

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS



**“Genotipificación de *Giardia intestinalis* en aislados de niños y caninos en Linaca, aldea del Municipio de Tatumbla, Departamento de Francisco Morazán, Honduras, durante el año 2016.”**

TESIS SUSTENTADA POR:

**ESTEFANÍA CUÉLLAR MACÍAS**

PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN ENFERMEDADES  
INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

TEGUCIGALPA M.D.C. 27 DE SEPTIEMBRE DEL 2017

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

RECTORA

JULIETA CASTELLANOS, M.Sc.

VICERRECTORA ACADÉMICA

BELINDA FLORES, M.Sc.

DIRECTORA DEL SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

LETICIA SALOMÓN, M.Sc.

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

NABIL KAWAS, M.Sc.

COORDINADORA DEL POSTGRADO EN ENFERMEDADES

INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

MARITZA CANALES GIRÓN, M.S.P.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

ASESOR DE TESIS

GUSTAVO ADOLFO FONTECHA, Ph.D.

TERNA EXAMINADORA:

ANABELLE FERRERA, Ph.D.

MARÍA MERCEDES RUEDA M.Sc.

GUSTAVO ADOLFO FONTECHA, Ph.D.

## **DEDICATORIA**

A Dios por su amor incondicional y fidelidad, por siempre guiar mis pasos.

A mis padres Gustavo Cuéllar (Q.D.D.G) y Ada Litza Macías, por su amor, dedicación y apoyo en cada etapa de mi vida.

A mi tutor de tesis Dr. Gustavo Fontecha por haberme aceptado como su estudiante, gracias por todas sus enseñanzas, paciencia, dedicación, oportunidades y confianza expresada.

A Dra. Maritza Canales, por haberme permitido continuar en un proceso de aprendizaje profesional, sin su ayuda no hubiera sido posible culminar esta meta.

## **RECONOCIMIENTOS**

Se agradece el apoyo Financiero de la Dirección de Investigación Científica y post-grado UNAH y al Instituto de Investigaciones en Microbiología –UNAH.

A los directores y maestros de los centros educativos: Kínder “Caridad de Ardón” y Escuela “José Trinidad Reyes” de la aldea de Linaca, Francisco Morazán.

A mis amigos y a los futuros colegas de la Escuela de Microbiología que ayudaron en el viaje de campo para la recolección de las muestras: Dr. Lisandro Mendoza, Dra. Mahli Galeano, Dr. Bryan Ortiz, Dr. Juan José Díaz, Daniela Chávez, Lesly López, Stefanny Sinclair, Héctor Ventura.

# Contenido

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	12
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO.....	15
<b>2.1 <i>Giardia intestinalis</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Taxonomía, morfología y ciclo de vida de <i>Giardia</i> spp. ....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.1 Taxonomía de <i>Giardia</i> spp.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.2 Organización celular de <i>Giardia</i> spp.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.3 Ciclo de vida de <i>Giardia</i> spp. ....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Interacciones hospedero-parásito en la infección por <i>Giardia</i> spp. ¡Error! Marcador no definido.</b>	
<b>2.3.1 <i>Giardia intestinalis</i> en humanos .....</b>	<b>28</b>
<b>2.4 Rutas de transmisión y población en riesgo .....</b>	<b>30</b>
<b>2.5 Transmisión zoonótica de <i>Giardia intestinalis</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>2.6 Taxonomía molecular de <i>Giardia intestinalis</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>2.6.1 <i>Giardia intestinalis</i>: Métodos de genotipificación.....</b>	<b>33</b>
<b>2.7. Taxonomía molecular de <i>Giardia intestinalis</i>.....</b>	<b>35</b>
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA.....	41
<b>3.1 OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1.1 OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2. ENFOQUE .....</b>	<b>41</b>
<b>3.3 TIPO DE DISEÑO.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4. PROFUNDIDAD DEL ESTUDIO.....</b>	<b>42</b>
<b>3.5 TEMPORALIDAD .....</b>	<b>42</b>
<b>3.6 POBLACIÓN Y MUESTRAS .....</b>	<b>42</b>
<b>3.7 AREA DE ESTUDIO .....</b>	<b>42</b>

<b>3.8 DESCRIPCIÓN DE INSTRUMENTOS Y TÉCNICAS</b> .....	43
<b>3.8.1. RECLUTAMIENTO DE PACIENTES</b> .....	43
<b>3.8.2. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO MEDIANTE OBSERVACIÓN MI- CROSCÓPICA</b> .....	44
<b>3.8.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR</b> .....	45
<b>3.9. PLAN DE ANÁLISIS</b> .....	50
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS</b> .....	51
<b>4.1 RESULTADOS GENERALES</b> .....	51
<b>4.1.1 Resultados en muestras de niños</b> .....	51
<b>4.1.2 Resultados en muestras de caninos</b> .....	52
<b>4.1.3 Resultados de amplificación con los marcadores moleculares</b> .....	52
<b>4.2 Genotipificación de <i>Giardia intestinalis</i> mediante el gen de la enzima glutamato des- hidrogenasa (<i>gdh</i>).</b> .....	52
<b>4.2.1 Amplificación de un fragmento del gen glutamato deshidrogenasa (<i>gdh</i>) para determinar simultáneamente 3 genotipos mediante PCR uniplex descrito por [Eligio et al., 2008].</b> .....	52
<b>4.2.2 Amplificación de un fragmento del gen <i>gdh</i> de <i>Giardia intestinalis</i> mediante PCR-RFLP.</b> .....	54
<b>4.3 Amplificación de un fragmento del gen <i>bg</i> de <i>Giardia intestinalis</i> mediante PCR anidada – RFLP</b> .....	56
<b>4.4 Amplificación de un fragmento del gen <i>tpi</i> de <i>Giardia intestinalis</i> para la determinación de genotipos A y B.</b> .....	58
<b>4.5 Amplificación de un fragmento del gen <i>SSUr RNA</i> de <i>Giardia intestinalis</i> mediante PCR y secuenciación.</b> .....	59
<b>4.5.1 Secuenciación del gen <i>SSUr RNA</i> para determinar genotipo</b> .....	61
<b>CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN</b> .....	64
<b>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES</b> .....	70
<b>CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES LIMITA- CIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	71
<b>CAPÍTULO 8: REFERENCIAS</b> .....	72
<b>ANEXOS</b> .....	84

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Características morfológicas del trofozoíto y quiste de <i>Giardia</i> spp.....	13
<b>Figura 2.2.</b> Ciclo de vida de <i>Giardia</i> spp.....	15
<b>Figura 3.1.</b> Algoritmo de trabajo.....	32
<b>Figura 4.1</b> Separación electroforética del gen <i>gdh</i> por PCR uniplex para los subgenotipos AI y AII .....	40
<b>Figura 4.2</b> Separación electroforética del gen <i>gdh</i> por PCR uniplex para el genotipo B. ...	40
<b>Figura 4.3</b> Separación electroforética del gen <i>gdh</i> . .....	42
<b>Figura 4.3.1</b> Digestión del gen <i>gdh</i> con la enzima NlaIV. ....	42
<b>Figura 4.3.2</b> Digestión del gen <i>gdh</i> con la enzima RSAI.....	43
<b>Figura 4.4</b> Separación electroforética del gen <i>bg</i> .....	44
<b>Figura 4.4.1</b> Digestión del gen <i>bg</i> con la enzima <i>HaeIII</i> .....	44
<b>Figura 4.5</b> Separación electroforética del gen <i>tpi</i> para el genotipo A .....	45
<b>Figura 4.5</b> Separación electroforética del gen <i>tpi</i> para el genotipo B .....	46
<b>Figura 4.7</b> Separación electroforética del gen <i>SSUr RNA</i> .....	47
<b>Figura 4.8.</b> Alineamiento de seis secuencias de la región pequeña ribosomal de <i>Giardia intestinalis</i> . .....	48
<b>Figura 4.9.</b> Alineamiento de la secuencia de la subunidad 18S ribosomal (292 pb) de la muestra GN07 .....	49

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Diferencias morfológicas dentro las seis especies de <i>Giardia</i> spp.....	9
<b>Tabla 2.2.</b> Rutas de trasmisión de <i>Giardia intestinalis</i> en humanos.....	20
<b>Tabla 2.3</b> Marcadores moleculares comúnmente utilizados para la genotipificación de <i>Giardia intestinalis</i> .....	22
<b>Tabla 2.4</b> Denominaciones de los genotipos de <i>Giardia intestinalis</i> identificados en seres humanos.....	24
<b>Tabla 2.5</b> Genotipos (subtipos) y hospederos de <i>Giardia intestinalis</i> .....	25
<b>Tabla 2.6.</b> Subtipos y hospederos de <i>Giardia intestinalis</i> .....	26
<b>Tabla 2.7</b> Investigaciones a nivel mundial en la genotipificación de <i>Giardia intestinalis</i> en humanos .....	27
<b>Tabla 2.8</b> Investigaciones a nivel mundial en la genotipificación de <i>Giardia intestinalis</i> en animales domésticos .....	28
<b>Tabla 4.1</b> Análisis de resultados entre los marcadores moleculares de las muestras de niños y muestras de perro .....	50

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>bg</b>	beta giardina
<b>gdh</b>	glutamato deshidrogenasa
<b>tpi</b>	triosa fosfato isomerasa
<b>SSU-rRNA</b>	subunidad pequeña (18S) ribosomal
<b>RFLP</b>	Técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

# RESUMEN

## **Antecedentes**

*Giardia intestinalis* es el parásito protozoario más frecuente en humanos, y el parásito entérico más frecuente en animales domésticos. Afecta principalmente a niños y produce cuadros clínicos de variada intensidad desde la infección asintomática hasta cuadros graves de diarrea crónica con síndrome de malabsorción y retraso en el crecimiento [Hunter and Thompson, 2005; Robertson et al., 2014]. La taxonomía reciente del parásito basada en marcadores moleculares presenta ocho genotipos (A-H) morfológicamente indistinguibles al microscopio óptico, pero con diferencia genotípica [Faria et al., 2017]. Si bien, estos genotipos presentan diferente especificidad de hospedero, a la fecha, los genotipos A y B, son los responsables de la gran mayoría de las infecciones de origen humano, y también han sido detectados en una amplia variedad de mamíferos, razón por la cual se les denomina genotipos con potencial zoonótico [Feng and Xiao, 2011]. En el país no se habían descrito los genotipos del parásito, siendo esta la primera investigación en reportarlos.

**Objetivo.** Identificar los genotipos de *Giardia intestinalis* causando infección en niños y en caninos en una comunidad rural de Honduras, mediante los genes glutamato deshidrogenasa (gdh), triosa fosfato isomerasa (tpi), el gen de la beta giardina (bg), la subunidad pequeña ribosomal (SSU-rRNA) y la secuenciación de este último gen.

**Materiales y métodos.** Estudio transversal descriptivo. Se capturaron 242 muestras de heces de niños y 26 muestras de caninos provenientes del área de estudio. Las muestras se analizaron mediante examen en fresco (lugol - solución salina) en búsqueda de quistes de *Giardia intestinalis*. Las muestras que contenían quistes del parásito pasaron por un proceso de

concentración y ruptura. Al lisado de los quistes se les realizó extracción de ADN con un equipo automatizado y posteriormente se analizaron mediante técnicas de biología molecular.

**Resultados.** De las muestras de niños analizadas, 18/242 (7.4%) resultaron positivas por microscopía con quistes de *Giardia intestinalis*. En el análisis molecular se identificó en las muestras de niños 15/18 (83.33%) con infección mixta de los genotipos A y B, 2/18 (11.11%) del genotipo A y 1/18 (5.55%) del genotipo B. No se logró identificar quistes del parásito por microscopía en las 26 muestras de caninos, y a pesar de ello se sometieron a análisis molecular, resultando la amplificación de 4/26 (15.38%). Setenta y cinco por ciento de las muestras de caninos mostraron infección mixta con los genotipos A y B, mientras que el genotipo A se observó en el 25%.

**Conclusión.** Se describe por primera vez los genotipos A y B de *Giardia intestinalis* causantes de infección en niños y caninos de la aldea de Linaca, municipio de Tatumbla; siendo estos los primeros datos de epidemiología molecular de los genotipos presentes en el país provenientes del área de estudio.

**Palabras claves:** genotipificación, *Giardia intestinalis*, infección zoonótica

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Las infecciones parasitarias son una de las principales causas de enfermedad en países subdesarrollados, donde cerca de 2 mil millones de personas están infectadas con algún enteroparásito, esto produce a su vez diferentes patologías en el hospedero. Las altas tasas de prevalencia de los parásitos intestinales son atribuidas en gran medida a la mala situación socioeconómica, pobre saneamiento, atención médica inadecuada, falta de sistemas de salud y a un abastecimiento inadecuado de agua [Huruy et al., 2011].

Algunos parásitos intestinales causan cuadros diarreicos agudos y crónicos [Eppig et al. 2010; Hunter and Thompson, 2005]. Las enfermedades diarreicas ocupan el primer lugar entre las enfermedades que se presentan a nivel global y son una de las dos principales causas de muerte de niños menores de cinco años, con un 16 a 17% de todas las muertes en el mundo [OMS, 2004]. Entre los parásitos patógenos los protozoarios *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y el coccidio *Cryptosporidium* spp. son considerados como los más importantes en infecciones gastrointestinales [OMS, 2009; Eppig et al., 2010; Okhuysen, 2012].

De los tres protozoos anteriormente mencionados *Giardia intestinalis* es el parásito protozoario más frecuente en el humano a nivel mundial, así como también es el parásito entérico más frecuente en animales domésticos [Feng and Xiao, 2011].

La prevalencia de giardosis humana en países industrializados puede ir de un 2% hasta un 5%, y exceder el 30% en países en vía de desarrollo. En Honduras la prevalencia oscila entre 1 a 61%, esta prevalencia depende de factores como: falta de higiene, el hacinamiento y la mala calidad del agua de cada zona. En un estudio realizado por Kaminsky en 1991 reporta una prevalencia de 61% en dos áreas rurales: Tatumbla y Linaca, pertenecientes al Departamento Francisco Morazán, y en un barrio marginal de Tegucigalpa [Kaminsky,1991].

Los niños son los más frecuentemente infectados por *Giardia intestinalis* en los países en vías de desarrollo, junto con los grupos que habitan en comunidades aisladas en zonas rurales. Estos niños están en máximo riesgo de sufrir las consecuencias crónicas de la infección por *Giardia intestinalis*, como síndrome de malabsorción, retraso psicomotor y retraso en el crecimiento [Hunter and Thompson, 2005; Robertson et al., 2014]. Existen varios factores por los cuales la giardosis es un problema de salud pública: La elevada variabilidad genética del parásito, su amplia cantidad de hospederos y reservorios, la resistencia natural de los quistes a sobrevivir por largos tiempos en el medio ambiente, y su baja dosis infecciosa.

La evolución de la taxonomía del género *Giardia* spp. ha pasado por dos etapas: una marcada por la descripción morfológica del parásito basada en las características estructurales de sus cuerpos medianos. Tradicionalmente esta distinción separaba los aislados de *Giardia* spp. encontrados en humanos y mamíferos (denominada *Giardia intestinalis*), de los aislados en ratones (*Giardia muris*), y en anfibios (*Giardia agilis*). La segunda etapa se basa en secuencias genéticas de *Giardia* spp. a través de diversas técnicas de biología molecular [Feng and Xiao, 2011; Ryan and Caccio, 2013].

Como se mencionó anteriormente la taxonomía del parásito basada en marcadores moleculares presenta ocho genotipos (A-H) morfológicamente indistinguibles al microscopio óptico, pero con diferencia genotípica. Los estudios recientes de genotipificación de este parásito han colocado todos los aislamientos de los seres humanos en dos genotipos (A y B), y estos a su vez incluyen al menos cuatro subtipos genéticos: AI-IV y BI-IV. También a través de análisis filogenéticos en animales han sido identificados los genotipos C y D, que se han encontrado principalmente en perros y otros cánidos (zorros y coyotes). El genotipo E se ha encontrado en otros mamíferos (bovinos, búfalos, ovejas, cabras y cerdos). Los genotipos F y G se han encontrado principalmente en gatos y roedores, respectivamente y el genotipo H en animales marinos [Feng and Xiao, 2011; Ryan and Caccio, 2013].

Con este estudio se ofrece la posibilidad de describir por primera vez los genotipos de *Giardia intestinalis* obtenidos de muestras de heces de niños y caninos-mascotas en la aldea de Linaca, municipio de Tatumbula del Departamento de Francisco Morazán, contribuyendo a esclarecer la epidemiología molecular del protozoo y el reporte de estos genotipos en el país provenientes del área de estudio.

# CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

## 2.1 *Giardia intestinalis*

En siglo XVII, Anton Van Leeuwenhoek; comerciante holandés de telas y tallador aficionado de lentes observó por primera vez a través de los rudimentarios microscopios fabricados por él mismo, un organismo que por su descripción, correspondía a *Giardia intestinalis* [Vázquez and Campos, 2009]. Este “animáculo”, como él lo denominó, lo encontró al examinar sus propias evacuaciones diarreicas. El descubrimiento del protozoo fue descrito en una de sus comunicaciones a la Royal Society of London, el 4 de noviembre de 1681.

El descubrimiento de Leeuwenhoek fue muy importante; sin embargo, fue olvidado y no se le tomó en cuenta. Es hasta el año de 1859 cuando el profesor Vilem Dusan Fedorovic Lambl, médico muy preparado, realiza la primera descripción loable del parásito en la ciudad de Praga, al observarlo por casualidad en evacuaciones diarreicas de un niño con enteritis, cuando investigaba la presencia de proglótidos de *Taenia* spp. en bilis y le denominó *Cercomonas intestinalis*, describiéndolo en dibujos magistrales que no dejan lugar a duda de que se trataba de *Giardia intestinalis*. En 1879, Gras describió un organismo de forma oval con cuatro flagelos que emergen de la parte anterior, en el extremo posterior presenta una prolongación tan larga como el cuerpo, y en la región anterior reconoció estructuras similares a núcleos. Este investigador realizó sus observaciones en muestras procedentes de humanos y de ratas domésticas y campestres, por lo que consideró que los organismos observados eran los mismos en el hombre y los roedores. Sugirió que el humano se infectaba al consumir alimen-

tos almacenados en los graneros, contaminados por las heces de las ratas, y llamó a los organismos observados *Dimorphus muris*. Posteriormente, en 1881, les cambió el nombre y los denominó *Megastoma entericum*. Kunstler, en 1882, encontró estructuras móviles en las heces de anfibios a las que denominó *Giardia*. Blanchard, en 1888, llamó a estos organismos *Lambliia intestinalis* y Stiles, en 1902, *Lambliia duodenalis* [Ankarklev et al., 2012]. En 1912, Rodenwalt realizó las descripciones, probablemente las más detalladas que existen del parásito basadas en observaciones de heces humanas. En algunas publicaciones se atribuye a Kofoid en el año 1915 el nombre de *Giardia lamblia* y, en otras, se postula que fue Stiles quién conjuga ambos términos dando origen a la denominación de *Giardia lamblia* en honor al profesor A. Giard de París y al doctor F. Lambl de Praga [Vázquez and Campos, 2009].

La controversia persistió hasta 1952 cuando Filice propuso los nombres de *Giardia intestinalis* y *Giardia duodenalis*. Actualmente lo más aceptado por la Organización Mundial de la Salud es *Giardia intestinalis* [Ankarklev et al., 2012], y para fines de este trabajo así se referirá al protozoo.

En 1978, con base en las manifestaciones clínicas y lesiones histológicas de la porción superior del intestino delgado, observados en pacientes de los cuales el parásito fue aislado Kulda y Nohynkonova demostraron definitivamente que este microorganismo podía causar enfermedad en el humano. En 1981, La Organización Mundial de la Salud (OMS) añadió a *Giardia intestinalis* a su lista de parásitos patógenos [Galindo and Almannoni, 2009]. En el 2004, La Organización Mundial de la Salud (OMS) declara la giardiasis como una enfermedad desatendida, la que se define como una causal que impide el desarrollo y retrasa cambios socioeconómicos importantes en países en desarrollo [Vidal, 2005].

## **2.2 Taxonomía, morfología y ciclo de vida de *Giardia* spp.**

### **2.2.1 Taxonomía de *Giardia* spp.**

La giardiosis es una infección causada por un protozoo del género *Giardia* spp., del Phylum Metamonada. Los protozoos pertenecientes a este grupo poseen uno o varios flagelos y presentan reproducción asexual por fisión binaria longitudinal; son parte de la Clase Eopharyngia del Orden Diplomonadida, quiere decir que son amitocnoriales y poseen dos núcleos [Ryan and Caccio, 2013].

La nomenclatura y taxonomía del género *Giardia* spp. ha sufrido varios cambios a lo largo de la primera mitad del siglo XX. Seis especies son actualmente reconocidas, basados en evidencias morfológicas: *Giardia agilis* se encuentra en anfibios, *Giardia muris* en ratones y otros roedores, *Giardia ardeae* y *Giardia psittaci* en aves, *Giardia microti* en ratones de campo y *Giardia intestinalis* en una amplia gama de hospederos mamíferos, incluyendo humanos, caninos, cerdos, gatos, ganado y fauna silvestre [Thompson and Monis, 2004]. (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Diferencias morfológicas dentro las seis especies de *Giardia* spp. [Thompson and Monis, 2004].

<b>Especie</b>	<b>Diferencia morfológica</b>
<i>Giardia agilis</i>	Trofozoíto alargado y delgado con cuerpos medianos en forma de lágrima.
<i>Giardia ardeae</i>	Trofozoíto solo posee un flagelo caudal
<i>Giardia intestinalis</i>	Trofozoíto piriforme con cuerpos medianas en forma de garra.
<i>Giardia microti</i>	Trofozoíto tiene cuerpo mediano en forma de uña de martillo.
<i>Giardia muris</i>	Trofozoíto corto y redondeado con cuerpos medianos redondeados.
<i>Giardia psittaci</i>	Trofozoíto carece de flanco ventrolateral

### 2.2.2 Organización celular de *Giardia* spp.

Este organismo tiene dos fases en su ciclo de vida. La fase de trofozoíto que es móvil y se reproduce en el tracto intestinal de su hospedero, mientras que la fase de quiste es la fase de resistencia al medio ambiente y por ende la responsable de la transmisión (Figura 2.1).

Los trofozoítos poseen dos núcleos idénticos, un disco adhesivo ventral usado para unirse a las células epiteliales intestinales y dos cuerpos medios cuya función aún es desconocida,

carecen por completo de mitocondrias, peroxisomas y el aparato de Golgi. Debido a estas características peculiares, *Giardia* spp. se ha considerado durante mucho tiempo un organismo primitivo que divergió de los eucariotas ancestrales antes de su adquisición de las mitocondrias [Galindo and Almannoni, 2009].

Los trofozoítos son por lo general de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de largo y 5 a 15  $\mu\text{m}$  de ancho, con dos núcleos idénticos [Galindo and Almannoni, 2009]. Los núcleos se sitúan en la mitad anterior del parásito y en posición simétrica respecto al eje longitudinal. Los núcleos son ovoides y muestran un cariosoma central, formado por una masa densa de cromatina. La membrana nuclear, muy delgada y de composición muy poca conocida, no está cubierta de cromatina. En los núcleos no se han identificado nucléolos [Galindo and Almannoni, 2009].

