles 5, 6, y 8: muestras representativas de sub ensamble AII; carriles 7 y 9: muestras representativas de ensamble B de *G. lamblia*.



**Fig. 15.** Patrón de digestión enzimática con las enzimas *Rsa I* del producto amplificado en la PCR-*gdh* (432pb). PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, MBI, Fermentas, St Leon-Rot, Alemania); carril 1: Control Positivo sub ensamble BIII (*G. lamblia* RD25); carril 2: Control positivo sub ensamble BIV (*G. lamblia* CA 14); carriles 3-5: muestras representativas de sub ensamble BIII; carriles 6 y 7: muestras representativas de sub ensamble BIV.

#### 4.4. Relación entre ensambles de *G. lamblia* y manifestaciones clínicas en niños

Con el objetivo de identificar una posible asociación entre la sintomatología desarrollada en los niños con los ensambles de *G. lamblia* infectantes, se correlacionaron variables clínicas recopiladas en las encuestas epidemiológicas con los ensambles de este parásito intestinal identificados mediante las técnicas moleculares empleadas. Para eliminar el sesgo en este



análisis se tuvieron en cuenta los niños que sólo estuvieron infectados por *G. lamblia* como patógeno de importancia médica.

#### 4.4.1. Estudio 1: Relación entre ensambles de *G. lamblia* y características clínicas en niños de la Habana, 2010-2011

Como se puede observar en la tabla 9, al realizar la relación entre las variables clínicas con el ensamble genético infectante en los 85 niños solo infectados por *G. lamblia* (5 de 90 presentaron co infección con otros protozoos y/o helmintos de importancia médica), no se evidenciaron diferencias estadísticas en los porcentajes de los síntomas entre los ensambles A, B y mixto A+B, en cuanto a las variables: dolor abdominal, flatulencia, vómito, anorexia, fiebre, pérdida de peso, prurito anal, fatiga, cefalea y náuseas (prueba de comparación de proporciones o prueba exacta de Fisher,  $P > 0,05$ ).

**Tabla 9.** Características clínicas de la población estudiada según el ensamble de *Giardia lamblia* detectado en los niños infectados solamente con este protozoo intestinal. La Habana, 2010-2011.

Características Clínicas	Ensamble B	Ensamble A	Ensambls mixtos	Valor de <i>P</i>
	(n=36)	(n=34)	A + B	
	No. (%)	No. (%)	(n=15) No. (%)	
Diarreas	12 (33,33)	10 (29,41)	5 (33,33)	$P=0,93$
Dolor abdominal o cólicos	27 (75,0)	22 (64,71)	10 (66,67)	$P=0,63$
Flatulencia	11 (30,56)	8 (23,53)	4 (26,67)	$P=0,80$
Nauseas	9 (25,0)	8 (23,53)	2 (13,33)	$P=0,64$
Vómitos	4 (11,11)	9 (26,47)	4 (26,67)	$P=0,21$
Cefaleas	9 (25,0)	5 (14,71)	0 (0)	$P=0,08$
Anorexia	20 (55,56)	15 (44,12)	5 (33,33)	$P=0,32$
Fiebre	3 (8,33)	6 (17,65)	2 (13,33)	$P=0,51$
Pérdida de peso	17 (47,22)	15 (44,12)	8 (53,33)	$P=0,84$
Prurito anal	13 (36,11)	17 (50,0)	4 (26,67)	$P=0,25$
Fatiga	9 (25,0)	8 (23,53)	3 (20,0)	$P=0,93$



No obstante, al comparar tres de los síntomas más comunes de esta enfermedad (diarrea o flatulencia o dolor abdominal), se identificó una asociación entre estas variables con la infección por el ensamble B de este protozoo intestinal ( $P=0,0007$ ) (Tabla 10). Sin embargo esta asociación no se obtuvo cuando este análisis se realizó con las infecciones producidas por el ensamble A y A+B, de *G. lamblia*, respectivamente.

**Tabla 10.** Presencia de algunos síntomas digestivos en niños solo infectados por *G. lamblia* en relación con los ensamblajes infectantes de este parásito intestinal, La Habana, 2010-2011.

Datos clínicos	Ensamble B		Ensamble A		Ensamblajes mixtos A+B	
	Sí (n=36) n (%)	No (n=49) n (%)	Sí (n=34) n (%)	No (n=51) n (%)	Sí (n=15) n (%)	No (n=70) n (%)
<u>Signo o Síntoma</u>						
Sí	33 (91,67)	44 (89,79)	32 (94,12)	45 (88,23)	12 (80)	65 (92,86)
No	3 (8,33)	5 (10,20)	2 (5,88)	6 (11,76)	3 (20)	5 (7,14)
OR (IC al 95 %)	1,25 (0,30-5,08)		2,13 (0,45-∞)		0,30 (0,07-1,32)	
Valor de <i>P</i>	$P=0,54$		$P=0,30$		$P=0,14$	
<u>Algunos síntomas digestivos*</u>						
Sí	36 (100)	37 (75,51)	26 (76,47)	47 (92,16)	11 (73,33)	62 (88,57)
No	0 (0)	12 (24,49)	8 (23,53)	4 (7,84)	4 (26,67)	8 (11,43)
OR (IC al 95 %)	24,33 (2,33-∞)		0,27 (0,08-0,96)		0,30 (0,07-1,32)	
Valor de <i>P</i>	$P=0,0007$		$P=0,05$		$P=0,14$	

\*diarrea, o flatulencia o dolor abdominal

#### 4.4.2. Estudio 2: Relación entre ensamblajes de *G. lamblia* y características clínicas en niños de la Habana, 2013

En el presente estudio se analizó el significado clínico de la infección por *G. lamblia* en niños infectados por este protozoo que presentaron el mismo resultado en la identificación del ensamble genético mediante las dos PCR utilizados (Tabla 11).

Debido al número limitado de infecciones causadas por el ensamble A de este parásito en la población estudiada, no fue posible la asociación entre este ensamble en particular con ningún síntoma típico de la giardiasis. Por esta razón el análisis estadístico agrupó por una parte el ensamble B y por otra parte un denominado grupo no B, el cual comprendió los niños infectados con los ensamblajes A y mixto A+B.



La diarrea fue la única característica clínica asociada estadísticamente con la infección del ensamble B de *G. lamblia* ( $P < 0,05$ ), al ser comparada con la infección mixta (A+B) (Tabla 11).

**Tabla 11.** Distribución de ensamblajes genéticos de *G. lamblia* mediante PCR-*tpi* y PCR-*EI-HF* y su relación con variables clínicas en niños escolares de La Habana.2013.

Datos clínicos	B (n= 28)		No B (n=15)		Valor de P
	n	%	n	%	
Diarrea	11	(39,3)	1	(6,7)	0,03*
Dolor abdominal	12	(42,9)	3	(20,0)	0,19
Flatulencia	5	(17,9)	2	(13,3)	0,53
Nausea	6	(21,4)	5	(33,3)	0,47
Vómito	5	(17,9)	3	(20,0)	0,58
Anorexia	6	(21,4)	4	(26,7)	0,49
Fiebre	5	(17,9)	2	(13,3)	0,53
Pérdida de peso	11	(39,3)	3	(20,0)	0,17
Fatiga	4	( 7,1)	1	(6,7)	0,42

\* Diferencia significativa mediante prueba exacta de Fisher

En la tabla 12 se expone la comparación de los síntomas digestivos: diarrea, flatulencia y dolor abdominal, entre el ensamble B y el grupo de los ensamblajes A y A+B. La presencia de algunos síntomas digestivos fue ligeramente superior en el grupo del ensamble B de *G. lamblia*, no obstante, no se encontró asociación estadística con el grupo no B, en parte por el número limitado de infecciones causadas por los ensamblajes A y A+B en el Estudio 2.



**Tabla 12.** Presencia de algunos síntomas digestivos en niños solo infectados por *G. lamblia* en relación con el ensamble B y el grupo no B de este parásito intestinal, La Habana, 2013

Datos clínicos	Ensamble B	
	Sí (n=28) n (%)	No (n=15) n (%)
<u>Signo o Síntoma</u>		
Sí	15 (53,57)	8 (53,33)
No	13 (46,43)	7(46,67)
OR (IC al 95 %)	1,01 (0,30-3,46)	
Valor de <i>P</i>	<i>P</i> =0,62	
<u>Algunos síntomas digestivos*</u>		
Sí	15 (53,57)	6 (40,0)
No	13 (46,43)	9 (60,0)
OR (IC al 95 %)	1,73 (0,50-5,99)	
Valor de <i>P</i>	<i>P</i> =0,30	

#### 4.4.3. Estudio 3: Relación entre ensamblajes genéticos de *G. lamblia* y características clínicas en niños preescolares de Fomento, Sancti Spiritus 2013

Al comparar las manifestaciones clínicas desarrolladas en niños preescolares del municipio Fomento, provincia de Sancti Spiritus, debido a la infección por los ensamblajes genéticos de *G. lamblia* no se evidenció diferencias estadísticamente significativas entre las variables clínicas analizadas en relación con los grupos de ensamblajes genéticos investigados (B y no B) ( $P \geq 0,05$ ) (Tabla 13).

**Tabla 13.** Distribución de ensamblajes genéticos de *G. lamblia* y su relación con variables clínicas en niños preescolares del municipio Fomento, Sancti Spiritus, 2013.

Datos clínicos	B (n= 15)		No B (n=17)		Valor de <i>P</i>
	n	%	n	%	
Diarrea	7	(46,7)	4	(23,5)	0,16
Dolor abdominal	6	(40,0)	5	(29,4)	0,40
Flatulencia	2	(13,3)	5	(29,4)	0,25
Nausea	6	(40,0)	5	(29,4)	0,40
Vómito	2	(13,3)	3	(17,6)	0,56



Anorexia	3 (20,0)	4 (23,5)	0,58
Fiebre	1(6,7)	2 (11,8)	0,55
Pérdida de peso	6 (40,0)	6 (35,3)	0,54
Fatiga	4 (26,7)	1 (5,9)	0,13

No obstante, en la Tabla 14 se expone la relación de tres de los síntomas más comunes (diarrea o dolor abdominal o flatulencia) en esta infección intestinal parasitaria, con los grupos de ensambles analizados, y se evidenció una diferencia significativa en el ensamble B donde hubo un mayor riesgo de presentar uno de estos síntomas digestivos en comparación con los ensambles A y A+B combinados ( $P=0,04$ ).

**Tabla 14.** Presencia de algunos síntomas digestivos en niños preescolares solo infectados por *G. lamblia* en relación con el ensamble B y el grupo no B de este parásito intestinal. Municipio Fomento, provincia Sancti Spíritus, 2013

Datos clínicos	Ensamble B	
	Sí (n=15) n (%)	No (n=17) n (%)
<u>Signo o Síntoma</u>		
Sí	11 (73,33)	8 (47,06)
No	4 (26,67)	9 (52,94)
OR (IC al 95 %)	3,09 (0,72-13,06)	
Valor de $P$	$P=0,13$	
<u>Algunos síntomas digestivos*</u>		
Sí	10 (66,7)	5 (29,41)
No	5 (33,3)	12 (70,59)
OR (IC al 95 %)	4,80 (1,11-20,75)	
Valor de $P$	$P=0,04^*$	

\* Diferencia significativa mediante prueba exacta de Fisher

#### 4.4.5 Relación entre ensambles genéticos de *G. lamblia* y características clínicas en niños preescolares y escolares en los tres estudios realizados

De forma global se obtuvo en los tres estudios realizados una distribución de 165 ensambles como sigue: 81 ensambles B (49,1%), 44 ensambles A (26,7%) y 40 ensambles mixto A+B (24,2%). Para conocer acerca de posibles diferencias en la sintomatología en población preescolar y escolar en cuanto a los ensambles genéticos de *G. lamblia* infectantes, se realizó un compendio de los datos de ambos grupos como se expone en la Tabla 15.



**Tabla 15.** Relación entre la sintomatología en niños preescolares (< 5 años) y escolares (> 5 años) con el ensamble de *Giardia lamblia* infectante.

Datos clínicos	Ensamble B		Ensamble A		Ensamblajes mixtos A+B	
	< 5 años (n=42) n (%)	> 5 años (n=37) n (%)	< 5 años (n=20) n (%)	> 5 años (n=22) n (%)	< 5 años (n=24) n (%)	> 5 años (n=15) n (%)
<u>Signo o Síntoma</u>						
Sí	35 (83,33)	24 (64,86)	16 (80,0)	19 (86,36)	15 (62,5)	10 (66,67)
No	7 (16,67)	13 (35,14)	4 (20,0)	3 (13,64)	9 (37,5)	5 (33,33)
OR (IC al 95 %)	2,71 (0,96-7,59)		2,13 (0,14-2,95)		0,30 (0,22-3,13)	
Valor de <i>P</i>	<i>P</i> =0,05		<i>P</i> =0,44		<i>P</i> =0,53	
<u>Algunos síntomas digestivos*</u>						
Sí	31 (73,81)	18 (48,65)	12 (60,0)	17 (77,27)	12 (50,0)	7 (46,67)
No	11 (26,19)	19 (51,35)	8 (40,0)	5 (22,73)	12 (50,0)	8 (53,33)
OR (IC al 95 %)	2,97 (1,17-7,55)		0,44 (0,12-1,63)		1,14 (0,32-4,05)	
Valor de <i>P</i>	<b><i>P</i>=0,02*</b>		<i>P</i> =0,19		<i>P</i> =0,14	

\*Diferencia significativa mediante prueba de  $\chi^2$

Al comparar la presencia de síntomas generales, no se evidenció diferencias estadísticamente significativas, si bien los niños preescolares mostraron un mayor porcentaje de sintomatología en comparación con los niños escolares cuando estuvieron infectados por el ensamble B de *G. lamblia* ( $P = 0,05$ ). De forma interesante, cuando se agruparon los síntomas diarrea o flatulencia o dolor abdominal, se constató una diferencia estadísticamente significativa (OR=2,61;  $P = 0,02$ ) en los niños preescolares infectados por el ensamble B de este parásito en relación con los niños escolares. Para los restantes ensambles genéticos analizados, A y mixto A+B no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la infección por estos ensambles y los grupos de escolares y preescolares.



## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

### 5.1 Comportamiento de la giardiosis en los diferentes periodos de estudio en La Habana y Fomento

La infección causada por *G. lamblia* constituye una de las principales causas de enfermedad diarreaica a nivel mundial, y se estima que causa, aproximadamente 280 millones de personas sintomáticas cada año, principalmente en países en vías de desarrollo (Feng y Xiao, 2011). No obstante, esta cifra pudiera ser superior, con la introducción de las técnicas moleculares, las cuales presentan una mayor sensibilidad en comparación con las técnicas parasitológicas y de ELISA, en el diagnóstico parasitológico (Ghieth *et al.*, 2016; Hijjawi *et al.*, 2018).

