

EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN GIARDIASIS: SUS POTENCIALIDADES

MOLECULAR DIAGNOSIS IN GIARDIASIS: ITS POTENTIALITIES

Vivian Villalba Vizcaíno

RESUMEN

Giardia intestinalis es un parásito de amplia distribución mundial, causante de enfermedad diarreica aguda no bacteriana. La transmisión del parásito es fecal -oral y puede ocurrir entre humanos, humanos - animales y animales - animales, siendo el agua la principal fuente de contaminación, por lo que en términos generales se considera que esta parasitosis es un importante problema de salud. Este parásito protozoo presenta alta variabilidad genética, lo que le confiere diversidad de hospederos. Se han identificado ocho genotipos del parásito relacionados con hospederos específicos; pero también son considerados algunos genotipos inespecíficos, lo que favorece el ciclo zoonótico del parásito. Existen algunas técnicas usadas de manera convencional para el diagnóstico de la infección por *G. intestinalis*, sin embargo tienen poca sensibilidad debido a la eliminación intermitente de los quistes del parásito; por lo que el desarrollo de las nuevas técnicas moleculares, tales como Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), Polimorfismo en los fragmentos de restricción (RFLP), Secuenciación, abre nuevos horizontes para la investigación en este campo. Se conoce poco respecto al papel de los animales domésticos, la distribución de los genotipos circulantes en nuestro medio y el impacto sobre la salud. El objetivo de este trabajo es describir las características particulares de *G. intestinalis*, el problema de salud que representa, las herramientas moleculares disponibles y su utilidad para responder preguntas no aclaradas sobre el ciclo de este importante protozoo.

PALABRAS CLAVE: *Giardia intestinalis*, diarrea, genotipificación, RFLP, filogeografía.

ABSTRACT

Giardia intestinalis is a parasite of worldwide distribution, causing acute non-bacterial diarrhea. Parasite transmission is fecal-oral and it can get between humans, humans-animals and animals-animals, being waterborne transmission main, so it is generally considered that this disease is an important health problem.. This protozoan parasite has a high genetic variability, because it has a diverse range of host. This protozoan has eight genotypes identified, with a host-specific relationship; but some of them could be non-specific, which allows zoonotic transmission. There are some techniques conventionally used for the diagnosis of infection with *G. intestinalis*, however these have low sensitivity due to intermittent elimination of cysts; but to investigate this area, many new techniques are available, such as Polymerase Chain Reaction(PCR), Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Sequencing. It's not clear the role of pets in zoonotic transmission, genotype distribution in our environment and impact in health population. The aim of this paper is showing particular characteristics of *G. intestinalis*, health problems that this parasite represent to population, the molecular tools available and its potentiality to resolve some questions about this important protozoan.

KEY WORDS: *Giardia intestinalis*, diarrhea, genotyping, RFLP, phylogeography.

Dirección de los autores:

Grupo de Investigación Evolución, Sistemática y Ecología Molecular y CIMET. Universidad del Magdalena; Cra 32 No. 22-08. Santa Marta, Magdalena, Colombia. vvillalba@unimagdalena.edu.co, vitavivi@hotmail.com (V.V-V).



INTRODUCCIÓN

Giardia es un grupo de parásitos protozoos de distribución mundial amplia, pertenecientes al Phylum Metamonada, Clase Treponadea, Orden Giardiida y Familia Giardiidae. Son eucariotas unicelulares que carecen de algunos compartimientos y cuyo ciclo de vida transcurre entre un estadio infectante y otro patogénico, el quiste y trofozoito, respectivamente. De acuerdo con sus características morfológicas, se han identificado seis especies distintas, cada una de las cuales es relacionada con un hospedero específico (Plutzer et al., 2010). Sin embargo, una de estas especies comprende un grupo con similitudes morfológicas pero diferencias genéticas, presente en los mamíferos, conocido como *Giardia intestinalis*, al cual se refiere en adelante este escrito.

La afección causada por *G. intestinalis* en la salud de los seres humanos varía desde una enfermedad diarrea aguda y crónica, síndrome de malabsorción hasta cuadros asintomáticos que finalmente tendrán consecuencias en el desempeño de los individuos infectados. Este parásito puede estar presente como contaminante en el agua y la tierra, por lo que constituye un problema importante en las comunidades con pobres condiciones higiénicas y de servicios públicos, convirtiéndose en un problema de salud pública actualmente reconocido por la OMS dentro de la lista de enfermedades desatendida (Mohammed Mahdy et al., 2009).