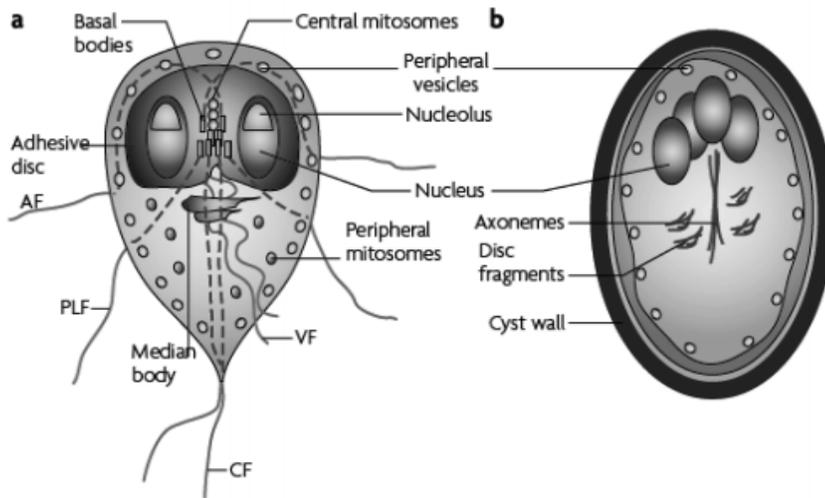
Las estructuras del citoesqueleto incluyen ocho flagelos orientados en sentido posterior dispuestos en cuatro pares (anterior, ventral, posterior-lateral y caudal), un par de cuerpos en forma de garra-mediana (estructuras microtubulares de función desconocida) y un disco adhesivo bilobulado rígido situado en la parte anterior del lado ventral [Galindo and Almannoni, 2009].

El disco adhesivo es una estructura cóncava y bilobulada de 0.4  $\mu\text{m}$  de grosor máximo, que ocupa las tres cuartas partes anteriores de la superficie ventral del trofozoíto. Esta estructura rígida reforzada por microtúbulos (que se extienden adyacentes a la membrana plasmática) y cintas fibrosas dorsales (que cursan desde los microtúbulos al citoplasma) y rodeada de un anillo de citoplasma contráctil. El disco adhesivo, junto al par de los flagelos ventrales, que se encuentran en el surco que separa sus dos lóbulos, es responsable de la capacidad de adherirse a células del hospedero. Cuatro pares de flagelos emergen de cada trofozoíto:

ventrales, anteriores, posteriores y caudales. Los flagelos, que son estructuras móviles responsables de la locomoción del parásito, se originan en ocho kinetosomas situadas simétricamente, próximos a la línea media y al borde anterior de los núcleos. Los axonemas de todos los flagelos cursan distancias variables dentro del citoplasma antes de salir del cuerpo del protozoo, y los correspondientes al par de flagelos anteriores tienen la particularidad de emerger lateralmente al área del disco adhesivo en el lado opuesto a su respectivo kinetosoma [Lujan and Svard,2011; Adam, 2001].

Los cuerpos medianos son un par de estructuras alargadas, de coloración oscura, ligeramente curvas, dispuestos de maneras oblicuas o transversales y muy próximas entre sí. Están situadas inmediatamente detrás del disco adhesivo y encima de los axonemas de los flagelos caudales. Estos elementos únicos del género *Giardia*, y cuyas funciones aún no se conocen, han sido clasificados de diferentes maneras por varios grupos de autores: cuerpos parabasales, kinetoplastos y cuerpos cromatoidales [Galindo and Almannoni, 2009; Adam, 2001].

El quiste del parásito es ovoide con doble membrana, de 8-12 micras de largo y 7-10 micras de ancho. Cuando madura y se excreta en las heces, el quiste contiene cuatro núcleos tetraploides y los componentes desmontados del disco adhesivo y flagelos [Adam, 2001; Lujan and Svard, 2011]. ( Figura 2.1)



**Figura 2.1.** Características morfológicas (a) del trofozoíto (b) y del quiste de *Giardia* spp. AF=Flagelo anterior ; VF=Flagelo ventral ; PLF: Flagelo posterior y lateral; CF=Flagelo caudal [Ankarklev et al., 2010].

*Giardia* spp. es un microorganismo anaerobio y microaerotolerante; es decir el protozoo puede sobrevivir y multiplicarse en condiciones de ausencia de oxígeno o presencia de este en bajas concentraciones. Precisamente, en este rango de condiciones se encuentra el parásito cuando yace sobre la mucosa del intestino delgado [Adam, 2001].

Existen dos familias de proteínas mejor caracterizadas del citoesqueleto de *Giardia* spp.: giardinas, grupo de 23 proteínas de estructura  $\alpha$  helicoidal y de peso molecular entre 29 y 38 kDa, identificadas en las cintas dorsales del disco ventral, y las tubulinas, proteínas de estructura y de peso moleculares menos conocidos, que forman parte de los microtúbulos presentes en el disco ventral, flagelos y cuerpos medianos [Galindo and Almannoni, 2009; Adam, 2001].

El genoma de *Giardia* spp. tiene cromosomas lineales flanqueados por telómeros similares en secuencia a los encontrados en organismos eucarióticos de mayor desarrollo filogenético

(TAGGG). Los datos publicados acerca del número de cromosomas de *Giardia* spp. sugieren la presencia de cinco cromosomas en cada núcleo, todos con varias copias. También se describe la presencia de cromosomas de menor tamaño denominados “menores” o “accesorios”, los cuales son copias parciales de los cromosomas mayores. En consecuencia y con independencia de su reproducción asexual, *Giardia* spp. es un organismo poliploide. Recientemente la poliploidía del protozoo pudiera ser el medio que dispone este para, en su condición de asexual, reparar mutaciones y otros defectos de sus genes.

La suma de las tallas de los cinco cromosomas de *Giardia* spp. (3,8; 3,0; 2,3; 1,6 y 1,6 Mb) han permitido calcular que el tamaño del genoma de 12,3 Mb. Debido que *Giardia* spp. no posee mitocondrias u otros organelos citoplasmáticos que contengan ADN, se considera que este tipo de ácido nucleico solo está presente en el núcleo [Galindo and Almannoni,2009].

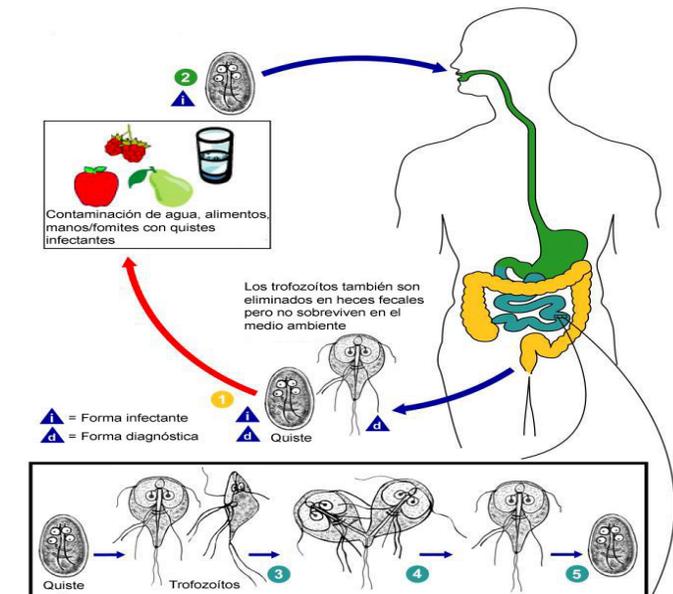
### 2.2.3 Ciclo de vida de *Giardia* spp.

*Giardia* spp. tiene un ciclo de vida simple (Figura 2.2). La infección en el hospedero es causada por la ingesta del quiste. La ingesta del quiste puede ocurrir directamente a través del contacto fecal-oral, o indirectamente a través de agua contaminada o alimentos. La dosis infecciosa es baja (10-100 quistes) [Mohammed Mahdy et al., 2008]. Una vez dada la ingesta de los quistes, el pH bajo del contenido estomacal del hospedero daña la pared de los quistes, pero no lo suficiente para que se dé la exquistación en ese segmento del tubo digestivo. Esta se produce en el duodeno, donde por acción de las enzimas pancreáticas, tripsina y quimiotripsina, terminan por debilitar la pared de los quistes para que emerjan los exquizoítos. El estadio de exquizoíto es de muy poca duración. Durante la primera división del exquizoíto tiene el reensamblaje de los discos ventrales. Dando continuidad a su ciclo biológico, los trofozoítos de *Giardia* spp. se replican de manera asexual, por fisión binaria, sobre las criptas del duodeno y porción superior del yeyuno. Con la ayuda de su aparato locomotor los flagelos de los trofozoítos realizan movimientos sobre la mucosa intestinal. A diferencia de otros protozoos que parasitan el tubo digestivo, los trofozoítos de *Giardia* spp. no invaden epitelio intestinal, sino que se adhieren a la superficie de este mediante un proceso que protagoniza el disco ventral. Parte de los trofozoítos no adheridos a la superficie intestinal son arrastrados por el mucus y en los alimentos de digestión. A medida que la forma vegetativa del parásito avanza distalmente, las condiciones se le hacen más adversas y se inicia el proceso de enquistamiento [Galindo and Almannoni, 2009].

El proceso enquistamiento parece estar inducida por un pH alcalino y por la presencia de altos niveles de bilis y niveles bajos de colesterol [Lauwaet et al., 2007]. Los quistes son inmediatamente infecciosos una vez excretados, 300 millones de quistes pueden ser excretados en las heces de una persona infectada [Roberts et al., 2009]. En el medio ambiente, los quistes de *Giardia* spp. son resistentes a condiciones ambientales adversas y pueden permanecer viables por semanas y meses [Galindo and Almannoni, 2009]. Los trofozoítos pueden ser excretados en heces diarreicas [Vázquez and Campos, 2009], pero no pueden sobrevivir mucho tiempo fuera del hospedero.

Los altos números de quistes excretados en las heces, así como la resistencia de los quistes a condiciones ambientales, conduce a altos niveles de contaminación del medio ambiente, sobre todo en aguas dulces donde los quistes de *Giardia* spp. pueden sobrevivir durante varias semanas. La recuperación de los quistes es común en aguas dulces, donde este parásito se observa con más frecuencia que *Cryptosporidium* spp. [Smith et al., 2006]. Los quistes de *Giardia* spp. se recuperan normalmente en grandes cantidades en las aguas residuales no tratadas en todo el mundo. En las plantas de tratamiento de agua los quistes del parásito pueden ser removidos a través de la floculación y sedimentación seguida de filtración [Betancourt and Rose, 2004].

Se ha demostrado que los quistes de *Giardia* spp. todavía pueden ser recuperados en aguas tratadas [Lobo et al.,2009]. Con todo lo antes mencionado, la transmisión hídrica es un factor clave en la transmisión de la infección por *Giardia* spp.



**Figura 2.2** Ciclo de Vida de *Giardia intestinalis* [CDC, 2010]

### **2.3.1 *Giardia intestinalis* en humanos**

*Giardia intestinalis* es el parásito entérico reportado más frecuentemente en los seres humanos en muchos países [Olson et al., 2000]. La giardiosis es una de las enfermedades gastrointestinales infecciosas más comunes en todo el mundo y también se ha incluido en la Iniciativa de Enfermedades Desatendidas de la Organización Mundial de la Salud desde 2004 [Savioli et al., 2006].

En Honduras la prevalencia de la giardiosis en la población infantil oscila entre 1 y 61%, esta prevalencia dependerá de factores como la falta de higiene, el hacinamiento y la mala calidad del agua de cada región.

#### **2.3.1.1 Las manifestaciones clínicas**

En su mayoría las infecciones por *Giardia intestinalis* son asintomáticas en un 80%. [Galindo and Almannoni, 2009]. Es importante considerar que las personas asintomáticas son una importante fuente de diseminación de la infección.

Dentro la giardiosis sintomática esta se puede clasificar en giardiosis aguda y giardiosis crónica. En la giardiosis sintomática el periodo de incubación es variable, puede ser tan breve como siete días o tan prolongado como cuatro semanas [Roxstrom-Lindquist et al., 2006].

La giardiosis 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 adquieren la infección y no viven en áreas endémicas, o recientemente han llegado a ellas, así como entre niños infectados menores de cinco años, con independencia de la endemidad del área en que viven. Las

manifestaciones clínicas que se pueden presentar son: diarrea, flatulencia, dolor y distensión abdominal, fatiga, vómitos y anorexia. Las diarreas son acuosas, malolientes y grasientas, suelen ser abundantes en volumen y no muy numerosas [John and Petri, 2006].

La giardiosis crónica es el resultado de la evolución desfavorable de una forma aguda. En los niños con giardiosis crónica se describe con poca frecuencia el síndrome de malabsorción intestinal, así como el retardo en el crecimiento y desarrollo psicomotor [Hunter and Thompson, 2005; Robertson et al., 2014].

A pesar de que son raras, también se han registrado manifestaciones extra-intestinales cutáneas, oculares, bucales y articulares [Cantey et al., 2011; Galindo and Almannoni, 2009].

### **2.3.1.2 Diagnóstico de laboratorio y tratamiento**

El diagnóstico de *Giardia intestinalis* en seres humanos y animales se hace tradicionalmente en el examen microscópico de las heces [Adam, 2001] y se basa en la identificación de los trofozoítos o quistes del protozoo en examen directo de heces en solución salina y lugol. Los quistes se excretan a menudo de forma esporádica, y se recomienda el examen de al menos tres muestras, ya que el examen de una única muestra de heces tiene una sensibilidad de entre 35-50% pero la realización de técnicas de concentración y el estudio de heces seriadas incrementan la sensibilidad hasta un 70% [Hill, 2001].

El Metronidazol se suele considerar el fármaco de elección [John and Petri, 2006] pero otros compuestos de la familia de los 5-nitroimidazoles, como: el tinidazol, secnidazol, ornidazol son eficaces, y también los benzimidazoles (albendazol, mebendazol), quinacrina, paromomicina o nitazoxanida [Galindo and Almannoni, 2009].

## **2.4 Rutas de transmisión y población en riesgo**

En los seres humanos *Giardia intestinalis* puede ser transmitida a través de rutas directas e indirectas (Tabla 2.2). Estas rutas no son mutuamente excluyentes, ya que la propagación de la enfermedad puede seguir caminos diferentes dentro del mismo entorno o durante un brote [Katz et al., 2006]. Como otras infecciones entéricas, factores como la falta de higiene, el hacinamiento y la mala calidad del agua son todos conocidos por favorecer la transmisión de *Giardia intestinalis*, particularmente en los países en desarrollo [Younas et al., 2008]. En los países desarrollados donde las condiciones higiénicas son favorables, la transmisión se ha relacionado con aguas no tratadas. Sin embargo, investigadores que respaldan la transmisión zoonótica de *Giardia intestinalis* argumentan que los animales también juegan un papel importante en la propagación del protozoo.

La giardiosis muestra una distribución asociada a la edad, en la mayoría de los casos ocurren en niños menores de diez años (y en particular en los menores de cuatro años) y los adultos entre 25 y 44 años de edad que están en contacto con niños [Younas et al., 2008].

Esta tendencia puede reflejar diferencias en el estado inmune o en la frecuencia de la exposición al parásito entre los diferentes grupos de edad. Infecciones por *Giardia intestinalis* son conocidas por ser un fenómeno muy común en las guarderías [Lebbad et al., 2011].

**Tabla 2.2.** Rutas de transmisión de *Giardia intestinalis* en humanos [Katz et al., 2006].

---

<b>Directa: Persona a persona</b>	Pobre higiene contaminación fecal-oral directa (países en vías de desarrollo, guarderías)
<b>Indirecta: Fuentes de agua</b>	Aguas no tratadas, aguas recreacionales
<b>Indirecta: Alimentos</b>	Productos regados con agua contaminada, contaminación fecal por personas quienes preparan alimentos.

---

## 2.5 Transmisión zoonótica de *Giardia intestinalis*

*Giardia intestinalis* es un parásito que se encuentra en una gran variedad de animales domésticos y silvestres y por lo general se considera uno de los parásitos intestinales más comunes de los animales domésticos y de granja [Ryan and Caccio, 2013; Thompson et al., 2008]. Razón por la cual, durante años se ha debatido su potencial zoonótico.

Como se ha mencionado anteriormente, se plantea una posible transmisión zoonótica debido al estrecho contacto que puede existir entre humanos y animales (mascotas), especialmente los caninos. Estos animales se han convertido en parte integral de la familia y usualmente se mantienen dentro de la casa, viviendo en contacto frecuente con los humanos, tanto así, que algunos llegan a compartir la cama con sus amos. Esta cercanía no está libre de riesgos, ya que un perro infectado por el parásito, sin importar las condiciones higiénico-sanitarias, puede actuar como fuente de infección para el humano, tomando en cuenta que *Giardia intestinalis* es uno de los protozoos entéricos más frecuente en los caninos [Ballweber et al., 2010; Zheng et al., 2014]. Estudios realizados en diferentes partes del mundo han proporcionado evidencia acerca de la posible transmisión zoonótica de caninos y otros animales domésticos [Ryan and Caccio, 2013].

En Honduras un estudio reciente reportó la presencia de *Giardia intestinalis* en caninos en un 5.9% [Kaminsky et al., 2014], sin embargo, no se tienen datos de estudios de genotipificación de *Giardia intestinalis* en caninos en el país.

## 2.6 Taxonomía molecular de *Giardia intestinalis*

### 2.6.1 *Giardia intestinalis*: Métodos de genotipificación

En los últimos años, el uso de análisis de isoenzimas, reacción en cadena de la polimerasa con análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP), y secuenciación de genes constitutivos muestran una variación genética extensa y consistente a través de múltiples genes de *Giardia intestinalis* [Ryan and Caccio, 2013]. Existe una amplia variedad de marcadores que se utilizan en la genotipificación de *Giardia intestinalis* como: Factor de elongación 1- $\alpha$ , Ferredoxina, Histona H2B,  $\alpha$  tubulina, Chaperonina 60, ITS y 5.8S rDNA. Los marcadores moleculares más utilizados por diferentes autores a nivel mundial incluyen: la subunidad pequeña (18S) ribosomal (SSU-rRNA), beta giardina (bg) [Caccio et al., 2002], triosa fosfato isomerasa (tpi) [Lebbad et al., 2011] y glutamato deshidrogenasa (gdh) [Caccio et al., 2002; Read et al., 2004] (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3** Marcadores moleculares comúnmente utilizados para la genotipificación de *Giardia intestinalis* [Lujan and Svard, 2011]

<b>Marcador molecular</b>	<b>Función</b>	<b>Localización</b>	<b>Secuencia disponible</b>
SSU-rRNA	Pequeña subunidad del ribosoma	Múltiples cromosomas	Todos los genotipos de <i>Giardia intestinalis</i> <i>Giardia muris</i> <i>Giardia microti</i> <i>Giardia ardae</i> <i>Giardia agilis</i>
beta giardina	Proteína estructural	Cromosoma 4	Todos los genotipos de <i>Giardia intestinalis</i> <i>Giardia muris</i>
triosa fosfato isomerasa	Enzima conservada	Cromosoma 5	Todos los genotipos de <i>Giardia intestinalis</i> <i>Giardia muris</i> <i>Giardia microti</i> <i>Giardia ardae</i>
glutamato deshidrogenasa	Enzima conservada	Cromosoma 4	Todos los genotipos de <i>Giardia intestinalis</i> <i>Giardia muris</i> <i>Giardia ardae</i>

## 2.7. Taxonomía molecular de *Giardia intestinalis*

La evolución de la taxonomía del género *Giardia* spp. ha transcurrido en dos etapas: una marcada por la descripción de tantas especies del parásito, como de hospederos; basadas en criterios morfológicos como las características estructurales de los cuerpos medios del protozoo para distinguir de *Giardia* spp. encontrada en humanos y mamíferos denominada *Giardia intestinalis*, la hallada en ratones *Giardia muris* y en anfibios *Giardia agilis*.

La segunda etapa marcada en un mejor conocimiento sobre las características genéticas de *Giardia intestinalis* provenientes de diferentes hospederos a través de diversas técnicas de biología molecular, ya que morfológicamente son indistinguibles tanto a nivel de trofozoíto como de quiste, pero difieren por una serie de rasgos moleculares. Y es con la ayuda de marcadores moleculares y técnicas de biología molecular que les permitió a los investigadores clasificar inicialmente las poblaciones genéticas de *Giardia intestinalis* de la siguiente manera: en América, grupo 1, 2 y 3, en Europa como: Polish y Belgian, y en Australia como ensamblajes A y B; pero fue Adam en el 2001, en un intento de unificar las denominaciones utilizadas en la literatura sobre el tema, que propuso el término genotipo en lugar de ensamblaje o equivalentes [Adam, 2001; Galindo and Almannoni, 2009] (Tabla 2.4). Durante los años siguientes otros estudios permitieron conocer genotipos adicionales que fueron clasificados del C al H [Feng and Xiao, 2011; Ryan and Caccio, 2013] (Tabla 2.5).

**Tabla 2.4** Denominaciones de los genotipos de *Giardia intestinalis* identificados en seres humanos [Galindo and Almannoni, 2009].

<b>Europa</b>	<b>Norteamérica</b>	<b>Australia</b>
<b>Grupo Polaco</b>	Grupo 1 Y 2	Ensamble A
<b>Grupo Belga</b>	Grupo 3	Ensamble B

La existencia de grupos genéticamente distintos dentro de *Giardia intestinalis* se demostró oficialmente mediante electroforesis de aloenzimas en los años 80 [Andrews et al., 1989] y estudios posteriores mostraron que los aislamientos humanos pertenecían a dos grupos, que se denominaron genotipos A y B [Mayrhofer et al., 1995]. Tras el análisis de polimorfismos de proteínas en 23 diferentes loci en *Giardia intestinalis* de aislados de humanos y animales, los ocho genotipos (A-H) fueron confirmados, así como la sub-estructuración del genotipo A y B (ambos en representación de un grupo de cuatro sub-tipos: AI-IV y BI-IV) y E (con tres sub-tipos [Monis et al., 2003] (Tabla 2.5).

**Tabla 2.5** Genotipos (subtipos) y hospederos de *Giardia intestinalis*. [Galindo and Almannoni, 2009].

Genotipo	Subtipo	Hospederos
A (zoonótico)	AI-IV	Humanos, vacunos, gatos, caninos
B (zoonótico)	BI-IV	Humanos, caninos, ratas, castores
C y D		Caninos
E	EI-EIII	Vacunos, carneros y cerdos
F		Gatos
G		Ratas domésticas
H		Animales marinos.

Los genotipos A y B tienen una amplia gama de hospederos (que abarca tanto a los humanos como una variedad de especies animales) y muestran el potencial de transmisión zoonótica. Por el contrario, los genotipos del C a H son particulares de ciertos animales [Lindarte et al., 2011].

Del genotipo A, los subtipos AI y AII se han encontrado en humanos, mientras los subtipos AI, AIII, AIV se han descrito en otros animales. Del genotipo B, los subtipos BIII y BIV se han encontrado en humanos, mientras los subtipos BI, BII, y BIII se describen en animales. Sobre estos subtipos, estudios se han centrado en el potencial zoonótico de *Giardia intestinalis* [Feng and Xiao, 2011]. La aparición de estos subtipos se ha confirmado en estudios que utilizan un enfoque de genotipificación de múltiples loci [Caccio and Sprong, 2010] (Tabla 2.6).