La giardiosis representa un problema de salud pública importante debido a su alta prevalencia que presenta en muchos países en vías de desarrollo (Coelho *et al.*, 2017) y su tendencia a causar brotes, incluso en países desarrollados (Feng y Xiao, 2011; Shen *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2017); además está demostrada la asociación negativa que presenta esta infección intestinal con el desarrollo cognoscitivo y retardo en el crecimiento en los niños (George *et al.*, 2018), por lo que el diagnóstico precoz de esta parasitosis en este grupo etario es de gran importancia (Squire y Ryan, 2017; Dacal *et al.*, 2018). De hecho, *Giardia* es una de las causas principales de gastroenteritis a nivel mundial, y se plantea que en países en vías de desarrollo, por cada caso reportado, pudiera existir un subregistro de 15 casos en la comunidad sin ser detectado (WalDRAM *et al.*, 2017). Esta parasitosis, además, es común en el ganado y en otros animales acompañantes, por lo que resulta también importante en la medicina veterinaria (Feng y Xiao, 2011).

En los tres estudios realizados la frecuencia de infección por *G. lamblia* osciló de 22,8% (Estudio 1), 11,9% (Estudio 2) a 10,8% (Estudio 3), confirmando a este parásito intestinal como uno de los más importantes y prevalentes que afecta a niños en Cuba. Esta diferencia encontrada en los valores de frecuencia de infección en el Estudio 1 en comparación con los Estudios 2 y 3, respectivamente, estuvo dada por el diseño empleado, en el cual la selección de casos estuvo principalmente compuesta por pacientes sintomáticos remitidos a consulta externa del HPD-WS, mientras que en los restantes dos estudios comprendió una pesquisa parasitológica en escuelas primarias y en niños preescolares.



De hecho, en el Estudio 1 se encontró una asociación estadística entre los niños atendidos en consulta externa en comparación con los hospitalizados y los que procedían de la pesquisa parasitológica, respectivamente; resultado influenciado por el diseño empleado en este estudio, como se planteó anteriormente, debido a que la gran mayoría de casos sintomáticos infectados por *G. lamblia* provenían de la consulta externa del HPD-WS. Aún cuando esta parasitosis intestinal es frecuentemente diagnosticada en la red de nuestros centros de salud, son escasos los datos acerca de la epidemiología de la giardiosis sintomática en población pediátrica (Bello *et al.*, 2011).

En Cuba, según datos de la primera encuesta nacional de parasitismo realizada en 1984, *G. lamblia* es el protozoo intestinal más frecuentemente identificado en la población del país (Núñez, 2001). En la década pasada, estudios realizados por Núñez *et al.* (1999) y Mendoza *et al.* (2001) mostraron tasas de infección de esta parasitosis entre 20 y 54% en niños que asistían a círculos infantiles de Ciudad de La Habana. Si bien los resultados de estos autores presentan tasas de infección por *G. lamblia* superior al de nuestro estudio, hay que destacar que desde inicios del 2000 se han implementado políticas encaminadas a una mejora del saneamiento ambiental, de la calidad del agua potable, y de promoción de medidas educativas para prevenir enfermedades diarreicas agudas, lo que indirectamente conllevaría a un descenso de las parasitosis intestinales (Bello *et al.*, 2011).

Otra encuesta de alcance nacional, realizada en 2009, encontró que *G. lamblia* con 6,02%, sigue siendo, entre los parásitos de importancia médica, el más frecuentemente identificado en nuestra población (Rojas *et al.*, 2012). Esta cifra, inferior a la reportada en nuestro trabajo, pudiera deberse a que en el diseño muestral de las encuestas nacionales de parasitismo intestinal se incluyen a todos los grupos etarios, y nuestra investigación estuvo centrada en el grupo más vulnerable, la población pediátrica, de ahí la mayor tasa de infección por *G. lamblia* identificada.

La giardiosis, junto a otras entidades infecciosas de etiología parasitaria, como las geohelminosis, reúne los criterios de lo que se ha dado en llamar Enfermedades Desatendidas (Holveck *et al.*, 2007). Estas enfermedades presentan una significativa contribución la perpetuación de la pobreza en las áreas o países donde son endémicas, al deteriorar el crecimiento físico y el desarrollo cognoscitivo de sus generaciones más jóvenes y reducir la



capacidad de trabajo y la productividad de sus adultos (Fonte y Almannoni, 2009; Chiappini *et al.*, 2018; Ibáñez-Cervantes *et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta que el modo de infección es común en las infecciones gastrointestinales de etiología viral, parasitaria y bacteriana, a través de agua y alimentos contaminados con microorganismos patógenos, el control de las medidas higiénico sanitarias resultan de gran importancia en la prevención de estas enfermedades (Choy *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016; Squire y Ryan, 2017; Chiappini *et al.*, 2018).

La epidemiología de *G. lamblia* está fuertemente asociada con una variedad de factores de riesgos relacionados con el hospedero, como son las condiciones socio demográficas, ambientales y zoonóticas (Choy *et al.*, 2014). En la presente investigación encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el riesgo de infección por *G. lamblia* con el consumo de agua no hervida en el Estudio 3. Es bien conocido que *Giardia* y *Cryptosporidium* representan una de las causas más comunes de brotes de transmisión hídrica (Savioli *et al.*, 2006), de ahí que la calidad del agua constituye un parámetro esencial en la evaluación como factor de riesgo en la giardiosis (Karanis *et al.*, 2007; Daniels *et al.*, 2018). Otros estudios sobre giardiosis y factores de riesgos igualmente reportaron este predictor (consumo de agua no hervida) como importante en la infección por este protozoo intestinal (Choy *et al.*, 2014; Coronato Nunes *et al.*, 2016; Daniels *et al.*, 2018).

Lo interesante de este resultado es que en la región montañosa de Fomento predominan los pozos como fuente de abastecimiento de agua potable, a diferencia de los Estudios realizados en La Habana (1 y 2) en donde el agua provenía principalmente de acueductos. Es conocido que el agua subterránea es la fuente primaria de agua potable en aproximadamente un cuarto de la población mundial y que los dispositivos de tuberías y pozos para almacenar agua pueden ser susceptibles de contaminación fecal, convirtiéndolos por ende en una vía potencial de transmisión de enteropatógenos, a menos que el agua sea tratada antes de ingerirse (WHO y Unicef, 2015). En el área estudiada de Fomento se constató que aquellas personas que no hirvieron el agua presentaron una mayor frecuencia de infección por *G. lamblia*. Si se tiene en cuenta que la dosis infecciosa para el humano es de tan solo 10 a 100 quistes, se realza la importancia del conocimiento y la percepción de riesgo por parte de la población,



principalmente rural que se abastece de agua de pozos, a los patógenos que pueden ser transmitidos por vía hídrica (Karanis *et al.*, 2007).

Otro aspecto importante que se corroboró en los Estudios 2 y 3 fue que la tenencia de perros en las casas resultó un factor de riesgo que estuvo asociado estadísticamente con una frecuencia mayor de infección por *G. lamblia*. Estos resultados coinciden con hallazgos en niños escolares de países en vías de desarrollo en países de Asia y Europa (Ballweber *et al.*, 2010; Choy *et al.*, 2014; Adell-Aledón *et al.*, 2018).

Si se tiene en cuenta que *Giardia lamblia* se reporta globalmente como un parásito frecuente en perros, con prevalencias de 10 a 35 % en perros domésticos (Adell-Aledón *et al.*, 2018) y dada la relación estrecha que se establece entre el humano y sus mascotas, el estudio de parásitos intestinales zoonóticos revestiría una gran importancia tanto para la salud animal y humana. Referente a *G. lamblia*, desde la perspectiva de salud pública sería necesario diferenciar los quistes de *G. lamblia* que infectan primariamente a perros y otros carnívoros (ensambles C y D de este parásito) de aquellos que presentan potencial zoonótico (ensambles A y B). Para ello resulta imprescindible la utilización de técnicas moleculares para poder tener mayor información y hallazgos en esta importante y actual temática de transmisión zoonótica de este parásito intestinal.

Otras investigaciones epidemiológicas desarrolladas han demostrado que regiones donde el suministro de agua es escaso, el contacto con niños pequeños, y el contacto con animales domésticos y de granjas, resultan importantes factores de riesgo asociados con la infección por *G. lamblia* (Hunter y Thompson, 2005; Thompson, 2009; Abe y Teramoto, 2012; Kiani *et al.*, 2016; Rivero *et al.*, 2017). Otros factores importantes que facilitan la emergencia de la infección de este protozoo son: el fecalismo al aire libre, educación higiénico sanitaria inadecuada, hacinamiento y aumento de la densidad poblacional y reservorios animales de la infección (Al-Mekhlafi *et al.*, 2016; Kiani *et al.*, 2016; Sarkari *et al.*, 2016; Utaaker *et al.*, 2017). Por todo lo anteriormente expuesto, se considera que se debe de realizar un enfoque de "Una Salud" en la epidemiología de la giardiosis, en el cual se reconoce que la salud óptima humana está interconectada con el bienestar de los animales y su ambiente (Lee *et al.*, 2017).



## 5.2 Caracterización molecular de aislamientos de *G. lamblia*

Las herramientas de clasificación molecular, en específico las que utilizan la PCR, y sus variantes, han sido de gran valor en el estudio de las infecciones por *Giardia lamblia* al permitir un mejor conocimiento de la diversidad genética, ecología, epidemiología, genética poblacional, y potencial zoonótico, estudiando un amplio rango de aislamientos obtenidos a partir de muestras de heces de seres humanos y de una gran variedad de otros mamíferos (Ryan y Cacciò, 2013).

Varias aproximaciones se han empleado en el desarrollo de procedimientos para el diagnóstico y la caracterización molecular de *G. lamblia*. De estos acercamientos, los más utilizados son los basados en la identificación de este protozoo intestinal mediante la amplificación de los fragmentos nucleotídicos de la especie con el empleo de PCR convencionales, las cuales permiten amplificar de manera específica una secuencia de ADN en varios millones de copias, así como la combinación de esta con análisis de RFLP (Wegayehu *et al.*, 2017). La utilización de la PCR anidada, una variante de la PCR convencional, permite aumentar la sensibilidad, así como la especificidad de esta técnica ya que detecta el ADN amplificado por dos PCR sucesivas. En estos últimos años, de igual forma, se ha empleado la PCR en tiempo real, la cual muestra excelentes valores de sensibilidad y especificidad (Almeida *et al.*, 2010; Incani *et al.*, 2017). En varios estudios se utiliza de igual forma la secuenciación, método más informativo que los anteriores, aunque mucho más costoso (Mero *et al.*, 2017; Sánchez *et al.*, 2017).

Los estudios de caracterización molecular en *Giardia* han tenido un avance significativo en las últimas décadas. La mayoría de las investigaciones de genotipaje en *Giardia* se centran en los genes que codifican para la subunidad menor del ARNr, y los genes *tpi*,  $\beta$ -giardina, *gdh*, factor de elongación- $\alpha$ ., y recientemente las regiones intergénicas del ADNr (Wielinga y Thompson, 2007; Thompson y Ash, 2016; Sánchez *et al.*, 2017).

La resolución del genotipaje en los estudios en *Giardia*, se considera que no posee suficiente poder discriminatorio cuando se utiliza un solo marcador genético de ahí que se postula que más de un marcador genético debe ser analizado (Cacciò *et al.*, 2008; Ryan y Cacciò, 2013). De acuerdo con estos autores al utilizar varios marcadores genéticos aumenta la probabilidad de detectar un mayor número de infecciones mixtas (Cacciò *et al.*, 2008; Ryan y Cacciò, 2013). En la presente investigación se realizó la detección y caracterización molecular de las



muestras de heces positivas a *G. lamblia* en el examen parasitológico en los diferentes estudios con dos marcadores genéticos.

El gen *tpi* se utilizó como marcador para el genotipaje de *G. lamblia* en los diferentes estudios realizados en combinación con otros marcadores moleculares (IGS-ADNr, *gdh* y E1). La utilidad de este gen en la caracterización molecular de este protozoo intestinal, se demostró inicialmente por Baruch *et al.*, (1996), en aislamientos axénicos provenientes de humanos y otros mamíferos. Debido al alto grado de polimorfismo de este gen, algunos autores plantean que tiene el poder de resolución comparado a un análisis multilocus, por lo que debiera de ser implementado en todo esquema de genotipaje en *G. lamblia* (Sulaiman *et al.*, 2003; Ryan y Cacciò, 2013; Ghieth *et al.*, 2016).

Los demás genes utilizados en los diferentes estudios, de igual forma se utilizan en esquemas de caracterización molecular y estudios filogenéticos en *G. lamblia* (Ryan y Cacciò, 2013). Los espaciadores intergénicos (IGS) están compuestas por regiones variables que permiten poder diferenciar los distintos ensamblajes (A y B) de *G. lamblia*, además de su naturaleza multicopia lo que redundante en su utilidad en la caracterización de este protozoo intestinal (Lee *et al.*, 2006; Hussein *et al.*, 2017).

El gen *gdh* se ha utilizado extensivamente como herramienta de genotipaje por investigadores a nivel mundial (Skhal *et al.*, 2017). Si bien este gen tiene un menor grado de polimorfismo que el gen *tpi*, su utilización resulta importante en el genotipaje exitoso de muestras humanas y de animales domésticos (Ryan y Cacciò, 2013).

La utilización de PCR-ensamble específicos, como el reportado por Vanni *et al.*, (2012) permite una diferenciación rápida y simple de los ensamblajes genéticos de *G. lamblia* que infectan al humano. Su factibilidad y bajo costo, hace que sean una herramienta diagnóstica en países de bajos ingresos (Vanni *et al.*, 2012). El gen E1 utilizado en este ensayo, es altamente específico y resulta una herramienta útil en el diagnóstico molecular de infecciones en humanos causadas por *G. lamblia* (Vanni *et al.*, 2012).

En este enigmático protozoo intestinal, se presenta en los estudios de caracterización molecular el fenómeno de resultados no coincidentes en el genotipaje cuando se emplean más de un marcador genético (Huey *et al.*, 2013). Las razones de estas discrepancias se especulan que sean por mal apareamiento en las secuencias de los cebadores que podría reducir la capacidad de amplificar



determinado ensamble sobre otro (Robertson *et al.*, 2007; Huey *et al.*, 2013). Otros autores explican este hecho sobre la base de: (i) la presencia de quistes genéticamente diferentes en la muestra fecal en combinación con la amplificación preferencial de un ensamble de *G. lamblia* (A o B) con un marcador genético comparado con la amplificación del otro ensamble (B o A) de *G. lamblia* utilizando otro marcador molecular; o (ii) la ocurrencia previa de recombinación sexual entre los ensamblajes de este protozoo intestinal que conducirían a una infección por un ensamble mixto (A+B) mediante la detección de al menos dos marcadores genéticos en la PCR (Sprong *et al.*, 2009; Ryan y Cacciò, 2013; Thompson y Ash, 2016).

