

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Genotipificación de *Giardia duodenalis* en una población infantil de cuatro parroquias rurales del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ)**

**Erika Nicole Montenegro Tobar**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 04 de mayo de 2020

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Genotipificación de *Giardia duodenalis* en una población infantil de cuatro parroquias rurales del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ)**

**Erika Nicole MontenegroTobar**

**Nombre del profesor, Título académico**

Sonia Zapata Mena, Ph. D.

Quito, 04 de mes de 2020

## **DERECHOS DE AUTOR**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Erika Nicole Montenegro Tobar

Código: 00130139

Cédula de identidad: 1717712705

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres y mi ñaña, por su compañía en cada noche de desvelo, por haber moldeado la persona que soy ahora. Por cada viaje, cada libro y cada enseñanza que me han brindado.

A mis mentores Sonia Zapata por su infinita paciencia, Rosita Bayas y Juan Mosquera por compartir sus conocimientos y por inculcar en mi valores, principios y sabiduría; les aseguro que pronto darán resultados en beneficio de nuestra sociedad.

Al proyecto PRISA por financiar este proyecto y por depositar en mi la confianza de ser parte de este gran equipo. Agradezco a la USFQ, al COCIBA, al Instituto de Microbiología porque se han convertido en mi segundo hogar.

Finalmente, agradezco a mis amigos, en especial a mis Biólogos y Biotecnólogos que a pesar de que ya no forman parte de la USFQ, siguen transmitiéndome sus conocimientos día a día y forman parte de mi vida.

## RESUMEN

*Giardia duodenalis* es un protozooario que parasita el intestino delgado de mamíferos y puede llegar a causar una infección gastrointestinal denominada giardiasis. La giardiasis tiene un impacto significativo en la salud pública debido al efecto negativo que puede tener en el crecimiento y desarrollo cognitivo de la población infantil infectada, principalmente en países en vías de desarrollo donde la prevalencia puede variar entre 8 y 30%. *G. duodenalis* tiene una distribución global y está conformada por ocho ensamblajes o genotipos (A-H) de los cuáles A y B son más frecuentes en humanos. En Ecuador, se conoce poco sobre los genotipos de *G. duodenalis* circulantes en zonas urbanas y rurales. El objetivo del presente estudio fue identificar los genotipos de *G. duodenalis* presentes en muestras de heces de niños menores a cinco años, pertenecientes a cuatro parroquias rurales del Distrito Metropolitano de Quito. Para esto, se extrajo ADN de 22 muestras de heces que fueron previamente diagnosticadas como positivas para *G. dudodenalis* por microscopía y por ensayo inmunológico de flujo lateral. Para el análisis molecular se amplificó y secuenció una región de ~511 pb del locus de  $\beta$ -*giardina* (*bg*). El análisis filogenético reveló que la mayoría de las secuencias obtenidas pertenecen al genotipo B (83.33%) y un menor porcentaje al genotipo A (16.67%). Ambos genotipos tienen la capacidad de infectar tanto a seres humanos como a animales de compañía principalmente perros y gatos. Por lo tanto, se sugiere utilizar el presente estudio como base para expandir los análisis de genotipado en muestras ambientales y de animales de compañía, con el fin de establecer posibles rutas de transmisión y reservorios del parásito.

Palabras clave: *Giardia duodenalis*, genotipos,  $\beta$ -*giardina*, giardiasis

## ABSTRACT

*Giardia duodenalis* is a protozoan parasite of the small intestine of mammals and causative agent of a gastrointestinal infection denominated giardiasis. Giardiasis has a significant impact on public health due to how it negatively affects the growth and cognitive development of the infected child population, especially in developing countries where the prevalence can range from 8 and 30%. *G. duodenalis* has a global distribution and can be divided in eight assemblies or genotypes (A-H), of which A and B are more frequent in humans. In Ecuador, little is known about the circulating genotypes of *G. duodenalis*, in both urban and rural areas. The objective of the present study was to identify the genotypes of *G. duodenalis* present in stool samples from children under five years old, belonging to four rural parishes in the “Distrito Metropolitano de Quito”. For this, DNA was extracted from 22 stool samples that were previously diagnosed as positive for *G. dudodenalis* by microscopy and immunological lateral flow assay. For molecular analysis, a ~ 511 bp region of the  $\beta$ -*giardin* (*bg*) locus was amplified and sequenced. The phylogenetic analysis revealed that most of the sequences belonged to genotype B (83.33%) and to a smaller percentage to genotype A (16.67%). Both genotypes have the ability to infect humans and pets, mainly dogs and cats. Therefore, we propose the present study as a foundation to expand genotyping analyzes in environmental and pets samples, in order to establish possible transmission routes and reservoirs of the parasite.

Key words: *Giardia duodenalis*, genotypes,  $\beta$ -*giardin*, giardiasis.

**TABLA DE CONTENIDO**

<b>1. Introducción</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Métodos</b> .....	<b>18</b>
2.1 Colección de muestras y análisis parasitológico .....	18
2.2 Análisis molecular .....	18
<b>3. Resultados</b> .....	<b>21</b>
<b>4. Discusión</b> .....	<b>22</b>
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>26</b>
<b>6. Referencias bibliográficas</b> .....	<b>27</b>
<b>7. Tablas</b> .....	<b>33</b>
<b>8. Figuras</b> .....	<b>34</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Información demográfica y genotipo encontrado en las muestras analizadas.....	33
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de transmisión de <i>Giardia duodenalis</i> (Esch & Petersen, 2013).....	34
<b>Figura 2.</b> Distribución por parroquia de la prevalencia de <i>Giardia duodenalis</i> en cuatro parroquias rurales del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ).....	35
<b>Figura 3.</b> Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de la amplificación de la región ~511 pb del gen de $\beta$ -giardina ( <i>bg</i> ).....	35
<b>Figura 4.</b> Árbol filogenético obtenido con el método <i>Neighbor-joining</i> de 12 secuencias de <i>Giardia duodenalis</i> .....	36

## 1. INTRODUCCIÓN

La giardiasis es una infección gastrointestinal causada por *Giardia duodenalis* (también llamada *Giardia lamblia* o *Giardia intestinalis*) que es una especie altamente patógena (Pacheco et al., 2019; Herrera, 2005) responsable de 280 millones de casos anuales a nivel mundial (Norman, Comeche, Chamorro, Pérez-Molina, & López-Vélez, 2020). La giardiasis incluye infecciones asintomáticas, giardiasis aguda autolimitada e infección crónica (Kotton, 2017). La giardiasis es un problema de salud pública debido a que afecta a millones de personas a nivel mundial, en particular, a los países en vías de desarrollo. La incidencia de giardiasis en países en vías de desarrollo es alta siendo los niños quienes tienen mayor riesgo de presentar la enfermedad (Escobedo, Almirall, González, & Ballesteros, 2019). En los últimos años, se han reportado altas tasas de prevalencia de giardiasis en niños menores a 5 años de edad en países en vías de desarrollo, además de presentar alta tasa de infección repetitiva inclusive durante su primer año de vida (Quispe, 2017).

En América Latina, la giardiasis es la infección más frecuente en niños menores a 12 años de edad con el 55 % en niños preescolares y el 24 % en lactantes (Apt, 2013). En países en vías de desarrollo como el Ecuador, la enfermedad diarreica aún es considerada como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños menores a 5 años de edad (Bhavnani, Goldstick, Cevallos, Trueba, & Eisenberg, 2012), pues la coinfección entérica es frecuente en la población. La Organización Panamericana de la Salud (PAHO por sus siglas en inglés) revela que la segunda causa de muerte en niños ecuatorianos menores a 5 años de edad es ocasionada por enfermedades infecciosas intestinales con 11.2% (Pan American Health Organization [PAHO], 2007).