**Tabla 2.6.** Subtipos y hospederos de *Giardia intestinalis* [Ryan and Caccio, 2013].

Genotipo	Subtipo	Hospederos
A (zoonótico)	AI	Humanos, vacunos, gatos, caninos
	AII	Humanos
	AIII	Gatos
	AIV	Becerro, conejo de indias
B (zoonótico)	BI	Monos, caninos
	BII	Monos, caninos
	BIII	Humanos, vacunos, gatos, caninos
	BIV	Humanos

Los genotipos C y D son comúnmente encontrado en caninos [Ballweber et al., 2010; Lebad et al., 2010]. Los caninos también pueden estar infectados con el genotipo A y en general con el subtipo AI, y el genotipo B se ha reportado ocasionalmente [Ryan and Caccio, 2013].

El genotipo E es el de mayor prevalencia en el ganado, incluyendo cerdos, vacas, ovejas y cabras. Los genotipos F y G se han encontrado principalmente en gatos y roedores, respectivamente, y el genotipo H en animales marinos [Feng and Xiao, 2011; Faria et al., 2016].

En los últimos años a nivel mundial se hecho un esfuerzo por entender la diversidad genética de *Giardia intestinalis* en diferentes poblaciones de estudio, esto incluye humanos y animales a través de diferentes técnicas y marcadores moleculares, encontrando hallazgos de importancia para la epidemiología (Tablas 2.7 y 2.8).

**Tabla 2.7** Investigaciones a nivel mundial en la genotipificación de *Giardia intestinalis* en humanos [ Feng and Xiao, 2011].

Ubicación	Total de muestras	Muestras positivas	No. De muestras genotipificadas	genotipo A	genotipo B	Infecciones mixtas	Referencias
Bélgica	373	4.0	72	18	54		Feng and Xiao (2011)
Francia			25	9	16		Feng and Xiao (2011)
Alemania	202	1.5	3	3			Feng and Xiao (2011)
Italia			120	65	39	16(A+B)	Glangaspero et al. (2007)
Países bajos	829	2.0	18	9	9		Feng and Xiao (2011)
Noruega			21		21		Feng and Xiao (2011)
Noruega		1.3	63	3	60		Feng and Xiao (2011)
Polonia	232	3.7	3	2	1		Feng and Xiao (2011)
Portugal	190		7	7			Feng and Xiao (2011)
Portugal		3.0	25	25			Feng and Xiao (2011)
España	327		7	2	4	1(A+B)	Cardona et al. (2011)
España			108	43	61	4(A+B)	Feng and Xiao (2011)
Suecia			207	73	128	6(A+B)	Lebbad et al. (2011)
Reino unido			199	48	145	6(A+B)	Feng and Xiao (2011)
Reino unido			33	9	21	3(A+B)	Feng and Xiao (2011)
Norte América							
Canadá	658	0.	3	3			Budu-Amoako et al.(2012b)
Canadá			6	6			Feng and Xiao (2011)
EUA			12		2		Feng and Xiao (2011)
Oceania							
Australia			12		11	1(A+B)	Feng and Xiao (2011)
Brasil	245	5.18	30		30		Santos et al. (2012)
Brasil	388	23.8	62	62			Feng and Xiao (2011)
Brasil			37	29	8		Feng and Xiao (2011)
Cuba			20	9	11		Feng and Xiao (2011)
Guatemala	645	5.4	20	7	12	1(A+B)	Velásquez et al. (2011)
México			19	19			Feng and Xiao (2011)
México			9	9			Feng and Xiao (2011)
México			12	12			Feng and Xiao (2011)
Nicaragua			119	23	54		Feng and Xiao (2011)
Perú	1531	20.4	167	66	81	20(A+B)	Feng and Xiao (2011)
Perú	845	23.8	16	10	6		Feng and Xiao (2011)
Perú			25	6	19		Feng and Xiao (2011)
África			579	294	264	21	Feng and Xiao (2011)
Egipto	52	34.6	18	1	14	2(8+E)2(E)	Feng and Xiao (2011)
Sahara	120	34.2	32	12	18	2(A+B)	Feng and Xiao (2011)
Uganda	427	20.1	34	5	23	4(A+B)	Feng and Xiao (2011)
Uganda	62	5.0	252	86	141	25	Feng and Xiao (2011)
Asia							
Irlandia	2534	12.7	267	20	231	16(A+B)	Feng and Xiao (2011)
China			8	4	4		Feng and Xiao (2011)
China			18	12	8		Feng and Xiao (2011)
India	51	34.4	14	6	6		Feng and Xiao (2011)
India			16	5	8	3(A+B)	Feng and Xiao (2011)
India			19	6	9	4(A+B)	Feng and Xiao (2011)
Japón			3	2	1		Feng and Xiao (2011)
Laos			5		5		Feng and Xiao (2011)
Malasia	321	23.7	42	1	41		Feng and Xiao (2011)
Nepal	1096	4.1	35	7	26	2(A+B)	Feng and Xiao (2011)
Arabia Saudita	1500	6.5	40	23	15	2(A+B)	Feng and Xiao (2011)
Corea del sur			5	5			Liang et al.(2012)
Taiwán	209	3.8	8	8			Feng and Xiao (2011)
Tailandia	6967	0.9	61	5	31	25(A+B)	Feng and Xiao (2011)
Tailandia	204	20.3	35	25	1		Alyousefi et al. (2013)

**Tabla 2.8** Investigaciones a nivel mundial en la genotipificación de *Giardia intestinalis* en animales domésticos [ Feng and Xiao, 2011].

Ubicación	Hospedero	genotipo	Marcador	Referencias
EUA y Perú	Alpacas y Llamas	A	bg, gdh, 18S rRNA	Gómez-Couso et al. (2012) and Scorza et al. (2012)
Australia	Gatos	B	gdh	Read et al. (2004)
Brasil	Gatos	AI	gdh	Souza et al. (2007)
Europa (Alemania, Italia, Polonia, España, Suecia)	Gatos	AI, AII, AIII, B	[gdh, bg (RFLP)], bg, gdh, tpi	van Keulen et al. (2002), Papini et al. (2007), Caccio et al. (2008), Sprong et al. (2009), Lebbad et al. (2010), Jaros et al. (2011), Dado et al. (2012) and Sotiriadou et al. (2013)
Japón	Gatos	AI	gdh, tpi	Suzuki et al. (2011)
EUA	Gatos	AI y B	gdh, tpi	Vasilopoulos et al. (2007), Oates et al. (2012) and Scorza et al. (2012)
Canada	Gatos	A y B	18S rRNA	McDowall et al. (2011)
Argentina	Caninos	B	tpi RFLP	Minvielle et al. (2008)
Australia	Caninos	A y B	gdh	Read et al. (2004) and Palmer et al. (2008)
Canada	Caninos	A, AI y B	gdh, tpi 18S rRNA	Himsworth et al. (2010) and McDowall et al. (2011)
China	Caninos	AI	gdh	Li et al. (2012)
Europa (Bélgica, Alemania, Italia, Suecia, Polonia, países bajos)	Caninos	A, AI, AII y B	bg, gdh, tpi	Lalle et al. (2005a), Zygnier et al. (2006), Leonhard et al. (2007), Claerebout et al. (2009), Overgaauw et al. (2009), Lebbad et al. (2010), Marangi et al. (2010), Upjohn et al. (2010), Berrilli et al. (2012) and Sotiriadou et al. (2013)
India	Caninos	AI, AII, B (varios sub-tipos)	tpi	Traub et al. (2004)
Japón	Caninos	AI	gdh	Itagaki et al. (2005)
México	Caninos	AI, AII	bg, gdh	Ponce-Macotela et al. (2002), Lalle et al. (2005b) and Eligio-García et al. (2008)
Thailandia	Caninos	A y B	18S rRNA	Inpankaew et al. (2007) and Traub et al. (2009)
EUA	Caninos	AI, AII y B	gdh, tpi, 18S rRNA	Covacin et al. (2011), McDowall et al. (2011) and Scorza et al. (2012)
Australia	Ganado	A	gdh, 18S rRNA	Ng et al. (2011)
Brasil	Ganado	AI	gdh	Souza et al. (2007) and Dixon et al. (2011)
Canada	Ganado	A y B	bg, 18S rRNA	Uehlinger et al. (2011), Budu-Amoako et al. (2012a, 2012b, 2012c) and Paz e Silva et al. (2012)
China	Ganado	AI Y B	tpi	Liu et al. (2012)
Europa (Belgica, Inglaterra, Francia, Alemania, Italia, Portugal, España, Reino Unido)	Ganado y Cerdos	AI, AII, AIII, B	bg, gdh, 18S rRNA	van Keulen et al. (2002), Lalle et al. (2005a), Langkjaer et al. (2007), Mendonça et al. (2007), Geurden et al. (2008a), Sprong et al. (2009), Castro-Hermida et al. (2011), Geurden et al. (2012) and Minetti et al. (2013)
India	Ganado	AI	Bg	Khan et al. (2011)
Japón	Ganado	AI	gdh	Itagaki et al. (2005)
Nueva Zelandia	Ganado	A y B	bg, tpi	Learmonth et al. (2003), Winkworth et al. (2008) and Abeywardena et al. (2012)
Taiwán	Ganado	A	Bg	Hsu et al. (2007)
EUA	Ganado	AI, AII y B	tpi, bg, 18S rRNA	Trout et al. (2004, 2005, 2006, 2007), Coklin et al. (2007), Feng et al. (2008), Santin et al. (2009, 2012) and Mark-Carew et al. (2012)
Italia	Gallinas y Patos	A, B, mixto A y B	bg, 18S rRNA	Berrilli et al. (2012)
Suecia	Cerdos	B	bg, gdh, tpi	Lebbad et al. (2010)
Australia y EUA	Caballos	AI, AII, B (varios sub-tipos)	tpi	Traub et al. (2005) and Scorza et al. (2012)
Columbia	Caballos		bg, gdh, tpi, 18S rRNA	Traversa et al. (2012)
Italia	Caballos			Santín et al. (2013)
Australia	Cerdos	A	18S rRNA	Armson et al. (2009)
Canada	Cerdos	B		Farzan et al. (2011)
Europa	Cerdos	A, AI and B	bg, gdh, tpi, 18S rRNA	Langkjaer et al. (2007), Caccio et al. (2008) and Sprong et al. (2009)
China, EUA	Conejos	B (varios sub-tipos)	tpi	Sulaiman et al. (2003), Lebbad et al. (2010) and Zhang et al. (2012b)
Japón	Tejones	AI	gdh, bg	Abe et al. (2005, 2010)
Australia	Ovejas	A	gdh, tpi	Ryan et al. (2005), Yang et al. (2009), Nolan et al. (2010), Sweeny et al. (2011)
China	Ovejas y Cabras	AI, AIV y B	tpi	Zhang et al. (2012a)
Europa (Bélgica, Italia, España, Suecia, Reino Unidos)	Ovejas, Cabras y Cerdos	AI, AII, B (varios sub-tipos)	bg, gdh, tpi, 18S rRNA	Giangaspero et al. (2005), Aloisio et al. (2006), Castro-Hermida et al. (2007), Giangaspero et al. (2007), Geurden et al. (2008b), Gómez-Muñoz et al. (2009), Sprong et al. (2009), Lebbad et al. (2010), Robertson et al. (2010), Castro-Hermida et al. (2011), Gómez-Muñoz et al. (2012) and Minetti et al. (2013)
USA	Ovejas	A	bg, gdh, tpi	Santín et al. (2007), Scorza et al. (2012)

# CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

## 3.1 OBJETIVOS

### 3.1.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar los genotipos de *Giardia intestinalis* causando infección en niños y caninos en Linaca aldea del municipio de Tatumbla, Departamento de Francisco Morazán, Honduras durante el año 2016.

### 3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la frecuencia de los genotipos de *Giardia intestinalis* causantes de infección en niños en Linaca aldea del municipio de Tatumbla, Departamento de Francisco Morazán, Honduras, durante el año 2016.
  2. Establecer la frecuencia de genotipos de *Giardia intestinalis* causantes de infección en caninos en Linaca aldea del municipio de Tatumbla, Departamento de Francisco Morazán, Honduras, durante el año 2016.
- 

## 3.2. ENFOQUE

Estudio cuantitativo. Dado que el objetivo del estudio es determinar la frecuencia relativa de los genotipos encontrados en las muestras analizadas.

## 3.3 TIPO DE DISEÑO

Diseño no-experimental descriptivo.

### **3.4. PROFUNDIDAD DEL ESTUDIO**

La profundidad del estudio es “descriptiva”.

### **3.5 TEMPORALIDAD**

Transversal.

### **3.6 POBLACIÓN Y MUESTRAS**

Muestreo no-probabilístico por conveniencia.

La población de estudio estuvo conformada por niños de los centros educativos: Kínder “Caridad de Ardón” y la Escuela primaria “José Trinidad Reyes”.

### **3.7 AREA DE ESTUDIO**

Linaca, aldea del municipio de Tatumbula del Departamento de Francisco Morazán, Honduras.

Con datos del Instituto Nacional de Estadística de Honduras, esta aldea cuenta con una población total de 1,797 habitantes siendo las poblaciones infantiles conformadas por las edades de 0 a 14 años las que constituyen el 30% de la población de esta localidad. Solo el 38% de las viviendas cuentan con agua proveniente del sistema público o privado, y el resto de la población obtiene su agua de pozo o río.

## **3.8 DESCRIPCIÓN DE INSTRUMENTOS Y TÉCNICAS**

### **3.8.1. RECLUTAMIENTO DE PACIENTES**

Se inicia con el reclutamiento de pacientes una vez obtenido la aprobación del Comité de Ética CEI-MEIZ (No.03-2016) (Anexo 1).

La población de estudio fue conformada por niños de los centros educativos: Kínder “Caridad de Ardón” y la Escuela primaria “José Trinidad Reyes”. La población de estudio seleccionada fueron niños de 4-12 años, por ser la población mayormente vulnerable a sufrir las consecuencias crónicas de esta parasitosis [Robertson et al., 2014]. Se colectaron muestras de los caninos que habitaban en las casas de estos niños, ya que estudios realizados en diferentes partes del mundo han proporcionado evidencia acerca de la posible transmisión zoonótica de animales domésticos, en especial de caninos [Ryan and Caccio, 2013]. Para poder realizar el muestreo fue necesario la socialización y explicación del objetivo del proyecto, así como los riesgos y beneficios del mismo a los directores de los centros educativos y padres de familia.

Una vez que el individuo dio su consentimiento en participar en la investigación, se les explicó el estudio en mayor detalle. Después de haber explicado la dinámica de la intervención, se llenó el consentimiento informado (Anexo 2) o asentimiento informado en el caso de los niños de 8-17 años (Anexo 3) y una carta de autorización (Anexo 4) de parte de los dueños de los animales para poder analizar las muestras de sus mascotas y una ficha de registro (Anexo 5) con la descripción de datos demográficos, sociales, clínicos e epidemiológicos de cada participante.

Posteriormente se realizó en cada salón de clase una charla de concientización sobre los parásitos intestinales y la explicación de la toma de muestra de materia fecal humana y animal, apegadas a las normativas internacionales estándares para la recolección de muestras fecales para estudio coproparasitológico.

Se esperaba coleccionar 200 muestras de heces de niños entre 4 a 12 años. Y en cuanto a las muestras de los animales se aceptaron cuantas muestras los participantes accedieron a llevar de los caninos que habitaban en su casa.

Las muestras fueron organizadas, y almacenadas por personal capacitado involucrado en el proyecto. Luego las muestras transportadas a las instalaciones de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras, campus Tegucigalpa, para su análisis.

### **3.8.2. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROCÓPICA**

Todas las muestras recolectadas se analizaron mediante examen microscópico en fresco solución salina – lugol en búsqueda de quistes del protozoo *Giardia intestinalis*.

(Anexo 7).

### 3.8.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Las muestras de heces que contenían quistes de *Giardia intestinalis* fueron sometidas a un proceso de concentración con un método de flotación: Método de Sheatter (Anexo 8), luego el concentrado de quistes de *Giardia intestinalis* pasó un proceso de lisis química (Anexo 9) y posteriormente se les realizó ruptura mecánica mediante perlas de vidrio de 0.1 mm con el Mini BeadBeater® system (Bio Spec products Inc.) (Anexo 10), una vez hecho el proceso anterior se realizó la extracción de ADN con equipo automatizado Automate Express®, con el kit de extracción Prepfilier Express, Forensic DNA Extraction kit® (Applied Biosystem, Biokim) (Anexo 11) y posteriormente analizadas mediante reacción de cadena polimerasa – polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción PCR-RFLP dirigidos a los genes: glutamato deshidrogenasa (gdh) (Anexo 12,13), triosa fosfato isomerasa (tpi) (Anexo 14), SSU-rRNA (Anexo 15) y la secuenciación sanger de este gen y por último el gen beta giardina (Anexo 16).

### **3.8.3.1 Amplificación de un fragmento del gen glutamato deshidrogenasa (*gdh*).**

La genotipificación de *Giardia intestinalis* mediante el gen *gdh* se realizó utilizando dos técnicas moleculares.

#### **3.8.3.1.1 Amplificación de un fragmento del gen glutamato deshidrogenasa (*gdh*) para determinar simultáneamente 3 genotipos mediante PCR uniplex descrito por [Eligio et al., 2008].**

El genotipo AI se detectó con los primers F-AI GCG CTG TCT ACT TCC TGG AG, y R-AI CAG CTT CTC GTT GAA CC; el genotipo AII con los primers F-AII CTC ACA GGC AAG AAC GTC AA, y R-AII CTC GTT GAA CCC ATC CTT GT; y el genotipo B usando los primers F-B GCC TCA GGA ACG AGT TTA CG, R-B GAC GTT CTT GCC CCT GAT TA. El programa utilizado para los tres fue mediante desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos; seguido por 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos y 72°C por 3 minutos, y extensión final a 72°C por 7 minutos). Teniendo como bandas diagnósticas para cada genotipos los siguientes tamaños: AI =200 pb, AII = 280 pb y B =180 pb. Ver figuras (4.1, 4.2).

### **3.8.3.1.2 Amplificación de un fragmento del gen glutamato deshidrogenasa (gdh) mediante PCR RFLP descrito por [Read et al., 2004].**

La primera PCR utilizó los primers F-gdhe TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT, y R-gdhi GTT RTC CTT GCA CAT CTC C con una desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos; seguido por 55 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 20 segundos y 72°C por 45 segundos, y extensión final a 72°C por 4 minutos. La segunda PCR utilizó los primers F-gdhi CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG y R-gdhi GTT RTC CTT GCA CAT CTC C con una desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos; seguido por 55 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 20 segundos y 72°C por 45 segundos, y extensión final a 72°C por 4 minutos. El producto de amplificación fue de 430 pb. La enzima NlaIV fue utilizada para diferenciar el genotipo AI (150 pb/120 pb/90 pb), del genotipo AII (120 pb/90 pb/80 pb/70 pb); mientras que la enzima RsaI para determinar los genotipos BIII (300 pb/130 pb) y BIV (430 pb). La incubación con las enzimas de restricción se llevó a cabo a 37 °C por 2 horas. La enzima NlaIV, luego de la incubación descrita anteriormente, se inactivó con una incubación a 65°C por 20 minutos Ver figuras (4.3, 4.3.1, 4.3.2).

### **3.8.3.2 Amplificación de un fragmento del gen bg de *Giardia* spp. para determinar los genotipos A, B y E mediante PCR RFLP descrito por [Caccio et al., 2002].**

La primera PCR utilizó los primers F-G7 AAG CCC GAC CTC ACC CGC AGT GC y R-G759 GAG GCC CTG GAT CTT CGA GAC con una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos; seguido por 37 ciclos a 95°C por 60 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, y extensión final a 72°C por 10 minutos. El producto de amplificación fue de 753 pb. La enzima HaeIII fue utilizada para diferenciar el genotipo A (202 pb/ 150 pb/126 pb/ 74 pb), del genotipo B (202 pb/ 176 pb/ 150 pb/11 pb/ 84 pb) y del genotipo E (202 pb/ 186 pb/ 150 pb/102 pb). La incubación con la enzima de restricción se llevó a cabo a 37 °C por 4 horas. Ver figuras (4.4, 4.4.1).

### **3.8.3.3 Amplificación de un fragmento del gen tpi de *Giardia* spp. para la determinación genotipos A y B descrito por [Bertrand et al., 2005].**

Para el genotipo A se utilizó los primer F-tpiA GGA GAC CGA GCA AAG C y R- tpiA CTT GCC AAG CGC CTC AA, y para el genotipo B se usó los primers F-tpiB AAT AGC ACA RAA CGT GTA TCT G, y R- tpiB CCC ATG TCC AGC ATC T usando el siguiente programa; desnaturalización inicial a 95°C por 15 segundos; seguido por 50 ciclos a 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, y extensión final a 72°C por 7 minutos. Las bandas para los genotipos fueron las siguientes: genotipo A =

148 pb y genotipo B = 81 pb.

Ver Figuras (4.5, 4.6)

### **3.8.3.3 Amplificación de un fragmento del gen SSUr RNA de *Giardia* spp. mediante PCR y secuenciación descrita por [Caccio et al., 2002].**

Se usaron los primers F-H11 CAT CCG GTC GAT CCT GCC y R-RH4 AGT CGA ACC CTG ATT CTC CGC CAG G con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 96°C por 2 minutos; seguido por 35 ciclos a 96°C por 20 segundos, 59°C por 1 minuto y 72°C por 30 segundo y extensión final a 72°C por 7 minutos; esperando un producto de amplificación de 292 pb. Para la secuenciación Sanger de este gen, todas las muestras positivas fueron enviadas a Macrogen USA (<https://www.macrogenusa.com>) Ver figura (4.7).

#### **3.8.3.3.1 Secuenciación del gen SSUr RNA para determinar genotipo**

El análisis de las secuencias se llevó a cabo con el programa Geneious® 7.1.5 software (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand), y una vez que se obtuvo la secuencia consenso de cada muestra se comparó mediante la herramienta Blast contra la base de datos disponible del NCBI. Además se comparó las secuencias con secuencias de referencia disponibles en la base de datos <http://giardiadb.org/> en búsqueda del genotipo al cual pertenecían; el resultado obtenido se basó en el mejor score de similitud y valor E. Ver figuras (4.8, 4.9).