Además de los mecanismos de mutación y recombinación del ADN, que se suponen probablemente, representan las principales fuentes de variación genética en *G. lamblia*, se reportan otros mecanismos que pudieran modificar el nivel de variación genética en las cuatro copias del genoma de *G. lamblia*. El fenómeno de diplomixis, por ejemplo, es un proceso de recombinación entre los dos núcleos de este protozoo, el cual ocurre en el proceso de enquistamiento (Franzén *et al.*, 2009; Thompson y Ash, 2016). El análisis de genes de muestras de pacientes infectados con el ensamble B de este protozoo intestinal muestran con frecuencia un alto grado de divergencia en las secuencias, pudiendo ser causadas por infecciones mixtas de diferentes genotipos de este grupo genético, o por un alto grado en la divergencia de las secuencias alélicas (Franzén *et al.*, 2009; Thompson y Ash, 2016).

Varios trabajos se han centrado en la comparación de los resultados obtenidos por diferentes marcadores genéticos (*tpi*, *gdh* y *bg*) en la caracterización molecular de *Giardia lamblia* en los que se han reportado discrepancias que han oscilado entre 5 y 15% (Huey *et al.*, 2013; de Lucio *et al.*, 2015; Fahmy *et al.*, 2015; Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017; Dacal *et al.*, 2017; Skhal *et al.*, 2017).

La implicación de estas discordancias ha derivado en el cuestionamiento de la validez y fortaleza de la caracterización molecular en este protozoo cuando se utiliza un solo marcador genético, dado la diversidad genética de este parásito intestinal y la posibilidad de enmascarar los datos generados mediante un solo marcador (Feng y Xiao, 2011). De ahí la necesidad de implementar un algoritmo diagnóstico y de caracterización moleculares para el estudio de la epidemiología molecular en *G. lamblia*.



Si bien se conoce que el gen SSU-ARNr es muy útil en la detección molecular de *G. lamblia* en estudios realizados a nivel mundial, y debiera ser empleado en todo ensayo de detección del ADN del parásito, sus secuencias muy conservadas hacen que no sea posible diferenciar las variantes genéticas de ensamblajes y sub ensamblajes a nivel de un formato de PCR (Feng y Xiao, 2011; Ryan y Cacciò, 2013). Es por ello que gana en relevancia la introducción de genes polimórficos para detectar los grupos genéticos de *G. lamblia*.

En nuestro estudio identificamos un elevado porcentaje de coincidencia utilizando dos marcadores genéticos. Los marcadores *tpi* e IGS-ADNr, mostraron una concordancia perfecta, lo que apunta a que estos marcadores son idóneos en la caracterización molecular de aislamientos de *G. lamblia*. Importante destacar que esta concordancia entre los genes *tpi* e IGS-ADNr, es la primera vez que se reporta a nivel mundial en estudios que aborden la temática de caracterización molecular de este protozoo intestinal. Son escasas las investigaciones publicadas en esta temática en la literatura internacional, no obstante los resultados obtenidos para la concordancia entre los genes *tpi* y *gdh* que fue muy buena ( $\geq 0,8$  para los ensamblajes A y mixto A+B), coincide con lo reportado por Huey *et al.* (2013). En el caso de los genes *tpi* y *E1*, si bien encontramos un índice de concordancia menor, es la primera vez que se evalúa a nivel internacional la concordancia mediante las dos PCR a punto final descritas para ambos genes, por lo que aporta resultados preliminares en esta temática.

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios de esta investigación, novedosos en cuanto a la concordancia de las PCR utilizadas, confirman que en la caracterización molecular de *G. lamblia* a partir de muestras de heces se debe de utilizar un marcador genético polimórfico como el gen *tpi*, dado su alto poder de resolución y el gen multicopia IGS-ADNr. La detección del ADN de este parásito intestinal a partir de diferentes muestras biológicas y ambientales debiera incluirse en cualquier formato de diagnóstico molecular, y complementado con los marcadores anteriormente mencionados (*tpi* e IGS-ADNr) integran un esquema que pudiera proponerse en nuestro país en sus variantes de PCR a punto final y PCR anidada con los protocolos descritos para una caracterización de ensamblajes y sub ensamblajes de *G. lamblia* en los diferentes centros de investigación en donde puedan contar con esta metodología de amplificación enzimática *in vitro* del ADN.



En los diferentes estudios llevados a cabo, la identificación de los ensamblajes genéticos de *G. lamblia* mediante las variantes de PCR utilizadas arrojó que el ensamblaje B de este parásito fue predominante sobre los ensamblajes A y mixto A+B. En un estudio previo realizado en nuestro país por Pelayo *et al.* (2008), aun cuando analizaron solo un reducido número de muestras (solo 20 aislamientos), reportaron una prevalencia del ensamblaje B de 55% y del ensamblaje A de 45%.

De manera general, la caracterización molecular de un gran número de muestras realizado a nivel mundial demuestran que los humanos son infectados exclusivamente con los ensamblajes A y/o B de *G. lamblia* (Ryan y Caccio, 2013). De acuerdo a la compilación de datos publicados al respecto, el ensamblaje B predomina en Asia, Australia, Europa y Sudamérica (Lebbad *et al.*, 2011; Saksirisampant *et al.*, 2012; Asher *et al.*, 2014; Hawash *et al.*, 2016), mientras que el ensamblaje A tiene una mayor frecuencia de infección, según los estudios llevados a cabo en África (Hussein *et al.*, 2016) y algunas áreas de Latinoamérica (Scalia *et al.*, 2016). En tres estudios realizados recientemente en niños menores de 5 años en Angola y Afganistán, el ensamblaje B fue mayoritario en el número de muestras caracterizadas (Gasparinho *et al.*, 2017; Laas *et al.*, 2017; Dacal *et al.*, 2018; Naguib *et al.*, 2018).

En cuanto a las infecciones mixtas (A+B) reportadas en el presente estudio, éstas sobrepasaron 20% del total de las muestras genotipadas. Este resultado pudiera ser indicativo de la (re)infección en los niños mediante el contacto directo entre ellos en las escuelas y círculos infantiles. Este dato es semejante a otros publicados en esta temática, en los que ha oscilado entre 5 a 30% (Sahagun *et al.*, 2008; Geurden *et al.*, 2009; Mbae *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2016). No obstante actualmente se debate si en realidad estas son infecciones mixtas verdaderas o son producto, en algunos casos, de secuencias alélicas heterocigóticas que se dan en un mismo genotipo (Caccio y Sprong, 2009; Thompson y Ash, 2016). Resultados similares han sido reportados en estudios recientes llevados a cabo en el Reino Unido de la Gran Bretaña, España y Angola, respectivamente (Waldram *et al.*, 2017; de Lucio *et al.*, 2015; Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017; Dacal *et al.*, 2018).

Los sub ensamblajes de *G. lamblia* se determinaron mediante las técnicas de PCR anidada (gen IGS-ADNr, estudio 1) y PCR-RFLP (*gdh*, Estudio 3). En el estudio 1, se pudo identificar a



nivel de sub ensamble los ensambles A, y se obtuvo que 87% (60/69) estuvo infectado por el sub ensamble AII.

Con relación al ensamble A, anteriormente se pensaba que el sub ensamble AI era el único sub ensamble zoonótico y que el sub ensamble AII se encontraba solo en humanos (Sprong *et al.*, 2009). Actualmente se conoce que ambos sub ensambles son identificados tanto en animales como en el humano, siendo el sub ensamble AI reportado preferentemente en animales domésticos y mascotas, mientras que el sub ensamble AII, predominantemente en humanos, pero también en una amplia variedad de mamíferos (Scalia *et al.*, 2016; Wegayehu *et al.*, 2016). De forma interesante, se ha sugerido la posible transmisión zoonótica del sub ensamble AII al humano al encontrarse en estudios el mismo ensamble en los habitantes y sus mascotas acompañantes (perros) en la misma residencia (Volotão *et al.*, 2007; Kostopoulou *et al.*, 2017).

En el conjunto de estudios hubo un amplio predominio del sub ensamble AII en las muestras que pudieron ser subtipadas, lo que apunta a un modo de transmisión antropoonótico, fundamentalmente. Esto coincide con otros reportes de la literatura internacional en los cuales, este sub ensamble es el más comúnmente identificado (Ferreira *et al.*, 2013; Fahmi *et al.*, 2015; de Lucio *et al.*, 2016; Skhal *et al.*, 2016; Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017).

Este resultado de caracterización molecular de aislamientos de *G. lamblia* en niños, y la identificación de sub ensambles de este protozoo intestinal es pionero en el área del Caribe, en donde solo hay publicado un estudio en Jamaica en donde se reporta el predominio del sub ensamble AII en población adulta (Lee *et al.*, 2017).

El sub ensamble BIII, primera vez reportado en el Caribe, se identificó en las muestras analizadas mediante la PCR-RFLP (*gdh*) en el estudio 3. El análisis de la variabilidad genética del ensamble B mostró un predominio del sub ensamble BIII (85,7%) de las muestras analizadas, si bien el número de éstas fue mucho menor en comparación con la identificación de los sub ensambles A detectados en los estudios 1 y 3.

Varios estudios reportan que la distribución de sub ensambles BIII y BIV en humanos muestra una marcada diferencia entre continentes. En África la infección por el sub ensamble BIII de *G. lamblia* es más prevalente (81%), siendo lo opuesto en América del Norte donde



estudios realizados muestran una mayor asociación del sub ensamblé BIV (86%) (Sprong *et al.*, 2009; Coronato Nunes *et al.*, 2016; Sánchez *et al.*, 2017; Skhal *et al.*, 2017).

La variabilidad en la distribución de los ensamblés genéticos de *G. lamblia* entre estos países podría estar dada por diferentes factores como el rol de los animales en la transmisión de la enfermedad, el nivel de las condiciones higiénicas, o la distribución geográfica (Al.Mohammed *et al.*, 2011; Ryan y Cacciò, 2013; Squire y Ryan, 2017).

El patrón de distribución identificado en las muestras subtipadas para el ensamblé B son coincidentes con estudios realizados en Brasil y Siria (Coronato Nunes *et al.*, 2016; Skhal *et al.*, 2017). Estas variantes genéticas reportadas dentro del ensamblé pudieran estar relacionadas con posibles mecanismos de virulencia que aún no están del todo dilucidados en este protozoo intestinal, por lo que se hace necesario el empleo de técnicas que conlleven al estudio del proteoma en *Giardia* (Thompson y Ash, 2016).

Son muy pocos los trabajos publicados en nuestro continente que aborden la temática de la caracterización molecular de *G. lamblia* en niños mediante varios marcadores genéticos (Torres-Romero *et al.*, 2014; Sequí *et al.*, 2018; Villalba-Vizcaíno *et al.*, 2018). Es de destacar que el presente trabajo es el primero en nuestro continente en evaluar un número de muestras que sobrepasa el centenar, 165 caracterizadas en total, y que aborde el análisis molecular del tipo de ensamblé genético de *G. lamblia* en la población estudiada en diferentes periodos de tiempo y de áreas geográficas analizadas.

La presente investigación sirve como punto de partida para la realización de estudios que analicen la distribución espacial de esta parasitosis en la provincia La Habana y a lo largo del país, teniendo en cuenta el predominio del ensamblé B en los diferentes estudios realizados tanto en La Habana, como en el municipio Fomento, provincia Sancti Spiritus. Es interesante resaltar que en un estudio realizado en Brasil por Oliveira-Arbex *et al.* (2016), constatan el hecho del cambio de patrón de los ensamblés de *G. lamblia* en el tiempo en diferentes comunidades de un mismo estado, por lo que factores relacionados con el parásito (tipo de ensamblé y factores de virulencia), el humano y el ambiente pudieran contribuir al cambio en cuanto a la prevalencia de un ensamblé sobre el otro (Oliveira-Arbex *et al.*, 2016).

De igual forma, estudios más refinados que impliquen el análisis de las secuencias de los productos de PCR amplificados, para detectar polimorfismos de nucleótidos simples pudieran



dar evidencias para predecir el origen geográfico de los aislamientos de *G. lamblia* (Sequí *et al.*, 2018). Se ha evidenciado que diferentes variantes genéticas del ensamble B de ese parásito generadas mediante el análisis de los genes *tpi* y *gdh* son raras o están ausentes en el continente europeo y africano, de ahí la importancia de los estudios de epidemiología molecular en *G. lamblia* que complementen el diagnóstico y caracterización moleculares en este enigmático parásito intestinal (Sequí *et al.*, 2018).

### **5.3 Caracterización clínica de los niños infectados con *G. lamblia*: Relación con los ensamblajes genéticos**

Varios factores están propuesto para explicar la variabilidad en la respuesta clínica observada en los pacientes infectados con *G. lamblia* (Buret, 2007). Entre estos se encuentran: el estado inmune del hospedero, edad y estatus nutricional, características genéticas de la cepa infectante, virulencia y patogenicidad entre otras (Haque *et al.*, 2005; Feng y Xiao, 2011; Hussein *et al.*, 2016). De forma habitual los pacientes sintomáticos desarrollan las manifestaciones clínicas de 6 a 15 días post infección en una giardiosis aguda, mientras que en una infección crónica los síntomas pueden prolongarse por varias semanas (Homan y Mank, 2001). A pesar de las múltiples investigaciones realizadas hasta la fecha en esta temática, resultan aún enigmáticos los mecanismos de virulencia y la respuesta del hospedero ante la infección por este protozoo flagelado intestinal (Ryan y Cacciò, 2013; Thompson y Ash, 2016, Squire y Ryan, 2017).

Hasta la fecha existen muy pocos estudios dirigidos a investigar si existe alguna asociación entre los ensamblajes de *G. lamblia* con la resistencia de los quistes en el ambiente (Choy *et al.*, 2014). Si estos factores están relacionados con el ensamble/sub ensamble/genotipo, se pudiera esperar que determinado ensamble exista en una mayor proporción en el ambiente que potencialmente conduzca a un mayor probabilidad de transmisión (Thompson y Ash, 2016). Un estudio realizado por Haque *et al.*, (2005) reportó que la infección por el ensamble B de *G. lamblia* producía una mayor carga de DNA y por tanto el resultado de una mayor prevalencia de este grupo genético.