La giardiasis se relaciona estrechamente con la falta de sistemas de saneamiento adecuados, la falta de infraestructura básica, un estrato socioeconómico bajo y niveles de educación

escasos (Henriques et al., 2017). En poblaciones rurales de Latinoamérica, se estima que aproximadamente 108 millones de personas viven en condiciones de escasos recursos económicos y carecen de estructuras básicas, de los cuales el 15 % (16 millones de personas) presentan esta infección protozoaria (Apt, 2013). Las enfermedades parasitarias son frecuentes en países de clima tropical ya que este favorece al desarrollo del ciclo de vida de parásitos que suelen habitar el medio ambiente puesto que necesitan huéspedes específicos para así complementar su ciclo de vida (Vilcahuamán, 2019).

La giardiasis es una infección gastrointestinal que causa diarrea acuosa maloliente que produce flatulencias, dolores abdominales, náuseas, pérdida de peso, desnutrición, síndrome de malabsorción y malestar general (Zapata, Arboleda, & Díaz, 2016). La giardiasis crónica tiene un impacto negativo en los niños, responsable de altas tasas de mortalidad (Pedraza, Suarez, De la Hoz, & Fragoso, 2019). La giardiasis tiene posibles secuelas post-infecciosas y consecuencias a largo plazo en países en vías de desarrollo debido a que existe mayor riesgo de transmisión (Escobedo, Almirall, Cimerman & Rodríguez, 2016). La giardiasis puede afectar tanto en el crecimiento como a nivel de desarrollo cognitivo (Weatherhead et al., 2017). Una de las consecuencias en niños es el síndrome de malabsorción, los niños dejan de absorber grasas, nutrientes y vitaminas ocasionando desnutrición. La desnutrición genera diversas alteraciones provocando daños irreparables en el desarrollo cognitivo de los infantes, esto impide el adecuado desarrollo psicomotor y genera retrasos en el crecimiento (Simsek, 2004).

Las especies del género *Giardia* pertenecen al dominio Eucaria, reino Protista, clase Fornicata, orden Diplomonadida y familia Hexamitidae (Jimenez, 2020). Dentro del género se reconoce seis especies *G. duodenalis*, *G. muris*, *G. agilis*, *G. microti*, *G. ardeae* y *G. psittaci*. Cada una de las especies tienen su hospedador específico. *G. muris* cuyo hospedador son los roedores, *G. agilis* encontrado en anfibios, *G. microti* en ratas y topes, *G. ardeae* en garzas y otras aves y *G. psittaci* en aves Psitácidas (Quispe, 2017). Los reservorios de *G. duodenalis*

incluyen un amplio rango de hospederos como los mamíferos, incluyendo a los humanos, no humanos, animales de compañía como perros y gatos (Chomel, 2014), y/o animales de granja como bovinos, caprinos u ovinos (Quispe, 2017; Cacciò & Sprong, 2011).

*Giardia duodenalis* conocida también como *G. intestinalis* o *Giardia lamblia* (Feng & Xiao, 2011; Pacheco et al., 2019) es un protista protozoario unicelular, heterótrofo flagelado anaerobio que forma parte de los parásitos intestinales de transmisión zoonótica entre mamíferos (Ankarklev et al., 2018). *G. duodenalis* tiene una amplia variación genética por lo que se considera un complejo de especies dividido en ocho diferentes grupos conocidos como genotipos o ensamblajes (Feng & Xiao, 2011; Ryan & Cacciò, 2013). Un genotipo constituye a grupos genéticamente diferentes distribuidos geográficamente en diferentes localidades u hospederos (Fonte & Almannoni, 2010). Las distancias genéticas entre los distintos ensamblajes son grandes, por lo que se sugiere que cada ensamblaje debería ser considerado como una especie diferente (Jerlström-Hultqvist et al., 2010; Ankarklev et al., 2015). Los genotipos de *G. duodenalis* se los ha clasificado de la A-H distribuidos en diferentes hospederos (Feng & Xiao, 2011).

Los genotipos A y B tienen un amplio rango de hospederos infectando principalmente a mamíferos incluyendo a los seres humanos (Vanni et al., 2012). El genotipo A puede infectar a humanos, primates no humanos, rumiantes tanto domésticos como salvajes, alpacas, cerdos, caballos, caninos domésticos y salvajes, gatos, hurones, roedores y marsupiales; mientras que, el genotipo B además de infectar primates y humanos, tiene la capacidad de infectar vacas, perros, caballos, conejos, castores e inclusive ratas (Feng & Xiao, 2011). De los dos genotipos, el genotipo B parece ser más patogénico que el genotipo A en humanos (Quispe, 2017). El genotipo A se ha dividido en cuatro subgenotipos conocidos como AI, AII, AIII y AIV. Los subgenotipos AI y AII han sido encontrados en muestras humanas, mientras que los subconjuntos AI, AIII y AIV han sido aislados de muestras animales, de tal manera que la

literatura científica avala que solo el subgenotipo AI presenta potencial zoonótico, mientras que el subgenotipo AII es casi exclusivo para infecciones humanas (Hooshyar, Ghafarinasab, Arbabi, Delavari, & Rasti, 2017). Para el conjunto B, se han encontrado 4 subgenotipos: BI, BII, BIII y BIV, de los cuales BIII y BIV fueron aislados de muestras humanas, mientras que BI y BII se han hallado en animales, sin embargo, el subgenotipo BIII también presenta potencial zoonótico (Hooshyar et al., 2017).

Por otro lado, los genotipos C-H tienen un menor rango de hospederos. Los genotipos C y D infectan a caninos domésticos y salvajes; el genotipo E infecta a rumiantes domésticos, cerdos y caballos (Fantinatti, 2019); el genotipo F infecta solamente a felinos; mientras que, el genotipo G solo a ratas o ratones y el genotipo H a focas marinas (Feng & Xiao, 2011). Recientemente, el genotipo E ha sido vinculado con infecciones en seres humanos (Zahedi, Field, & Ryan, 2017; Fantinatti, Bello, Fernandes, & Da-Cruz, 2016). Por tanto, los diferentes genotipos tienen la capacidad de infectar tanto a humanos como a animales (Ryan & Cacciò, 2013).

La transmisión de *Giardia duodenalis* puede ser directa vía fecal-oral o indirecta vía anal-oral. La transmisión directa del parásito se da principalmente por el consumo de agua y alimentos contaminados siendo una de las causas para la aparición de brotes en guarderías y de enfermedades en viajeros internacionales (Leder & Weller, 2019). La transmisión de *Giardia duodenalis* inicia cuando la forma infectante del parásito se ingiere, ya sea por alimentos como frutas o verduras o aguas contaminadas (Quispe, 2017). Los quistes de *G. duodenalis* son la forma infecciosa y resisten por largos periodos de tiempo en el ambiente. La temperatura es un parámetro significativo en la supervivencia y recuperación de quistes viables del parásito *Giardia* sp. (Erickson & Ortega, 2006). Los quistes en agua del grifo permanecen hasta 56 días de 0°C a 4°C y 14 días de 20°C a 28°C; mientras que, en agua de ríos pueden sobrevivir hasta 80 días de 0°C a 4°C o 28 días de 20°C a 28°C (Feng & Xiao, 2011). Por otro

lado, los quistes se caracterizan por tener una pared celular gruesa la cual les confiere la capacidad de resistencia al cloro, por lo que gran parte de los brotes de esta especie, han sido correlacionados a sistemas de purificación de agua únicamente por cloración (Madigan, Martinko, Buckley, & Stahl, 2015).

Los trofozoítos de *Giardia duodenalis* (forma diagnosticada/vegetativa) son capaces de producir quistes (forma infectante). Tras la ingesta de los quistes se da la exquistación o desenquistamiento (Figura 1), rompimiento de la pared del quiste en el estómago del hospedero debido al ácido gástrico y pH alcalino presentes (Casana, 2018). El quiste sin su pared, posteriormente, atraviesa el duodeno en donde las proteasas favorecen a la exocitosis formando así los excizoitos tetranucleados y flagelados (forma transitoria). Los excizoitos tetranucleados terminan en el intestino delgado proximal en donde se transforman en trofozoítos (Quispe, 2017). Los trofozoitos se unen a las células epiteliales intestinales utilizando su disco ventral adhesivo, estructura citoesquelética esencial para su supervivencia y patogenicidad (Juri & Soon-Jung, 2019). Una vez que los trofozoítos llegan al yeyuno, se enquistan formando la pared celular gruesa que les permite sobrevivir en su forma infectante; finalmente tanto los trofozoítos como los quistes son liberados junto con las heces continuando con su transmisión cuando otro huésped los ingiere (Quispe, 2017). Para completar el ciclo de vida, *Giardia duodenalis* necesita de huéspedes específicos (Vilcahuamán, 2019). Los animales domésticos han sido asociados con la transmisión de manera directa entre humanos especialmente en entornos endémicos (Geurden & Olson, 2011).