Se han identificado ocho genotipos de *G. intestinalis*, de los cuales sólo los genotipos A y B causan enfermedad en el humano, los restantes tienen especificidad por otros hospederos (Monis et al., 2003). Las distancias genéticas entre los genotipos A y B son amplias y cada genotipo presenta sub-divisiones adicionales. Aunque morfológicamente son indistinguibles, algunas diferencias que podrían encontrarse entre estos genotipos están relacionadas con aspectos bioquímicos, crecimiento, infectividad, sensibilidad a medicamentos, entre otras (Plutzer et al., 2010).

La ruta de transmisión de *G. intestinalis* es fecal-oral, a través de mecanismos antroponóticos, zoonóticos, antropozoonóticos, siendo el agua una fuente importante para el esparcimiento de los quistes (Plutzer et al., 2010). En una población humana, pueden encontrarse todos los mecanismos, según las condiciones del medio, los conocimientos y prácticas de los individuos de la comunidad; pero la significancia de cada mecanismo

para la evolución clínica de la enfermedad y la distribución del parásito, no ha sido completamente dilucidada. Otro factor a considerar para la comprensión de la transmisión y cuadro clínico, son los factores del hospedero tales como la inmunidad, la nutrición y la edad.

El diagnóstico de esta parasitosis se realiza a través de métodos clásicos de microscopía y tinción con yodo; sin embargo, la excreción de quistes de manera intermitente provoca fallas, por lo que se hace necesario la utilización de otras técnicas, tales como ELISA, Inmunofluorescencia basadas en el reconocimiento de los antígenos de superficie del parásito y recientemente las técnicas de diagnóstico molecular a través de PCR-RFLP. Esta técnica parte de la amplificación de un segmento del ADN del parásito y su posterior digestión con enzimas de restricción, lo que dará un patrón de bandas específico para cada genotipo; secuenciación, la cual usa una reacción enzimática y posterior electroforesis capilar para describir el orden de las pares de bases en el fragmento amplificado, de manera que luego se puedan comparar las secuencias en búsqueda de homología y relaciones con otras secuencias a través de árboles filogenéticos. Las técnicas moleculares descritas tienen mucho potencial para la resolución de los cuestionamientos actuales.

Ciclo de vida del parásito y epidemiología

Diversos hospederos son responsables del mantenimiento del ciclo de vida de *G. intestinalis*, la cual es transmitida a través de la ruta fecal – oral, con la interacción entre animales, humanos y animales-humanos de forma directa o indirecta, a través del agua (por consumo, actividades recreativas, aguas servidas) (Fernandes et al., 2011) y los alimentos contaminados (Plutzer et al., 2010). La infección por *G. intestinalis* es adquirida por la ingesta de los quistes presentes en los medios antes descritos. Una vez que los quistes llegan al estómago, sufren el proceso de desenquistamiento para dar paso a la forma patogénica, el trofozoito, que gracias a sus disco ventral se adhiere a las vellosidades intestinales y en su interacción con la mucosa, a través de múltiples mecanismos patogénicos, es capaz de causar diarrea y daños a la barrera intestinal que deterioran la función de absorción de nutrientes (Troeger et al., 2007; Cotton et al., 2011). Por otra parte, el sistema inmune asociado a la mucosa del intestino es capaz de interactuar con el parásito y controlar la infección a través de la producción de anticuerpos locales y citoquinas inflamatorias en el marco de una respuesta inmune celular, dependiendo

esto del genotipo del parásito, que se conoce como interacción patógeno-hospedero, lo que podría definir las manifestaciones clínicas. Los trofozoítos se reproducen asexualmente por fisión binaria en el duodeno y al pasar al yeyuno sufren el proceso de enquistamiento para posteriormente ser expulsados con las heces y renovar el ciclo de vida (Roxstrom-Lindquist et al., 2006; Botero y Restrepo 2012).

Los quistes excretados por los individuos infectados pueden contaminar fuentes de agua, alimentos y animales, de acuerdo con las condiciones higiénicas presentes, con lo cual continúa el ciclo de vida del parásito. Es importante anotar que los quistes excretados al medio, pueden permanecer libres durante largos períodos de tiempo, manteniendo la fuente de infección latente (Plutzer et al., 2010).