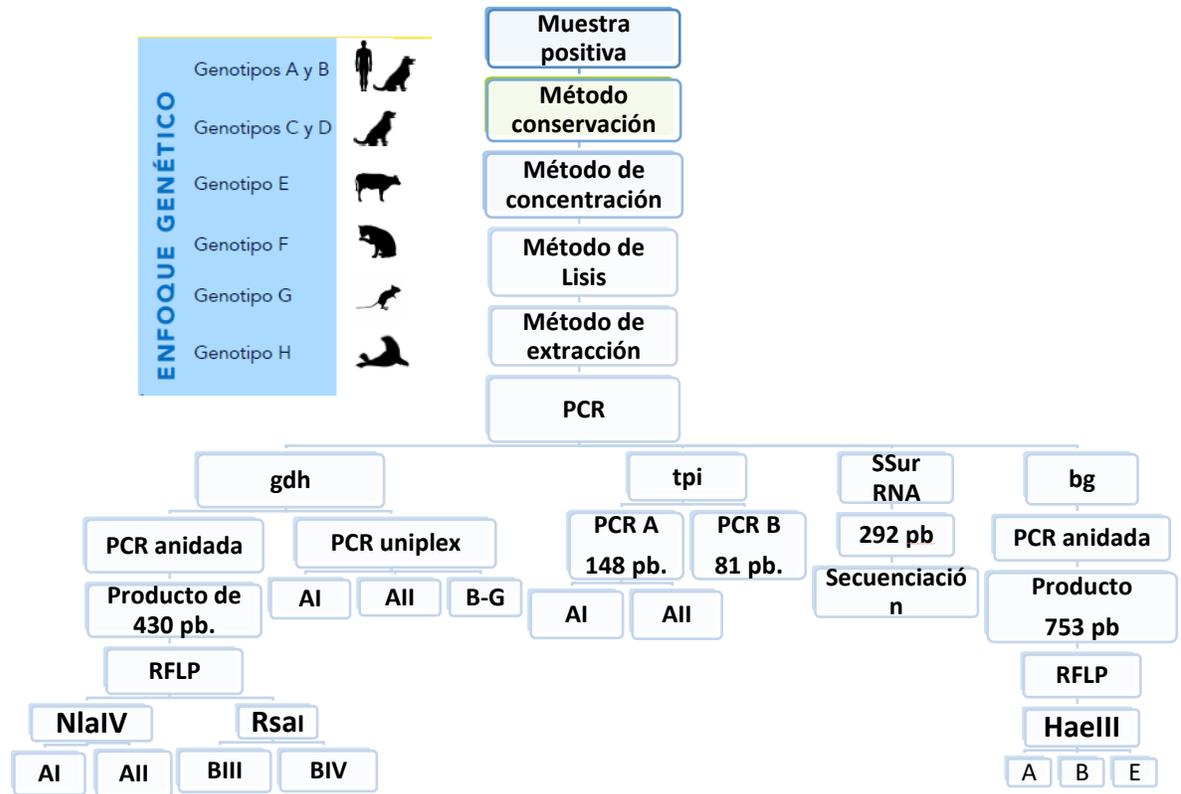


Figura 3.1 Algoritmo de trabajo

### 3.9. PLAN DE ANÁLISIS

Los resultados fueron reportados y analizados en términos de frecuencias relativas de los genotipos encontrados en las muestras de heces analizadas. Se llevó una base de datos de los resultados encontrados en Microsoft Excel.

# CAPÍTULO 4: RESULTADOS

## 4.1 RESULTADOS GENERALES

Se recolectaron un total de 242 muestras de materia fecal de niños que asisten al kínder “Caridad de Ardón”, y a la Escuela Primaria “José Trinidad Reyes” de la aldea Linaca del municipio de Tatumbla, Francisco Morazán y 26 muestras fecales de sus caninos-mascota.

De las 242 muestras de materia fecal de niños, 18 (7.4%) de ellas presentaron quistes del parásito *Giardia intestinalis* por microscopía. Ninguna muestra de canino reveló quistes de *Giardia intestinalis*.

### 4.1.1 Resultados en muestras de niños

La frecuencia de los genotipos encontrados en las muestras de los niños de la aldea de Linaca con al menos un marcador molecular fue la siguiente: Infección mixta del genotipo A y genotipo B, 15/18 (83.33%); solo genotipo A 2/18 (11.11%), solo genotipo B 1/18 (5.55%). (Tabla 4.1)

#### **4.1.2 Resultados en muestras de caninos**

La frecuencia de los genotipos encontrados en las muestras de caninos con al menos un marcador molecular fue la siguiente: solo genotipo A en 1/4 (25%), e infección mixta de los genotipos A/B en 3/4 (75%). (Tabla 4.1)

#### **4.1.3 Resultados de amplificación con los marcadores moleculares**

De las dieciocho muestras de niños que contenían quistes del parásito y que se analizaron por biología molecular se logró en un 100% la amplificación de todas las muestras con al menos un marcador molecular para determinar el genotipo.

De las veintiséis muestras de caninos obtenidas y que sometieron análisis molecular, ya que por microscopía no se determinó la presencia del parásito, se logró la amplificación de cuatro muestras y de las cuales en un 100% se determinó el o los genotipos de estas cuatro muestras con al menos un marcador molecular.

Con los diferentes marcadores moleculares usados en el análisis de las muestras se logró la siguiente amplificación: el gen *tpi* y el gen SSUr RNA amplificaron en un 100%, el gen *gdh* con modalidad uniplex y anidada un 59% y 41% respectivamente y el gen *bg* en un 22%.

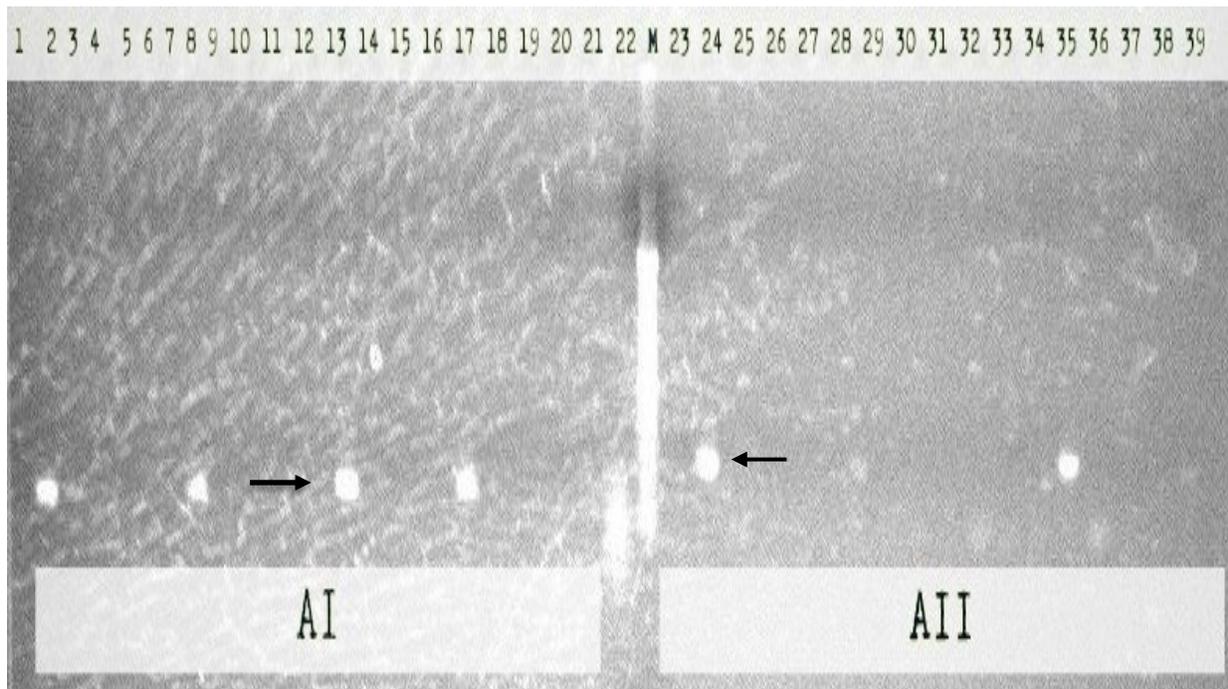
### **4.2 Genotipificación de *Giardia intestinalis* mediante el gen de la enzima glutamato deshidrogenasa (*gdh*).**

#### **4.2.1 Amplificación de un fragmento del gen glutamato deshidrogenasa (*gdh*) para determinar simultáneamente 3 genotipos mediante PCR uniplex descrito por [Eligio et al., 2008].**

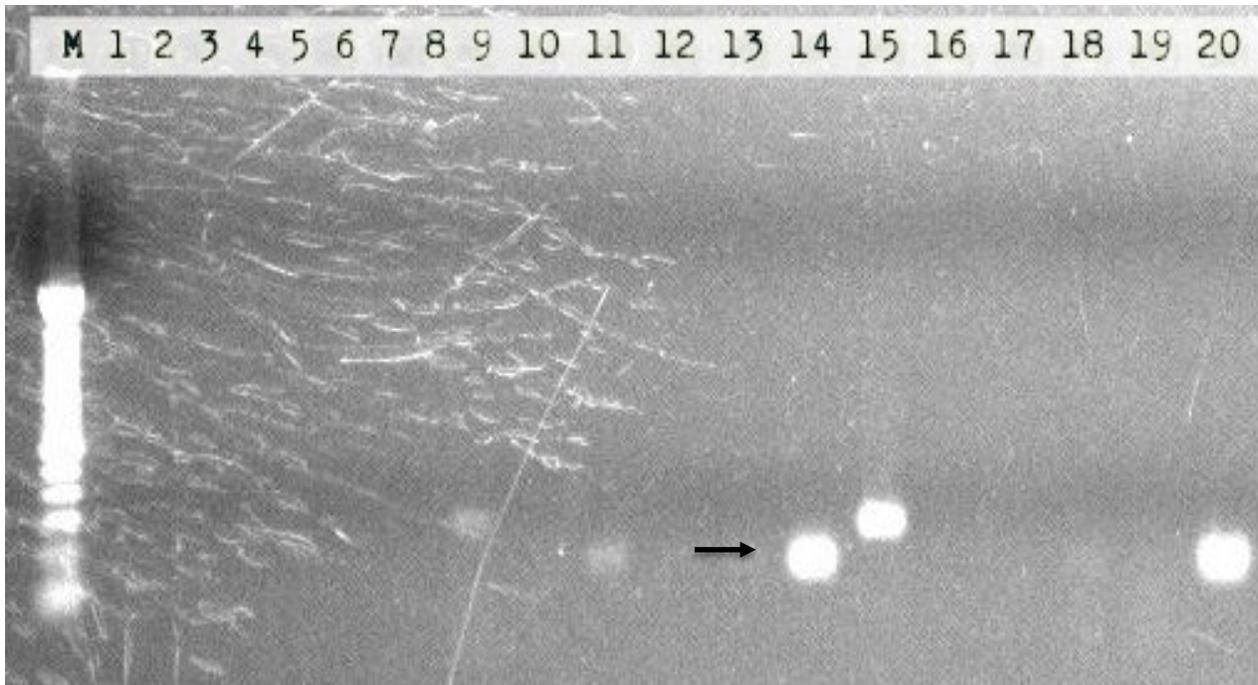
El fragmento del gen *gdh* fue utilizado para determinar simultáneamente 3 genotipos. El subgenotipo AI, el subgenotipo AII y el genotipo B de *Giardia intestinalis* descrito por [Eligio et al., 2008].

Teniendo como bandas diagnósticas para cada genotipo los siguientes tamaños: AI = 200 pb, AII = 280 pb y B =180 pb.

Se amplificó el gen *gdh* en 13/22 (59 %) de las muestras fecales positivas para *Giardia intestinalis* de origen humano y de canino. El genotipo AI se determinó en 2/13 (15.38 %), el genotipo AI más el genotipo AII en 3/13 (23.1 %), y el genotipo B fue identificado en 4/13 (30.77 %) muestras. Se detectó infección mixta con los genotipos A y B en 4/13 (30.77 %) de las muestras.



**Figura 4.1** Separación electroforética del gen *gdh* por PCR uniplex. Carriles:1-39 muestras. M marcador molecular de 100 pb. Banda diagnóstica para el subgenotipo AI de 200 pb y para el subgenotipo AII de 280 pb.

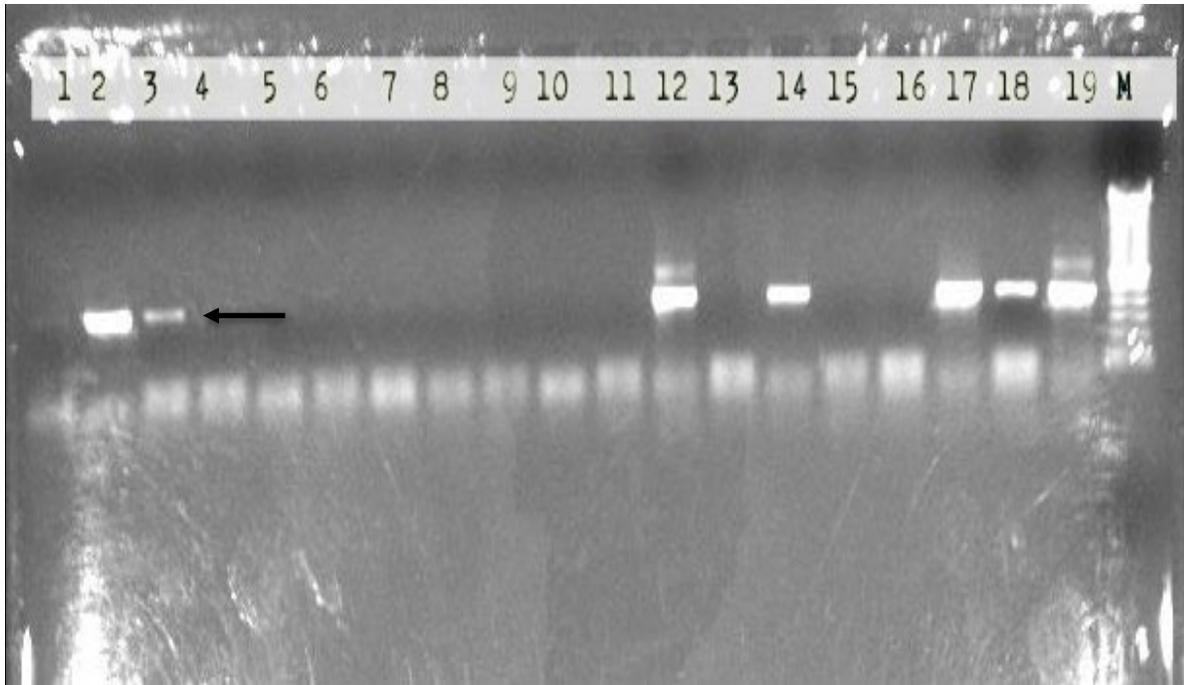


**Figura 4.2** Separación electroforética del gen *gdh* por PCR uniplex. Carriles: 1-20 muestras. M marcador molecular de 100 pb. Banda diagnóstica genotipo B de 180 pb.

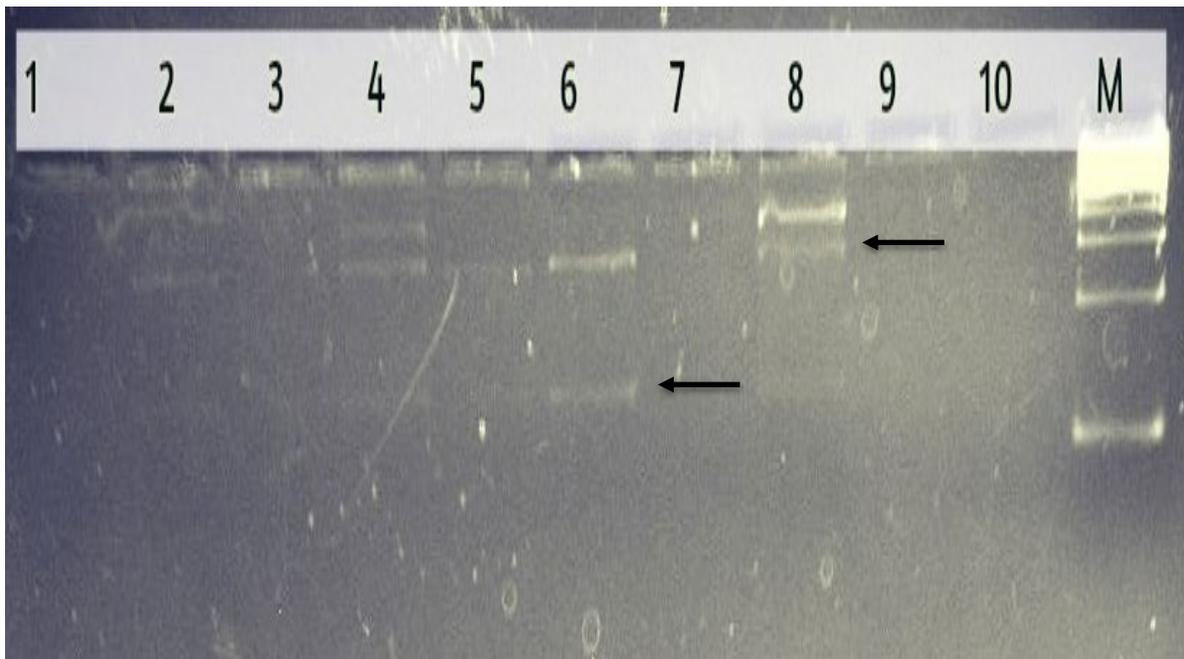
#### 4.2.2 Amplificación de un fragmento del gen *gdh* de *Giardia intestinalis* mediante PCR-RFLP

Mediante la amplificación de un fragmento del gen *gdh* con una PCR anidada se obtuvo un producto de 430 pb. Posteriormente el fragmento se digirió con 2 enzimas de restricción (RFLP). La enzima *NlaIV* se utilizó para diferenciar el genotipo AI (patrón de bandas: 150pb / 120 pb / 90 pb), del genotipo AII (patrón de bandas: 120 pb / 90 pb / 80 pb / 70 pb); mientras que la enzima *RsaI* se usó para determinar los genotipos B3 (300pb/130 pb) y B4 (430 pb) como fue descrito por [Read et al., 2004].

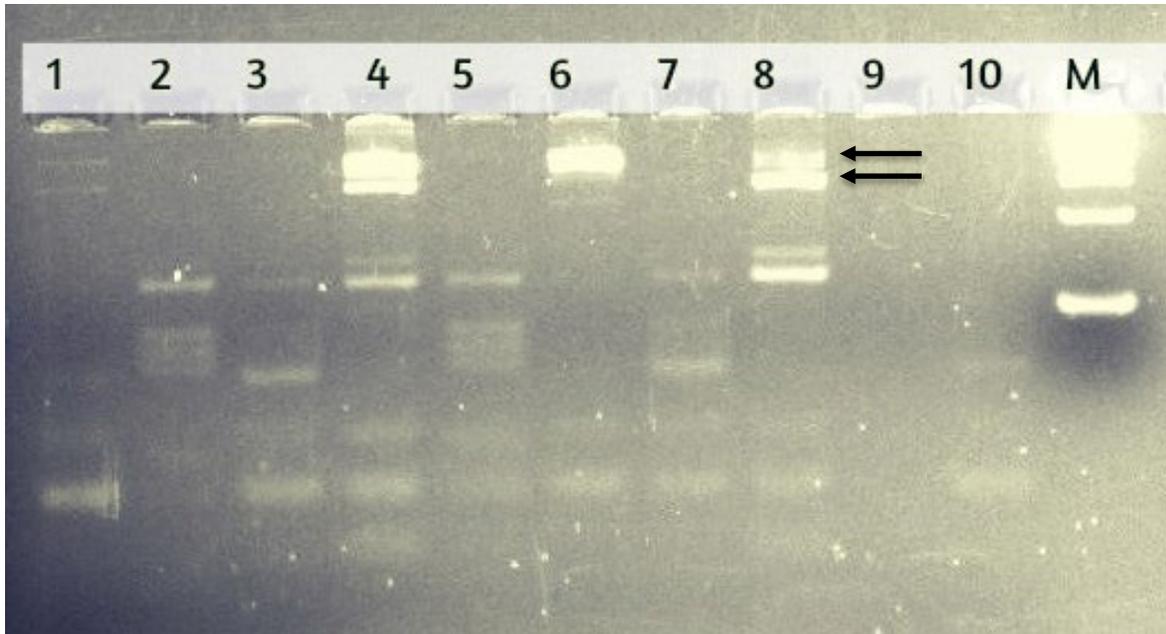
Se amplificó el gen *gdh* en 9/22 (41 %) de las muestras fecales positivas para *Giardia intestinalis* de origen humano y de canino. El genotipo AII se determinó en 3/9 (33.33 %) de las muestras, el genotipo AI junto al genotipo AII en 1 muestra (11.11 %), y con infección mixta del genotipo A y B en 5/9 (55.55 %) en la siguiente combinación AI/BIII/BIV en 2/5(40 %), AI/BIII en 3/5 (60 %).



**Figura 4.3** Separación electroforética del gen *gdh*. Carriles: 1-19 muestras. M marcador molecular de 100 pb. Producto de PCR de 430 pb.



**Figura 4.3.1** Digestión del gen *gdh* con la enzima NlaIV. Carriles: 1-10 muestras. M marcador molecular de 100 pb. Subgenotipo AI (150 pb), Subgenotipo AII (120 pb), B (300 pb/100pb).

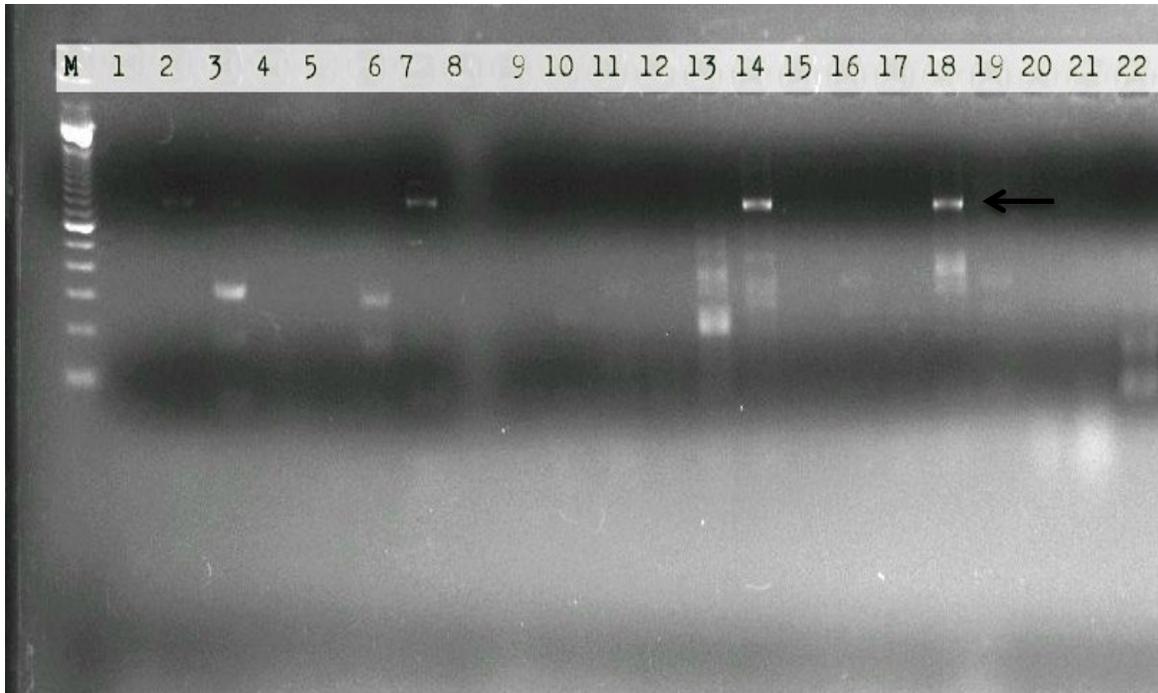


**Figura 4.3.2** Digestión del gen *gdh* con la enzima *RsaI*. Carriles 1-10 muestras. M marcador molecular de 100pb. Subgenotipo BIII (300pb/180pb), subgenotipo BIV (430pb)

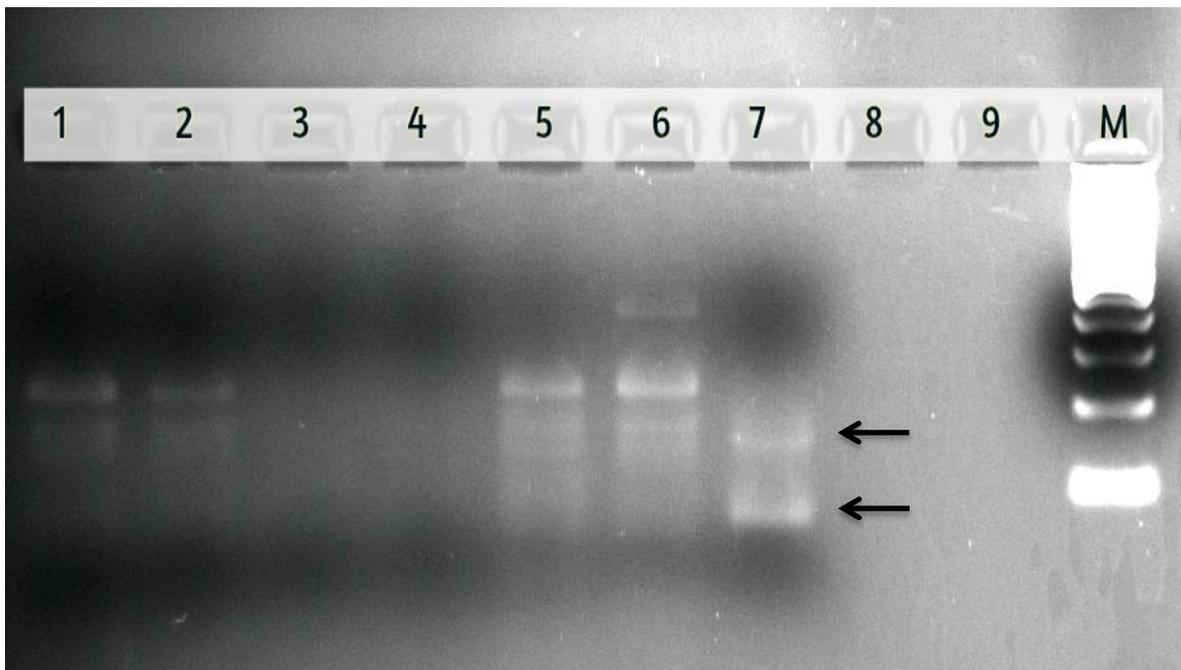
### **4.3 Amplificación de un fragmento del gen *bg* de *Giardia intestinalis* mediante PCR anidada – RFLP**

Mediante la amplificación de un fragmento del gen *bg* y posterior digestión mediante RFLP con la enzima *HaeIII*; fue posible identificar los genotipos A, B y E de *Giardia intestinalis* descrito por [Caccio et al., 2002].