Los genotipos A y B de *Giardia duodenalis* son los responsables de causar la mayor parte de las infecciones en humanos (Feng y Xiao, 2011). Como estos ensamblajes también se encuentran en otros mamíferos, se consideran como ensamblajes zoonóticos (Ryan y Cacciò, 2013). La identificación molecular del genotipo de *G. duodenalis* se basa en el uso de la técnica de la *polimerasa chain reaction* (PCR, por sus siglas en inglés) y del análisis de la secuencia

de ADN utilizando marcadores moleculares específicos. Entre los genes más utilizados se destaca los genes de la *triosa fosfato isomerasa (tpi)*, la *glutamato deshidrogenasa (gdh)*,  *$\beta$ -giardina (bg)*, y la subunidad pequeña del ARN ribosomal (*ARNr SSU*) (Goñi et al., 2018). En particular, el gen más utilizado es el de  *$\beta$ -giardina (bg)* que se encuentra en el cromosoma CH991793 de las especies *G. duodenalis* y *G. muris* (Cacciò & Sprong, 2011). Este gen codifica para la proteína  *$\beta$ -giardina* principal componente del citoesqueleto de las especies anteriormente mencionadas (León, 2018). Por otro lado, los genes *gdh* y *tpi* codifican para una enzima *housekeeping* y se encuentran en los cromosomas CH991814 y CH991793 de manera consecutiva, estos genes son los más utilizados para la identificación de subgenotipos de *G. duodenalis* (Cacciò & Sprong, 2011).

Las secuencias de los diferentes genes pueden ser alineadas para la identificación del genotipo y subgenotipo mediante análisis filogenético como el de *Neighbor-joining*. El análisis de *Neighbor-joining* presenta un árbol filogenético basado en mínima evolución, agrupa las secuencias con respecto a su criterio de optimización dentro de su evolución mínima generando ramas de una menor longitud (Martínez & González, 2013). Este método permite la clasificación de distintos individuos cuya especie o subespecie se desconoce, de tal manera que la distancia genética entre dos terminales se basa al número total de sustituciones de cada base (Peña, 2011).

En el Ecuador, los estudios relacionados sobre diversidad de genotipos y subgenotipos de *Giardia duodenalis* presentes en personas son escasos. Los estudios realizados en el país se enfocan en la prevalencia del parásito en poblaciones rurales y urbanas. Dos estudios indican una prevalencia entre el 20 % al 24 % de *G. duodenalis* presente en niños menores a 5 años de edad pertenecientes a comunidades remotas del noroeste del país (Bhavani et al., 2012; Atherton et al., 2013). En poblaciones urbanas, se reporta una prevalencia menor del 12.9% en niños menores a 12 años de edad (Tarupi, Silva, & Darquea, 2018). De los pocos estudios

realizados sobre la presencia de genotipos y subgenotipos en poblaciones rurales, un estudio menciona que los genotipos A y B de *G. duodenalis* se encuentran circulando en comunidades rurales al norte de Ecuador; por otro lado, el estudio indica la presencia de los subgenotipos AI, AII, BIII y BIV (Atherton et al., 2013). A nivel de poblaciones rurales de la Sierra se desconoce qué genotipos y subgenotipos de *G. duodenalis* están circulando. A nivel clínico es importante conocer los genotipos circulantes para inferir el origen de la transmisión y de ese modo se puede establecer adecuados programas de control enfocados a la eliminación del parásito.

El presente estudio tiene como objetivo identificar los genotipos y subgenotipos de *Giardia duodenalis* presentes en muestras de heces provenientes de niños menores a 5 años pertenecientes a cuatro parroquias rurales del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ). La identificación de los genotipos y subgenotipos se realizó mediante la amplificación y secuenciación de una región parcial del gen  $\beta$ -*giardina* (*bg*).

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Colección de muestras y análisis parasitológico

Las muestras de heces de niños menores a 5 años que se usaron en el presente estudio forman parte del proyecto (PRISA) de la Universidad de Michigan State. Las muestras se colectaron en cuatro parroquias rurales del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ): Pifo, Yaruquí, Checa y El Quinche durante ocho meses desde enero a octubre del 2019. Para el presente estudio se tomó en consideración la siguiente información: la edad de los niños y si los niños tuvieron contacto o no con animales. Las muestras fueron previamente analizadas para ver la presencia de *Giardia* sp. mediante microscopía y ensayo inmunológico de flujo lateral usando las tirillas de *Crypto/Giardia Duo-Strip* (CorisBioConcept) de acuerdo a las especificaciones del fabricante (CorisBioconcept SPRL, 2012).

### 2.2 Análisis molecular

De las muestras que fueron positivas para *Giardia* sp. mediante el análisis parasitológico, se escogieron 22 para determinar molecularmente la especie y los genotipos de la misma. Para lo cual, se extrajo el ADN a partir de 0.3 g de las muestras de heces. Para la extracción del material genético se usó el *kit PowerSoil DNA Isolation* (Mo Bio Laboratories) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Todas las muestras de ADN obtenidas fueron cuantificadas para determinar su concentración y calidad mediante espectrofotometría usando el equipo Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, 2020). Todas las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

Para la amplificación de una región parcial del gen  $\beta$ -*giardina* (*bg*) se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa anidada (Nested-PCR, por sus siglas en inglés). Para la amplificación se usó las mismas condiciones reportas por Gil, Cano, & De Lucio (2017). Para lo cual se usó dos pares de *primers*: externos e internos. Los *primers* externos fueron los

siguientes: G7eF (AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC) y G759eR (GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC); mientras que, los *primers* internos fueron los siguientes G99iF (GAACGAACGAGATCGAGGTCCG) y G609iR (CTCGACGAGCTTCGTGTT) (Gil et al., 2017). La reacción de PCR para la amplificación con los *primers* externos se realizó en un volumen final de reacción de 10 $\mu$ L, la misma que contenía ADN (20ng), buffer GoTaq 1X (Promega), dNTPs [0.2 $\mu$ M], MgCl<sub>2</sub> [1.5mM], *primer* F [0.2 $\mu$ M], *primer* R [0.2 $\mu$ M], Taq polimerasa 1U. Para la amplificación de la región interna, se tomó como templado 1 $\mu$ L del producto de PCR de la primera amplificación y se usó las mismas condiciones de reacción descritas para la amplificación de la región externa.

Las condiciones del termociclado para la primera amplificación con los *primers* externos fueron: desnaturalización inicial durante 5 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 94°C, *annealing* por 30 segundos a 65°C, extensión por 40 segundos a 72°C, seguida de una extensión final durante 7 minutos a 72°C. Mientras que las condiciones del termociclado de la segunda PCR usando los *primers* internos son las mismas que para la amplificación con los *primers* externos, a excepción del paso de *annealing* que fue a 55°C por 30 segundos (Gil et al., 2017).