La prevalencia de *G. intestinalis* varía en los diversos estudios, registrándose entre 2 y 4% en los países industrializados y hasta un 60% en los países en desarrollo. La giardiasis afecta al menos 2,5 millones de niños en los países en desarrollo causando diarrea y deficiencias nutricionales (Eligio-García et al., 2008; Kohli et al., 2008; Mohammed Mahdy et al., 2009; Molina et al., 2011). Estas cifras no contemplan los cuadros asintomáticos que son frecuentes e importantes por la capacidad que tiene el hospedero para infectar a los individuos cercanos. Las condiciones que favorecen la permanencia y transmisión del parásito son entre otras: pobre higiene, carencia de servicios públicos, hábitos, tipo de vivienda y convivencia con animales domésticos (Ivanov, 2010). Molina et al. (2011) mostraron que la dificultad para acceder a los servicios de salud contribuyó a la prevalencia y transmisibilidad del parásito, además de las pobres condiciones de sanidad de la población de Berisso (Argentina), lo que hace necesario incrementar los programas de educación para el cuidado de la salud y la asistencia médica.

Diagnóstico de *G. intestinalis* y preguntas por resolver

Existen diversos métodos utilizados para corroborar la presencia de la infección por *G. intestinalis*. Convencionalmente se realiza el análisis coproparasitológico con tinción de yodo para observar quistes y/o trofozoítos presentes en la muestra de materia fecal, pero esta técnica es dependiente del operador y en ocasiones arroja resultados falsos positivos dado que la excreción de quistes no es constante sobre todo en las infecciones crónicas. Por esta razón, se desarrollaron

otras técnicas basadas en la detección del antígeno, tales como ELISA e inmunofluorescencia directa que permiten detectar proteínas excretadas del parásito y aumentan la sensibilidad diagnóstica (Verweij et al., 2003; Geurden et al., 2008; Chakarova, 2010; Plutzer et al., 2010; Rishniw et al., 2010).

Por otra parte, se han desarrollado nuevas técnicas de la mano de la biología molecular con el objetivo de aumentar la sensibilidad y especificidad de las pruebas y adicionalmente realizar análisis genéticos que permitan determinar la distribución de genotipos del parásito y comprender su ciclo de vida (Verweij et al., 2003; Plutzer et al., 2010). Entre otras, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la secuenciación, el polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (RFLP) han superado las dificultades presentadas por la excreción discontinua de quistes, los estadios asintomáticos y crónicos de la enfermedad y la falta de discriminación de los ensambles o genotipos que presentan ELISA y la Inmunofluorescencia (Elsafi et al., 2013; Nazeer et al., 2013; El-Nahas et al., 2013).

Muchos estudios han implementado el uso de las técnicas moleculares para el diagnóstico, en conjunto con las técnicas convencionales, en búsqueda de la caracterización genotípica del parásito y las comparan en términos de sensibilidad y especificidad, dando como conclusión general la necesidad de emplear las técnicas moleculares junto al diagnóstico serológico, especialmente en los casos crónicos y asintomáticos de la enfermedad, cuya excreción de quistes se torna intermitente (Verweij et al., 2003; Read et al., 2004; Lee et al., 2006; Eligio-García et al., 2008; Kohli et al., 2008; Traub et al., 2009; Calderaro et al., 2010; El-Badry et al., 2010; Al-Mohammed 2011; El-Nahas et al., 2013; Elsafi et al., 2013; Nazeer et al., 2013).

A pesar de los avances en las pruebas diagnósticas y el mejoramiento en la sensibilidad y especificidad de las mismas, quedan algunas preguntas por resolver, que generarán nuevos horizontes para investigación. Una de esas preguntas se origina a partir del hallazgo en la variabilidad genética del parásito, del que se han descrito ocho genotipos cuyas relaciones genéticas son más complejas de lo esperado, lo que mantiene la pregunta si estos genotipos pertenecen a la misma especie o son distintas, por lo que se hace necesario el desarrollo de técnicas que faciliten la discriminación genética. De otra parte, no está claro aún el papel de los animales domésticos en la transmisión zoonótica de *G. intestinalis*, la fuente primaria de contaminación, la

distribución de los genotipos en nuestra área geográfica, los genes de susceptibilidad o resistencia a los fármacos, la correlación con la presentación clínica. Todos estos aspectos son importantes para la ecoepidemiología de la enfermedad y su conocimiento permitirá desarrollar acciones pertinentes para reducir su prevalencia y consecuencias (Plutzer et al., 2010).