Se amplificó el gen *bg* en 5/22 (22.72 %) de las muestras fecales positivas para *Giardia intestinalis* de origen humano y de canino. El genotipo A se determinó en 1/5 muestra (25%), y el genotipo B en 4/5 (95 %) muestras.



**Figura 4.4** Separación electroforética del gen *bg* con un producto de PCR de 753 pb. Carriles 1-22: muestras. M: marcador molecular de 100 pb.

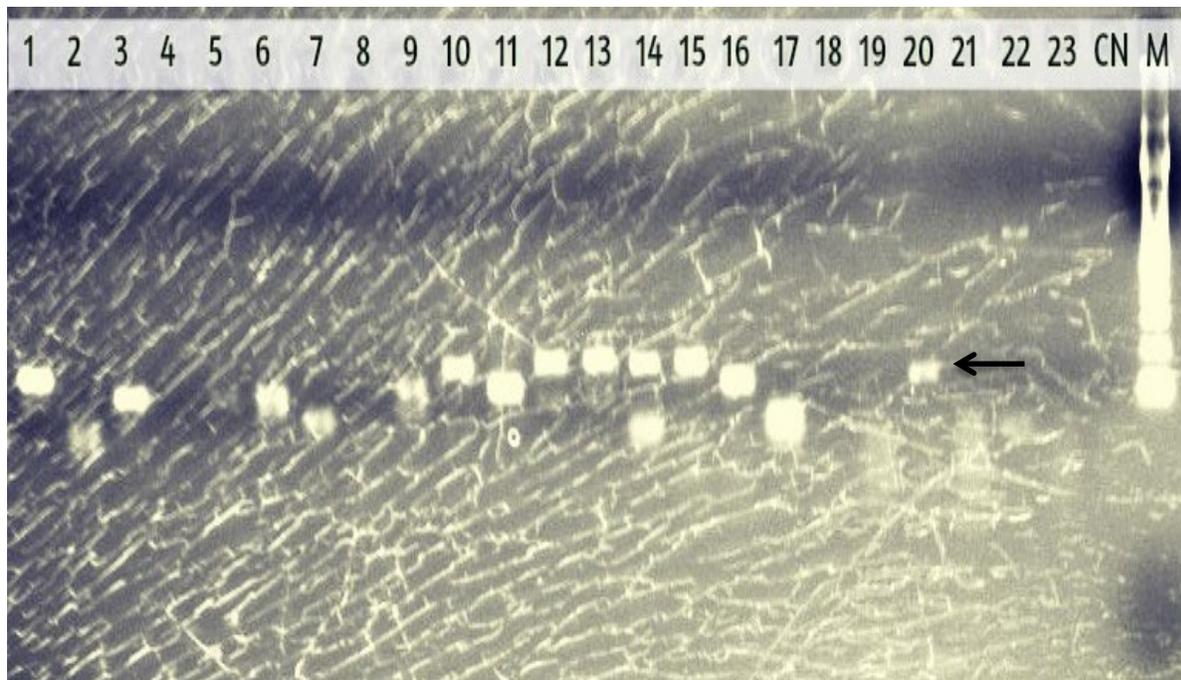


**Figura 4.4.1** Digestión del gen *bg* con la enzima *HaeIII*. Carriles 1-9 muestras. M marcador molecular 100 pb. Genotipo A (202 pb/150 pb/126 pb/ 74 pb). Genotipo B (202 pb/ 176 pb/ 1 50 pb/11 pb/ 84 pb). Genotipo E (202 pb/ 186 pb/ 150 pb/102 pb).

#### 4.4 Amplificación de un fragmento del gen *tpi* de *Giardia intestinalis* para la determinación de genotipos A y B.

Mediante la amplificación de un fragmento del gen *tpi* fue posible identificar los genotipos A y B de *Giardia intestinalis* de acuerdo a lo descrito por [Bertrand et al., 2005].

Se amplificó el marcador del gen *tpi* en 22/22 (100 %) muestras fecales positivas para *Giardia intestinalis* de origen humano y de perro. El genotipo A se determinó en 4/22 (18.18 %) muestras, el genotipo B en 7/22 (31.81 %) muestras, y se observaron ambos genotipos A y B en 11/22 (50 %) muestras.



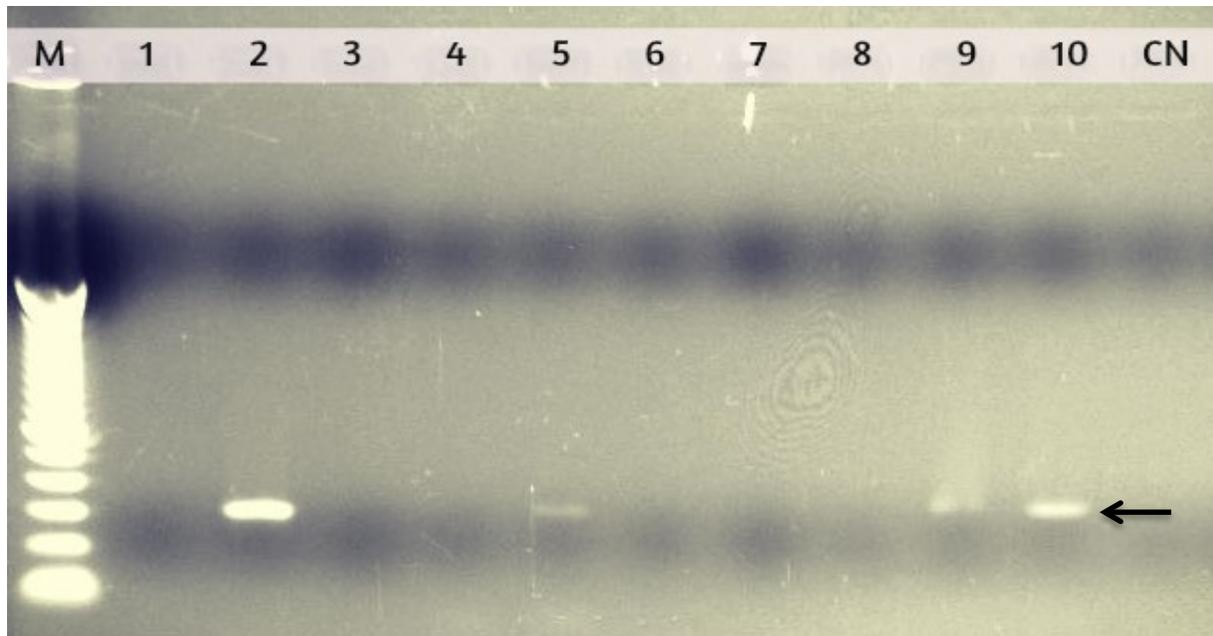
**Figura 4.5** Separación electroforética del gen *tpi* para el genotipo A Carriles: 1-27 muestras. M: marcador molecular de 100 pb. Producto de PCR de 148 pb.



**Figura 4.6** Separación electroforética del gen *tpi* para el genotipo B. Carriles: 1-27muestras. M: marcador molecular de 100pb. Producto de PCR de 80 pb.

#### **4.5 Amplificación de un fragmento del gen *SSUr RNA* de *Giardia intestinalis* mediante PCR y secuenciación.**

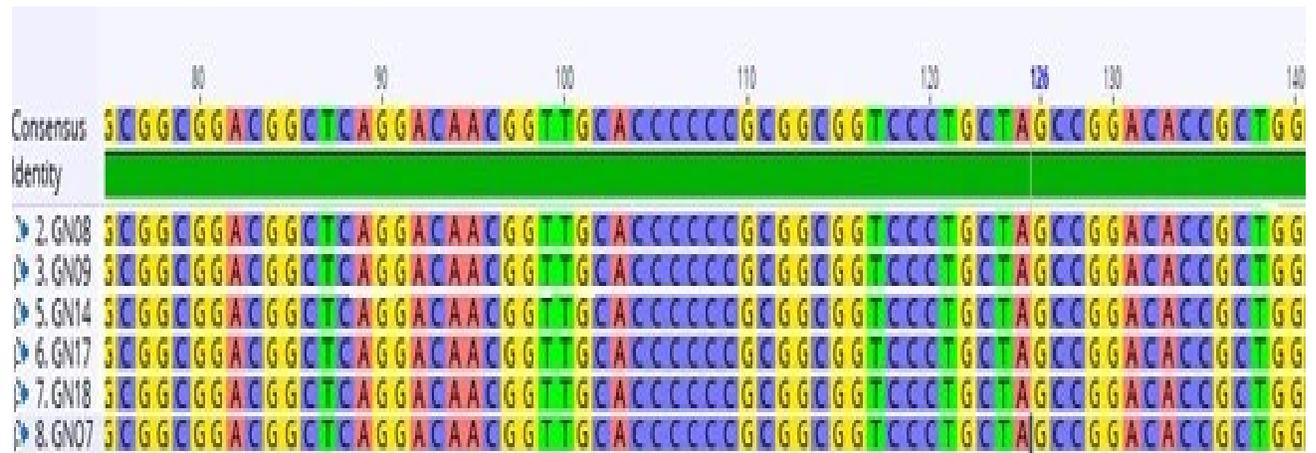
Mediante la amplificación de un fragmento del gen *SSUr RNA* se logró amplificar 22/22 (100%) de las muestras humanas y caninas según lo descrito por [Caccio et al., 2002]; y luego mediante secuenciación Sanger fue posible identificar a los genotipos de *Giardia intestinalis*.



**Figura 4.7** Separación electroforética del gen SSUr RNA. Carril 1-10 muestras. CN: Control Negativo. M: marcador molecular 100 pb. Producto de PCR de 292 pb.

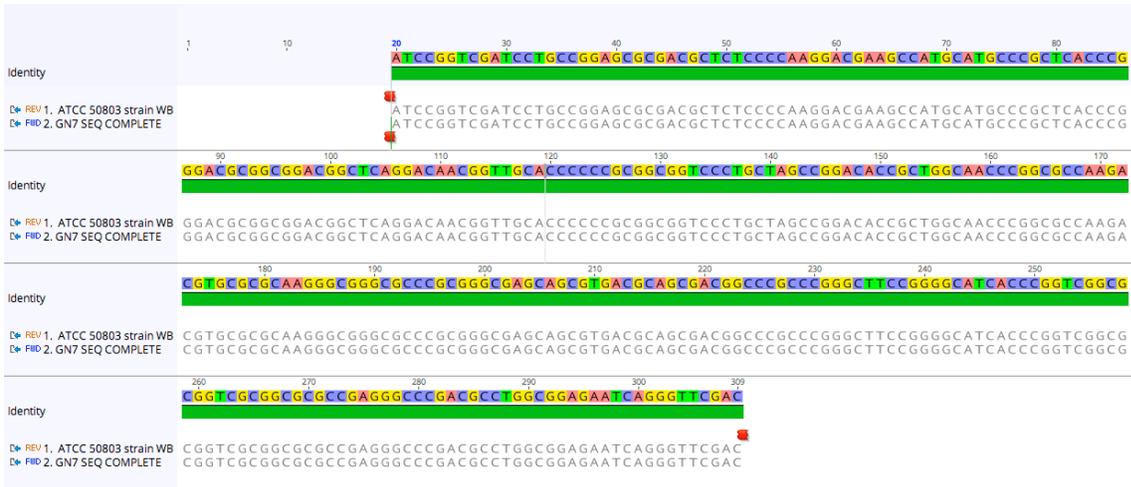
En la secuenciación gen SSUr RNA de las veintidós muestras se logró obtener con éxito la secuencia de 17/22 (77.27 %) de las muestras de humanos y caninos; de estas, 14 pertenecían a niños y tres a caninos.

#### 4.5.1 Secuenciación del gen *SSUr RNA* para determinar genotipo



**Figura 4.8.** Alineamiento de seis secuencias de la región pequeña ribosomal de *Giardia intestinalis*. La barra superior en verde indica el grado de homología entre las secuencias.

Al comparar en el BLAST (NCBI) la secuencia consenso obtenida de la muestra GN07 (291 pb) contra las secuencias disponibles en la base de datos, se obtuvo una cobertura máxima de 99 % y un 100 % de identidad máxima para la subunidad pequeña ribosomal 18S de *Giardia intestinalis*, pero sin revelar pertenencia a ninguno de los genotipos conocidos. El mismo procedimiento se realizó a las 16 muestras restantes que se lograron secuenciar, obteniendo al igual al caso anterior la cobertura e identidad máxima para la subunidad pequeña 18S de *Giardia intestinalis* pero sin revelar el genotipo.



**Figura 4.9.** Alineamiento de la secuencia de la subunidad 18S ribosomal (292 pb) de la muestra GN07 y la cepa ATCC WB 50803 de *Giardia lamblia* caracterizada como del ensamble “A” de acuerdo a la búsqueda realizada en <http://giardiadb.org/>. Score de similitud de 524 y valor E = 2e-148. SNPs = 0.

La Figura 4.9 identifica la secuencia GN07 que fue caracterizada como genotipo A con el mejor *score* de similitud y valor E, este patrón se mantuvo de manera similar en las dieciséis muestras restantes en las que se caracterizó este genotipo.

**Tabla 4.1** Análisis de resultados entre los marcadores moleculares muestras de niños (GN), muestras de perro (GP).

#	Código muestra	SSUr RNA	Secuenciación SSUr RNA	gdh	gdh anidada	tpi	bg	Resultado final
1	GN01	Si	A	-	AII	A	-	<b>AII</b>
2	GN02	Si	A	AI/AII	AI/BIII/BIV	A	B	<b>A1/A2/B3/B4</b>
3	GN03	Si	A	AI	AI/AII	A/B	-	<b>AI/AII/B</b>
4	GN04	Si	A	-	-	B	B	<b>A/B</b>
5	GN05	Si	-	B	-	A/B	-	<b>A/B</b>
6	GN06	Si	-	-	-	B	-	<b>B</b>
7	GN07	Si	A	AI/AII/B	-	B	-	<b>AI/AII/B</b>
8	GN08	Si	A	B	-	A/B	-	<b>A/B</b>
9	GN09	Si	A	B	AII	A/B	B	<b>AII/B</b>
10	GN10	Si	-	AI/B	-	B	-	<b>AI/B</b>
11	GN11	Si	A/B	-	-	A/B	-	<b>A/B</b>
12	GN12	Si	A	AI/B	AI/BIII/BIV	A/B	-	<b>AI/BIII/BIV</b>
13	GN13	Si	-	B	-	A/B	-	<b>A/B</b>
14	GN14	Si	A	AI/AII	AI/BIII	A/B	-	<b>AI/AII/BIII</b>
15	GN15	Si	-	-	-	A/B	-	<b>A/B</b>
16	GN16	Si	A	-	-	A	-	<b>A</b>
17	GN17	Si	A	-	AI/BIII	A/B	-	<b>AI/BIII</b>
18	GN18	Si	A	AI/AII	AI/B	A/B	B	<b>AI/AII/B</b>
19	GP22	Si	A	-	AII	A	A	<b>AII</b>
20	GP37	Si	A	AI	-	B	-	<b>A/B</b>
21	GP47	Si	A	-	-	B	-	<b>A/B</b>
22	GP21	Si	-	AI/AII/B	-	B	-	<b>AI/AII/B</b>

## CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

La frecuencia de los genotipos encontrados con al menos un marcador molecular en las muestras de los niños fue la siguiente: Infección mixta del genotipo A y genotipo B, 15/18 (83.33%); solo genotipo A, 2/18 (11.11 %), solo genotipo B, 1/18 (5.55 %). Estos resultados concuerdan con la literatura científica que reporta la mayoría de las infecciones en humanos por los genotipos A y B [Faria et al., 2016] y el predominio de un genotipo sobre el otro ha sido ampliamente debatido a nivel mundial. En la revisión bibliográfica en América Latina realizada por Lindarte y colaboradores [Lindarte et al., 2011] se encontró que el genotipo A fue el genotipo más frecuentemente detectado causante de infecciones en humanos, lo cual contrasta con lo informado por Caccio y Ryan en el 2008 [Caccio and Ryan, 2008], quienes proponen que el genotipo B es el mayor responsable de las infecciones en humanos.

Estos hallazgos de la presencia de un genotipo más que de otro se ha atribuido a la ubicación geográfica y a las condiciones sanitarias de cada región; en los estudios de prevalencia de giardiasis se demuestra que las condiciones higiénicas están estrechamente relacionadas con la persistencia del protozoo [Rodriguez et al., 2014].

En cuanto a los hallazgos encontrados en este estudio se describe que la mayoría de las infecciones son infecciones mixtas de los genotipos A y B; en los estudios a nivel mundial reportan este tipo de infección en un bajo porcentaje que puede variar desde un 2 % hasta un 21 % con la salvedad que estos porcentajes se ven incrementados en países en vías de desarrollo [Gelanew et al,2007], pudiendo ser esta última aseveración la explicación del porqué se encontró un alto porcentaje de este tipo de infección en este estudio, ya que en nuestro país

sigue persistiendo una mala situación socioeconómica, atención médica inadecuada, falta de sistemas de salud y a un abastecimiento inadecuado de agua todo esto ayudando a la persistencia del protozoo.

Países como Canadá, Nicaragua, Cuba, Perú, Argentina, Brazil, Reino Unido, Etiopía, e India han reportado la presencia de este tipo de infección. Una posible explicación de este hallazgo es la exposición de las personas y animales a múltiples fuentes de infección que contengan una mezcla heterogénea de varios genotipos [Hopkins et al., 1997; Amar et al., 2002; Traub et al., 2004; Lalle et al., 2005; Gelanew et al., 2007; Lindarte et al., 2011].

La frecuencia de los genotipos encontrados con al menos un marcador molecular en las muestras de caninos fue la siguiente: solo genotipo A en 1/4 (25 %), e infección mixta de los genotipos A/B en 3/4 (75 %). Al igual que en los humanos, los estudios de genotipificación de *Giardia intestinalis* han reportado en caninos los genotipos zoonóticos A y B, así como los genotipos C y D que son hospedero específico de cánidos. La presencia de estos genotipos en caninos ha sido publicada por diversos autores; Leonhard y colaboradores [Leonhard et al., 2007] reportaron que el 60 % de los caninos de una zona urbana de Alemania estaban parasitados con el genotipo A; Lalle y colaboradores [Lalle et al., 2005] reportan la presencia tanto del genotipo A como el genotipo B y en América Latina un estudio realizado por Lindarte y colaboradores [Lindarte et al., 2011] describe que el genotipo A fue el genotipo más encontrado en los aislados de caninos; mientras que solo en un 10 % de los estudios se observó caninos infectados solamente con el genotipo B, y en 30 % se reportó la presencia en aislados de los genotipos hospedero-específicos C o D. En contraste con todos los estudios

anteriormente descritos, que le confieren la mayoría de infecciones en caninos a los genotipos zoonóticos, en el estudio realizado por Sommer y colaboradores [Sommer et al., 2015] reportan en un 59 % la presencia de los genotipos C y D mientras que solo en un 16 % la presencia de los genotipos A y B; y es en esta última investigación afirman el predominio de los genotipos C y D sobre los genotipos con potencial zoonótico no solo en Europa sudoriental sino también en todo el mundo.

En esta investigación cuando se analizaron las muestras de los caninos se utilizaron los primers para los genotipos zoonóticos A y B, así como los primers para identificar los genotipos hospedero específico de los caninos C y D utilizando el gen *gdh*, obteniendo como resultado ninguna amplificación de los genotipos C o D en las muestras y solo reportando la presencia de los genotipos zoonóticos. Este hallazgo contrasta con lo reportado por Sommer y colaboradores en el 2015 anteriormente mencionado. La posible explicación de este hallazgo en esta investigación es que en el área de estudio los caninos infectados con el parásito solo poseen los genotipos zoonóticos A y B, debido a una baja transmisibilidad de los genotipos hospedero específico (C o D) entre los caninos y pudiendo ser un factor determinante la convivencia de estos caninos mascotas con los humanos. Esta posibilidad debe ser confirmada ampliando el número de muestras de caninos de dicha localidad. Y es necesario proponer investigaciones que permitan conocer la compleja dinámica de transmisión del parásito entre ambos hospederos y establecer si existe una zoonosis.