Para visualizar los productos de PCR obtenidos de la segunda amplificación, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Para determinar el tamaño del producto de PCR se usó un marcador de peso molecular de 100 pb Invitrogen<sup>TM</sup> TrackIt<sup>TM</sup>. Las condiciones de corrida fueron de 100V durante 45 minutos (Gil et al., 2017). Los productos de PCR fueron visualizados bajo luz ultravioleta usando el fotodocumentador BIORAD Laboratories, Inc. Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen, Inc. (Corea del Sur) para su secuenciación con los *primers forward* y *reverse* internos. Para obtener la secuencia consenso, las dos secuencias, *forward* y *reverse*, fueron alineadas para su edición y limpieza usando los programas PreGap y Gap4 (Staden, 1996). Para determinar la identidad de las secuencias, se realizó una

comparación con las secuencias disponibles en la base del *GenBank* usando la herramienta BLAST (Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) [Internet], 1988). Para determinar los genotipos se construyó un árbol filogenético con el método de *Neighbor-joining*, (NJ) usando MEGA X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018). Para el análisis filogénico se utilizó el modelo de Kimura 2 Parámetros (K2P), una correlación basada en la distribución gamma (2) y un *bootstrap* de 1000. En el análisis se incluyeron nueve secuencias representativas de los genotipos A y B disponibles en la base de secuencias *GenBank*. Las secuencias de referencia usadas corresponden a los siguientes números de acceso: AY072725.1, AY072726, AY655702, X85958.1, AY072723.1, AY072724, KT211574. Las secuencias de los genotipos C y D (Número de acceso: AY545646 y AY545647) fueron utilizadas como *outgroups* (Hatam-Nahavandi, Mohebbali, & Mahvi, 2017; de Lucio, Martínez-Ruiz, & Merino, 2015).

### 3. RESULTADOS

Durante ocho meses, el proyecto PRISA colectó un total de 749 muestras de heces de niños menores a 5 años de cuatro parroquias rurales del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ). Del análisis parasitológico se encontró una prevalencia de 4.67% (n = 35) de *Giardia* sp. De las 35 muestras positivas para *Giardia* sp., se encontró un 48.6% de prevalencia en Yaruquí, 20% en Checa, 5.7% en Pifo y 17.1% en El Quinche (Figura 2).

Únicamente 22 muestras fueron utilizadas para el análisis molecular de las cuales, solo el 63.64% (n = 14) amplificaron una región de ~511 pb del gen de  $\beta$ -*giardina* (*bg*) (Figura 3). Finalmente, se obtuvieron 12 secuencias consenso de ~484 pb las cuales fueron comparadas con secuencias de referencias tomadas del *GenBank* pertenecientes a los genotipos A, B, C y D.

Como resultado del análisis filogenético, las 12 secuencias de *Giardia duodenalis* se agruparon en dos clados bien definidos (Figura 4). La mayor parte las secuencias (83.33%) se agruparon en el clado representado por las secuencias del genotipo B, subgenotipo BI; mientras que, un menor porcentaje (16.67%) de las secuencias obtenidas se agruparon en el clado constituido por secuencias del genotipo A, subgenotipos AII y AIII.

El subgenotipo BI se distribuyó en las cuatro parroquias (Yaruquí, Checa, Pifo, y El Quinche); mientras que los subgenotipos AII y AIII están presentes solo en Pifo. De acuerdo a la edad, el subgenotipo BI se encontró en niños de 0.7 meses a 4 años; mientras que, el genotipo AII y AIII estuvo presente en niños de 4 años (Tabla 1). El 80 % de los niños que presentaron el subgenotipo BI tuvieron contacto con animales; mientras que, solamente uno de los niños (50%), que presentó el subgenotipo AII, tuvo contacto con animales (Tabla 1).

#### 4. DISCUSIÓN

La prevalencia de *Giardia duodenalis* encontrada en niños menores de cinco años fue de 4.67% en las cuatro parroquias analizadas. Esta prevalencia es baja comparada con otros estudios reportados tanto a nivel nacional como alrededor del mundo. En Ecuador, varios estudios han reportado un rango de prevalencia desde 8% hasta 30% (Atherton et al., 2013; Bhavnani et al., 2012; Vasco, Graham, & Trueba, 2016; Sarzosa, Graham, Salinas, & Trueba, 2018). De igual forma, estudios de Brasil, Colombia y Egipto reportan prevalencias de *Giardia duodenalis* más altas que las reportadas en el presente estudio de entre 20-30% en niños menores de 12 años (Faria, Zanini, Dias, da Silva, & Sousa, 2016; Ramírez et al., 2015 y El Basha, Zaki, Hassanin, Rehan, & Omran, 2016).

La diferencia encontrada en este estudio podría deberse al número de muestras y periodo de colección de muestras. Los estudios antes mencionados realizaron muestreos prolongados a diferencia del presente estudio donde las muestras fueron colectadas en ocho meses. La baja prevalencia puede ser explicada debido a las condiciones climáticas puesto que es más común encontrar *G. duodenalis* en climas cálidos y tropicales (Henriques et al., 2017) como se ha reportado para poblaciones costeras del país como Esmeraldas en donde la prevalencia fue del 24% (Atherton et al., 2013) y 15% en Santa Elena (Chicaiza, 2017).

Los resultados confirman la presencia de *G. duodenalis* en población infantil de parroquias rurales dentro del DMQ. La parroquia de Yaruquí presentó la prevalencia (48.6%), mientras que estudios anteriores reportan una prevalencia menor del 15.64% (Sarzosa et al., 2018). La presencia, diseminación y persistencia de este parásito en poblaciones rurales podría estar relacionada con las condiciones socioeconómicas, la ausencia de estructuras de saneamiento, los malos hábitos de higiene, la baja escolaridad y la crianza de animales domésticos (Cardona, Rivera, & Carmona, 2014).

Esta parasitosis tiene implicaciones en el desarrollo del niño generando graves consecuencias tanto a nivel físico como a nivel intelectual (Lanzkowsky, 2016; Quispe, 2017). La giardiasis temprana, como resultado de la inmadurez inmunológica en niños, puede influir sobre el crecimiento y el desarrollo cognitivo infantil (Bartelt & Sartor, 2015; Silva, 2017; El Basha et al., 2016; Solano, Acuña, Barón, Morón, & Sánchez, 2008).

En las cuatro parroquias rurales analizadas se observó un alto porcentaje del genotipo B (83.33%). Este genotipo es uno de los más comunes en los brotes y es considerado el más virulento (Wang et al., 2019). Los resultados coinciden con una investigación previa realizada en el país, donde se encontró que de las 69 muestras genotipadas, el 61% se clasificaron como genotipo B, el 32% como genotipo A y 7% coinfecciones con los genotipos A y B (Atherton et al., 2013).

A nivel mundial se reportan hallazgos similares. Por ejemplo en España, se encontró que el genotipo B es el más frecuente y representa el 68% de las muestras analizadas, mientras que el genotipo A se encontró en menor frecuencia con el 30%. Además, en este estudio se encontró coinfección de los genotipos A y B en el 2% (Wang et al., 2019).

En el presente estudio no se detectaron coinfecciones probablemente debido al bajo número de muestras analizadas.

El genotipo B está asociado con la transmisión zoonótica en donde los reservorios animales pueden mantener la contaminación ambiental (Nunes et al., 2018). El estudio realizado por Sarzosa et al. (2018) en la parroquia de Yaruquí, encontró 20% de prevalencia de *Giardia duodenalis* en niños y 13% en animales domésticos, este estudio menciona la presencia del genotipo B en dos niños, así como también en un perro y un conejo (Sarzosa et al., 2018). De esta manera, se descubre la brecha de incertidumbre acerca de la vía de transmisión de este genotipo en particular. En este estudio la mayoría de niños demostraron

que mantenían una estrecha relación con animales, por lo que la transmisión zoonótica podría predominar en esta población.

Por otro lado, se logró identificar a nivel de subgenotipos y se encontró que el subgenotipo BI está circulando en las cuatro parroquias analizadas. El subgenotipo BI ha sido asociado principalmente a animales tanto mascotas como animales de crianza (Hooshyar et al., 2017). Las cuatro parroquias rurales se caracterizan por tener un alto número de animales de granja y de compañía que podrían ser reservorios importantes para la transmisión de enteropatógenos zoonóticos facilitando la transmisión de parásitos intestinales (Vasco et al., 2016; Lowenstein et al., 2020; Sarzosa et al., 2018).