Investigaciones realizadas en modelos animales evidencian una mayor asociación del ensamble B de *G. lamblia* con la patología intestinal. Bénéré *et al.*, (2012) en un estudio desarrollado evaluaron en modelos de gerbillos la asociación entre los ensamblajes A, B y E con la virulencia y el crecimiento del parásito en la mucosa intestinal. El resultado mostró que



el ensamble B y el sub ensamble AI indujeron una patogenicidad relativamente mayor comparada con los otros grupos evaluados (AII, y E), la que se caracterizó por un daño más extenso en la arquitectura de la mucosa intestinal y, una disminución de la función enzimática a nivel del borde en cepillo del intestino (Bénére *et al.*, 2012).

En cuanto a la asociación del ensamble genético de *G. lamblia* con la sintomatología desarrollada en el humano, habría que añadir que inicialmente fueron descritas diferencias en cuanto a la sintomatología en pacientes holandeses infectados con diferentes ensamblajes genéticos, dentro de los cuales el ensamble A estuvo asociado con una sintomatología de leve a intermitente, mientras que el ensamble B estuvo asociado a un patrón de la enfermedad persistente y severa (Homan y Mank, 2001). Desde entonces, varios estudios han encontrado una asociación entre la diarrea con la infección por el ensamble A (Ajjampur *et al.*, 2009; Perez Cordon *et al.*, 2013), y del mismo modo otros autores han identificado una asociación de la sintomatología con el ensamble B de este parásito (Gelanew *et al.*, 2007; Choy *et al.*, 2014; Ismail *et al.*, 2016).

Actualmente no existe un consenso en cuanto a esta temática, si bien se postula que está determinada por varios factores, como lo son las características genéticas del parásito, en asociación con la interacción con el microbioma intestinal (Thompson y Ash, 2016), así como las características inherentes del hospedero en cuanto a estatus nutricional e inmunológico (Feng y Xiao, 2011).

En nuestro estudio obtuvimos una asociación estadísticamente significativa entre los síntomas diarrea o dolor abdominal o flatulencia, los síntomas más característicos de esta infección, y la infección por el ensamble B de *G. lamblia*. Resultados similares han reportado otras investigaciones en cuanto a la asociación del ensamble B con estos síntomas. Por ejemplo, Gelanew *et al.* (2007) en un estudio realizado en Etiopía encontraron una asociación entre el ensamble B y la presencia de diarrea y dolor abdominal en niños. Mohammed Mahdy *et al.*, (2011) en Arabia Saudita evidenciaron, de igual forma una relación directa entre el grupo B y la sintomatología de los niños (dolor abdominal, diarrea, flatulencia y pérdida de peso). En un trabajo previo realizado en nuestro país por Pelayo *et al.* (2008), identificaron que el ensamble B de *G. lamblia* estuvo presente significativamente en aquellos niños que presentaron síntomas como diarrea, dolor abdominal, náuseas y vómitos. Estudios más recientes



realizados en Malasia, Egipto y Ghana reportan, de igual forma, la asociación del ensamble B de este parásito con las manifestaciones clínicas de diarrea y dolor abdominal en niños (Choy *et al.*, 2014; Anim-Baidoo *et al.*, 2016; Ismail *et al.*, 2016; Hussein *et al.*, 2017).

En un estudio realizado en niños suecos infectados con *G. lamblia* se constató una asociación entre la flatulencia y el ensamble B infectante en esa población de estudio (Lebbad *et al.*, 2011). En Argentina, Minvielle *et al.*, (2008) en una investigación realizada en niños argentinos evidenciaron una relación entre el ensamble B y la diarrea producida en ellos. No obstante, aun cuando la mayoría de los trabajos consultados en esta temática demuestran algún tipo de asociación, la investigación realizada por Kohli *et al.* (2008) en niños brasileiros tuvo como resultado que no hubo asociación entre el ensamble infectante y los síntomas presentes en esos niños.

Estudios *in vitro* demuestran que existen diferencias en cuanto al crecimiento de los ensamblajes A y B, teniendo este último un crecimiento más lento y más difícil de establecerse en los cultivos *in vitro*, lo que lo correlaciona con el curso crónico de las infecciones causadas por este ensamble genético y el establecimiento de infecciones persistentes las cuales pueden ser refractarias a la quimioterapia convencional (Thompson y Monis, 2004). De igual forma, se conoce que existen otras diferencias importantes entre los dos ensamblajes genéticos (A y B), en cuanto a: contenido del ADN, susceptibilidad a la infección por los virus ARN de doble cadena, metabolismo y bioquímica, lo que sumado a las diferencias filogenéticas apuntan a que sean consideradas como especies diferentes (Cacciò *et al.*, 2008; Ryan y Cacciò, 2013; Squire y Ryan, 2017).

Cabría esperar entonces, que dado las diferencias reportadas en cuanto a estos dos ensamblajes, debieran existir diferencias en las manifestaciones clínicas desarrolladas por la infección de éstos en los niños.

En opinión de este autor, la presente investigación abordó aspectos epidemiológicos de esta parasitosis, la más importante en población pediátrica en nuestro país, corroborando la importancia que se debe de tener en cuanto al conocimiento de factores de riesgos en la población, tales como el contacto con animales domésticos y el consumo de agua de calidad. No se conoce de otros estudios en Cuba que estudien el riesgo de infección por *G. lamblia*



asociado con la tenencia de perros en el hogar en dos provincias del país. Este resultado conducirá al diseño de estudios sobre la verificación de la posible transmisión zoonótica de este parásito entre los canes y el humano a través del análisis microscópico coprológico, PCR y genotipaje multilocus de aislamientos de *G. lamblia* obtenidos tanto de muestras de heces de humanos como de perros que conviven en los hogares.

Otro factor importante como predictor no solo de la infección de *G. lamblia*, sino de agentes enteropatógenos de etiología bacteriana, viral y de otras causas parasitarias, lo constituye el consumo de agua hervida o tratada, ya sea por filtración o por agentes químicos para eliminar los patógenos que puedan estar presentes. Teniendo en cuenta que nuestro país es azotado cada año por ciclones y diversas tormentas tropicales, la contaminación del agua es un hecho probable, de ahí que las campañas comunicativas para hervir el agua o tratarla con hipoclorito de sodio, o filtrarla, cobran mayor importancia cada año.

Siguiendo los lineamientos de la OMS, de que solo a través de una política integrada, como se conoce de Una Salud, que comprenda la mejora tanto en la salud humana como veterinaria y un mejor saneamiento ambiental se tendrá un sistema de salud más sostenible en el tiempo en cuanto al combate frente a las enfermedades infecciosas (WHO, 2015). Por esta razón a través de estos pilares se podrá disminuir no solo los índices de prevalencia de *G. lamblia* en nuestro país, sino de los agentes infecciosos transmitidos por el agua y alimentos.

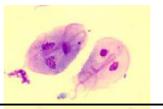
Este estudio permitió caracterizar molecularmente un número representativo de aislamientos de *G. lamblia* en nuestro país, teniendo en cuenta que el trabajo previo publicado por Pelayo *et al.* (2008) caracterizó tan solo 20 aislamientos. La comparación de diferentes métodos moleculares y la selección de los marcadores genéticos a utilizar en la identificación de los ensamblajes y sub ensamblajes de *G. lamblia* resulta importante para los Laboratorios de Parasitología que dispongan de equipamiento para realizar estas metodologías en este parásito intestinal en nuestro país. Además, pudiera constituir una referencia para estudios futuros que se desarrollen en nuestra área geográfica de América Latina en donde hay pocos datos publicados en cuanto a esta temática de investigación.

Debido a que varios autores postulan que *Giardia lamblia* se considera un complejo de especies, y que cada ensamblaje, A y B, correspondería a una especie diferente (Feng y Xiao,



2011; Ryan y Cacciò, 2013), el abordaje de las diferencias que pudieran existir en cuanto a la epidemiología molecular, ecología, y manifestaciones clínicas en este protozoo resultan importante para un mejor conocimiento de la biología de este importante parásito intestinal. Los datos obtenidos en el presente trabajo muestran la distribución del ensamble B predominante en el tiempo y el espacio de los estudios realizados y su relación con la sintomatología clínica más característica de este parásito en población pediátrica: diarrea o flatulencia o dolor abdominal, lo cual pudiera apuntar al papel más virulento de este grupo genético en niños de nuestro país, principalmente aquellos menores de 5 años.

La introducción de herramientas diagnósticas moleculares en el LNR-PI durante el periodo de estudio permitió el abordaje de la hipótesis de la presente investigación, la cual es necesaria su continuidad en estudios de alcance nacional en el cual se integren datos de patrones de distribución de los ensambles y sub ensambles de *G. lamblia* asociados con las manifestaciones clínicas desarrolladas en niños por la infección de esta parásito intestinal. De esta manera se obtendrá información valiosa y de utilidad desde el punto de vista epidemiológico, zoonótico, molecular y clínico.



## VI. CONCLUSIONES

1. La infección por *G. lamblia* es muy frecuente en los niños estudiados, con un riesgo incrementado de tomar agua no hervida y con tenencia de perros.
2. La identificación del ensamble B y de los subensambles AII y BIII de *G. lamblia* fue predominante en los niños infectados por este protozoo intestinal, en comparación con el ensamble A y mixto A+B y los subensambles AI y BIV.
3. Los marcadores genéticos *tpi* y IGS-ADNr mostraron resultados idénticos de concordancia en la clasificación de los ensambles genéticos de *G. lamblia*.
4. La infección por el ensamble genético B de *G. lamblia* estuvo asociado significativamente con diarrea o dolor abdominal o flatulencia, especialmente en niños menores de 5 años de edad.



## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Realizar estudios de caracterización molecular en *G. lamblia* mediante análisis multilocus y otras técnicas de última generación que permitan abordar de manera más integral la epidemiología molecular en esta parasitosis intestinal.
2. Realizar un estudio integral que permita conocer la distribución de los ensamblajes y subensamblajes de *G. lamblia* en Cuba y la asociación de éstos con las manifestaciones clínicas que se manifiestan en población pediátrica.
3. Identificar posibles factores de virulencia relacionados con los ensamblajes genéticos de este protozoo mediante técnicas de genómica comparativa.
4. Estudiar muestras de heces de perros domésticos y sus dueños mediante variantes que permitan evaluar la dinámica de la transmisión en *Giardia*.



### VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul-Wahid A, Faubert G. Characterization of the local immune response to cyst antigens during the acute and elimination phases of primary murine giardiasis. *Int J Parasitol.* 2008; 38: 691-703.
- Abe N, Teramoto I. Molecular evidence for person-to-person transmission of a novel subtype in *Giardia duodenalis* assemblage B at the rehabilitation institution for developmentally disabled people. *Parasitol Res.* 2012; 110: 1025–1028.
- Adam, RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 447–475.
- Adell-Aledón M, Köster PC, de Lucio A, Puente P, Hernández-de-Mingo M, Sánchez-Thevenet P, *et al.* Occurrence and molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* infection in dog populations in eastern Spain. *BMC Vet Res.* 2018; 22: 26-32.
- Ajjampur SS, Sankaran P, Kannan A, Sathyakumar K, Sarkar R, Gladstone BP. *Giardia duodenalis* assemblages associated with diarrhea in children in South India identified by PCR-RFLP. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80: 16–19.
- Al-Delaimy AK, Al-Mekhlafi HM, Nasr NA, Sady H, Atroosh WM, Nashiry M. Epidemiology of intestinal polyparasitism among Orang Asli school children in rural Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 21; 8:e3074.
- Almeida A, Moreira MJ, Soares S, Delgado ML, Figueiredo J, Silva E. Biological and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* isolates from five hydrographical basins in northern Portugal. *Korean J Parasitol* 2010; 48: 105-111.
- Al-Mekhlafi AM, Abdul-Ghani R, Al-Eryani SM, Saif-Ali R, Mahdy MA. School-based prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors in rural communities of Sana'a, Yemen. *Acta Trop.* 2016; 163: 135-141.
- Al-Mekhlafi HM, Al-Maktari MT, Jani R, Ahmed A, Anuar TS, Moktar N. Burden of *Giardia duodenalis* infection and its adverse effects on growth of schoolchildren in rural Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7: e2516.
- Al-Mohammed HI. Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. *Parasitol Res.* 2011; 108: 1375–1381.
- Al-Shehri H, Stanton MC, LaCourse JE, Atuhaire A, Arinaitwe M, Wamboko A. An extensive burden of giardiasis associated with intestinal schistosomiasis and anaemia in school children on the shoreline of Lake Albert, Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2016; 110: 597-603.



- Alvarado ME, Rubiano C, Velandia D, Wasserman M. In silico analysis of the EF-hand proteins in the genome of *Giardia intestinalis* assembly A. Parasitol Res. 2018; 117: 1035-1041.
- Alvarado ME, Wasserman M. Analysis of phosphorylated proteins and inhibition of kinase activity during *Giardia intestinalis* excystation. Parasitol Int. 2010; 59: 54-61.
- Andrews RH, Adams M, Boreham PF, Mayrhofer G, Meloni BP. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. Int J Parasitol. 1989; 19: 183–190.
- Anim-Baidoo I, Narh C, Oddei D, Brown CA, Enweronu-Laryea C, Bandoh B. *Giardia lamblia* infections in children in Ghana. Pan Afr Med J. 2016; 24:217.
- Asher AJ, Holt DC, Andrews RM, Power ML. Distribution of *Giardia duodenalis* assemblages A and B among children living in a remote indigenous community of the Northern Territory, Australia. PLoS One. 2014; 9: e112058.
- Azcona-Gutiérrez JM, de Lucio A, Hernández-de-Mingo M, García-García C, Soria-Blanco LM, Morales L, et al. Molecular diversity and frequency of the diarrheagenic enteric protozoan *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in a hospital setting in Northern Spain. PLoS One. 2017; 12: e0178575.
- Babaei Z, Oormazdi H, Rezaie S, Rezaeian M, Razmjou E. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. Exp Parasitol 2011; 128:159-162.
- Bagchi S, Oniku AE, Topping K, Mamhoud ZN, Paget TA. Programmed cell death in *Giardia*. Parasitology. 2012; 39: 894-903.
- 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: 180-189.
- Barbecho JM, Bowman DD, Liotta JL. Comparative performance of reference laboratory tests and in-clinic tests for *Giardia* in canine feces. Parasit Vectors. 2018; 11:444-449.
- Barbosa J, Rodrigues AG, Pérez MJ, Pina-Vaz C. Evaluation of *Giardia duodenalis* viability after metronidazole treatment by flow cytometry. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014; 109: 1078-1080.
- Baruch AC, Jackson L, Tovias M, Andersson J, Scott D. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. J. Infect. Dis. 1996; 174: 233-236.