De las dieciocho muestras niños y cuatro muestras de caninos analizadas se logró una amplificación del 100% con al menos un marcador molecular. En los estudios a nivel mundial que han realizado análisis multilocus del parásito describen el éxito de más del 70 % de amplificación de las muestras agregándole robustez a los resultados a la hora de determinar el genotipo encontrado, a diferencia de las discrepancias y dificultades halladas en los reportes de estudios que solo analizan uno o dos marcadores moleculares y en especial cuando se tienen infecciones mixtas [Wielinga and Thompson, 2007; Faria et al,2016]. En un estudio realizado por Pallant y colaboradores [Pallant et al., 2015] donde genotipificaron muestras de caninos y gatos con el uso de tres marcadores moleculares (gdh, bg, SSUr RNA) describen el éxito de amplificación del 70 % de las muestras; al igual que Minetti y colaboradores [Minetti et al., 2011] que reportan el éxito de amplificación de un 73 % de las muestras usando los marcadores moleculares anteriormente descritos. Estos resultados contrastan con el estudio realizado por Rodríguez y colaboradores [Rodriguez et al., 2014] que describen solo un 58,97 % de amplificación con un solo marcador molecular. El porcentaje de muestras que no amplificaron es atribuido por la literatura a múltiples factores, partiendo de la premisa que cada muestra presenta desafíos únicos para su amplificación; pero la amplificación de ADN a partir de heces representa un reto agregado. Se deben tomar en cuenta múltiples factores para lograr la amplificación de una muestra a partir de heces tales como: la carga parasitaria; aquellas muestras que tengan baja cantidad de quistes del parásito tendrán un alta probabilidad de fracaso en su amplificación por el bajo contenido de ADN parasitario; sumado a ello los inhibidores naturales que se encuentran en este tipo de muestras como alimentos que no fueron metabolizados completamente por el hospedero, enzimas digestivas, moco del epitelio y

bilirrubina, para mencionar solo algunos [Menghi et al, 2006]. Se debe considerar también el conservante que se utilizará para almacenar la muestra de heces para evitar la degradación del ADN parasitario; en un estudio realizado por Wilke y Robertson [Wilke and Robertson, 2009] usaron diferentes sustancias para conservar las muestras de heces que contenían los quistes del parásito y luego evaluaron su amplificación con biología molecular; demostraron que los conservantes con mejor rendimiento en el análisis molecular fueron aquellas guardadas en alcohol al 70 % y dicromato de potasio al 2.5 % a diferencia de los pobres resultados obtenidos con sustancias como formalina y PBS. Faria y colaboradores, Wilke y Robertson y Salih y colaboradores [Faria et al., 2016; Wilke and Robertson, 2009; Salih et al., 2012] proponen que también se debe considerar el tiempo de extracción y conservación del ADN junto con el tiempo en el que se realiza el análisis después de haber realizado la extracción para evitar la degradación del material genético y obtener un mejor rendimiento de amplificación. Por ende la amplificación del ADN a partir de heces depende de múltiples factores como la cantidad de marcadores utilizados, cantidad inhibidores naturales que contiene este tipo de muestras, así como la forma de conservación de las muestras y también el tiempo desde la recolección hasta su procesamiento para evitar la degradación del ADN parasitario.

La amplificación con los marcadores moleculares usados se comportó de manera diferente. Los genes tpi y SSur RNA amplificaron el 100 % de las muestras; mientras que el gen gdh con modalidad uniplex y anidada amplificaron en un 59 % y 41 % respectivamente y por último el gen bg en 22 %. En concordancia con los resultados de este estudio, los estudios realizados por Pallant y colaboradores [Pallant et al., 2015], Sommer y colaboradores [Sommer et al.,

2015] y Faria y colaboradores [Faria et al., 2017] demostraron que la mayor amplificación la lograron en los genes tpi y SSU rRNA y los marcadores que amplificaron pobremente fueron el gen bg y el gen gdh. Lebbad y colaboradores [Lebbad et al.,2011] sugieren que los mejores marcadores para este tipo de estudio son el gen tpi junto al gen SSUr RNA. En contraste con nuestros resultados, Tangtrongsup y colaboradores [Tangtrongsup et al,2017] describen que es el gen gdh que tiene la mayor amplificación y el gen tpi el que menos amplificó las muestras.

El uso de la microscopía como única herramienta para detectar la presencia del parásito así como el análisis de una sola muestra pueden ser considerados como limitaciones en este estudio. Se ha demostrado que el examen de una única muestra de heces tiene una sensibilidad de entre 35-50 % pero la realización de técnicas de concentración y el estudio seriado de heces incrementan la sensibilidad hasta un 70 % [Hill, 2001] y acompañado del bajo número de quistes encontrados en la mayoría de las muestras debido a la excreción intermitente de quistes del parásito [ Faria et al., 2017; Sommer et al. 2015] explican la causa del porqué solo se encontró una positividad de 7.4 % en las muestras de los niños y en las muestras de los caninos ninguna reveló la presencia del quiste del parásito. En este estudio las 26 muestras de caninos se sometieron al análisis molecular, logrando la amplificación de 4 muestras; teniendo así una positividad de un 15 % por biología molecular, este resultado evidencia la sensibilidad de las técnicas de biología molecular con respecto a la microscopía que depende del expertise del microscopista [Amar et al., 2001].

## CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

1. La frecuencia de los genotipos de *Giardia intestinalis* causantes de infección en niños en Linaca aldea del municipio de Tatumbla, Departamento de Francisco Morazán, Honduras, durante el año 2016 fue la siguiente: Infección mixta del genotipo A y genotipo B, 15/18 (83.33 %); solo genotipo A 2/18 ( 11.11 %), solo genotipo B 1/18 (5.55 %).
2. La frecuencia de los genotipos de *Giardia intestinalis* causantes de infección en caninos en Linaca aldea del municipio de Tatumbla, Departamento de Francisco Morazán, Honduras, durante el año 2016 fue la siguiente: genotipo A en 1/4 (25 %), e infección mixta de los genotipos A/B en 3/4 (75 %).
3. Se reporta por primera vez los genotipos zoonóticos A y B de *Giardia intestinalis* causantes de infección en niños y caninos de la aldea de Linaca, municipio de Tatumbla; siendo estos los primeros datos de epidemiología molecular del parásito en el país, provenientes del área de estudio.
4. En el área de estudio las infecciones mixtas fueron más comunes que las infecciones con solo un tipo en las muestras tanto de los niños y caninos.
5. De las dieciocho muestras niños y cuatro muestras de caninos analizadas se logró una amplificación del 100% con al menos un marcador molecular para determinar el genotipo presente en la muestra.

## **CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS**

1. En el futuro se deberá determinar si los aislados de niños y caninos son idénticos para esclarecer si habría un vínculo zoonótico entre ellos.
2. En este estudio no se correlacionó la sintomatología de los pacientes con los genotipos encontrados, siendo la mira para próximos estudios.
3. La extracción de ADN a partir de heces representa un reto, por lo cual se recomienda tomar en consideración la carga parasitaria de las muestras, la solución conservante, los inhibidores naturales que contiene este tipo de muestra y el método de ruptura y extracción de ADN para lograr amplificación de las muestras.
4. En futuros estudios se debe ampliar el número de muestras y aumentar la diversidad geográfica del muestreo para obtener una mejor perspectiva de los genotipos de *Giardia intestinalis* presentes en el país, siendo lo antes mencionado limitaciones de este estudio

## CAPÍTULO 8: REFERENCIAS

1. Abou-Shady O, El Raziky MS, Zaki MM, Mohamed RK. 2011. Impact of *Giardia lamblia* on growth, serum levels of zinc, copper, and iron in Egyptian children. *Biological trace element research* 140(1):1-6.
2. Adam RD. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical microbiology reviews* 14(3):47-475.
4. Amar CF, Dear PH, Pedraza-Diaz S, Looker N, Linnane E, McLauchlin J. 2002. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *Journal of clinical microbiology* 40(2):446-452.
5. Andrews RH, Adams M, Boreham PF, Mayrhofer G, Meloni BP. 1989. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *International journal for parasitology* 19(2):183-190.
6. Ankarklev J, Hestvik E, Lebbad M, Lindh J, Kaddu-Mulindwa DH, Andersson JO, Tylleskar T, Tumwine JK, Svard SG. 2012. Common coinfections of *Giardia intestinalis* and *Helicobacter pylori* in non-symptomatic Ugandan children. *PLoS neglected tropical diseases* 6(8):e1780.
7. Ankarklev J, Jerlstrom-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svard SG. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature reviews*

Microbiology 8(6):413-422.

8. Ballweber LR, Xiao L, Bowman DD, Kahn G, Cama VA. 2010. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends in parasitology* 26(4):180-189.
9. Beck R, Sprong H, Pozio E, Caccio SM. 2012. Genotyping *Giardia duodenalis* isolates from dogs: lessons from a multilocus sequence typing study. *Vector borne and zoonotic diseases* 12(3):206-213.
10. Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J. 2005. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 43(12):5940-5944.
11. Betancourt WQ, Rose JB. 2004. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary parasitology* 126(1-2):219-234.
12. Boontanom P, Mungthin M, Tan-Ariya P, Naaglor T, Leelayoova S. 2011. Epidemiology of giardiasis and genotypic characterization of *Giardia duodenalis* in preschool children of a rural community, central Thailand. *Tropical biomedicine* 28(1):32-39.
13. Budu-Amoako E, Greenwood SJ, Dixon BR, Barkema HW, McClure JT. 2011. Foodborne illness associated with *Cryptosporidium* and *Giardia* from livestock. *J Food Prot* 74(11):1944-1955.
14. Caccio SM, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E. 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International journal for parasitology* 38(13):1523-1531.

15. Caccio SM, De Giacomo M, Pozio E. 2002. 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. *International journal for parasitology* 32(8):1023-1030.
16. Caccio SM, Sprong H. 2010. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Experimental parasitology* 124(1):10717. Cantey PT, Roy S, Lee B, Cronquist A, Smith K, Liang J, Beach MJ. 2011. Study of nonoutbreak giardiasis: novel findings and implications for research. *The American journal of medicine* 124(12):1175 e1171-1178.
18. Cedillo-Rivera R, Darby JM, Enciso-Moreno JA, Ortega-Pierres G, Ey PL. 2003. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. *Parasitology research* 90(2):119-123.
19. Cooper MA, Adam RD, Worobey M, Sterling CR. 2007. Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Current biology : CB* 17(22):1984-1988.
20. Cooper MA, Sterling CR, Gilman RH, Cama V, Ortega Y, Adam RD. 2010. Molecular analysis of household transmission of *Giardia lamblia* in a region of high endemicity in Peru. *The Journal of infectious diseases* 202(11):1713-1721.
21. Cotton JA, Beatty JK, Buret AG. 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *International journal for parasitology* 41(9):925-933.

22. Eligio-Garcia L, Cortes-Campos A, Jimenez-Cardoso E. 2005. Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasitology research* 97(1):1-6.
23. Eligio-Garcia L, Cortes-Campos A, Jimenez-Cardoso E. 2008. Classification of *Giardia intestinalis* isolates by multiple polymerase chain reaction (multiplex). *Parasitology research* 103(4):797-800.
24. Eppig C, Fincher C, Thornhill R. 2010. Parasite prevalence and the worldwide distribution of cognitive ability. *The Royal Society*.. Páginas 1-8.25. Faria, C.P., Zanini, G.M., Dias, G.S., da Silva, S., Sousa, M.C., 2016. Molecular characterization of *Giardia lamblia*: first report of assemblage B in human isolates from Rio de Janeiro (Brazil). *PLoS One* 11(8), e0160762.
26. Farzan A, Parrington L, Coklin T, Cook A, Pintar K, Pollari F, Friendship R, Farber J, Dixon B. 2011. Detection and characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. on swine farms in Ontario, Canada. *Foodborne Pathog Dis* 8(11): 1207-1213.
27. Feng Y, Xiao L. 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical microbiology reviews* 24(1):110-140.
28. Foronda P, Bargues MD, Abreu-Acosta N, Periago MV, Valero MA, Valladares B, Mas-Coma S. 2008. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitology research* 103(5):1177-1181.
29. Galindo L, Almannoni S. 2009. *Giardiasis*. La Habana.
30. Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM. Molecular characterization of hu-

- man isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop.* 2007;102:92-9.
31. Guy RA, Xiao C, Horgen PA. 2004. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. *Journal of clinical microbiology* 42(7):3317-3320.
  32. Hazrati Tappeh K, Manafi G, Asgharzadeh M, Manafi F. 2014. Incidence of *Giardia lamblia* Subspecies by PCR-RFLP in Stool Specimens of Hospitalized Children at Urmia Mutahhari Hospital, West Azerbaijan Province, Iran. *Iran J Parasitol* 9(4):541-547.
  33. Hill DR. 2001. In *Principles and practice of clinical parasitology*
  34. Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol* 83(1):44-51.
  35. Hunter PR, Thompson RC. 2005. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International journal for parasitology* 35(11-12):1181-1190.
  36. Huruy K., Kassu A., Mulu A., Worku N., Fetene T., Gebretsadik S., Biadgdlegne F., Belyhun Y., Muche A., Gelaw A., Anagaw B., Yifru S., Wondie Y., Bekele A., Tiruneh M., Reissig D., Moges F. Intestinal parasitosis and shigellosis among diarrheal patients in Gondar teaching hospital, northwest Ethiopia. *BMC ResearchNotes.* 2011; 4(472):1-8.
  37. John DT, Petri WA. 2006. *Markell and Voge's Medical Parasitology*, Philadelphia.
  38. Kaminsky R, Groothousen CM, Zúniga AM, Contreras M, Ferrera AM, Henríquez KC. 2014. *Toxocara canis* infection in dogs and risk of human toxocariasis, Hon-

duras..pdf>.

39. Kaminsky RG. 1991. Parasitism and diarrhoea in children from two rural communities and marginal barrio in Honduras. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85(1):70-73.
40. Katz DE, Heisey-Grove D, Beach M, Dicker RC, Matyas BT. 2006. Prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission. *Epidemiology and Infection* 134(5):935-941.
41. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Caccio SM. 2005. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International journal for parasitology* 35(2):207-213.
42. Lauwaet T, Davids BJ, Reiner DS, Gillin FD. 2007. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Current opinion in microbiology* 10(6):554-559.
43. Lebbad M, Ankarklev J, Tellez A, Leiva B, Andersson JO, Svard S. 2008. Dominance of *Giardia* assemblage B in Leon, Nicaragua. *Acta tropica* 106(1):44-53.
44. Lebbad M, Mattsson JG, Christensson B, Ljungstrom B, Backhans A, Andersson JO, Svard SG. 2010. From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Veterinary parasitology* 168(3-4):231-239.
45. Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, Botero-Kleiven S, Andersson JO, Svenungsson B, Svard SG. 2011. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS Negl Trop Dis* 5(8):e1262.
46. Lindarte G, Tamayo M, Isaza M., Osorio L. 2011. Investigación científica sobre geno-

- tipificación y distribución de *Giardia intestinalis* en humanos y caninos de América.
47. Leonhard S, Pfister K, Beelitz P, Wieling C, Thompson RCA (2007) The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Vet Parasitol* 150:33–38. doi:10.1016/j.vetpar.2007.08.034
  48. Lobo ML, Xiao L, Antunes F, Matos O. 2009. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. *Letters in applied microbiology* 48(6):732-737.
  49. Maia-Brigagao C, Morgado-Diaz JA, De Souza W. 2012. *Giardia* disrupts the arrangement of tight, adherens and desmosomal junction proteins of intestinal cells. *Parasitology international* 61(2):280-287.
  50. Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. 1995. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology* 111 ( Pt 1):11-17.
  51. McIntyre L, Hoang L, Ong CS, Lee P, Isaac-Renton JL. 2000. Evaluation of molecular techniques to biotype *Giardia duodenalis* collected during an outbreak. *The Journal of parasitology* 86(1):172-177.
  52. Minetti, C., Lamden, K., Durband, C., Cheesbrough, J., Fox, A., Wastling, J.M., 2015. Determination of *Giardia duodenalis* assemblages and multi-locus genotypes in patients with sporadic giardiasis from England. *Parasit. Vectors* 8, 444.
  53. Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA. 2008. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst*

Oswaldo Cruz 103(1):98-103.

54. Menghi CI, Gatta CL, Makiya R, Cesar Méndez O. 2006. Detección molecular de *Dientamoeba fragilis* en heces: eliminación de los inhibidores de la DNA polimerasa. *Parasitología latinoamericana*.61 (3-4):146-51
55. Mohammed Mahdy AK, Lim YA, Surin J, Wan KL, Al-Mekhlafi MS. 2008. Risk factors for endemic giardiasis: highlighting the possible association of contaminated water and food. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102(5):465-470.
56. Molina N, Polverino D, Minvielle M, Basualdo J. 2007. PCR amplification of triosephosphate isomerase gene of *Giardia lamblia* in formalin-fixed feces. *Revista latinoamericana de microbiología* 49(1-2):6-11.
57. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. 2003. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 3(1):29-38.
58. Olson ME, Ceri H, Morck DW. 2000. *Giardia* vaccination. *Parasitology today* 16(5): 213-217.
59. Okhuysen, P. 2012. Traveler's diarrhea due to intestinal protozoa. *Clinical infectious diseases*.; 33:110-114.
60. Panaro MA, Cianciulli A, Mitolo V, Mitolo CI, Acquafredda A, Brandonisio O, Cavallo P. 2007. Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite *Giardia intestinalis*. *FEMS immunology and medical microbiology* 51(2): 302-309.

61. Pallant L, Barutzki D, Schaper R, Thompson RC (2015) The epidemiology of infections with *Giardia* species and genotypes in well cared for dogs and cats in Germany. *Parasites & Vectors* 8:2 doi:10.1186/
62. Pelayo L, Nunez FA, Rojas L, Furuseh Hansen E, Gjerde B, Wilke H, Mulder B, Robertson L. 2008. *Giardia* infections in Cuban children: the genotypes circulating in a rural population. *Annals of tropical medicine and parasitology* 102(7):585-595.
63. Perez Cordon G, Cordova Paz Soldan O, Vargas Vasquez F, Velasco Soto JR, Sempere Bordes L, Sanchez Moreno M, Rosales MJ. 2008. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. *Parasitology research* 103(2):459-465.
64. Pestehchian N, Rasekh H, Babaei Z, Yousefi HA, Eskandarian AA, Kazemi M, Ak-bari M. 2012. Identification of genotypes of *Giardia duodenalis* human isolates in Isfahan, Iran, using polymerase chain reaction - Restriction Fragment Length polymorphism. *Adv Biomed Res* 1:84.
65. Ponce-Macotella M, Martinez-Gordillo MN, Bermudez-Cruz RM, Salazar-Schettino PM, Ortega-Pierres G, Ey PL. 2002. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *International journal for parasitology* 32(9):1201-1202.
66. Ramirez JD, Heredia RD, Hernandez C, Leon CM, Moncada LI, Reyes P, Pinilla AE, Lopez MC. 2015. Molecular diagnosis and genotype analysis of *Giardia duodenalis* in asymptomatic children from a rural area in central Colombia. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious*

- diseases 32:208-213.
67. Ravid Z, Duque S, Arevalo A, Nicholls RS, Wasserman M. 2007. Genetic diversity of *Giardia intestinalis* populations in Colombia. *Biomedica* 27(1):34-41.
  68. Read CM, Monis PT, Thompson RC. 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 4(2):125-130.
  69. Roberts L, Schmidt G, Janovy J. 2009. *Other Flagellated Protozoa*: McGraw-Hill Higher Education.
  70. Robertson LJ, Sprong H, Ortega YR, van der Giessen JW, Fayer R. 2014. Impacts of globalisation on foodborne parasites. *Trends in parasitology* 30(1):37-52.
  71. Roxstrom-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svard SG. 2006. *Giardia* immunity--an update. *Trends in parasitology* 22(1):26-31.
  72. Ryan U, Caccio SM. 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *International journal for parasitology* 43(12-13):943-956.
  73. Savioli L, Smith H, Thompson A. 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in parasitology* 22(5):203-208.
  74. Salih K, Yazar, Suleyman, & Cetinkaya, Ulfet. (2012). Stool sample storage conditions for the preservation of *Giardia intestinalis* DNA. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(8), 965-968.
  75. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000800001>.
  76. Smith HV, Caccio SM, Tait A, McLauchlin J, Thompson RC. 2006. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in

humans. *Trends in parasitology* 22(4):160-167.

77. Souza SL, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HF, Funada MR, Cortez A, Gregori F, Soares RM. 2007. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Veterinary parasitology* 149(3-4):258-264.
78. Sprong H, Caccio SM, van der Giessen JW, network Z, partners. 2009. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS neglected tropical diseases* 3(12):e558.
79. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L. 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging infectious diseases* 9(11):1444-1452.
80. Thompson RC, Monis PT. 2004. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in parasitology* 58:69-137.
81. Thompson RC, Palmer CS, O'Handley R. 2008. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Veterinary journal* 177(1):18-25.
82. Traub RJ, Robertson ID, Irwin P, Mencke N, Thompson RC. 2002. The role of dogs in transmission of gastrointestinal parasites in a remote tea-growing community in northeastern India. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 67(5):539-545.
83. Tungtrongchitr A, Sookrung N, Indrawattana N, Kwangsi S, Ongrotchanakun J, Chaicumpa W. 2010. *Giardia intestinalis* in Thailand: identification of genotypes. *J*

- Health Popul Nutr 28(1):42-52.
84. Vázquez TO, Campos RT. 2009. <Giardiasis. La parasitosis más.pdf>.
85. Vidal IdEIyPA. 2005. <Manual de Manejo de enfermedades parasitarias prioritarias en Hon- duras,2005.pdf>.8-12.
86. Wielinga CM, Thompson RCA (2007) Comparative evaluation of *Giardia* duodenalis sequence data. *Parasitology* 134:1795–1821.doi:10.1017/S0031182007003071
87. Wilke H, Robertson LJ 2009. Preservation of *Giardia* cysts in stool samples for subsequent PCR analysis. *J Microbiol Methods* 78: 292-296.
88. World Health Organization, UNICEF. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done, 1-44. New York, NY, USA, and Geneva, Switzerland; 2009.
89. Yason JA, Rivera WL. 2007. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. *Parasitol Res* 101(3):681-687.
90. Younas M, Shah S, Talaat A. 2008. Frequency of *Giardia lamblia* infection in children with recurrent abdominal pain. *JPM The Journal of the Pakistan Medical Association* 58(4):171-174.
91. Zheng G, Alsarakibi M, Liu Y, Hu W, Luo Q, Tan L, Li G. 2014. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from dogs in Guangdong, China based on multi-locus sequence. *The Korean journal of parasitology* 52(3):299-304.

# **ANEXOS**

## **ANEXO 1. APROBACIÓN DE COMITÉ DE ÉTICA CEI-MEIZ**



**UNAH**

FACULTAD DE CIENCIAS  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN  
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

**CONSTANCIA DE RESOLUCIÓN  
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN No. 03-2016**

Por este medio el Comité de Ética de Investigación de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (CEI-MEIZ) hace CONSTAR que el proyecto de investigación:

**Título:** "Genotipificación de *Giardia intestinalis* en niños en edad escolar y animales (perros y cerdos) en Linaca aldea del Municipio de Tatumbla, Departamento de Francisco Morazán, Honduras, durante el año 2016"

**Presentado por los Investigadores:** Dr. Gustavo Adolfo Fontecha (Investigador Principal y Asesor de tesis), Estefanía Cuellar Macías (Estudiante MEIZ Co-Investigadora) y José Lisando Mendoza (Estudiante SS Co-investigador).

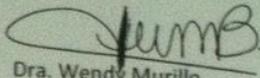
**Institución (es):** Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH)

**Fecha de presentación al comité:** 04 / 05 / 2016

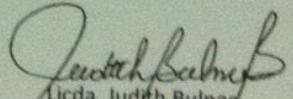
Fue sometido a un proceso de revisión y análisis, y en consecuencia fue **APROBADO**

**Duración de la aprobación:** 15 / 06 / 2016 al 15 / 06 / 2017

Para los fines de los interesados se les extiende la presente a los catorce días del mes de junio de 2016.