En lo que respecta al genotipo A (16%), es capaz de infectar tanto a humanos como otros animales incluidos rumiantes, alpacas, cerdos, caballos, roedores, gatos y perros (Feng & Xiao, 2011). Aunque se reporta la presencia del genotipo A en un porcentaje bajo, lo más relevante es la presencia de dos subgenotipos: AII y AIII presentes únicamente en la parroquia de Pifo. En estudios anteriores también se reporta la presencia del subgenotipo AII en poblaciones rurales (Sarzosa et al., 2018; Atherton et al., 2013). Debido a que este subgenotipo se encuentra casi exclusivamente en población humana, esto podría sugerir una adaptación en la transmisión antroponótica de la giardiasis en esta parroquia (Fonte & Almannoni, 2010; Hooshyar et al., 2017). Sin embargo, el contacto con animales no descarta una posible transmisión zoonótica puesto que, también se reporta la presencia de este subgenotipo en animales (Sprong, Cacciò, & Van Der Giessen, 2009).

Hasta el momento ningún estudio previo ha reportado la presencia del subgenotipo AIII, el cual se ha encontrado en animales domésticos como gatos y de crianza como ganado vacuno (Feng & Xiao, 2011; Perez, Zanini, Silva, da Silva, & de Céu, 2016). En zonas rurales es común encontrar este tipo de animal por lo que su presencia sugiere una transmisión zoonótica de este subtipo.

En cuanto a la PCR, existió un 63.64% de efectividad en las pruebas moleculares para el gen de  *$\beta$ -giardina* (*bg*), esta baja eficacia concuerda con estudios realizados previamente (Wang et al., 2019 y Sarzosa, 2016), esto se debe a que en ocasiones los *primers* no se pegan correctamente al ADN, pues existe una variabilidad del 3-5% en la secuencia del gen de  *$\beta$ -giardina* (Perez et al., 2016; Cacciò, De Giacomo , & Pozio, 2002; Guy, Payment, Krull, & Horgen, 2003) lo que resulta en inespecificidad de la PCR. Además, esta falta de especificidad del genotipado mediante PCR puede verse afectada debido a la presencia de inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa como hemo, carbohidratos o sales biliares (Oikarinen, 2009).

La principal limitación del presente estudio fue el uso de un solo marcador molecular ( *$\beta$ -giardina*) para la genotipificación. Para obtener resultados de genotipificación más robustos se debe usar dos marcadores moleculares adicionales como los genes *glutamato deshidrogenasa* (*gdh*) y *triosa fosfato isomerasa* (*tpi*) (Hooshyar et al., 2017). Además, en este estudio no se incluyeron muestras animales dentro de la identificación de *Giardia duodenalis* para poder relacionar la transmisión zoonótica en las cuatro parroquias estudiadas.

## 5. CONCLUSIONES

1. Se encontró una prevalencia de *G. duodenalis* del 4.67% en la población infantil de 0 a 5 años pertenecientes a las parroquias rurales de Pifo, Yaruquí, Checa y El Quinche, se identificó los genotipos A (16.67%) y B (83.33%) los cuales tienen la capacidad de infectar tanto a humanos como animales.
2. El análisis molecular del gen de  $\beta$ -*giardina* (*bg*) demostró la presencia de los subtipos BI, AII y AIII de los cuales AII está asociado mayormente a infecciones humanas a pesar que también se ha identificado en animales domésticos.
3. En Ecuador, existen pocos datos sobre giardiasis en el sistema de salud pública. Por lo tanto, saber la prevalencia y genotipos circulantes en una población permitirán emprender programas de control eficientes para detener la transmisión de este protozoo.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ankarklev, J., Franzén, O., Peirasmaki, D., Jerlström-Hultqvist, J., Lebbad, M., Andersson, J., & Svärd, S. (2015). Comparative genomic analyses of freshly isolated *Giardia intestinalis* assemblage A isolates. *BMC genomics*, 697.
- Apt, W. (2013). *Parasitología*. Ciudad de México: McGraw Hill Interamericana Editores S.A.
- Atherton, R., Bhavnani, D., Calvopiña, M., Vicuña, Y., Cevallos, W., & Eisenberg, J. (2013). Molecular identification of *Giardia duodenalis* in Ecuador by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 512–515. doi: 10.1590/0074-0276108042013019
- Bartelt, L., & Sartor, B. (2015). Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Reports*, 7. doi: 10.12703/P7-62
- Bhavnani, D., Goldstick, J., Cevallos, W., Trueba, G., & Eisenberg, J. (2012). Synergistic Effects Between Rotavirus and Coinfecting Pathogens on Diarrheal Disease: Evidence from a Community-based Study in Northwestern Ecuador. *American Journal of Epidemiology*, 387–395. Obtenido de 10.1093/aje/kws220
- Cacciò, S., & Sprong, H. (2011). Epidemiology of Giardiasis in Humans. In H. Luján, & S. Svärd, *Giardia A Model Organism* (pp. 17-28). Austria: SpringerWienNewYork. doi: 10.1007/978-3-7091-0198-8\_2
- Cacciò, S., 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*, 1023-30. doi: 10.1016/s0020-7519(02)00068-1
- Cardona, J., Rivera, Y., & Carmona, J. (2014). Salud indígena en el siglo XXI: parásitos intestinales, desnutrición, anemia y condiciones de vida en niños del resguardo indígena Cañamomo-Lomapieta, Caldas-Colombia. *Medicas UIS vol.27 no.2*, 29-39. Obtenido de <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-03192014000200004&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-03192014000200004&lng=en&nrm=iso)>
- Casana, C. (2018). *Prevalencia de Giardia spp. en roedores (Rattus spp.) procedentes de un zoológico de Lima Metropolitana* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) [Internet]. (1988). *Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE. UU.), Centro Nacional de Información Biotecnológica*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Chicaiza, H. (2017). *Frecuencia de enfermedades parasitarias en seis provincias del país, y su relación con factores de riesgo socio-sanitarios, en niños de séptimo año de educación básica en el "Propad" periodo marzo-diciembre 2015* (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

- Chomel, B. (2014). Emerging and Re-Emerging Zoonoses of Dogs and Cats. *Animals*, 4(3), 434-445. doi: 10.3390 / ani4030434
- CorisBioconcept SPRL. (2012). *Cryptosporidium y Giardia*. Obtenido de <https://www.corisbio.com/Products/Human-Field/Crypto-Giardia-Duo.php#>
- de Lucio, A., Martínez-Ruiz, R., & Merino, F. (2015). Molecular Genotyping of *Giardia duodenalis* Isolates from Symptomatic Individuals Attending Two Major Public Hospitals in Madrid, Spain. *PLoS ONE* 10(12). doi: 10.1371/journal.pone.0143981
- El Basha, N., Zaki, M., Hassanin, O., Rehan, M., & Omran, D. (2016). *Giardia* assemblages A and B in diarrhetic patients: a comparative study in Egyptian children and adults. *The Journal of Parasitology*, Vol. 102, No. 1. doi: 10.1645/14-676
- Erickson, M., & Ortega, Y. (2006). Inactivation of Protozoan Parasites in Food, Water, and Environmental Systems. *Journal of Food Protection*, Vol. 69, No. 11, 2006, 2786–2808. doi: 10.4315/0362-028X-69.11.2786
- Esch, K., & Petersen, C. (2013). Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 58-85. doi: 10.1128/CMR.00067-12
- Escobedo, A., Almirall, P., Cimerman, S., & Rodríguez, A. (2016). Sequelae of giardiasis: an emerging public health concern. *International Journal of Infectious Diseases* 49, 202-203. doi: 10.1016/j.ijid.2016.06.008
- Escobedo, A., Almirall, P., González, E., & Ballesteros, J. (2019). Efficacy of 5-nitroimidazole compounds for giardiasis in Cuban children: systematic review and meta-analysis. *Le infezioni in medicina: rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive*, 58-67. Obtenido de <https://pdfs.semanticscholar.org/2968/1c7b884d8097e682873d52ad73da799c0df4.pdf>
- Fantinatti, M. (2019). Zoonotic potential of *Giardia lamblia* and control of giardiasis. *Insights in Veterinary Science*. doi: 10.29328/journal.ivs.1001013
- Fantinatti, M., Bello, A., Fernandes, O., & Da-Cruz, A. (2016). Identification of *Giardia lamblia* Assemblage E in Humans Points to a New Anthroozoonotic Cycle. *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 214, Issue 8, 256–259. doi: 10.1093/infdis/jiw361
- Faria, C., Zanini, G., Dias, G., da Silva, S., & Sousa, M. (2016). Molecular Characterization of *Giardia lamblia*: First Report of Assemblage B in Human Isolates from Rio de Janeiro (Brazil). *PLoS ONE*, 11(8). doi: 10.1371 / journal.pone.0160762
- Feng, Y., & Xiao, L. (2011). Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *American Society for Microbiology*, 110–140. doi: 10.1128 / CMR.00033-10
- Fonte, G., & Almannoni, S. (2010). Giardiasis ¿Una zoonosis? *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 108-113. doi: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-30032010000200001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032010000200001)