- Bashir M, Farid A, Rabia I, Mostafa B, El Amir A. Serological versus antigen detection methods for *Giardia duodenalis* diagnosis. J Egypt Soc Parasitol. 2014; 44: 709-718.
- Begaydarova R, Nasakaeva G, Tabagari S, Yuxhnevich Y, Alshynbekova G. Clinical and diagnostic features and treatment of giardiasis. Georgian Med News. 2014; 236: 55-61.
- Bello J, Núñez FA, González OM, Fernández R, Almirall P, Escobedo AA. Risk factors for *Giardia infection* among hospitalized children in Cuba. Ann Trop Med Parasitol. 2011; 105: 57-64.
- Bénéré E, Van Assche T, Van Ginneken C, Peulen O, Cos P, Maes L. Intestinal growth and pathology of *Giardia duodenalis* assemblage subtype A(I), A(II), B and E in the gerbil model. Parasito. 2012; 139: 424-433.
- Bertrand IL, Albertini L, Schwartzbrod J. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human faeces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 2005; 43: 5940-5944.
- Best AA, Morrison HG, McArthur AG, Sogin ML, Olsen GJ. Evolution of eukaryotic transcription: insights from the genome of *Giardia lamblia*. Genome Res. 2004; 14: 1537-1547.
- Boughattas S, Behnke JM, Al-Ansari K, Sharma A, Abu-Alainin W, Al-Thani A. Molecular analysis of the enteric protozoa associated with acute diarrhea in hospitalized children. Front Cell Infect Microbiol. 2017; 2; 7:343.
- Bouzid M, Halai K, Jeffreys D, Hunter PR. The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. Vet Parasitol. 2015; 207:181-202.
- Bryman A. Quantitative Data Analysis with SPSS release 10 for Windows. London : Routledge; 2001.
- Buret AG. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. Gut. 2007; 56:316-317.
- 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. Parasitol. 2010; 137:919-925.
- Cacciò SM, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. Int J Parasitol. 2008; 38:1523-1531.



- 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; 32:1023–1030.
- Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol* 2008; 160:75-80.
- Cacciò SM, Sprong H. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol.* 2010; 124: 107-112.
- Cañete R, Díaz MM, Avalos García R, Laúd Martínez PM, Manuel Ponce F. Intestinal parasites in children from a day care centre in Matanzas City, Cuba. *PLoS One.* 2012; 7:e51394.
- Cañete R. Mebendazole as an alternative in *Giardia duodenalis* infection. *West Indian Med J.* 2013; 62: 165-167.
- Castro ED, Germini MC, Mascarenhas JD, Gabbay YB, Lima IC, Lobo Pdos S. Enteropathogens detected in a daycare center, southeastern Brazil: bacteria, virus, and parasite research. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015; 57: 27-32.
- Cavalier-Smith T, Chao EE. Molecular phylogeny of the free-living archezoon *Trepomonas agilis* and the nature of the first eukaryote. *J Mol Evol* 1996; 43: 551-562.
- Chiappini E, Zaffaroni M, Bianconi M, Veneruso G, Grasso N, Garazzino S, et al. Italian multicentre study found infectious and vaccine-preventable diseases in children adopted from Africa and recommends prompt medical screening. *Acta Paediatr.* 2018; 53: 212-218.
- Choy SH, Al-Mekhlafi HM, Mahdy MA, Nasr NN, Sulaiman M. Prevalence and associated risk factors of *Giardia* infection among indigenous communities in rural Malaysia. *Sci Rep* 2014; 4: 6909.
- Claerebout E, Casaert S, Dalemans AC, De Wilde N, Levecke B, Vercruysse J. *Giardia* and other intestinal parasites in different dog populations in Northern Belgium. *Vet Parasitol.* 2009; 161:41-46.
- Coelho CH, Silva ACC, Costa AO, Fernandes AP. Morphological and physiological characteristics of a virulent and zoonotic assemblage A *Giardia duodenalis* canine strain. *Acta Trop.* 2017; 174: 76-81.



- Conn DB, Weaver J, Tamang L, Graczyk TK. Synanthropic flies as vectors of *Cryptosporidium* and *Giardia* among livestock and wildlife in a multispecies agricultural complex. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007; 7: 643-651.
- Coronato Nunes B, Pavan MG, Jaeger LH, Monteiro KJ, Xavier SC, Monteiro FA. Spatial and molecular epidemiology of *Giardia intestinalis* deep in the amazon, Brazil. *PLoS One.* 2016; 11: e0158805.
- Cotton JA, Amat CB, Buret AG. Disruptions of host immunity and inflammation by *Giardia duodenalis*: Potential consequences for co-infections in the gastro-intestinal Tract *Pathogens* 2015; 4: 764–792.
- Cotton JA, Beatty JK, Buret AG. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol* 2011; 41: 925–933.
- Cotton JA, Motta JP, Schenck LP, Hirota SA, Beck PL, Buret AG. *Giardia duodenalis* infection reduces granulocyte infiltration in an *in vivo* model of bacterial toxin-induced colitis and attenuates inflammation in human intestinal tissue. *PLoS One.* 2014; 9: e109087.
- Coulibaly G, Ouattara M, Dongo K, Hürlimann E, Bassa FK, Koné N, *et al.* Epidemiology of intestinal parasite infections in three departments of south-central Côte d'Ivoire before the implementation of a cluster-randomised trial. *Parasite Epidemiol Control.* 2018; 18: 63-76.
- Dacal E, Saugar JM, de Lucio A, Hernández-de-Mingo M, Robinson E, Köster PC, *et al.* Prevalence and molecular characterization of *Strongyloides stercoralis*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Blastocystis* spp. isolates in school children in Cubal, Western Angola. *Parasit Vectors.* 2018; 11: 67.
- Damitie M, Mekonnen Z, Getahun T, Santiago D, Leyns L. Molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* infection in humans in Southern Ethiopia: a triosephosphate isomerase gene-targeted analysis. *Infect Dis Poverty.* 2018; 7:17.
- Daniels ME, Smith WA, Jenkins MW. Estimating *Cryptosporidium* and *Giardia* disease burdens for children drinking untreated groundwater in a rural population in India. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 29; 12: e0006231.
- de la Guardia RD, Lopez MB, Burgos M, Osuna A. Purification and characterization of a protein capable of binding to fatty acids and bile salts in *Giardia lamblia*. *J Parasitol.* 2011; 97: 642-647.



- de Lucio A, Amor-Aramendía A, Bailo B, Saugar JM, Anegagrie M, Arroyo A. Prevalence and genetic diversity of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. among school children in a rural area of the Amhara Region, North-West Ethiopia. PLoS One. 2016; 11:e0159992.
- Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH. Epi Info Version 6: A World Processing, Database, and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers. Atlanta, GA : Centers for Disease Control. 1994.
- Desai L, Kurien RT, Simon EG, Dutta AK, Joseph AJ, Chowdhury SD. Hypogammaglobulinemia-associated gastrointestinal disease-A case series. Indian J Gastroenterol. 2014; 33:560-563.
- Dobell C. The discovery of the protozoa of man. Proc Royal Soc Med. 1920; 13:1-15.
- Ebnetter JA, Hehl AB. The single epsin homolog in *Giardia lamblia* localizes to the ventral disk of trophozoites and is not associated with clathrin membrane coats. Mol Biochem Parasitol. 2014; 197: 24-27.
- Edlind TD, Chakraborty PR. Unusual ribosomal RNA of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. Nucleic Acids Res. 1987; 15: 7889-7901.
- Einarsson E, Troell K, Hoepfner MP, Grabherr M, Ribacke U, Svärd SG. Coordinated changes in gene expression throughout encystation of *Giardia intestinalis*. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10:e0004571.
- El-Gebaly NS, Halawa EF, Moussa HM, Rabia I, Abu-Zekry M. Saliva and sera IgA and IgG in Egyptian *Giardia*-infected children. Parasitol Res. 2012; 111: 571-575.
- Eligio-García L, Cortes-Campos A, Cota-Guajardo S, Gaxiola S, Jiménez-Cardoso 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. 2008; 156:205-209.
- Emery SJ, Lacey E, Haynes PA. Quantitative proteomics in *Giardia duodenalis*-Achievements and challenges. Mol Biochem Parasitol. 2016; 208:96-112.
- Emery-Corbin SJ, Vuong D, Lacey E, Svärd SG, Ansell BRE, Jex AR. Proteomic diversity in a prevalent human-infective *Giardia duodenalis* sub-species. Int J Parasitol. 2018; 18: 164-168.
- Erlandsen SL, Bemrick WJ, Wells CL, Feely DE, Knudson L, Campbell SR. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). J Parasitol. 1990; 76: 717-724.



- Escobedo AA, Almirall P, Hanevik K, Cimerman S, Rodríguez-Morales AJ, Almanza C, *et al.* Giardiasis: a diagnosis that should be considered regardless of the setting. *Epidemiol Infect.* 2018; 146: 1216-1218.
- Escobedo AA, Cimerman S. Giardiasis: a pharmacotherapy review. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8: 1885–1902.
- Escobedo AA, Hanevik K, Almirall P, Cimerman S, Alfonso M. Management of chronic *Giardia* infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014; 12: 1143-1157.
- Evans-Osses I, Mojoli A, Monguió-Tortajada M, Marcilla A, Aran V, Amorim M. Microvesicles released from *Giardia intestinalis* disturb host-pathogen response in vitro. *Eur J Cell Biol.* 2017; 35: 30240.
- Fahmy HM, El-Serougi AO, El Deeb HK, Hussein HM, Abou-Seri HM, Klotz C. *Giardia duodenalis* assemblages in Egyptian children with diarrhea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; 34: 1573-1581.
- Farthing MJ. The molecular pathogenesis of giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997; 24: 79–88.
- Faso C, Konrad C, Schraner EM, Hehl AB. Export of cyst wall material and Golgi organelle neogenesis in *Giardia lamblia* depend on endoplasmic reticulum exit sites. *Cell Microbiol.* 2013; 15:537-553.
- Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 35-54.
- Feleke H, Medhin G, Abebe A, Beyene B, Kloos H, Asrat D. Enteric pathogens and associated risk factors among under-five children with and without diarrhea in Wegera District, Northwestern Ethiopia. *Pan Afr Med J.* 2018; 29:72.
- Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 110-140.
- Ferreira FS, Machado Sá da Bandeira RA, Constantino CA, da Fonseca AM, Gomes Jda G, Rodrigues RM. Molecular and clinical characterization of *Giardia duodenalis* infection in preschool children from Lisbon, Portugal. *J Parasitol Res.* 2013; 25: 29-36.
- Fink MY, Singer SM. The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis. *Trends Parasitol.* 2017; 33: 901-913.
- Fisher BS, Estraño CE, Cole JA. Modeling long-term host cell-*Giardia lamblia* interactions in an *in vitro* co-culture system. *PLoS One.* 2013; 8: e81104.



- Fonte L, Almannoni SA. Giardiasis. Entre realidades y mitos. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas 2009. ISBN 978-959-212-476-9.
- Forsell J, Granlund M, Samuelsson L, Koskiniemi S, Edebro H, Evengård B. High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1-3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. Parasit Vectors. 2016; 29:370.
- Franzén O, Jerlström-Hultqvist J, Castro E, Sherwood E, Ankarklev J, Reiner DS. Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? PLoS Pathog. 2009; 5: e1000560.
- Gabaldón T, Ginger ML, Michels PA. Peroxisomes in parasitic protists. Mol Biochem Parasitol. 2016; 209: 35-45.
- Garcia LS. Intestinal protozoa coccidia and microsporida, in Diagnostic Medical Parasitology, L. Garcia, Ed., American Society of Microbiology, Washington, DC, USA, 4th edition, 2001.
- García-Cervantes PC, Báez-Flores ME, Delgado-Vargas F, Ponce-Macotela M, Nawa Y, De-la-Cruz-Otero MD. *Giardia duodenalis* genotypes among schoolchildren and their families and pets in urban and rural areas of Sinaloa, Mexico. J Infect Dev Ctries. 2017; 11: 180-187.
- Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis. Clin Microbiol Rev. 2001; 14:114-128.
- Gasparinho C, Ferreira FS, Mayer AC, Mirante MC, Vaz Nery S, Santos-Reis A, et al. Molecular characterization of *Giardia lamblia* in children less than 5 years of age with diarrhoea attending the Bengo General Hospital, Angola. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2017; 111: 497-503.
- Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. Acta Trop 2007; 102: 92-99.
- George CM, Burrowes V, Perin J, Oldja L, Biswas S, Sack D, et al. Enteric infections in young children are associated with environmental enteropathy and impaired growth. Trop Med Int Health. 2018; 23: 26-33.
- Geurden T, Levecke B, Cacció SM, Visser A, De Groote G, Casaert S, et al. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. Parasitol. 2009; 136:1161-1168.
- Geurden T, Olson ME, O'Handley RM, Schettters T, Bowman D, Vercurysse J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP): Guideline for



- the evaluation of drug efficacy against non-coccidial gastrointestinal protozoa in livestock and companion animals. *Vet Parasitol.* 2014; 204: 81-86.
- Ghieth MA, Kotb MA, Abu-Sarea EY, El-Badry AA. Molecular detection of giardiasis among children at Cairo University Pediatrics Hospitals. *J Parasit Dis.* 2016; 40: 1470-1474.
  - Gil H, Cano L, de Lucio A, Bailo B, de Mingo MH, Cardona GA. Detection and molecular diversity of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheltered dogs and cats in Northern Spain. *Infect Genet Evol.* 2017; 50: 62-69.
  - Gomes MA, de Oliveira DR, de Freitas SE, de Pinho Viana M, Borges EL. Effect of giardiasis combined with low-protein diet on intestinal absorption of glucose and electrolytes in gerbils. *Exp Parasitol.* 2012; 131: 448-451.
  - Gutiérrez-Jiménez J, Luna-Cázares LM, Cruz LM, De Aquino-López JA, Sandoval-Gómez D, León-Ortiz AT, *et al.* Children from a rural region in The Chiapas Highlands, Mexico, show an increased risk of stunting and intestinal parasitoses when compared with urban children. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2019; 76: 18-26.
  - Halliez MC, Buret AG. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol.* 2013; 19: 8974-8985.
  - Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis.* 2005; 192: 2171-2173.
  - Hawash Y, Ghonaim MM, Al-Shehri S. An improved PCR-RFLP assay for detection and genotyping of asymptomatic *Giardia lamblia* infection in a resource-poor setting. *Korean J Parasitol.* 2016; 54: 1-8.
  - Heusinkveld M, Mughini-Gras L, Pijnacker R, Vennema H, Scholts R, van Huisstede-Vlaanderen KW, *et al.* Potential causative agents of acute gastroenteritis in households with preschool children: prevalence, risk factors, clinical relevance and household transmission. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016; 35: 1691-1700.
  - Heyworth MF. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite.* 2016; 23:13.
  - Heyworth MF. Immunological aspects of *Giardia* infections. *Parasite.* 2014; 21:55.
  - Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nat Biotech* 1992; 10:413–417.