Potencialidad del diagnóstico molecular en Giardiasis

Con el objeto de resolver los interrogantes pendientes en el panorama de la giardiasis, han surgido diversas herramientas de análisis que permiten comprender la dinámica y ecología de la enfermedad, teniendo en cuenta la genética y los aspectos que influyen en el establecimiento de un microorganismo dentro de un ecosistema, además de su relación con los hospederos. En el caso específico de este escrito, se han realizado análisis multilocus con el fin de aclarar la relación genética entre los genotipos y sub-genotipos debido a la complejidad genética que ha presentado el parásito (Lebbad et al., 2011; Wielinga et al., 2011). Por otra parte, el desarrollo de las herramientas moleculares ha permitido profundizar en el conocimiento de la distribución de los genotipos en diferentes áreas geográficas e iniciar la asociación entre los genotipos y el cuadro clínico con el fin de establecer marcadores de infectividad y virulencia que faciliten posteriormente el manejo y tratamiento (Kohli et al., 2008; Al-Mohammed 2011; Lebbad et al., 2011).

La implementación de técnicas y métodos para inferir relaciones filogenéticas en un contexto geográfico (*Filogeografía*), facilitará la comprensión de los procesos de evolución genética y los factores determinantes para ellos (interacción con el hospedero, factores ambientales y geográficos, entre otros). Adicionalmente, todas las herramientas moleculares que logren avances y perfeccionamiento llevarán a respuestas importantes para el desarrollo de programas de promoción y prevención: El ciclo de transmisión del parásito y el papel de otros hospederos en la infección humana y la propagación del protozoo; la relación de los genotipos con la presentación clínica y la respuesta a la terapia anti-parasitaria. Dentro de las visiones futuras de estas técnicas, se encuentra el desarrollo de métodos para el diagnóstico rápido, costo-efectivo y que pueda implementarse en condiciones de difícil acceso para otras metodologías pero con la sensibilidad y especificidad de las técnicas disponibles, actualmente. Entre estas técnicas se encuentra la amplificación de

ADN a través del método LAMP y las PCR Multiplex (LyMBERY y Thompson, 2012).

CONCLUSIONES

La giardiasis se ha convertido en un importante problema de salud y gana terreno debido a las condiciones socioeconómicas de las comunidades donde se desarrolla. Son muchas las preguntas alrededor de esta parasitosis, referentes a la epidemiología, presentación y evolución clínica, al ciclo de transmisión del parásito y las relaciones genéticas entre sus ensamblajes o genotipos y con los hospederos, por lo que al lograr la respuesta de estos cuestionamientos se podrá avanzar no sólo en el conocimiento, sino también en el desarrollo de estrategias para la promoción y prevención de este cuadro clínico. Parte de estas respuestas pueden lograrse gracias al avance de las técnicas y métodos moleculares y la combinación con los conceptos epidemiológicos y ecológicos que finalmente nos permitirán comprender cada aspecto del ciclo de vida, transmisión y patogénesis de *G. intestinalis*.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Mohammed, H. I. 2011. Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. *Parasitology Research* 108 (6): 1375-81.
- Botero, D. y M. Restrepo. 2012. 5a Edición. *Parasitosis Humana*. Editorial CIB. pp: 79-88.
- Calderaro, A., C. Gorrini, S. Montecchini, S. Peruzzi, G. Piccolo, S. Rossi, F. Gargiulo, N. Manca, G. Dettori y C. Chezzi. 2010. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the laboratory diagnosis of giardiasis. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease* 66 (3): 261-267.
- Chakarova, B. 2010. Comparative evaluation of the diagnostic methods for detection of *Giardia intestinalis* in human fecal samples. *Trakia Journal of Sciences* 8: 174-179.
- Cotton, J. A., J.K. Beatty, y A.G. Buret. 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *International Journal for Parasitology* 41 (9): 925-933.
- El-Badry, A. A., K.H. Al-Ali y A-R. S. Mahrous. 2010. Molecular identification & prevalence of *Giardia lamblia* & *Cryptosporidium* in duodenal aspirate in Al- Madinah. *Journal of Medicine and Biomedical Sciences* 1 (2): 47-52.
- El-Nahas, H.A., D.A. Salem, A.A. El-Henawy, H.I. El-Nimr, H.A. Abdel-Ghaffar, y A.M. El-Meadawy. 2013. *Giardia*