- Geurden, T., & Olson, M. (2011). Giardia in pets and farm animals, and their zoonotic potential. *Springer, Vienna.*, 71-92. doi: 10.1007 / 978-3-7091-0198-8\_4
- Gil, H., Cano, L., & De Lucio, A. (2017). Detection and molecular diversity of Giardia duodenalis and Cryptosporidium spp. in sheltered dogs and cats in Northern Spain. *Infection, Genetics and Evolution*, 62-69. doi: 10.1016 / j.meegid.2017.02.013
- Goñi, M., Benito, M., Cieloszyk, J., Arango, E., LaPlante, D., Remacha, M., . . . Rubio, E. (2018). El gen tpi como herramienta en los estudios epidemiológicos de la giardiosis. *Revista salud ambiental 18(1)*, 78-84. Obtenido de: [https://zaguan.unizar.es/record/75900/files/texto\\_completo.pdf](https://zaguan.unizar.es/record/75900/files/texto_completo.pdf)
- Guy, R., Payment, P., Krull, U., & Horgen, P. (2003). Real-Time PCR for Quantification of Giardia and Cryptosporidium in Environmental Water Samples and Sewage. *American Society for Microbiology*, 5178–5185. doi: 10.1128/AEM.69.9.5178-5185.2003
- Hatam-Nahavandi, K., Mohebali, M., & Mahvi, A. (2017). Subtype analysis of Giardia duodenalis isolates from municipal. *Environmental Science Pollution Research 24*: 12740–12747. doi: 10.1007/s11356-016-6316-y
- Henriques, C., Durigan, M., Guiguet, D., Schneider, A., Bueno, R., & Singer, S. (2017). Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. *Neglected Tropical Diseases*. doi: 10.1371/journal.pntd.0006005
- Herrera, I. (2005). Giardiasis y desnutrición. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 1024-0675.
- Hooshyar, H., Ghafarinasab, S., Arbabi, M., Delavari, M., & Rasti, S. (2017). Genetic Variation of Giardia lamblia Isolates from Food-handlers in Kashan, Central Iran. *Iranian Journal of Parasitology 12(1)*, 83-89. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5522702/>
- Jerlström-Hultqvist, J., Franzén, O., Ankarklev, J., Xu, F., Nohýnková, E., Andersson, J., & Andersson, B. (2010). Genome analysis and comparative genomics of a Giardia intestinalis assemblage E isolate. *MC genomics, 11(1)*, 543. Obtenido de: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-11-543>
- Jimenez, A. (2020). *Stolen genes, a shortcut to success: Evolution of metabolic and detoxification capacities in Diplomonads* (Tesis doctoral). Universidad de Uppsala, Upsala, Suecia.
- Juri, K., & Soon-Jung, P. (2019). Role of gamma-giardin in ventral disc formation of Giardia lamblia. *Parasites Vectors 12*:227. doi: 10.1186/s13071-019-3478-8
- Kotton, C. (2017). Zoonoses from pets other than dogs and cats. *UpToDate*.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution 35*, 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096

- Lanzkowsky, P. (2016). Iron-deficiency anemia. *Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology*, 69-83. doi: 10.1016/B978-0-12-801368-7.00006-5
- Leder, K., & Weller, D. (2019). Giardiasis: Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis. *UpToDate*.
- León, A. (2018). *Coinfección de Giardia intestinalis en pacientes con criptosporidiosis mediante la amplificación del gen  $\beta$ -giardina* (Tesis de pregrado). Universidad de Sonora, Sonora, México.
- Lowenstein, C., Vasco, K., Sarzosa, S., Salinas, L., Mosco, A., Perry, M., . . . Graham, J. (2020). Determinants of Childhood Zoonotic Enteric Infections in a Semirural Community of Quito, Ecuador. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1-9. doi: 10.4269/ajtmh.19-0690
- Madigan, M., Martinko, J., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *BROCK. Biología de los microorganismos*. Madrid: PEARSON EDUCACIÓN S.A.
- Martínez, A., & González, A. (2013). *Aplicaciones de la Bioinformática en la elaboración de filogenias moleculares*. Obtenido de <https://www.udc.es/grupos/gibe/uploads/gibe/andres%20ana/filogenias.pdf>
- Norman, F., Comeche, B., Chamorro, S., Pérez-Molina, J., & López-Vélez, R. (2020). Update on the major imported protozoan infections in travelers and migrants. *Future Microbiology* 15(3), 213-225. doi: 10.2217/fmb-2019-0212
- Nunes, B., Calegar, D., Pavan, M., Jaeger, L., Lima, K., Chaves dos Reis, E., . . . Bóia, M. (2018). Genetic diversity of Giardia duodenalis circulating in three Brazilian biomes. *Infection, Genetics and Evolution* , 107-112. doi: 10.1016/j.meegid.2018.02.001
- Oikarinen, S. (2009). PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *Journal of Clinical Virology*, 211-214. doi: 10.1016 / j.jcv.2008.12.017
- Pacheco, F., Carvalho, S., Cardoso, L., Andrade, L., Gisele, M., Gomes, D., & Teixeira, M. (2019). Immune response markers in sera of children infected with Giardia duodenalis AI and AII subassemblages. *Immunobiology*, 224(4), 595-603. doi: 10.1016/j.imbio.2019.04.001
- Pan American Health Organization [PAHO]. (2007). *Ecuador - Health in the Americas Vol. II*. Obtenido de <https://www.paho.org/hia2007/archivosvol2/paisesing/Ecuador%20English.pdf>
- Pedraza, B., Suarez, H., De la Hoz, I., & Fragoso, P. (2019). Prevalencia de parásitos intestinales en niños de 2-5 años en hogares comunitarios de Cartagena de Indias, Colombia. *Revista chilena de nutrición*. doi: 10.4067/S0717-75182019000300239
- Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista peruana de Biología Volumen 18 No.2 Lima* . Obtenido de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-99332011000200023](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332011000200023)