- Hijjawi N, Yang R, Hatmal M, Yassin Y, Mharib T, Mukbel R, *et al.* Comparison of ELISA, nested PCR and sequencing and a novel qPCR for detection of *Giardia* isolates from Jordan. *Exp Parasitol.* 2018; 185: 23-28.
- Hijjawi N, Yang R, Hatmal M, Yassin Y, Mharib T, Mukbel R, Mahmoud SA, Al-Shudifat AE, Ryan U. Comparison of ELISA, nested PCR and sequencing and a novel qPCR for detection of *Giardia* isolates from Jordan. *Exp Parasitol.* 2018;185: 23-28
- Hjøllø T, Bratland E, Steinsland H, Radunovic M, Langeland N, Hanevik K. Longitudinal cohort study of serum antibody responses towards *Giardia lamblia* variant-specific surface proteins in a non-endemic area. *Exp Parasitol.* 2018; 191:66-72.
- Holveck J, Ehrenberg J, Ault S, Rojas R, Vasquez J, Cerqueira MT. Prevention, control, and elimination of neglected diseases in the Americas: Pathways to integrated, inter-programmatic, intersectoral action for health and development. *BMC Public Health.* 2007; 7: 6.
- Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol.* 2001; 31: 822-826.
- Horlock-Roberts K, Reaume C, Dayer G, Ouellet C, Cook N, Yee J. Drug-Free Approach to study the unusual cell cycle of *Giardia intestinalis*. *mSphere.* 2017; 2: e00384-16.
- Huang DB, White AC. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterol. Clin North Am* 2006; 35:291–314.
- Huey CS, Mahdy MA, Al-Mekhlafi HM, Nasr NA, Lim YA, Mahmud R, *et al.* Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Malaysia. *Infect Genet Evol.* 2013; 17: 269-276.
- Humen MA, Pérez PF, Liévin-Le Moal V. Lipid raft-dependent adhesion of *Giardia intestinalis* trophozoites to a cultured human enterocyte-like Caco-2/TC7 cell monolayer leads to cytoskeleton-dependent functional injuries. *Cell Microbiol.* 2011; 13: 1683-1702.
- Hunter PR, Thompson RCA. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol.* 2005; 35: 1181–1190.
- Hussein EM, Ismail OA, Mokhtar AB, Mohamed SE, Saad RM. Nested PCR targeting intergenic spacer (IGS) in genotyping of *Giardia duodenalis* isolated from



- symptomatic and asymptomatic infected Egyptian school children. *Parasitol Res.* 2017; 116:763-771.
- Hussein EM, Zaki WM, Ahmed SA, Almatary AM, Nemr NI, Hussein AM. Predominance of *Giardia lamblia* assemblage A among iron deficiency anaemic pre-school Egyptian children. *Parasitol Res.* 2016; 115: 1537-1545.
  - Ibáñez-Cervantes G, León-Ávila G, Bello-López JM, Pérez-Rangel A, León-García G, Noguera-Torres B, et al. Changes in the incidence of intestinal giardiasis in Mexican population during five years (2011-2015). *Acta Parasitol.* 2018; 63: 40-47.
  - Incani RN, Ferrer E, Hoek D, Ramak R, Roelfsema J, Mughini-Gras L. Diagnosis of intestinal parasites in a rural community of Venezuela: Advantages and disadvantages of using microscopy or RT-PCR. *Acta Trop.* 2017; 167: 64-70.
  - Inpankaew T, Schär F, Odermatt P, Dalsgaard A, Chimnoi W, Khieu V, Muth S, Traub RJ. Low risk for transmission of zoonotic *Giardia duodenalis* from dogs to humans in rural Cambodia. *Parasit Vectors.* 2014; 7:412.
  - Ismail MA, El-Akkad DM, Rizk EM, El-Askary HM, El-Badry AA. Molecular seasonality of *Giardia lamblia* in a cohort of Egyptian children: a circannual pattern. *Parasitol Res.* 2016; 11: 4221-4227.
  - Itagaki T, Kinoshita S, Aoki M, Itoh N, Saeki H, Sato N. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. *Vet Parasitol.* 2005; 133: 283-287.
  - Jaran AS. Prevalence and seasonal variation of human intestinal parasites in patients attending hospital with abdominal symptoms in northern Jordan. *East Mediterr Health J.* 2017; 22:756-760.
  - Júlio C, Sá C, Ferreira I, Martins S, Oleastro M, Angelo H, et al. Waterborne transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* at river beaches in Southern Europe (Portugal). *J Water Health.* 2012; 10:484-496.
  - Kappagoda S, Singh U, Blackburn BG. Antiparasitic Therapy. *Mayo Clin Proc.* 2011; 86: 561-583.
  - Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health* 2007; 5: 1–38.
  - Kasaei R, Carmena D, Jelowdar A, Beiromvand M. *Molecular genotyping of Giardia duodenalis* in children from Behbahan, southwestern Iran. *Parasitol Res.* 2018; 117: 1425-1431.



- Keiser J, Ingram K, Utzinger J. Antiparasitic drugs for paediatrics: systematic review, formulations, pharmacokinetics, safety, efficacy and implications for control. *Parasitol.* 2011; 138:1620-1632.
- Keselman A, Li E, Maloney J, Singer SM. The Microbiota contributes to CD8+ T Cell activation and nutrient malabsorption following intestinal infection with *Giardia duodenalis*. *Infect Immun.* 2016; 84: 2853-2860.
- Kevin J. Esch, Christine A. Petersen. Transmission and epidemiology of zoonotic Protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26: 58–85.
- Kiani H, Haghghi A, Salehi R, Azargashb E. Distribution and risk factors associated with intestinal parasite infections among children with gastrointestinal disorders. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2016; S80-S87.
- Kinyua MN, Trimmer J, Izurieta R, Cunningham J, Ergas SJ. Viability and fate of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in tubular anaerobic digesters. *Sci Total Environ.* 2016; 1:167-177.
- Koehler AV, Jex AR, Haydon SR, Stevens MA, Gasser RB. *Giardia/giardiasis: A perspective on diagnostic and analytical tools.* *Biotech Adv.* 2014; 32: 280–289.
- Kohli A, Bushena O, Pinkertona R, Houpta E, Newmanc R, Searsd C. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; 102: 718-725.
- Kostopoulou D, Claerebout E, Arvanitis D, Ligda P, Voutzourakis N, Casaert S. Abundance, zoonotic potential and risk factors of intestinal parasitism amongst dog and cat populations: The scenario of Crete, Greece. *Parasit Vectors.* 2017; 10:43.
- Krupa Shankar DS, Ramnane M, Rajouria EA. Etiological approach to chronic urticaria. *Indian J Dermatol.* 2010; 55: 33-38.
- Kulda J, Nohýnková E. Flagellates of the human intestine and of intestine of other species, In: Kreier, J.P. (Ed.) *Parasitic protozoa*, 1978, vol II. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- Lalle M, Frangipane di Regalbono A, Poppi L, Nobili G, Tonanzi D, Pozio E, *et al.* A novel *Giardia duodenalis* assemblage A subtype in fallow deer. *J Parasitol.* 2007; 93:426-428.
- 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. *Int J Parasitol.* 2005; 35:207-213.



- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1997; 33: 680-685.
- Lass A, Karanis P, Korzeniewski K. First detection and genotyping of *Giardia intestinalis* in stool samples collected from children in Ghazni Province, eastern Afghanistan and evaluation of the PCR assay in formalin-fixed specimens. *Parasitol Res*. 2017; 116:2255-2264.
- Lauwaet T, Davids BJ, Reiner DS, Gillin FD. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Curr Opin Microbiol*. 2007; 10: 554-559.
- Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, Botero-Kleiven S, Andersson JO, Svenungsson B. 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:e1262.
- Lee HY, Kim J, Noh HJ, Kim HP, Park SJ. *Giardia lamblia* binding immunoglobulin protein triggers maturation of dendritic cells via activation of TLR4-MyD88-p38 and ERK1/2 MAPKs. *Parasite Immunol*. 2014; 36: 627-646.
- Lee J-H, Lee J, Park S-J, Yong T-S, Hwang U-W. Detection and genotyping of *Giardia intestinalis* isolates using intergenic spacer (IGS)-based PCR. *Kor J Parasitol* 2006; 44: 343-353.
- Lee MF, Cadogan P, Eytte S, Copeland S, Walochnik J, Lindo JF. Molecular epidemiology and multilocus sequence analysis of potentially zoonotic *Giardia* spp. from humans and dogs in Jamaica. *Parasitol Res*. 2017; 116: 409-414.
- Lee SC, Ngui R, Tan TK, Roslan MA, Ithoi I, Mahdy MAK, et al. Understanding *Giardia* infections among rural communities using the one health approach. *Acta Trop*. 2017; 176:349-354.
- Li E, Liu M, Singer SM. Resistance to reinfection in mice as a vaccine model for giardiasis. *Hum Vaccin Immunother*. 2014; 10: 1536-1543.
- Liao CW, Chiu KC, Chiang IC, Cheng PC, Chuang TW, Kuo JH, et al. Prevalence and risk factors for intestinal parasitic infection in schoolchildren in Battambang, Cambodia. *Am J Trop Med Hyg*. 2017; 12; 16-21.
- Liu A, Yang F, Shen Y, Zhang W, Wang R, Zhao W, et al. Genetic analysis of the *gdh* and *bg* genes of animal-derived *Giardia duodenalis* isolates in Northeastern China and evaluation of zoonotic transmission potential. *PLoS One*. 2014; 9: e95291.



- Llanio R, Fernández JE, Pérez F, Fernández JA, Pena A, Rodríguez L, *et al.* Propedéutica Clínica y Fisiopatología. La Habana: Pueblo y Educación; 1991.
- Lloyd D, Williams CF. Comparative biochemistry of *Giardia*, *Hexamita* and *Spirotrunculus*: Enigmatic diplomonads. *Mol Biochem Parasitol.* 2014; 197:43-49.
- López JL, Barrero E, Núñez FA, Finlay CM, de Rojas V. Algunas características psicosociales de individuos con predisposición a *Trichuris trichiura*. *Rev Cubana Med Trop.* 1993; 45: 180-183.
- Lujan HD. Mechanisms of adaptation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Essays Biochem.* 2011; 51: 177-191.
- Luther A, Bartelt, R. Balfour Sartor. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Rep.* 2015; 7: 62.
- Mahbubani MH, Read CM, Johnson M, Rideel L, Svensson J. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 74-8.
- Makiuchi T, Nozaki T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie.* 2014; 100:3-17.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1992.
- Markova K, Uzlikova M, Tumova P, Jirakova K, Hagen G, Kulda J, *et al.* Absence of a conventional spindle mitotic checkpoint in the binucleated single-celled parasite *Giardia intestinalis*. *Eur J Cell Biol.* 2016; 95: 355-367.
- Mbae C, Mulinge E, Guleid F, Wainaina J, Waruru A, Njiru ZK, *et al.* Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children in Kenya. *BMC Infect Dis.* 2016; 16:135.
- McNally SG, Dawson SC. Eight unique basal bodies in the multi-flagellated diplomonad *Giardia lamblia*. *Cilia.* 2016; 5:21.
- Mendez TL, De Chatterjee A, Duarte T, De Leon J, Robles-Martinez L, Das S. Sphingolipids, lipid rafts, and Giardial encystation: The show must go on. *Curr Trop Med Rep.* 2015; 2: 136-143.
- Mendoza D, Núñez FA, Escobedo A, Pelayo L, Fernández M, Torres D. Parasitosis intestinales en 4 círculos infantiles de San Miguel del Padrón, Ciudad de la Habana, 1998. *Rev Cubana Med Trop.* 2001; 53: 189-193.



- Mero S, Kirveskari J, Antikainen J, Ursing J, Rombo L, Kofoed PE. Multiplex PCR detection of *Cryptosporidium* sp, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* directly from dried stool samples from Guinea-Bissauan children with diarrhoea. *Infect Dis (Lond)*. 2017; 27:1-9.
- Midlej V, Penha L, Silva R, de Souza W, Benchimol M. Mitosomal chaperone modulation during the life cycle of the pathogenic protist *Giardia intestinalis*. *Eur J Cell Biol*. 2016; 95: 531-542.
- Minetti C, Lamden K, Durband C, Cheesbrough J, Fox A, Wastling JM. Determination of *Giardia duodenalis* assemblages and multi-locus genotypes in patients with sporadic giardiasis from England. *Parasit Vectors*. 2015; 8: 444.
- 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.
- Molina N, Minvielle M, Grenóvero S, Salomón C, Basualdo J. High prevalences of infection with *Giardia intestinalis* genotype B among children in urban and rural areas of Argentina. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011; 105: 299-309.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Gen Evol*. 2003; 3: 29–38.
- Monis PT, Cacciò SM, Thompson RCA. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* 2009; 25: 93-100.
- Monis PT, Svard S, Adam B, Ludwig T. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitol*. 1996; 112: 1-12.
- Moore CE, Elwin K, Phot N, Seng C, Mao S, Suy K, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* species and *Giardia duodenalis* from symptomatic Cambodian children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10:e0004822.
- Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*. 2007; 317: 1921-1926.
- Müller J, Schildknecht P, Müller N. Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in *Giardia lamblia*: characterization of a novel nitroreductase (GINR2). *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68: 1781-1789.



- Naguib D, El-Gohary AH, Arafat N, Wang Y, Feng Y, Xiao L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in children in Egypt. *Parasit Vectors*. 2018; 11:403.
- Nash TE, Herrington DA, Losonsky GA, Levine MM. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J Infect Dis*. 1987; 156: 974-984.
- Nash TE, Keister DB. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *J Infect Dis*. 1985; 152:1166-1171.
- Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol*. 2015; 53:1-5.
- Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification. *Nihon Rinsho*. 2007; 65:957-961.
- Núñez FA, Cordoví RA. Manual de Técnicas Básicas para el Diagnóstico de las Parasitosis Intestinales. Editado por el Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP) y la UNICEF. 2003.
- Núñez FA, Hernández M, Finlay CM. Longitudinal study of giardiasis in three day care centres of Havana City. *Acta Trop*. 1999; 73:237- 242.
- Núñez FA, López JL, de la Cruz AM, Finlay CM. Risk factors for *Giardia lamblia* infection in children in daycare centers in Havana, Cuba. *Cad Saude Publ*. 2003; 19: 677-682.
- Núñez FA. *Giardia lamblia*. En: Llop A, Valdés Dapena M, Zuazo JL, editores. *Microbiología y Parasitología Médicas*. T III. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2001. p.31-8.
- Ochoa TJ, Cleary TG. Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie*. 2009; 91: 30-34.
- Oliveira-Arbex AP, David EB, Oliveira-Sequeira TC, Bittencourt GN, Guimarães S. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in asymptomatic children attending daycare centre: evidence of high risk for anthroponotic transmission. *Epidemiol Infect*. 2016; 144: 1418-1428.
- Ortega YR, Adam RD. *Giardia*: overview and update. *Clin Infect Dis*. 1997; 25: 545-549.
- Ortega-Pierres MG, Jex AR, Ansell BRE, Svärd SG. Recent advances in the genomic and molecular biology of *Giardia*. *Acta Trop*. 2018; 184: 67-72.