  
Dra. Wendy Murillo  
Presidente CEI-MEIZ



  
Licda. Judith Bulnes  
Secretaria CEI-MEIZ

ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Universidad Nacional Autónoma de Honduras

## Consentimiento Informado

Genotipificación de *Giardia intestinalis* en niños en edad escolar y animales (caninos y cerdos) en Linaca aldea del municipio de Tatumbla, Departamento de Francisco Morazán, Honduras, durante el año 2016.

### Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas

**Por favor lea esta hoja cuidadosamente, si no entiende algo pregunte y le explicaremos, conserve esta hoja durante todo el estudio.**

Señor padre de familia ¿Le gustaría que su hijo(a) participará en esta investigación basado en la búsqueda de una infección intestinal causada por un parásito llamado Giardia intestinalis?

La giardiosis, causada por el parásito Giardia intestinalis, constituye una de las parasitosis de gran importancia epidemiológica y clínica por su alta prevalencia como causante de infección, fundamentalmente entre la población infantil. Estos niños están en máximo riesgo de sufrir las consecuencias crónicas de la infección por Giardia intestinalis, como síndrome de malabsorción, retraso psicomotor y retraso en el crecimiento.

La participación es completamente voluntaria no tendrá que pagar nada y tampoco recibirá ninguna compensación o pago por ello; sin embargo, su participación nos ayudara a conocer el número de casos de Giardia intestinalis en el área donde usted vive y posteriormente la caracterización genética (genotipo y subtipo) del parásito. Si decide no participar no habrá ningún problema. Si usted y su hijo (a) más adelante deciden salirse del estudio, pueden hacerlo en cualquier momento, su decisión siempre será respetada.

Si usted y su hijo (a) deciden participar le haremos algunas preguntas personales, sobre su salud y medidas que usted utiliza para prevenir o eliminar la presencia de Giardia intestinalis, además nos brindará una muestra de heces para identificar la infección parasitaria por Giardia intestinalis.

La cantidad de heces debe ser del tamaño de una nuez. La muestra será transportada al laboratorio de la Maestría en enfermedades Infecciosas y Zoonóticas de la Escuela de Microbiología de la UNAH, Tegucigalpa donde se realizarán los análisis.

Este estudio no implica ningún riesgo para la salud. Como parte de beneficio del estudio se le realizará un examen general de heces a la muestra de heces y se le notificará su resultado; en caso de requerir tratamiento (desparasitante) se le proveerá con indicación médica.

Toda la información que usted y su hijo(a) nos provean será guardada en un archivo con llave; de igual forma se procederá con los resultados de laboratorio; solo el personal del estudio podrá ver esta información. Los resultados de esta investigación podrían ser publicados en reportes o revistas, en inglés o español. No usaremos su nombre en ninguna publicación.

Finalmente, solicitamos su autorización para guardar sus muestras y datos para investigaciones futuras de otras enfermedades infecciosas. Esta autorización quedará registrada en este documento (del cual usted tendrá una copia y nosotros otra). Si usted no está de acuerdo, su muestra y datos se guardarán hasta el final de este estudio y luego serán destruidos.

¿Esta Ud. de acuerdo en dejarnos guardar su muestra y la información de su cuestionario para estudios futuros? Por favor marque alguna de las casillas:

SI  NO

---

Nombre de la persona que obtiene el consentimiento      Firma      Fecha

#### DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO

Me han explicado este estudio completamente a mí y a mí hijo (a) y hemos accedido voluntariamente a participar en él. Mi hijo (a) y yo hemos tenido la oportunidad de hacer preguntas. Mi hijo (a) y yo entendemos que cualquier pregunta que nosotros podamos tener en el futuro acerca del estudio será respondida por los investigadores.

---

Nombre del participante      Firma      Fecha

---

Nombre del padre o guardián legal      Firma      Fecha

**MUCHAS GRACIAS POR SU AYUDA Y VALIOSO TIEMPO**

### **ANEXO 3 . ASENTIMIENTO INFORMADO**

#### **Universidad Nacional Autónoma de Honduras Asentimiento Informado Participantes entre 8 y 17 años de edad**

Genotipificación de *Giardia intestinalis* en niños en edad escolar y animales (caninos y cerdos) en Linaca aldea del municipio de Tatumbla, departamento de Francisco Morazán, Honduras, durante el año 2016

#### **Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas**

Vamos a realizar un estudio para tratar de descubrir un bicho que puede estar haciéndote sentir mal.

Si aceptas estar en el estudio se te hará algunas preguntas por ejemplo si tienes dolor de estómago, diarrea, vómito y otras preguntas, y nos darás una muestra heces.

Puedes preguntar las veces que gustes. Además, si luego ya no quieres seguir en el estudio puedes retirarte en cualquier momento. Nadie puede enojarse contigo si decides que no quieres estar o continuar en el estudio. Recuerda, no tienes que participar en el estudio si no quieres. Este estudio no implica ningún riesgo para tu salud.

La cantidad de heces no debe ser del tamaño de una nuez. La muestra será transportada al laboratorio de la Maestría en enfermedades Infecciosas y Zoonóticas de la Escuela de Microbiología de la UNAH, Tegucigalpa donde se realizarán los análisis.

Toda la información que nos proveas será guardada en un archivo con llave; de igual forma se procederá con los resultados de laboratorio; solo el personal del estudio podrá ver esta información. Los resultados de esta investigación podrían ser publicados en reportes o revistas, en inglés o español. No usaremos tu nombre en ninguna publicación.

Finalmente, solicitamos tu autorización para guardar tus muestras y datos para investigaciones futuras de otras enfermedades infecciosas. Esta autorización quedará registrada en este documento. Si no está de acuerdo, su muestra y datos se guardarán hasta el final de este estudio y luego serán destruidos.

Si firmas este papel quiere decir que leíste o alguien te lo leyó y que quieres estar en el estudio. Si no quieres estar en el estudio, no lo firmes.

Si aceptas participar, por favor coloca tu nombre y tú firma justo aquí debajo

---

Nombre del niño o niña (letra imprenta)      Edad      Fecha

---

Nombre del padre o guardian legal      Firma      Fecha

---

Nombre de la persona que obtiene el asentimiento (letra imprenta)

---

Firma de la persona que obtiene el asentimiento      Fecha

**MUCHAS GRACIAS POR SU AYUDA Y VALIOSO TIEMPO**

#### **ANEXO 4. AUTORIZACIÓN TOMA MUESTRA ANIMAL**

**Universidad Nacional Autónoma de Honduras**  
**Autorización toma muestra animal (perro y cerdo)**

Genotipificación de *Giardia intestinalis* en niños en edad escolar y animales (caninos y cerdos) en Linaca aldea del municipio de Tatumbla, departamento de Francisco Morazán, Honduras, durante el año 2016

**Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas**

**Por favor lea esta hoja cuidadosamente, si no entiende algo pregunte y le explicaremos, conserve esta hoja durante todo el estudio.**

*Giardia intestinalis* infecta al ser humano, así como a los animales. Los animales infectados por este parásito pueden presentar heces blandas, diarreicas y pérdida de peso y juegan un papel importante en la propagación del parásito a otros animales y a los humanos.

Nos gustaría saber si usted nos brinda una muestra de heces de su animal o animales (perro (s) y cerdo (s)) con el fin de realizar una investigación para saber si su animal tiene una infección por el parásito llamado *Giardia intestinalis* y posteriormente realizar análisis moleculares.

Su autorización es completamente voluntaria no tendrá que pagar nada y tampoco recibirá ninguna compensación o pago por ello; sin embargo, su autorización nos ayudara a conocer el número de casos por *Giardia intestinalis* en animales en la zona donde usted vive. Si decide no participar no habrá ningún problema. La decisión tomada no afectara la integridad del animal y la toma de muestra no representa un riesgo para el o los animales. Si usted más adelante decide salirse del estudio, pueden hacerlo en cualquier momento, su decisión siempre será respetada.

Toda la información que nos provean será guardada en un archivo con llave; de igual forma se procederá con los resultados de laboratorio; solo el personal del estudio podrá ver esta información. Los resultados de esta investigación podrían ser publicados en reportes o revistas, en inglés o español. No usaremos su nombre e ninguna publicación.

Finalmente, solicitamos su autorización para guardar la muestra y datos para investigaciones futuras de otras enfermedades infecciosas. Esta autorización quedará registrada en este documento (del cual usted tendrá una copia y nosotros otra). Si usted no está de acuerdo, la muestras y datos se guardaran hasta el final de este estudio y luego serán destruidos.

¿Está Ud. de acuerdo en dejarnos guardar su muestra y la información de su cuestionario para estudios futuros? Por favor marque alguna de la casilla: SI NO

#### DECLARCIÓN DEL VOLUNTARIO

Me han explicado este estudio completamente y he accedido voluntariamente a autorizar la toma de muestra de heces de mi perro (s) o cerdo (s).

---

Nombre propietario animal                      Firma del propietario animal                      Fecha

Nombre del animal	Código asignado
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	

**MUCHAS GRACIAS POR SU AYUDA Y VALIOSO TIEMPO**

**ANEXO 5. FICHA REGISTRO**

**Universidad Nacional Autónoma de Honduras**  
**Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas**  
**Ficha Registro**

Genotipificación de *Giardia intestinalis* en niños en edad preescolar y animales (caninos y cerdos) en Linaca aldea del municipio de Tatumbla, Departamento de Francisco Morazán, Honduras, durante el año 2016.

Código:

Nombre completo:

Fecha nacimiento:

Edad      años      meses      Sexo:

Lugar de nacimiento:

Residencia (últimos cinco años):

Ocupación:

Eliminación de excretas

Red cloacal

Pozo

Letrina

Aire libre

Tratamiento de agua

Sistema municipal

Filtro

Cloración

Ninguno

¿Se lava las manos antes de comer? Siempre  A veces  Nunca

¿Se lava las manos luego de ir al baño? Siempre  A veces  Nunca

¿Lava la verdura que consume? Siempre  A veces  Nunca

Signos/Síntomas Humanos

Tiempo duración síntomas

Diarrea:	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	_____
Vómitos:	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	_____
Pérdida apetito:	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	_____
Fiebre inexplicable:	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	_____
Decaimiento:	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	_____
Dolor abdominal:	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	_____
Estreñimiento	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	_____
Flatulencia	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	_____
Otro síntoma	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	_____

Animales:

Código dado a la muestra perro(s):

¿Lugar en donde se encuentran los animales?

Adentro del domicilio

Afuera del domicilio

En los últimos meses alguno de sus animales ha estado enfermo: Si  No

Si su respuesta fue sí que síntomas presento: \_\_\_\_\_ Tiempo duración síntomas

Diarrea Si  No  \_\_\_\_\_

Heces blandas Si  No  \_\_\_\_\_

Pérdida de peso Si  No  \_\_\_\_\_

Otro Síntomas

Código dado a la muestra cerdo:

¿Lugar en donde se encuentran los animales?

domicilio

Adentro del

Afuera del domicilio

En los últimos meses alguno de sus animales ha estado enfermo: Si  No

Si su respuesta fue sí que síntomas presento: Tiempo duración síntomas

Diarrea Si  No  \_\_\_\_\_

Heces blandas Si  No  \_\_\_\_\_

Pérdida de peso Si  No  \_\_\_\_\_

Otro Síntomas:

## ANEXO 6. PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDAR

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS



### PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTÁNDAR

**“Genotipificación de *Giardia intestinalis* en niños en edad escolar y animales (perros y cerdos) en Linaca aldea del Municipio de Tatumbla, Departamento de Francisco Morazán, Honduras, durante el año 2016.”**

Aprobado por: Gustavo A. Fontecha S.	Fecha: 28 / 04 / 2016.
Firma: 	

## ANEXO 7. POE MICROSCOPIA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS		
Facultad de Ciencias Escuela de Microbiología		
Examen Microscópico de Materia Fecal.	Código: POEMICROSCOPIA	Página: 1 de 2
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

**OBJETIVO:** Realizar correctamente el examen microscópico de materia fecal humana y animal con el fin de encontrar quistes de *Giardia intestinalis*.

**UNIDAD DE ANÁLISIS:** Muestras de materia fecal humana y animal (perro y cerdo).

### REACTIVOS:

Solución Salina 0.85%

Solución de lugol

### MATERIALES Y EQUIPO:

Bata de Laboratorio

Guantes

Porta-objetos 7.5 X 2.5 cm

Cubreobjetos 22 X 22 mm

Frasco con desinfectante para descartar material (cloro)

### PROCEDIMIENTO:

1. Identificar el porta objetos con la muestra a examinar.
2. Colocar 1 gota de solución salina en un extremo del portaobjetos y 1 gota de lugol en el otro extremo.
3. Con un aplicador tomar una muestra de heces y hacer una emulsión uniforme, primero en la gota de solución salina, y luego en la solución de lugol. Calcular más o menos 1.5-2 mg de heces.
4. Cubrir cada preparación con un cubreobjetos.
5. Observar, primero con el objetivo de 10X, en forma sistemática toda la preparación en solución salina. Para confirmar estructuras, usar objetivo 40 X.
6. Para asegurar un control calidad Verificar que la solución salina este limpia, sin contaminación de bacterias, hongos.
7. Verificar que la solución de lugol tenga la concentración adecuada.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS Facultad de Ciencias Escuela de Microbiología		
Examen Microscópico de Materia Fecal.	Código:	Página: 2 de 2
	POEMICROSCOPIA	
Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas		

**REFERENCIA:**

1. Kaminsky RG. 2003. Manual Parasitología: UNAH. Métodos para Laboratorios de Atención Primaria de Salud. Honduras.

**ANEXOS:**

**Anexo 1: Preparación de Solución salina fisiológica**

Cloruro de sodio 8.5 g

Agua destilada 1000 mL

Mezclar y guardar en frasco rotulado y tapado. Para usar dispensar en frascos goteros rotulados.

**Anexo 2: Solución Lugol. Solucion Madre**

Iodo en cristales 2.5 g

Ioduro de potasio 5.0 g

Agua destilada 50 mL

Mezclar en un matraz hasta disolución completa de los cristales. Guardar en frasco oscuro rotulado (solución madre). Para utilizar, diluir 0.5 mL de esta solución stock en 5.0 ml de agua destilada y mantener en frasco gotero color ambar rotulado.

## ANEXO 8. POE CONCENTRACIÓN DE QUISTES

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS		
Facultad de Ciencias		
Escuela de Microbiología		
Método de concentración Sheatter	Código:	Página: 1 de 2
	POECONCENTRACIÓN	
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

**OBJETIVO:** Realizar correctamente la concentración de quistes de *Giardia intestinalis*.

**UNIDAD DE ANÁLISIS:** Quistes de *Giardia intestinalis*.

### REACTIVOS:

Solución de Sheatter

Solución Salina 0.85%

Solución de Iugol

### MATERIALES Y EQUIPO:

Tubo Falcon cónico de 50 mL.

Aplicador de madera

Gasas quirúrgicas

Centrifuga

Tubo eppendorf 1.5 ml

Porta-objetos, 7.5 X 2.5 cm

Cubreobjetos, 22 X 22 mm

### PROCEDIMIENTO:

1. Coloque 5-10 g de heces en un tubo Falcon cónico de 50 mL.  
Agregue 40 ml de Solución de Sheatter
2. Homogenice la mezcla con aplicadores de madera hasta lograr una suspensión homogénea
3. Pase la suspensión por cuatro capas de gasa quirúrgica.
4. Centrifugue a 3000 rpm durante 10 minutos.
5. Transfiera 1 ml de la capa superior a un tubo eppendorf.
6. Observar por medio del microscopio los quistes para asegurar su presencia.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS

Facultad de Ciencias

Escuela de Microbiología



Método de concentración Sheatter	Código:	Página: 2 de 2
	POECONCENTRACIÓN	
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

#### REFERENCIAS:

1. Budu-Amoako E, Greenwood SJ, Dixon BR, Barkema HW, McClure JT. Foodborne illness associated with *Cryptosporidium* and *Giardia* from livestock. *J Food Prot.* 2011;74(11):1944-55. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-107. PubMed PMID: 22054199.

2. Farzan A, Parrington L, Coklin T, Cook A, Pintar K, Pollari F, et al. Detection and characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. on swine farms in Ontario, Canada. *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8(11):1207-13. doi: 10.1089/fpd.2011.0907. PubMed PMID: 21675863.

3. Sheather AL. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *Journal of Comparative Technology* 1923, 36:266-275.

## ANEXO 9. POE LISIS QUÍMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS		
Facultad de Ciencias		
Escuela de Microbiología		
Método de ruptura de quistes de <i>Giardia intestinalis</i> con lisis química	Código:	Página: 1 de 1
	POELISISQUIMICA	
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

**OBJETIVO:** Realizar correctamente la ruptura de quistes de *Giardia intestinalis*.

**UNIDAD DE ANÁLISIS:** Quistes de *Giardia intestinalis*

### MATERIALES Y EQUIPO:

Fenol  
Cloroformo  
Viales de 1.5 ml  
Acetato de sodio a 3M pH 5.2  
Isopropanol frío  
Etanol al 70%  
TC1X o agua estéril libre de nucleasas  
Microcentrifuga  
Bloque caliente  
Pipetas y puntas de 10-100-1000

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS

Facultad de Ciencias

Escuela de Microbiología



Método de ruptura de quistes de <i>Giardia intestinalis</i> con lisis química	Código:	Página: 2 de 2
	POELISISQUIMICA	
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

**PROCEDIMIENTO:**

1. Agregar a cada muestra recuperada del paso anterior 400 ul de la mezcla de fenol cloroformo en proporción 1:1 previamente homogenizada en un vortex.
2. Cntrifugar 10 min a 13,000 rpm, recuperar la fase acuosa y tranferir a un nuevo vial (anotar el volumen recuperado).
3. Agregar 1/10 volumen de acetato de sodio a 3M pH 5.2 y un volumen similar al obtenido de Isopropanol frio.
4. Centrifuga de 3 min a 13,000 rpm, eliminar el sobrenadante.
5. Lavar 3 veces con 200 ul de etanol al 70%.
6. Dejar evaporar el etanol residual en un bloque caliente.
7. Resuspender el material genético recuperado en 50 ul de TE1X o en 50 ul de agua estéril libre de nucleasas.
8. Guardar a -20°C hasta el uso.

## ANEXO 10. POE RUPTURA DE QUISTES

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS		
Facultad de Ciencias		
Escuela de Microbiología		
		
Ruptura de quistes de <i>Giardia intestinalis</i> . Mediante Perlas de Zirconio	Código:	Página: 1 de 1
	POERUPTURA	
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

**OBJETIVO:** Realizar correctamente la ruptura de quistes de *Giardia intestinalis*.

**UNIDAD DE ANÁLISIS:** Quistes de *Giardia intestinalis*

### MATERIALES Y EQUIPO:

Perlas de zirconio de 0.5 mm  
Mini Bead Beater  
Tubos eppendorf 1.5 ml  
Micropipetas 100-1000  $\mu$ L  
Puntas de 100-1000  $\mu$ L

### PROCEDIMIENTO:

1. Coloque 700  $\mu$ L de la muestra concentrada conteniendo los quistes del parásito en un tubo de 2.0 mL con cierre hermético.
2. Agregue aproximadamente 1 g de perlas de zirconio de 0.5 mm de diámetro y homogenice la mezcla
3. Agite en el aparato Mini Bead- Beater durante 1 minuto a máxima velocidad.
4. Recupere la mayor cantidad posible del sobrenadante evitando arrastrar las perlas de zirconio luego transfiera a un tubo eppendorf.
5. Use esta solución para la extracción de ADN.

### REFERENCIA:

1. Pestehchian N, Rasekh H, Babaei Z, Yousefi HA, Eskandarian AA, Kazemi M, et al. Identification of genotypes of *Giardia duodenalis* human isolates in Isfahan, Iran, using polymerase chain reaction - Restriction Fragment Length polymorphism. *Adv Biomed Res.* 2012; 1:84.

#### ANEXO 11. POE EXTRACCIÓN ADN DE QUISTES

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS Facultad de Ciencias Escuela de Microbiología		
Extracción de ADN de quistes de <i>Giardia intestinalis</i> . Prefiler Express Forensic DNA Extraction kit	Código: POEEXTRACCIÓN	Página: 1 de 3
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

**OBJETIVO:** Realizar correctamente la extracción de ADN *Giardia intestinalis* mediante el método automatizado con el kit de extracción Prefiler Express Forensic DNA Extraction kit.

**DEFINICIONES:**

ADN: Acido desoxirribonucleico genómico.

**UNIDAD DE ANÁLISIS:** ADN de *Giardia intestinalis*

**MATERIALES Y EQUIPO:**

Micropipetas 100-1000 µL  
 Puntas de 100-1000 µL  
 Kit de extracción Prefiler Express Forensic DNA Extraction  
 Equipo AUTOMATE EXPRESS

**PROCEDIMIENTO:**

- a) Proceso de lisis
  1. Prepare el bloque térmico a 70 c
  2. Verificar si el buffer de lisis posee precipitado, sí es así, lleve la solución a 37 c y de un vortex por cinco segundos o hasta que el precipitado se disuelva.
  3. Prepare la solución de lisis de la siguiente manera.  
 Cuadro 1. Solución de lisis

Solución	Volumen

Buffer de lisis Prefiler	500 ul
1M DTT (Ditiotreitol)	5 ul

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS		
Facultad de Ciencias		
Escuela de Microbiología		
Extracción de ADN de quistes de <i>Giardia intestinalis</i> . Prefiler Express Forensic DNA Extraction kit	Código:	Página: 2 de 3
	POEEXTRACCIÓN	
		Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas

Cuadro 2. Solución 1 MDTT

Solución	Volumen
DDT peso molecular 154	1.54g
Agua libre de nucleasas	10 ml

**Nota:** almacenar la solución de 1M DDT en alícuotas de 100 a 500 ul a – 20 c, por no más de 6 meses.

4. Monte el ensamblaje de columna y tubo, es decir, insertar la columna Prefiler Lysep® dentro del tubo de muestra y transfiera la muestra a dicho ensamble.
5. Agregue 500 ul de la solución de lisis recién preparada y asegúrese que la muestra se encuentre sumergida totalmente en esta solución.
6. Cierre la tapa del montaje cuidadosamente.
7. Coloque el montaje en el bloque térmico previamente calentado a 70c por 40 minutos, de vez en cuando agite levemente el montaje.
- b) Remoción del sustrato
8. Centrifugue el ensamble por dos minutos a 10,000rpm.
9. Si el volumen de la muestra recolectada, de muestra es menor de 300 ul hacer lo siguiente:
  - a. Centrifugar el montaje de nuevo por cinco minutos.
  - b. Si el volumen sigue siendo menor de 300 ul, completar a 300ul con buffer de lisis.
10. Si al remover la columna Prefiler Lysep®, se observa solución clara dejarla y colocar en la posición S del porta tips.
11. Si en el tubo de muestra se observa sedimento o pellet transferir el lisado claro ( no sedimento) aun nuevo tubo de muestra.

Nota: es importante evitar el sedimento ya que este puede causar interferencia en la extracción.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS Facultad de Ciencias Escuela de Microbiología		
Extracción de ADN de quistes de <i>Giardia intestinalis</i> . Prefiler Express Forensic DNA Extraction kit	Código: POEEXTRACCIÓN	Página: 1 de 3
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

12. Colocar todos los desechables en el equipo como se indica en el documento CIG LAB DPR19-ITO1 instructivo para el uso de AUTOMATE EXPRESS.
13. Iniciar el programa.