- Perez, C., Zanini, G., Silva, G., da Silva, S., & de Céu, M. (2016). Molecular Characterization of *Giardia lamblia*: First Report of Assemblage B in Human Isolates from Rio de Janeiro (Brazil). *PLoS ONE* 11(8):e0160762. doi: 10.1371/journal.pone.0160762
- Quispe, A. (2017). Giardiasis Epidemiology, Current Topics in Giardiasis, Alfonso J. Rodriguez-Morales, *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.70338.
- Ramírez, J., Heredia, R., Hernández, C., León, C., Moncada, L., Reyes, P., . . . López, C. (2015). Molecular diagnosis and genotype analysis of *Giardia duodenalis* in asymptomatic children from a rural area in central Colombia. *Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases* 2279, 1567-1348. doi: 10.1016/j.meegid.2015.03.015
- Ryan, U., & Cacciò, S. (2013). Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, 943-956. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.06.001
- Sarzosa, M. (2016). *Zoonotic Enteropathogens in a semi-rural community close to Quito* (Tesis de maestría). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.
- Sarzosa, M., Graham, J., Salinas, L., & Trueba, G. (2018). Sarzosa, M., Graham, J. P., Salinas, L., & Trueba, G. (2018). Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis* in Semi-rural Communities Near Quito, Ecuador. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 16(1), 1-6.
- Silva, M. (2017). *Prevalencia de parasitosis intestinal en niños de 2-5 del Centro de Salud Tipo C del Cantón Quero de la provincia de Tungurahua en el periodo agosto 2016 - enero 2017* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Simsek, Z. (2004). Impacto de la Infección por *Giardia* en el desarrollo psicomotor de la población infantil. *Journal of Tropical Pediatrics* 50(2), 90-93. Obtenido de <https://www.siicsalud.com/des/insiiccompleto.php/71727>
- Solano, L., Acuña, I., Barón, M., Morón, A., & Sánchez, A. (2008). Influencia de las parasitosis intestinales y otros antecedentes infecciosos sobre el estado nutricional antropométrico de niños en situación de pobreza. *Parasitología Latinoamericana* 63, 12-19. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/parasitol/v63n1-2-3-4/art03.pdf>
- Sprong, H., Cacciò, S., & Van Der Giessen, J. (2009). JWB. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.06.001
- Staden, R. (1996). The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, 5(3), 233. doi: 10.1007 / bf02900361
- Tarupi, W., Silva, J., & Darquea, L. (2018). Parasitosis intestinal en niños quiteños: análisis desde los determinantes sociales de la salud. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*. doi: 10.26807/remcb.v39i2.655

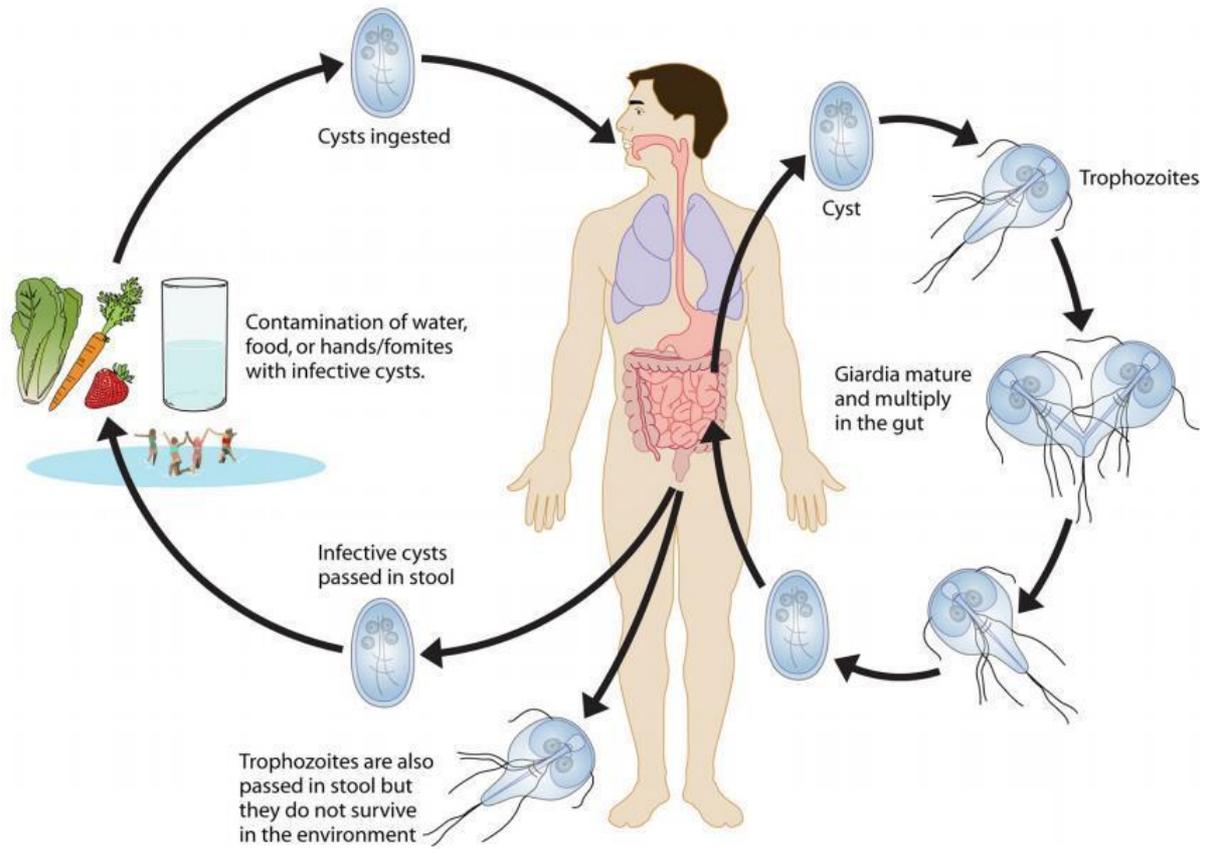
- ThermoFisher Scientific. (2020). *NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-2000#/ND-2000>
- Vanni, I., Cacciò, S., van Lith, L., Lebbad, M., Svärd, S., Pozio, E., & Tosini, F. (2012). Detection of *Giardia duodenalis* Assemblages A and B in Human Feces by Simple, Assemblage-Specific PCR Assays. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(8): e1776. doi: 10.1371/journal.pntd.0001776
- Vasco, K., Graham, J., & Trueba, G. (2016). Detection of Zoonotic Enteropathogens in Children and Domestic Animals in a Semirural Community in Ecuador. *Applied and Environmental Microbiology*, 4218-4224. doi: 10.1128/AEM.00795-16
- Vilcahuamán, M. (2019). *Contaminación por heces de perros y el riesgo a la Salud Pública en las principales avenidas y plazas de los Distritos de la Ciudad de Tacna, año 2017* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna, Tacna, Perú.
- Wang, Y., Gonzalez-Moreno, O., Roellig, D., Oliver, L., Huguet, J., Guo, Y., & Xiao, L. (2019). Epidemiological distribution of genotypes of *Giardia duodenalis* in humans in Spain. *Parasites & vectors*. 12 (1). 432. doi: 10.1186/s13071-019-3692-4
- Weatherhead, J., Arévalo, A., Sandoval, C., Vaca, M., Chico, M., Loor, S., . . . Mejía, R. (2017). Comparison of Cytokine Responses in Ecuadorian Children Infected with *Giardia*, *Ascaris*, or Both Parasites. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1394 - 1399. doi: 10.4269/ajtmh.16-0580
- Zahedi, A., Field, D., & Ryan, U. (2017). Molecular typing of *Giardia duodenalis* in humans in Queensland—first report of Assemblage E. *Parasitology*, 144(9). 1154-1161. doi:10.1017/S0031182017000439
- Zapata, A., Arboleda, L., & Díaz, L. (2016). Giardiasis y desnutrición infantil. *Investigar y Aprender*, 1, 61-73. doi:10.22209/ia.n1a06