- Pallant L, Barutzki D, Schaper R, Thompson RC. The epidemiology of infections with *Giardia* species and genotypes in well cared for dogs and cats in Germany. *Parasit Vectors*. 2015; 8:2.
- Parčina M, Reiter-Owona I, Mockenhaupt FP, Vojvoda V, Gahutu JB, Hoerauf A, *et al.* Highly sensitive and specific detection of *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*, and *Cryptosporidium* spp. in human stool samples by the BD MAX™ Enteric Parasite Panel. *Parasitol Res*. 2018; 117: 447-451.
- Pelayo L, Nuñez FA, Rojas L, Furuseth Hansen E, Gjerde B, Wilke H. *Giardia* infections in Cuban children: the genotypes circulating in a rural population. *Ann Trop Med Parasitol* 2008;102: 585-595.
- Perez Cordon G, Cordova Paz Soldan O, Vargas Vasquez F, Velasco Soto JR, Sempere Bordes L, Sanchez Moreno M. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. *PLoS One*. 2013; 8:e83207.
- Pham JK, Nosala C, Scott EY, Nguyen KF, Hagen KD, Starcevich HN, Dawson SC. Transcriptomic Profiling of high-density *Giardia* foci encysting in the murine proximal intestine. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7:227.
- Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *Int J Hyg Environ Health*. 2010; 213: 321-333.
- Procop GW. Gastrointestinal infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2001; 15:1073-1080.
- Prystajec N, Huck PM, Schreier H, Isaac-Renton JL. Assessment of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. as a microbial source tracking tool for surface water: application in a mixed-use watershed. *Appl Environ Microbiol*. 2014; 80: 2328-2336.
- Raj D, Ghosh E, Mukherjee AK, Nozaki T, Ganguly S. Differential gene expression in *Giardia lamblia* under oxidative stress: significance in eukaryotic evolution. *Gene*. 2014; 535: 131-139.
- Read C, Walters J, Robertson, ID, Thompson, RC. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol* 2002; 32: 229-231.
- 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: 125-130.



- Reses HE, Gargano JW, Liang JL, Cronquist A, Smith K, Collier SA, *et al.* Risk factors for sporadic *Giardia* infection in the USA: a case-control study in Colorado and Minnesota. *Epidemiol Infect.* 2018; 146: 1071-1078.
- Rivero MR, De Angelo C, Nuñez P, Salas M, Liang S. Intestinal parasitism and nutritional status among indigenous children from the Argentinian Atlantic Forest: determinants of enteroparasites infections in minority populations. *Acta Trop.* 2018; 187: 248-256.
- Rivero MR, De Angelo C, Nuñez P, Salas M, Motta CE, Chiaretta A, *et al.* Environmental and socio-demographic individual, family and neighborhood factors associated with children intestinal parasitoses at Iguazú, in the subtropical northern border of Argentina. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 20; 11: e0006098.
- Robertson LJ, Forberg T, Hermansen L, Gjerde BK, Langeland N. Molecular characterisation of *Giardia* isolates from clinical infections following a waterborne outbreak. *J Infect* 2007; 55: 79–88.
- Robertson LJ, Hanevik K, Escobedo AA, Mørch K, Langeland N. Giardiasis-why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol.* 2010; 26: 75-82
- Rojas L, Núñez FA, Aguiar PH, Silva LC, Alvarez D, Martínez R. Segunda encuesta nacional de infecciones parasitarias intestinales en Cuba, 2009. *Rev Cub Med Trop.* 2012; 64: 15-21.
- Roskens H, Erlandsen SL. Inhibition of *in vitro* attachment of *Giardia* trophozoites by mucin. *J Parasitol* 2002; 88: 869–873.
- Roxström-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svärd SG. *Giardia* immunity-an update. *Trends Parasitol.* 2006; 22: 26-31.
- Ryan U, Cacciò SM. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol.* 2013; 43:943-956.
- Sahagun J, Clavel A, Goni P. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 81–83.
- Saksirisampant W, Boontanom P, Mungthin M, Tan-Ariya P, Lamchuan D, Siripattanapong S. Prevalence of giardiasis and genotypic characterization of *Giardia duodenalis* in hilltribe children, Northern Thailand. *Trop Biomed.* 2012; 29: 331-338.
- Salusso A, Zlocowski N, Mayol GF, Zamponi N, Rópolo AS. Histone methyltransferase 1 regulates the encystation process in the parasite *Giardia lamblia*. *FEBS J.* 284: 2396-2409.



- Samuelson J, Bushkin GG, Chatterjee A, Robbins PW. Strategies to discover the structural components of cyst and oocyst walls. *Eukaryot Cell*. 2013; 12: 1578-1587.
- Sánchez A, Munoz M, Gómez N, Tabares J, Segura L, Salazar Á. Molecular Epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among indigenous Children from the Colombian Amazon Basin. *Front Microbiol*. 2017; 8:248.
- Sarkari B, Hosseini G, Motazedian MH, Fararouei M, Moshfe A. Prevalence and risk factors of intestinal protozoan infections: a population-based study in rural areas of Boyer-Ahmad district, Southwestern Iran. *BMC Infect Dis*. 2016; 16:703-708.
- Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘Neglected Diseases Initiative’. *Trends Parasitol*. 2006; 22: 203–208.
- Scalia LA, Fava NM, Soares RM, Limongi JE, da Cunha MJ, Pena IF. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2016; 110: 343-349.
- Schwartz CL, Heumann JM, Dawson SC, Hoenger A. A detailed, hierarchical study of *Giardia lamblia*'s ventral disc reveals novel microtubule-associated protein complexes. *PLoS One*. 2012; 7: e43783.
- Scott KG, Yu LC, Buret AG. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun* 2004; 72: 3536–3542.
- Sequí R, Muñoz-Antoli C, Oishi CY, Koster PC, de Lucio A, Hernández M, Puente P, et al. Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. *Parasit Vector*. 2018; 11: 490.
- Shen H, Zhang J, Li Y, Xie S, Jiang Y, Wu Y. The 12 Gastrointestinal pathogens spectrum of acute infectious diarrhea in a Sentinel Hospital, Shenzhen, China. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1926.
- Silva RK, Pacheco FT, Martins AS, Menezes JF, Costa-Ribeiro H Jr, Ribeiro TC. Performance of microscopy and ELISA for diagnosing *Giardia duodenalis* infection in different pediatric groups. *Parasitol Int*. 2016; 65:635-640.
- Singhal S, Mittal V, Khare V, Singh YI. Comparative analysis of enzyme-linked immunosorbent assay and direct microscopy for the diagnosis of *Giardia intestinalis* in fecal samples. *Indian J Pathol Microbiol*. 2015; 58:69-71.



- Skhal D, Aboualchamat G, Al Mariri A, Al Nahhas S. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblages and sub-assemblages in symptomatic patients from Damascus city and its suburbs. *Infect Genet Evol.* 2017; 47: 155-160.
- Speich B, Marti H, Ame SM, Ali SM, Bogoch II, Utzinger J. Prevalence of intestinal protozoa infection among school-aged children on Pemba Island, Tanzania, and effect of single-dose albendazole, nitazoxanide and albendazole-nitazoxanide. *Parasit Vectors.* 2013; 6:3.
- Sprong H, Cacciò S, van der Giessen J. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3:e558.
- Squire SA, Ryan U. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. *Parasit Vectors.* 2017; 10:195.
- Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 1444–1452.
- Sulemana A, Paget TA, Jarroll EL. Commitment to cyst formation in *Giardia*. *Microbiol.* 2014; 160: 330-339.
- Svärd SG, Hagblom P, Palm JE. *Giardia lamblia* - a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 218: 3-7.
- Thompson RC, Ash A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infect Genet Evol.* 2016; 40: 315-323.
- Thompson RC, Monis P. *Giardia*-from genome to proteome. *Adv Parasitol.* 2012; 78:57-95.
- 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.
- Thompson RC, Smith A. Zoonotic enteric protozoa. *Vet Parasitol.* 2011; 182: 70-78.
- Thompson RC. Parasite zoonoses and wildlife: One Health, spillover and human activity. *Int J Parasitol.* 2013; 43: 1079-1088.
- Thompson RCA, Monis PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol.* 2004; 58: 70–137.
- Thompson RCA. The impact of *Giardia* on science and society. 2009; In: Ortega Pierres G.
- Torres-Romero JC, Euan-Canto J, Benito G, Padilla N, Huchin C, Cedillo-Rivera 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. 2014; 109: 388-390.
- Tůmová P, Mazánek L, Lecová L, Dluhošová J, Typovská H, Kotrašová V, *et al.* A natural zoonotic giardiasis: Infection of a child via *Giardia* cysts in pet chinchilla droppings. Parasitol Int. 2018; 67: 759-762.
  - Tysnes KR, Skancke E, Robertson LJ. Subclinical *Giardia* in dogs: a veterinary conundrum relevant to human infection. Trends Parasitol. 2014; 30: 520-527.
  - Utaaker KS, Myhr N, Bajwa RS, Joshi H, Kumar A, Robertson LJ. Goats in the city: prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in extensively reared goats in northern India. Acta Vet Scand. 2017; 22; 59: 86-90.
  - Vanni I, Cacciò SM, van Lith L, Lebbad M, Svärd SG, Pozio E. Detection of *Giardia duodenalis* assemblages A and B in human feces by simple, assemblage-specific PCR assays. PLoS Negl. Trop. 2012; 6: e1776.
  - Ventura LL, Oliveira DR, Viana JC, Santos JF, Caliani MV, Gomes MA. Impact of protein malnutrition on histological parameters of experimentally infected animals with *Giardia lamblia*. Exp Parasitol. 2013; 133: 391-395.
  - Vermathen M, Müller J, Furrer J, Müller N, Vermathen P. HR-MAS NMR spectroscopy to study the metabolome of the protozoan parasite *Giardia lamblia*. Talanta. 2018; 188: 429-441.
  - Villalba-Vizcaíno V, Buelvas Y, Arroyo-Salgado B, Castro LR. Molecular identification of *Giardia intestinalis* in two cities of the Colombian Caribbean Coast. Exp Parasitol. 2018; 189: 1-7.
  - 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; 102:10-19.
  - Waddington CS, McLeod C, Morris P, Bowen A, Naunton M, Carapetis J, *et al.* The NICE-GUT trial protocol: a randomised, placebo controlled trial of oral nitazoxanide for the empiric treatment of acute gastroenteritis among Australian Aboriginal children. BMJ Open. 2018; 8: e019632.
  - Waldram A, Vivancos R, Hartley C, Lamden K. Prevalence of *Giardia* infection in households of *Giardia* cases and risk factors for household transmission. BMC Infect Dis. 2017; 11; 17: 486.



- Wampfler PB, Tosevski V, Nanni P, Spycher C, Hehl AB. Proteomics of secretory and endocytic organelles in *Giardia lamblia*. PLoS One. 2014;9(4):e94089.
- Weatherhead J, Cortés AA, Sandoval C, Vaca M, Chico M, Loor S, *et al.* Comparison of Cytokine Responses in Ecuadorian Children Infected with *Giardia*, *Ascaris*, or Both Parasites. Am J Trop Med Hyg. 2017; 96: 1394-1399.
- Wegayehu T, Karim MR, Li J, Adamu H, Erko B, Zhang L. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* species and *Giardia duodenalis* in lambs in Oromia special zone, Central Ethiopia. BMC Vet Res. 2017; 13:22.
- Wei Li, Ashesh A. Saraiya, Ching C. Wang. Experimental verification of the identity of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia* trophozoites. mBio. 2013; 4: e00321-13.
- WHO. Parasitic zoonoses. Report of a WHO expert committee with the participation of FAO. World Health Organ Tech Rep Ser 1979: 1-107.
- Wielinga CM, Thompson RCA. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. Parasitol. 2007; 134: 1795–1821.
- Woessner DJ, Dawson SC. The *Giardia* median body protein is a ventral disc protein that is critical for maintaining a domed disc conformation during attachment. Eukaryot Cell. 2012; 11: 292-301.
- Wordemann M, Polman K, Menocal Heredia LT, Junco Diaz R, Collado Madurga AM, Núñez Fernandez FA. Prevalence and risk factors of intestinal parasites in Cuban children. Trop Med Int Health. 2006; 11: 1813-1820.
- World Health Organization and Unicef. Progress on Sanitation and Drinking Water: 2015 Update and MDG Assessment. Geneva: World Health Organization. 2015.
- World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. JAMA. 2013;310:2191-2194.
- Yason JA, Rivera WL. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. Parasitol Res 2007; 101:681–687.
- Yoshida N, Tyler KM, Llewellyn MS. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. Trends Parasitol. 2011; 27: 459-466.
- Zamponi N, Zamponi E, Mayol GF, Lanfredi-Rangel A, Svärd SG, Touz MC. Endoplasmic reticulum is the sorting core facility in the Golgi-lacking protozoan *Giardia lamblia*. Traffic. 2017; 18: 604-621.



- 
- Zarebavani M, Dargahi D, Einollahi N, Dashti N, Mohebali M, Rezaeian M. Serum levels of zinc, copper, vitamin B12, folate and immunoglobulins in individuals with giardiasis. Iran J Public Health. 2012; 41:47-53.
  - Zylberberg HM, Green PH, Turner KO, Genta RM, Lebwohl B. Prevalence and predictors of *Giardia* in the United States. Dig Dis Sci. 2017; 62:432-440.



## IX. Autobibliografía

Artículos donde se publican los resultados de la Tesis.