- diagnostic methods in human fecal samples: a comparative study. *Cytometry part B (Clinical Cytometry)* 84B: 44-49.
- Elsafi, S.H., T.N. Al-Maqati, M.I. Hussein, A.A. Adam, M.M. Abu Hassan y E.M. Al Zahrani. 2013. Comparison of microscopy, rapid immunoassay and molecular techniques for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology Research*. DOI 10.1007/s00436-013-3319-1.
- Eligio-Garcia, L., A. Cortés-Campos, S. Cota-Guajardo, S. Gaxiola y E. Jimenez-Cardoso. 2008. Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using beta-giardin restriction gene. *Veterinary Parasitology Journal* 156 (3-4): 205-209.
- Fernandes, L.N., P.P. de Souza, R.S. de Araujo, M.T. Razzolini, R.M. Soares, M.I. Sato, E.M. Hachich, S.A. Cutolo, G.R. Matte, y M.H. Matte. 2011. Detection of assemblages A and B of *Giardia duodenalis* in water and sewage from Sao Paulo state, Brazil. *Journal of Water and Health* 9 (2): 361-7.
- Geurden, T., D. Berkvens, S. Casaert, J. Vercruyssen y E. Claerebout. 2008. A Bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology Journal* 157 (1-2): 14-20.
- Ivanov, A.I. 2010. *Giardia* and giardiasis. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 13: 65-80.
- Kohli, A., O.Y. Bushen, R.C. Pinkerton, E. Houpt, R.D. Newman, C.L. Sears, A.A. Lima y R.L. Guerrant. 2008. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102 (7): 718-725.
- Lebbad, M., I. Petersson, L. Karlsson, S. Botero-Kleiven, J.O. Andersson, B. Svenungsson y S.G. Svard. 2011. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS Neglected Tropical Disease* 5 (8): e1262. doi:10.1371/journal.pntd.0001262.
- Lee, J. H., J. Lee, S.J. Park, T.S. Yong y U.W. Hwang. 2006. Detection and genotyping of *Giardia intestinalis* isolates using intergenic spacers(IGS)-based PCR. *Korean Journal of Parasitology* 44 (4): 343-353.
- Lymbery, A.J. y R.C. Thompson. 2012. The molecular epidemiology of parasite infections: tools and applications. *Molecular and Biochemical Parasitology Journal* 181 (2): 102-116.
- Mohammed Mahdy, A.K., J. Surin, K.L. Wan, A. Mohd-Adnan, M.S. Al-Mekhlafi y Y.A. Lim. 2009. *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. *Acta Tropica Journal* 112 (1): 67-70.
- Molina, N., B. Pezzani, M. Ciarmela, A. Orden, D. Rosa, M. Apezteguia, J. Basualdo y M. Minvielle. 2011. Intestinal parasites and genotypes of *Giardia intestinalis* in school children from Berisso, Argentina. *The Journal of Infection in Developing Countries* 5 (7): 527-534.
- Monis, P., R. H. Andrews, G. Mayrhofer, y P. L. Ey. 2003. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infection, genetics and evolution* 3: 29-38.
- Nazeer, J.T., K.E.S. Khalifa, H. von Thien, M.M. El-Sibaei, M.Y. Abdel-Hamid, R.A.S. Tawfik y E. Tannich. 2013. Use of multiplex real-time PCR for detection of common diarrhea causing protozoan parasites in Egypt. *Parasitology Research*. 112: 595-601.
- Plutzer, J., J. Ongerth y P. Karanis. 2010. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213 (5): 321-333.
- Read, C.M., P. Monis y R.C. Thompson. 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, genetics and evolution* 4: 125-130.
- Rishniw, M., J. Liotta, M. Belloso, D. Bowman y K.W. Simpson. 2010. Comparison of 4 *Giardia* diagnostic tests in diagnosis of naturally acquired canine chronic subclinical giardiasis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24 (2): 293-297.
- Roxstrom-Lindquist, K., D. Palm, D. Reiner, E. Ringqvist y S.G. Svard. 2006. *Giardia* immunity--an update. *Trends in Parasitology* 22 (1): 26-31.
- Traub, R. J., T. Inpankaew, S.A. Reid, C. Sutthikornchai, Y. Sukthana, I.D. Robertson y R.C. Thompson. 2009. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in Temple communities in Bangkok--a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Tropica Journal* 111 (2): 125-132.
- Troeger, H., H.J. Epple, T. Schneider, U. Wahnschaffe, R. Ullrich, G.D. Burchard, T. Jelinek, M. Zeitz, M. Fromm y J.D. Schulzke. 2007. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut* 56 (3): 328-335.



Verweij, J. J., J. Schinkel, D. Laeijendecker, M.A. van Rooyen, L. van Lieshout y A.M. Polderman. 2003. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Molecular and Cell Probes* 17 (5): 223-225.

Wielinga, C., U. Ryan, R.C. Thompson y P. Monis. 2011. Multi-locus analysis of *Giardia duodenalis* intra-Assemblage B substitution patterns in cloned culture isolates suggests sub-

Assemblage B analyses will require multi-locus genotyping with conserved and variable genes. *International Journal for parasitology* 41: 495-503.

Fecha de Recepción: 07/09/2012
Fecha de Aceptación: 14/12/2012

