

SITUACIÓN ACTUAL DE *GIARDIA* EN ROEDORES DE CANARIAS

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Farmacia

Curso 2019-2020

Alumna: Paula Pérez Ortega

Tutora: Pilar Foronda Rodríguez

Cotutora: Katherine García Livia

Departamento de Parasitología

Modalidad: Mixta

Índice:

Resumen	3
Introducción	4
Hipótesis y objetivo	9
Material y métodos	9
Resultados	11
Discusión	15
Agradecimientos	17
Referencias	18

Resumen:

Giardia duodenalis is one of the most common causes of diarrhoea in human in the world. It infects a large number of vertebrates and is capable of producing zoonoses. The aim of this work was to study the current prevalence of the parasite in rodents in the Canary Islands, the temporal evolution and the possible areas of risk of transmission.

A total of 42 fecal samples from the wild rodents, *Rattus rattus* and *Mus musculus domesticus* from these three islands, El Hierro, Lanzarote and Tenerife, were analysed. Concentration techniques were used to search for *Giardia* cysts under the microscope.

The general prevalence found for *Giardia* was 30.95% with values ranging from 60% to 24.24% in El Hierro and Lanzarote, respectively. The results show that both *R. rattus* (60 %) and *M. m. domesticus* (14,81 %) are infected with *Giardia* sp., being the prevalence for *R. rattus*, significative higher. In Tenerife, *Giardia* sp. was not found in any animals, however, few samples were analyzed in this island.

The results of the study confirm the wide distribution of *Giardia* sp. in rodents in the Canary Islands. Similar prevalence to those published a decade ago was found, although an increase in El Hierro island was observed. Higher prevalence in *R. rattus*, with respect to *M. m. domesticus* was also confirmed. *Giardia* is a zoonotic parasite, and its presence in peridomestic wild animals could implies a risk of transmission to human.

Introducción:

El género *Giardia* se encuentra dentro de un grupo de parásitos pertenecientes al phylum Sarcomastigophora, subphylum Mastigophora, clase Zoomastigophorea, orden Diplomonadida, familia Hexamitidae donde se incluyen diferentes especies (Alcaraz et al. 2002).

Este microorganismo fue identificado por primera vez por Antonie van Leeuwenhoek a finales de 1600 al observar su propia materia fecal (Dobell et al. 1920), quien la incluyó en el phylum Metamonadina. El siguiente en describirla fue Lambl en 1800 como *Cercomonas intestinalis* (Elmendorf et al. 2003). Kunstler, en 1883, fue el que aconsejó el nombre de *Giardia* al género en honor a su profesor A.M Giard de París. En 1915, Stiles lo denominó *Giardia lamblia* en conmemoración a Lambl, que la redescubrió y proporcionó su primera descripción completa (Rajukar et al. 2012). El nombre “duodenalis” fue propuesto por Davaine en 1875 (Cielosyk 2016).

Hoy en día, hay descritas ocho especies de *Giardia* que se consideran válidas *Giardia agilis* Kunstler, 1882 en anfibios, *Giardia ardeae* Filice, 1952 y *Giardia psittaci* Filice, 1952 en pájaros, *Giardia microti* Filice, 1952 y *Giardia muris* Filice, 1952 en roedores, *Giardia duodenalis* Lambl, 1859 (syns. *Giardia intestinalis* y *Giardia lamblia*) en la mayoría de los vertebrados, incluyendo seres humanos, y las especie más recientemente descritas, *Giardia peramelis* Hillman, 2016, en bandicuts australianos y *Giardia cricetidarium* Lyu, 2018 en hámsters (Lyu et al. 2018).

De las ocho especies reconocidas de *Giardia*, *Giardia duodenalis* es la única capaz de provocar la enfermedad en el ser humano pudiendo parasitar también a otros animales tanto salvajes como domésticos. Los aislados de esta especie se subdividen en distintos genotipos según; especie del hospedador, morfología y diferencias moleculares (Thompson et al. 2019). De los genotipos de *G. duodenalis*, los genotipos A y B se corresponden con los principales responsables (99,2%) de los casos en humanos (Sprong et al. 2012)(Tabla 1).

Tabla 1. Especies, genotipos y hospedadores del género *Giardia* (modificado de Lyu et al. 2018, Monis et al. 2009 y Thompson et al. 2019).