- **Jerez Puebla L**, Núñez FA, Fernández YA, Fraga J, Rivero LR, Millán IA, Valdés LA, Silva IM. Correlation of *Giardia duodenalis* assemblages with clinical and epidemiological data in Cuban children. *Infect Genet Evol.* 2014; 23:7-12.
- **Luis Jerez Puebla**, Fidel A. Núñez, Alexey Brito García, Lázara Rojas Rivero, Irais Atencio Millán, Raúl Cordoví. Prado Sub-assemblages distribution of *Giardia duodenalis* and its association with clinical symptoms in children from Sancti Spíritus, Cuba. *J Coast Life Med* 2015; 3(11): 864-868.
- **Jerez Puebla LE**, Núñez FA, Martínez Silva I, Rojas Rivero L, Martínez González M, Méndez Sutil Y, Ayllón Valdés L, Atencio Millán I, Müller N. Molecular Characterization and Risk Factors of *Giardia duodenalis* among School Children from La Habana, Cuba. *J Parasitol Res.* 2015; 2015:378643.
- **Luis Jerez Puebla**, Fidel A. Núñez, Alexey Brito García, Lázara Rojas Rivero, Irais Atencio Millán, Raúl Cordoví Prado. Prevalence of *Giardia duodenalis* among children from a central region of Cuba: molecular characterization and associated risk factors. *J Parasit Dis* 2017; 41:405-413.



### Artículos del autor relacionados con el tema.

- A Pino Santos, FA Núñez Fernández, R Martínez Sánchez, I Domenech Cañete, M Rodríguez, **L Jerez Puebla**, Z Rodríguez González. Prevalence and Risk Factors for Intestinal Parasitic Infections in a Rural Community in “Consolación del Sur” Municipality, Cuba. *West Indian Med J.* 2014; 63(4): 337-343.
- **Luis Enrique Jerez Puebla**, Fidel A. Núñez, Lázara Rojas Rivero, Isabel Martínez Silva, Lucia Ayllón Valdés, Iraís Atencio Millán, Norbert Müller. Distribution of *Giardia duodenalis* assemblages by PCR-RFLP of  $\beta$ -*Giardin* Gene in Cuban Children. *J Pediatr Infect Dis* 2016; 1:21-26.
- **Luis Enrique Jerez Puebla**, Fidel A. Núñez, Lázara Rojas Rivero, Yordan Robau Hernández, Iraís Atencio Millán, Norbert Müller. Prevalence of intestinal parasites and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from dogs in La Habana, Cuba. *Parasite Epidemiol Control.* 2017; 2: 105–113.
- **Luis Enrique Jerez Puebla**, Fidel A. Núñez, Lissette Pérez Santos, Lázara Rojas Rivero, Isabel Martínez Silva, Lucia Ayllón Valdés, Iraís Atencio Millán, Norbert Müller. Molecular analysis of *Giardia duodenalis* from symptomatic and asymptomatic Cuban children. *Parasite Epidemiol Control.* 2017; 2: 105–113.
- Núñez FA, Rodríguez-Ortega M, Fresco-Sampedro Y, **Jerez-Puebla LE**. Parasitic Diarrhea in Cuban Patients. *Ann Infect Dis Epidemiol.* 2017; 2(3): 1020.

### Eventos científicos donde se han expuesto los resultados del presente trabajo.

- Evento BTJ-IPK. "Caracterización genética de *Giardia lamblia* en muestras fecales de niños infectados y su relación con características clínico-epidemiológicas". (**Autor**). Mención IPK, 18 de diciembre de 2012.
- Taller "Helmintiasis intestinal, enfermedades atópicas y nutrición en escolares de dos municipios cubanos 2008-2013, actualidad y proyecciones". Hospital Frank País. Diciembre 2012.
- I Taller Nacional de Parasitología "Carlos M. Finlay in Memoriam". 29 al 31 de Octubre de 2013. Genotipos de *Giardia*. Hospital Pedro Borrás.
- Evento BTJ-IPK. "Diagnóstico parasitológico en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitismo Intestinal (2012-2013)". (**Autor**). Premio IPK, 21 de Noviembre de 2013.



- Curso Latinoamericano de epidemiología molecular aplicada a las enfermedades infecciosas. Lima, Perú. 26 de noviembre al 6 de diciembre de 2013. Correlation of *Giardia duodenalis* assemblages with clinical and epidemiological data in Cuban children (**Autor**)
- VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, IPK, Cuba, 2014.
- Jornada Institucional de las BTJ. Prevalencia y caracterización molecular de aislamientos de *G. duodenalis* en perros de La Habana, Cuba. 7 de Abril de 2016 (**Autor**). (Mención).
- Bioinformatic Workshop on Viral Evolution and Molecular and Molecular Epidemiology. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from dogs in La Habana, Cuba. Julio de 2016. (**Autor**).
- VI International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference. Molecular analysis of *Giardia duodenalis* from symptomatic and asymptomatic children from La Habana, Cuba. 26 de Abril de 2017. (**Autor**).
- VI International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference. Molecular characterization of *Giardia lamblia* isolates from children from Havana: association with clinical and epidemiological aspects. 26 de Abril de 2017. (**Autor**).
- VI International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference. Molecular findings of Cuban isolates of *Giardia lamblia*: relationship between genetic assemblages and clinical, epidemiologic and zoonotic characteristics. 26 de Abril de 2017. (**Autor**).
- XXI Jornada de Médicos Residentes de Microbiología, IV de Egresados y I Jornada de Maestros y Doctorandos por el 80 Aniversario del IPK. Hallazgos moleculares de aislamientos cubanos de *Giardia lamblia*: relación entre ensamblajes genéticos y características clínico-epidemiológicas. 4 de mayo de 2017. (**Autor**).
- Congreso 80 Aniversario del IPK. Estudios moleculares de aislamientos cubanos de *Giardia lamblia*: relación entre ensamblajes genéticos y características clínico-epidemiológicas. 6 de diciembre de 2017. (**Autor**).
- Curso Internacional de Inmunología: Shaping of the Immune System: Nurture or Nature? Molecular analysis of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic and asymptomatic children from La Habana, Cuba. Universidad de Ciencias Médicas Victoria de Girón. 16-20 de julio de 2018. (**Autor**).
- II Curso Internacional de Inmunidad Innata en Enfermedades Infecciosas. *Giardia duodenalis* in Cuban children: clinical, molecular and immunological data, Universidad de Aguascalientes. 16 al 28 de Septiembre de 2018. (**Autor**).



### Reconocimiento de los Resultados.

- Sello Forjadores del Futuro de las Brigadas Técnicas Juveniles (BTJ)-2012
- Sello Forjadores del Futuro 2015
- Sello Forjadores del Futuro 2017
- **Resultado relevante institucional, octubre 2018**

Giardiosis en edad pediátrica: aspectos epidemiológicos y relación de hallazgos moleculares con características clínicas de la infección. **Lic. Luis Enrique Jerez Puebla**, Dr. Fidel Ángel Núñez Fernández, Dr. Norbert Müller, Dra. Lázara Rojas Rivero, Dra. Isabel Martínez Silva, Dra. Lucía Ayllón Valdés, Dra. Iraís Atencio Millán, Dr. Jorge Fraga Nodarse, Dra. Yenisey Alfonso Fernández, Dr. Alexey Brito García, Téc. Raúl Cordoví Prado, Dra. Yuliet Méndez Sutil, Dra. Raquel Junco.



## X. ANEXOS

### ANEXO 1

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

##### Protocolo de Investigación:

**“Aspectos epidemiológicos y relación de hallazgos moleculares con características clínicas en la giardiosis pediátrica. La Habana y Fomento, 2010-2013”.**

El Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), se propone realizar una investigación acerca de la posible correlación entre los ensamblajes genéticos de *Giardia lamblia* y las características clínico-epidemiológicas presentes en los niños que participarán en la investigación.

En el estudio se utilizarán muestras de heces de los niños para diagnosticar la presencia del parásito y su ensamblaje genético. Se recogerán además los datos clínicos y epidemiológicos en un modelo de cuestionario por parte de los investigadores presentes en este estudio.

Nuestro objetivo es conocer los ensamblajes genéticos de *G. lamblia* circulantes en el país en niños de la edad de pediátrica ya que es una de las causas más frecuentes de diarrea en esta etapa de la vida y su posible contribución en la severidad de la infección.

Los resultados sobre el diagnóstico realizado se le entregarán al médico de asistencia de su localidad

Declaro que he sido informado (a) del objetivo del estudio, así como la importancia de los resultados de la investigación. Para constancia de lo expuesto con anterioridad firmamos este documento a los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_.

Nombre del niño \_\_\_\_\_

Nombre del Padre o tutor \_\_\_\_\_

Firma del padre o tutor: \_\_\_\_\_.



## ANEXO 2.

## ENCUESTA DE PARASITISMO INTESTINAL

Encuesta No. ....

Nombre (s) y Apellidos \_\_\_\_\_  
 Dirección: Calle \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ % \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_ Barrio \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ Municipio: \_\_\_\_\_ Provincia \_\_\_\_\_  
 Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ (kg.) Talla: \_\_\_\_\_ (cm)  
 Edad: \_\_\_\_\_ Fecha de llenado de la encuesta: \_\_\_\_\_

## LOCALIZACION DE LA VIVIENDA.

- Urbana ----  
 Rural ----

## SEXO.

Masculino----  
 Femenino.----

## COLOR DE LA PIEL.

- Blanca-----  
 Negra-----  
 Mestiza-----  
 Otras.-----  
 No procede.

## -PROCEDENCIA :

- Círculo Infantil  
 Escuela  
 Vía no formal  
 - Lactancia Materna  
 NO  
 SÍ

Duración \_\_\_\_\_

## - Características de la Diarrea Actual

Duración \_\_\_\_\_ (días)

Fecha Comienzo \_\_\_\_\_

Frecuencia (24 h) \_\_\_\_\_

Presencia en las heces de:

Sangre \_\_\_ Mucus \_\_\_ Pus \_\_\_

-Cantidad de heces:  Escasa  
 Normal  Abundante

-Consistencia:  Líquida  Semilíquida Pastosa  Semipastosa

- Color de las heces: \_\_\_\_\_

No. miembros núcleo familiar: \_\_\_\_\_ No.  
 de habitaciones (dormitorios) en la vivienda: \_\_\_\_\_

## TRANSTORNOS ACOMPAÑANTES

- Dolor abdominal-----  Vómitos-----  
 náuseas -----  
 pérdida de peso-----  
 prurito anal -----  
 pérdida de apetito-----  
 fatiga -----  
 flatulencia -----  
 fiebre -----  
 dolor de cabeza-----

Otros

(¿Cuáles?: \_\_\_\_\_)

 Ninguno-----

Otros Análisis Complementarios:

Anemia: NO---- SÍ \_\_\_\_\_ g/%

Eosinofilia: NO---- SÍ \_\_\_\_\_ %

Tratamiento (Fecha de Comienzo) \_\_\_\_\_

Hidratación:  oral----- parenteral----- ninguna-----

Antibióticos

Quimioterapéuticos: \_\_\_\_\_

Antiparasitarios: \_\_\_\_\_

Diagnóstico de Laboratorio:

Viral: \_\_\_\_\_

Bacteriológico: \_\_\_\_\_

Parasitológico: \_\_\_\_\_



**Contacto con animales:**

- Perros SÍ  NO
- Gatos SÍ  NO
- Caballos SÍ  NO
- Pájaros SÍ  NO
- Palomas SÍ  NO
- Pollos SÍ  NO
- Cerdos SÍ  NO
- NO

Otros animales SÍ  NO  ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

Ninguno SÍ  NO  ¿Hay otras personas en el hogar con diarreas? Sí: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_

**Hábitos higiénico-sanitarios**

- Hierve agua para tomar SÍ  NO
- Se lava las manos después de comer. SÍ  NO
- Se lleva el dedo a la boca. SÍ  NO
- Lava las verduras antes de comer SÍ  NO
- Lava las frutas antes de comer SÍ  NO
- Chupa el tete SÍ  NO
- Se lava las manos después de ir al baño. SÍ  NO

Reses SÍ

Para ser llenado por el laboratorio

Parásitos detectados

- Trichuris*-----
- Enterobius*-----
- Ascaris*-----
- H. nana*-----
- Endolimax nana*-----
- Entamoeba. coli*-----
- E. histolytica / E. dispar*
- Taenia spp.*----- - *Shigella*-----
- Giardia*-----
- Blastocystis spp*-----
- Ancylostomideos*-----
- Strongyloidesstercoralis*-----
- Cryptosporidium spp.*
- Cyclosporacayetanensis*
- Cystoisospora belli*

Rotavirus: Positivo: SÍ  NO

Enterobacterias:

- *Escherichia coli* -----
- *Salmonella*-----
- *Vibrio*-----
- *Aeromonas*-----
- *Plesiomonas*-----
- *Yersinia*-----
- *Campylobacter*-----

Otros ¿cuáles? \_\_\_\_\_ Ninguno.-----

Resultados	Directo	Ritchie	Willis modificado	Ziehl Neelsen
Muestra				



# INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Ministerio de Salud Pública

## Centro Auspiciado por la UNESCO Centro Colaborador de la OMS/OPS



Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica  
y control biológico de vectores y huéspedes intermediarios  
Para el estudio de las Enfermedades Víricas  
En Tuberculosis y Micobacterias  
Para el estudio del Dengue y su vector



INSTITUTO  
Pedro Kourí

### PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 15-13

#### Caracterización genética de aislamientos de *Giardia lamblia* procedentes de niños sintomáticos y asintomáticos y su correlación clínico-epidemiológica

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Lic. Luis Jerez Puebla

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente proyecto de investigación por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

#### DICTAMEN

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el proyecto aparece reflejado de forma clara la forma de protección de los derechos y beneficios de los sujetos participantes en la investigación.
3. Se aprueba el proyecto presentado

Dado en el IPK, La Habana, a los 25 días del mes de Junio de 2013

Dr Eric Martínez  
Presidente

Dra. María Caridad Montalvo

Dra. Ana M. Montalvo

Dr. Daniel González

Lic. Iliana del Carmen Valdés



# INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Ministerio de Salud Pública

## Centro Auspiciado por la UNESCO Centro Colaborador de la OMS/OPS

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica  
y control biológico de vectores y huéspedes intermediarios  
Para el estudio de las Enfermedades Víricas  
En Tuberculosis y Micobacterias  
Para el estudio del Dengue y su vector



### CERTIFICACIÓN DE SEGURIDAD

El que firma certifica que todas las actividades de investigación de esta solicitud, que involucra humanos, fueron examinados y aprobadas por el Comité de Ética del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", que se reunió en:

La Habana, Instituto Pedro Kourí, 25 de Junio de 2013

(lugar y fecha)

El Comité de Ética estuvo formado por los siguientes miembros:

Nombre y Apellidos	Profesión	Cargo actual/institución
Dr. Eric Martínez (Presidente)	Médico	Invest Titular/IPK
Dra. María Caridad Montalvo.	Médico	Invest Auxiliar/IPK
Dra. Ana M. Montalvo	Bióloga	Invest Auxiliar/IPK
Dr. Daniel González	Médico	Investigador /IPK
Iliana del Carmen Valdés	Microbióloga	Investigador Auxiliar/IPK

Presidente del Comité de Ética Institucional

Dr. Eric Martínez

Firma

10-09-2013

Fecha

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"