## 7. TABLAS

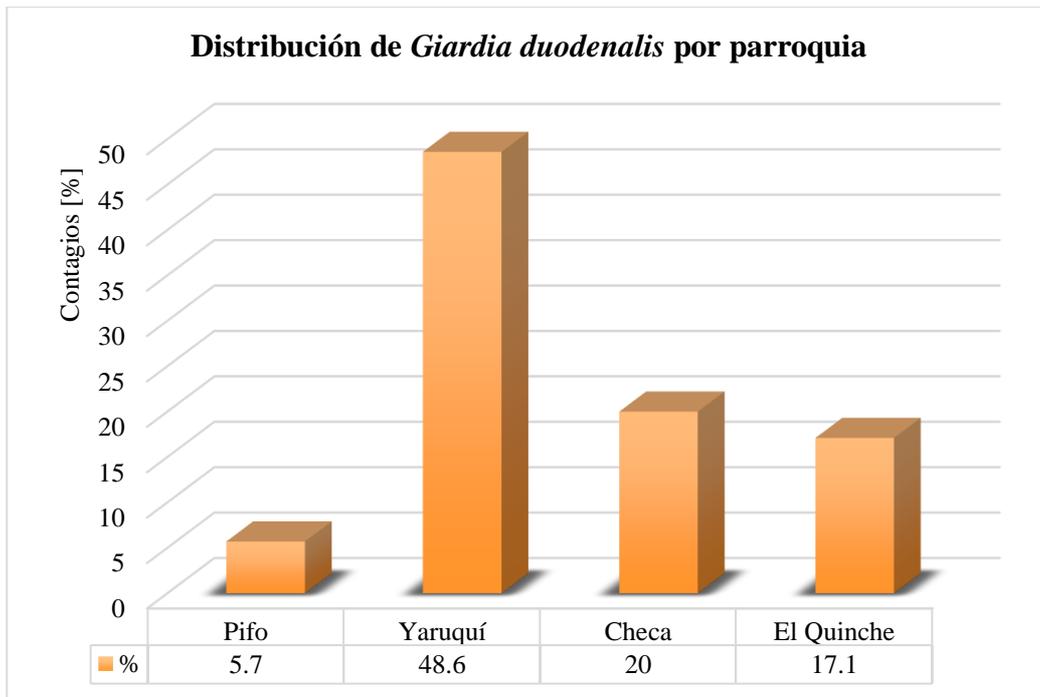
**Tabla 1.** Información demográfica y genotipo encontrado en las muestras analizadas.

<b>ID</b>	<b>Edad</b>	<b>Parroquia</b>	<b>Contacto con animales</b>	<b>Subgenotipo</b>
A2	3	Pifo	Si	BI
A3	4	Checa	No	BI
A5	5	Checa	Si	BI
A6	3	Yaruquí	Si	BI
A7	4	Pifo	No	AIII
A8	1	Yaruquí	Si	BI
A9	1	Checa	Si	BI
A12	4	Pifo	Si	AII
A14	2	Checa	Si	BI
A15	0.7	Yaruquí	No	BI
A17	3	Quinche	Si	BI
A18	2	Pifo	Si	BI

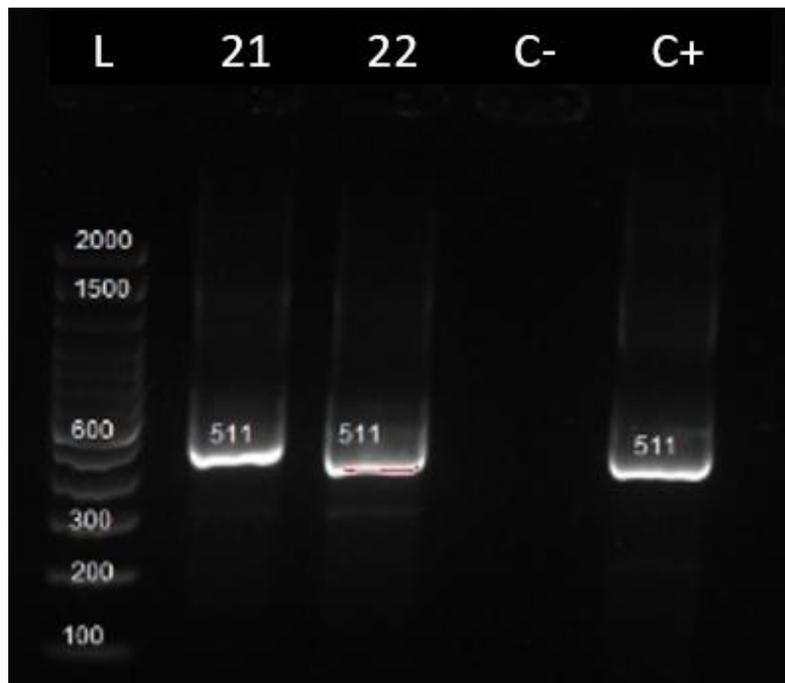
## 8. FIGURAS



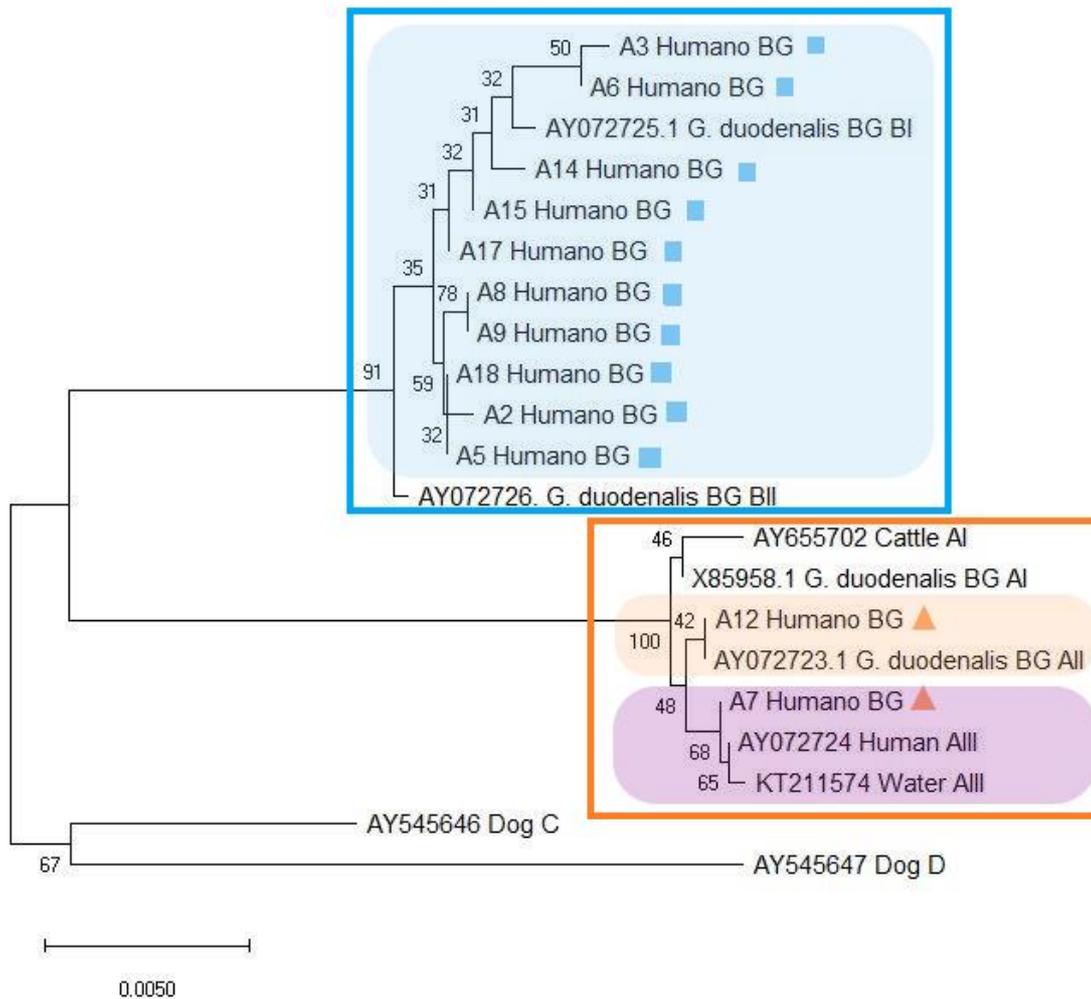
**Figura 1.** Ciclo de transmisión de *Giardia duodenalis* (Esch & Petersen, 2013).



**Figura 2.** Distribución por parroquia de la prevalencia de *Giardia duodenalis* en cuatro parroquias rurales del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ).



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de la amplificación de la región ~511 pb del gen de  $\beta$ -giardina (*bg*).



**Figura 4.** Árbol filogenético obtenido con el método *Neighbor-joining* de 12 secuencias de *Giardia duodenalis*. Las secuencias de referencias obtenidas del *GenBank* se nombran con su número de accesoión, mientras que, las secuencias del presente estudio se representan con cuadrados y triángulos. El subgenotipo BI se representa de color azul, el subgenotipo AII de color naranja y el subgenotipo AIII de color violeta. Las secuencias de los genotipos C y D fueron utilizadas como grupos externos.