Nota: POE tomado de los Procedimientos Operativos Estándares del Centro de Investigaciones Genéticas con Código CIG-LAB-ME02. Realizado por Dra. Alejandra Pinto y Dr. Gustavo Fontecha.

## ANEXO 12. POE GDH ANIDADA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS		
Facultad de Ciencias		
Escuela de Microbiología		
		
AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN <i>gdh</i> DE <i>Giardia intestinalis</i> MEDIANTE PCR ANIDADA Y DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS A1, A2, B3 Y B4 MEDIANTE RFLP	Código:	Página: 1 de 4
	POEGDHANIDADA	
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

**OBJETIVO:** Realizar correctamente la amplificación de un fragmento del gen *gdh* de *Giardia intestinalis* mediante PCR Anidada y determinación de los genotipos A1, A2, B3 y B4 mediante RFLP.

### DEFINICIONES:

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RFLP: Análisis de fragmento de restricción de longitud polimórfica.

Electroforesis en gel: es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico.

Genotipo: se refiere a la información genética que posee un organismo en particular en forma de ADN.

**UNIDAD DE ANÁLISIS:** ADN de *Giardia* intestinales.

### REACTIVOS:

Enzima 2X

Primer Fgdhe 10 µM: TCAACGTAAAYCGYGGYTTCCGT

Primer Rgdhi 10 µM: GTTRTCCTTGACATCTCC

Primer F-gdhi 10 µM: CAGTACAACCTCYGCTCTCGG

Enzima NlaIV

Enzima RsaI

**MATERIALES Y EQUIPO:**

Micropipetas 1-10µL

Micropipetas 10-100 µL

Tubos eppendorf 1.5 mL

Termociclador

Agarosa

TAE 0.5 X

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

Facultad de Ciencias

Escuela de Microbiología



AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN *gdh* DE *Giardia intestinalis* MEDIANTE PCR ANIDADA Y DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> Y B<sub>4</sub> MEDIANTE RFLP

Código:

POEGDHANIDADA

Página: 2 de 4

Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas

**PROCEDIMIENTO:**

NOTA: El mismo producto de la PCR<sub>2</sub> puede ser utilizado para secuenciación por ambos flancos.

1. PCR 1

REACTIVO	CANTIDAD (µL)
Enzima 2X	12.5
F-gdhe 10 µM	1.25
R-gdhi 10 µM	1.25
Agua	9.0
ADN	1.0

2. Programa PCR 1

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA °C	TIEMPO (SEGUNDOS)
1	94	120
	56	60
	72	120
55	94	30

	56	20
	72	45
1	72	420
	4	INFINITO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS Facultad de Ciencias Escuela de Microbiología			
AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN <i>gdh</i> DE <i>Giardia intestinalis</i> MEDIANTE PCR ANIDADA Y DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> Y B <sub>4</sub> MEDIANTE RFLP	Código:	Página: 3 de 4	
	POEGDHANIDADA		
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas		

### 3. PCR 2

REACTIVO	CANTIDAD (μL)
Enzima 2X	12.5
F-gdhi 10 Mm	1.25
R-gdhi 10 μM	1.25
Agua	9.0
Producto PCR 1	1.0

Programa PCR 2 (IGUAL QUE EL DE LA PCR 1)

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA °C	TIEMPO (SEGUNDOS)
1	94	120
	56	60
	72	120

55	94	30
	56	20
	72	45
1	72	420
	4	INFINITO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS Facultad de Ciencias Escuela de Microbiología		
AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN <i>gdh</i> DE <i>Giardia intestinalis</i> MEDIANTE PCR ANIDADA Y DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> Y B <sub>4</sub> MEDIANTE RFLP	Código:	Página: 4 de 4
	POEGDHANIDADA	
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

5. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Producto de 430 pb.

Digestión 1 (NlaIV = Diferenciación de subgenotipos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> e identificación de genotipo B) y Digestión 2 (RsaI = Diferenciación de subgenotipos B<sub>3</sub> y B<sub>4</sub>)

REACTIVO	CANTIDAD (µL)
Producto de PCR 2	10.0
Buffer específico 10X	2.0
NlaIV o RsaI	2 Unidades

7. Incubación a 37°C durante 3 horas.

8. Electroforesis en agarosa al 2.5%. Productos esperados.

NlaIV – A1 (150pb/120pb/90pb), A2 (120pb/90pb/80pb/70pb). B (300pb)

RsaI – B3 (300 pb / 130 pb), B4 (430 pb).

#### REFERENCIA:

1. Pérez Cordón G, Cordova Paz Soldan O, Vargas Vásquez F, Velasco Soto JR, Sempere Bordes L, Sanchez Moreno M, et al. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. *Parasitol Res.* 2008;103(2):459-65. doi: 10.1007/s00436-008-1007-3. PubMed PMID: 18470

#### ANEXO 13. POE GDH UNIPLEX

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS		
Facultad de Ciencias		
Escuela de Microbiología		
AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN <i>gdh</i> de <i>Giardia intestinalis</i> . MEDIANTE PCR UNIPLEX	Código:	Página: 1 de 3
	POE <i>gdh</i> UNIPLEX	
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

**OBJETIVO:** Realizar correctamente la amplificación de un fragmento del gen *gdh* de *Giardia intestinalis* mediante PCR uniplex.

#### DEFINICIONES:

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RFLP: Análisis de fragmento de restricción de longitud polimórfica.

Electroforesis en gel: es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico.

Genotipo: se refiere a la información genética que posee un organismo en particular en forma de ADN. UNIDAD DE ANÁLISIS: ADN de *Giardia* intestinales

**REACTIVOS:**

Enzima 2X

Primer F-AI 10 µM: GCGCTGTCTACTTCCTGGAG

Primer R-AI 10 µM: CAGCTTCTCCTCGTTGAACC

Primer F-AII 10 µM: CTCACAGGCAAGAACGTCAA

Primer R-AII 10 µM: CTCGTTGAACCCATCCTTGT

Primer F-B 10 µM: GCCTCAGGAACGAGTTTACG

Primer R-B 10 µM: GACGTTCTTGCCCCTGATTA

Primer F-C 10 µM: TGCAAGGACAACAACCCAT

Primer R-C 10 µM: ATCCTTGTCGACGATGGTTC

Primer F-D 10 µM: GCTCTCTGGTTCTGGAAACG

Primer R-D 10 µM: CATTCCCATGGCTTCTTGT

Primer F-E 10 µM: GGGCTGACACTGATGTTCT

Primer R-E 10 µM:

Primer F-F 10 µM: GCCACTCAGAACGAGGTTTC

Primer R-F 10 µM: CTCACGGAGTTCTGGGACAT

Primer F-G 10 µM: GCTACGGTGCCGTCTACTTC

Primer R-G10 µM: TCGTTCTTGAGGTGCATGAG

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

Facultad de Ciencias

Escuela de Microbiología



AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN <i>gdh</i> de <i>Giardia intestinalis</i> . MEDIANTE PCR UNIPLEX	Código:	Página: 2 de 3
	POE <i>gdh</i> UNIPLEX	
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

**MATERIALES Y EQUIPO:**

ADN

Micropipetas 1-10µL

Micropipetas 10-100 µL

Tubos eppendorf 1.5 mL

Termociclador

Agarosa

TAE 0.5 X

Buffer de carga

1. PCR para Ensamblados A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B,

REACTIVO	CANTIDAD (µL)
----------	---------------

Enzima 2X	25.0
F-AI / AII / B 10 Mm	0.5
R-AI/ AII / B 10 µM	0.5
Agua	17.0
ADN	5.0

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS Facultad de Ciencias Escuela de Microbiología		
AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN <i>gdh</i> de <i>Giardia intestinalis</i> . MEDIANTE PCR UNIPLEX	Código:	Página: 3 de 3
	POE <i>gdh</i> UNIPLEX	
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

## 2. Programa PCR

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA °C	TIEMPO (SEGUNDOS)
1	95	300
30	95	30
	52	30
	72	180
1	72	420
	4	INFINITO

--	--	--

Electroforesis en el gel de agarosa 1.5%

Producto de A1= 280 pb.

Producto de A2= 200 pb.

Producto de B= 180 pb.

(Bandas diagnósticas confirmadas por secuenciación)

Producto de C = 1100/900 pb.

Producto de D = 1050 pb.

Producto de E = 1800/800/650 pb.

Producto de F= 1050/800 pb.

Producto de G= 1100/900 pb.

**REFERENCIA:**

1.Eligio-Garcia L, Cortes-Campos A, Jimenez-Cardoso E. Classification of *Giardia intestinalis* isolates by multiple polymerase chain reaction (multiplex). Parasitol Res. 2008;103(4):797-800. doi: 10.1007/s00436-008-1042-0. PubMed PMID: 18551318.

**ANEXO 14. POE GEN TPI**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS		
Facultad de Ciencias		
Escuela de Microbiología		
AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN tpi DE <i>Giardia intestinalis</i> MEDIANTE DOS PCR-GENOTIPO ESPECÍFICAS Y DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS A <sub>1</sub> Y A <sub>2</sub> , MEDIANTE RFLP	Código:	Página: 1 de 3
	POEtpiPCR	
Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas		

**OBJETIVO:** Realizar correctamente la amplificación de un fragmento del gen tpi de *Giardia intestinalis* mediante dos PCR genotipo específicas.

**DEFINICIONES:**

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RFLP: Análisis de fragmento de restricción de longitud polimórfica.

Electroforesis en gel: es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico.

Genotipo: se refiere a la información genética que posee un organismo en particular en forma de ADN.

**UNIDAD DE ANÁLISIS:** ADN de *Giardia* intestinales

**REACTIVOS:**

Enzima 2X  
 Primer F tpi A10 µM : GGAGACCGACGAGCAAAGC  
 Primer R tpi A 10 µM : CTTGCCAAGCGCCTCAA  
 Primer F tpi B 10 µM: ATAGCAGCACARAACGTGTATCTG  
 Primer R tpi B 10 µM: CCCATGTCCAGCAGCATCT  
 RsaI

**MATERIALES Y EQUIPO:**

ADN  
 Micropipetas 1-10µL  
 Micropipetas 10-100 µL  
 Tubos eppendorf 1.5 µL  
 Cámara electroforética  
 Termociclador  
 Agarosa  
 TAE 0.5 X

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS  Facultad de Ciencias  Escuela de Microbiología			
AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN tpi DE <i>Giardia intestinalis</i> MEDIANTE DOS PCR-GENOTIPO ESPECÍFICAS Y DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS A1 Y A2, MEDIANTE RFLP	Código:	Página: 2 de 3	
	POE tpiPCR		
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas		

**PROCEDIMIENTO:**

NOTA: El mismo producto de las PCR puede ser utilizado para secuenciación por ambos flancos.

1. PCR para Ensamble A

REACTIVO	CANTIDAD (µL)
Enzima 2X	25.0
F-tpiA 10 µM	1.0

R-tpiA 10 $\mu$ M	1.0
Agua	18.0
ADN	5.0

### 2. PCR para Ensamble B

REACTIVO	CANTIDAD ( $\mu$ L)
Enzima 2X	25.0
F-tpiB 10 $\mu$ M	1.0
R-tpiB 10 $\mu$ M	1.0
Agua	19.0
ADN	5.0

<p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS</p> <p>Facultad de Ciencias</p> <p>Escuela de Microbiología</p> 		
<p>AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN tpi DE <i>Giardia intestinalis</i> MEDIANTE DOS PCR-GENOTIPO ESPECÍFICAS Y DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS A<sub>1</sub> Y A<sub>2</sub>, MEDIANTE RFLP</p>	Código:	<p>Página: 3 de 3</p>
	POE tpiPCR	
	<p>Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas</p>	

### 3. Programa PCR A y B

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA °C	TIEMPO (SEGUNDOS)
1	95	900
50	94	30
	62	30

	72	30
1	72	420
	4	INFINITO

4. Electroforesis en gel de agarosa 3.2%. Producto de A = 148 pb. Producto de B = 81 pb

**REFERENCIA:**

1. Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):5940-4. doi: 10.1128/JCM.43.12.5940-5944.2005. PubMed PMID: 16333079; PubMed Central PMCID: PMC131719

**ANEXO 15. POE GEN SSUR RNA**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS Facultad de Ciencias Escuela de Microbiología			
AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL gen SSUr RNA de <i>Giardia intestinalis</i> MEDIANTE PCR Y SECUENCIACIÓN	Código: POE SSUr RNAPCR	Página: 1 de 2  Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

**OBJETIVO:** Realizar correctamente la amplificación de un fragmento del gen SSU r RNA de *Giardia intestinalis* mediante PCR anidada.

## DEFINICIONES:

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RFLP: Análisis de fragmento de restricción de longitud polimórfica.

Electroforesis en gel: es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico.

Genotipo: se refiere a la información genética que posee un organismo en particular en forma de ADN.

Secuenciación: es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.

**UNIDAD DE ANÁLISIS:** ADN de *Giardia* intestinales

## REACTIVOS:

Enzima 2X

Primer F-H1110  $\mu\text{M}$  : CATCCGGTCGATCCTGCC

Primer R-RH4 10  $\mu\text{M}$  : GTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG

## MATERIALES Y EQUIPO:

ADN

Micropipetas 1-10 $\mu\text{L}$

Micropipetas 10-100  $\mu\text{L}$

Tubos eppendorf 1.5 mL

Cámara electroforética

Termociclador

Agarosa

TAE 0.5 X

Buffer de carga

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS		
Facultad de Ciencias		
AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL gen SSU Rna de <i>Giardia intestinalis</i> MEDIANTE PCR Y SECUENCIACIÓN	Código:	Página: 2 de 2
	POE SSUr RNAPCR	
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

## PROCEDIMIENTO:

### 1. PCR

REACTIVO	CANTIDAD ( $\mu\text{L}$ )
Enzima 2X	12.5
F-H11 10 $\mu\text{M}$	1.25

R-RH <sub>4</sub> 10 µM	1.25
Agua	9.0
ADN	1.0

2. Programa PCR

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA °C	TIEMPO (SEGUNDOS)
1	96	120
35	96	20
	59	20
	72	30
1	72	420
	4	INFINITO

3. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Producto de 292 pb.

4. Secuenciar por ambos lados.

REFERENCIA:

- Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol.* 1997;83(1):44-51.

PubMed PMID: 905769. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS Facultad de Ciencias Escuela de Microbiología		
<b>ANEXO 16 POE GEN BG</b>  AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN <i>bg</i> DE <i>Giardia intestinalis</i> MEDIANTE PCR ANIDADA Y DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS A, B Y E MEDIANTE RFLP	Código:	Página: 1 de 3
	POE <i>bg</i> ANIDADA	
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

**OBJETIVO:** Realizar correctamente la amplificación de un fragmento del gen *bg* de *Giardia intestinalis* mediante PCR Anidada y determinación de los genotipos mediante RFLP A, B y E.

**DEFINICIONES:**

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RFLP: Análisis de fragmento de restricción de longitud polimórfica.

Electroforesis en gel: es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico.

Genotipo: se refiere a la información genética que posee un organismo en particular en forma de ADN.

**UNIDAD DE ANÁLISIS:** ADN de *Giardia* intestinales

**REACTIVOS:**

Enzima 2X

Primer F-G7 10 μM: AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC

Primer R-G759 10 μM: GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC

Enzima HaeIII

**MATERIALES Y EQUIPO:**

ADN

Micropipetas 1-10 μL

Micropipetas 10-100 μL

Tubos eppendorf 1.5 mL

Cámara electroforética

Termociclador

Agarosa

TAE 0.5 X

Buffer de carga

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS		
Facultad de Ciencias		
Escuela de Microbiología		
AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN <i>bg</i> DE <i>Giardia intestinalis</i> MEDIANTE PCR ANIDADA Y DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS A, B	Código:	Página: 2 de 3
	POE <i>bg</i> ANIDADA	
	Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas	

PROCEDIMIENTO:

NOTA: El mismo producto de la PCR2 puede ser utilizado para secuenciación por ambos flancos.

1. PCR 1

REACTIVO	CANTIDAD (μL)
Enzima 2X	25.0
F-G7 10 μM	1.0
R-G759 10 μM	1.0
Agua	18.0
AND	5.0

2. Programa PCR 1

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA °C	TIEMPO (SEGUNDOS)
1	95	300
37	95	60
	60	30
	72	30
1	72	600
	4	INFINITO

3. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Producto de 753 pb.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS		
Facultad de Ciencias		
Escuela de Microbiología		
AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN <i>bg</i> DE <i>Giardia intestinalis</i> MEDIANTE PCR ANIDADA Y DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS A, B Y E MEDIANTE RFLP	Código:	Página: 3 de 3
	POE <i>bg</i> ANIDADA	
		Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas

REACTIVO	CANTIDAD (μL)
----------	---------------

Producto de PCR	10.0
Buffer específico 10X	2.0
HaeIII	10 Units

5. Incubación a 37°C durante 4 horas.

6. Electroforesis en agarosa al 3%. Productos esperados.

Genotipo A 126pb/74pb.

Genotipo B –176pb

Genotipo E – 202pb/186pb/150pb/102pb.

REFERENCIA:

1. Budu-Amoako E, Greenwood SJ, Dixon BR, Barkema HW, McClure JT. Foodborne illness associated with *Cryptosporidium* and *Giardia* from livestock. *J Food Prot.* 2011;74(11):1944-55. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-107. PubMed PMID: 22054199.

2. Caccio 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(8):1023-30. PubMed PMID: 12076631.

**ANEXO 17.** FOTOS VIAJE CAMPO A LINACA, TATUMBLA.



Charla educativa a padres de familia sobre parásitos intestinales e instrucciones para la toma de muestra de sus hijos.



Equipo de trabajo conformado por estudiantes de último año de la carrera de Microbiología y Microbiólogos en Servicio social.



Recolección de muestras con ayuda del equipo de trabajo conformado por estudiantes de último año de la carrera de Microbiología y Microbiólogos.



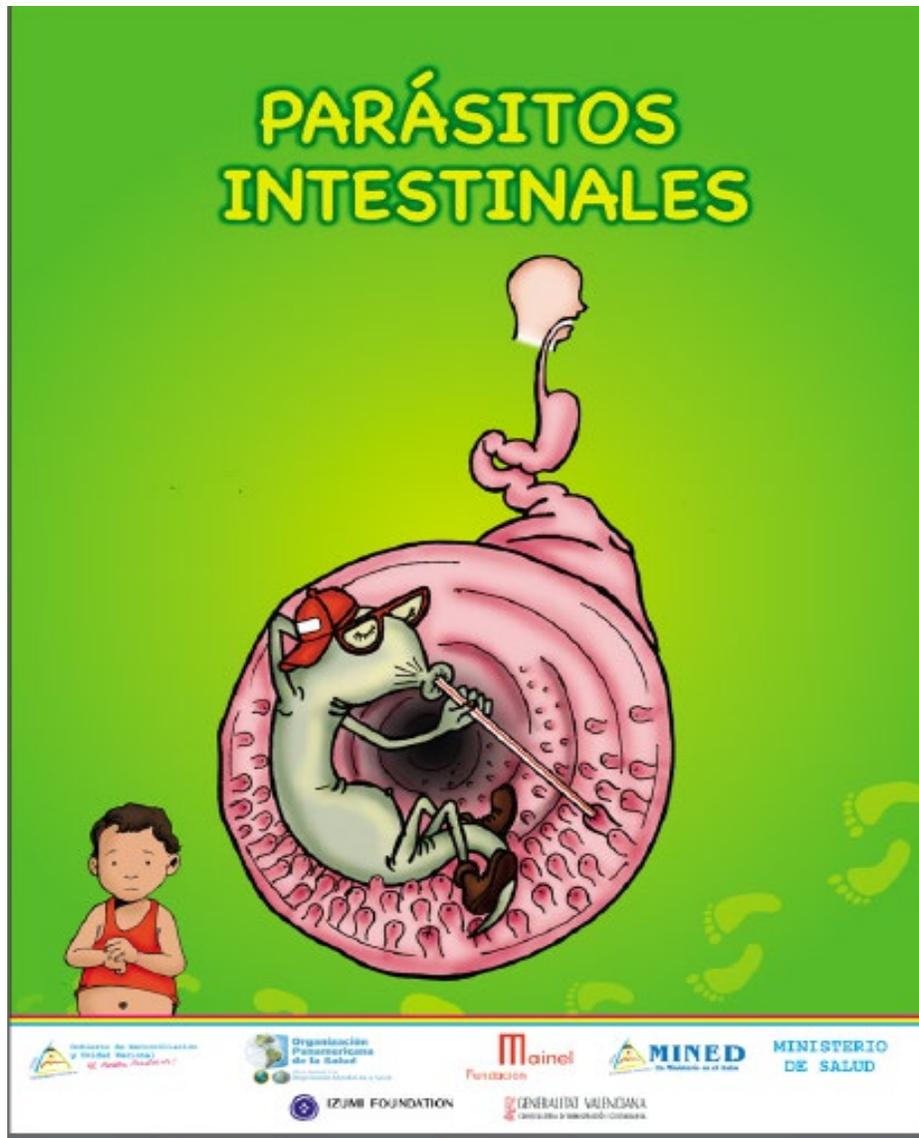
Análisis coproparasitológico de 242 muestras con ayuda de mi asesor de tesis Dr. Gustavo Fontecha y equipo de trabajo en viaje de campo.



Afiche sobre la prevención de parásitos intestinales, dejados en cada aula de los centros educativos.

Fuente:

[http://www.paho.org/nic/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=vigilancia-de-la-salud-publica-1&alias=656-afiche-de-prevencion-de-parasitosis&Itemid=23](http://www.paho.org/nic/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=vigilancia-de-la-salud-publica-1&alias=656-afiche-de-prevencion-de-parasitosis&Itemid=23)



Rotafolio sobre la prevención de parásitos intestinales, dejados en cada aula de los centros educativos. Anexado el material completo.

Fuente:

[http://www.paho.org/nic/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=kit-para-campanas-de-comunicacion&alias=661-rotafolio-de-prevencion-de-parasitos-intestinales&Itemid=235](http://www.paho.org/nic/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=kit-para-campanas-de-comunicacion&alias=661-rotafolio-de-prevencion-de-parasitos-intestinales&Itemid=235)

**ANEXO 18. CONSTANCIA FINIQUITO BECA POST GRADO -DICYP**



**UNAH**  
DIRECCIÓN DE  
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA  
Y POSGRADO

**CONSTANCIA**

La Dirección de Investigación Científica y Posgrado, por medio de la presente, **HACE CONSTAR:** Que **ESTEFANÍA CUELLAR MACÍAS** ha culminado satisfactoriamente la evaluación técnica y financiera del proyecto financiado mediante Beca de Investigación para Estudiante de Posgrado No. 05 – 2016 de la I Convocatoria, y denominado “**GENOTIPIFICACIÓN DE *GIARDIA INTESTINALIS* EN HUMANOS Y ANIMALES (PERROS, GATOS Y CERDOS) EN LINACA ALDEA DEL MUNICIPIO DE TATUMBLA, DEPARTAMENTO DE FRANCISCO MORAZÁN, HONDURAS, DURANTE EL AÑO 2016**” concedida en febrero del año 2016.

Dado en la Ciudad Universitaria a los seis días del mes de diciembre de dos mil dieciséis.

*Leticia Salomón*

Directora de Investigación Científica y Posgrado, UNAH