Especie de <i>Giardia</i>	Genotipo	Hospedador	Trofozoitos		
			Características morfológicas	Largo (µm)	Ancho (µm)
<i>G. duodenalis</i>	AI	Humanos, primates, perros, gatos, ganado, roedores y otros animales salvajes.	Forma de pera con cuerpo mediano en forma de garfio	12-15	6-8
	All	Humanos			
	B	Humanos	Forma de pera con cuerpo mediano en forma de garfio	12-15	6-8
<i>G. agilis</i>	-	Anfibios	Largo, delgados con cuerpo mediano en forma de garfio	20-30	4-5
<i>G. muris</i>	-	Roedores	Esféricos con cuerpos medianos esféricos y pequeños	9-12	5-7
<i>G. psittsci</i>	-	Aves	Forma de pera sin borde ventral-lateral. Cuerpos medianos con forma de gráfico	~14	~6
<i>G. ardeae</i>	-	Aves	Esféricos con muesca prominente en el disco ventral y flagelo caudal y rudimentario. Cuerpos medianos desde redondo-ovalados hasta los con forma de garfio.	10	6,5
<i>G. microti</i>	-	Roedores	Parecidos a <i>G. duodenalis</i> . Los quistes maduros contienen los trofozoitos completamente diferenciados.	12-15	6-8
<i>G. peramelis</i>	-	Roedores	-	-	-
<i>G. cricetarum</i>	-	Roedores	Forma de pera con cuatro pares de flagelos	12-18	8-12

Debido a que *G. duodenalis*, también afecta a otras especies animales, como se muestra en la tabla 1, se considera a esta especie un parásito zoonótico.

Este parásito, es uno de los causantes más comunes de diarreas por consumo de aguas contaminadas en una gran variedad de especies, entre ellas los humanos, esta patología es también conocida como giardiasis (Doménech 2003).

El ciclo biológico del parásito incluye dos fases o formas, el trofozoito que se corresponde con la forma vegetativa que habita el intestino delgado y la forma de quiste que se corresponde con la forma tanto infectiva como de resistencia que tiene este parásito (Alcaraz et al. 2020).

En cuanto a su morfología:

- Trofozoito (Figura 1)

El trofozoito presenta forma piriforme, con un polo anterior redondeado y un polo posterior más delgado. Tiene un tamaño de 10 a 20 μm de longitud y de 6 a 20 μm de ancho. Poseen dos núcleos, cuatro pares de flagelos y un disco suctor que le permite adherirse al epitelio intestinal, con una parte central denominada axostilo o axonema como consecuencia de un engrosamiento protoplasmático que divide al parásito en dos y que le sirve como esqueleto. Esta forma del parásito no sobrevive en el medio ambiente y es la principal causante de las manifestaciones clínicas, la podemos encontrar en heces líquidas.

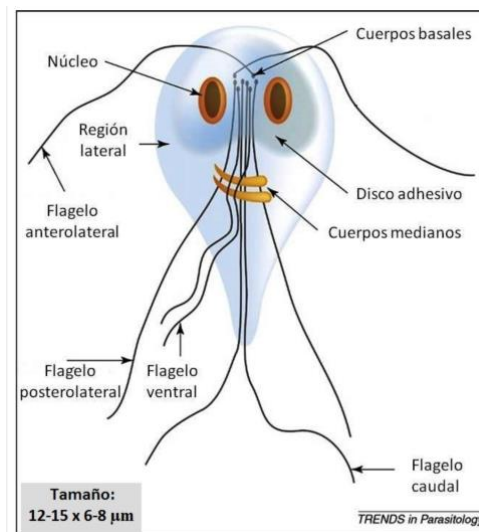


Figura 1. Trofozoito de *Giardia duodenalis* (modificado de Monis et al. 2009)

- Quiste (Figura 2)

El quiste tiene forma ovalada más pequeña que el trofozoito con un tamaño en torno a las 15 µm de longitud y en torno a las 10 µm de ancho. Presenta una pared quística de 0,3 µm de espesor adherida a la membrana plasmática del parásito.

Los quistes inmaduros son binucleados y reciben el nombre de prequistes mientras que los quistes maduros son tetranucleados.

Se corresponde con la forma de resistencia que tiene el parásito para sobrevivir en el medio ambiente y por tanto la causante de su transmisión. La podemos encontrar en heces.



Figura 2. Quiste de *Giardia* sp. Disponible en <http://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html> (consultado el 2 de diciembre de 2019).

En cuanto a su transmisión puede tener lugar tanto entre humanos, de animal a humano o viceversa. Se produce por la ingestión de quistes, que se corresponden con la forma infectiva del parásito, a través del consumo de agua o alimentos contaminados, o vía fecal- oral. Estas formas del parásito sufren un proceso denominado exquistación liberando los trofozoitos, por cada quiste se van a liberar dos trofozoitos. Éstas nuevas formas se multiplican por fisión binaria longitudinal, a partir de ahí, colonizan la parte superior del intestino delgado y se adhieren al epitelio intestinal gracias al disco ventral (Figura 3).

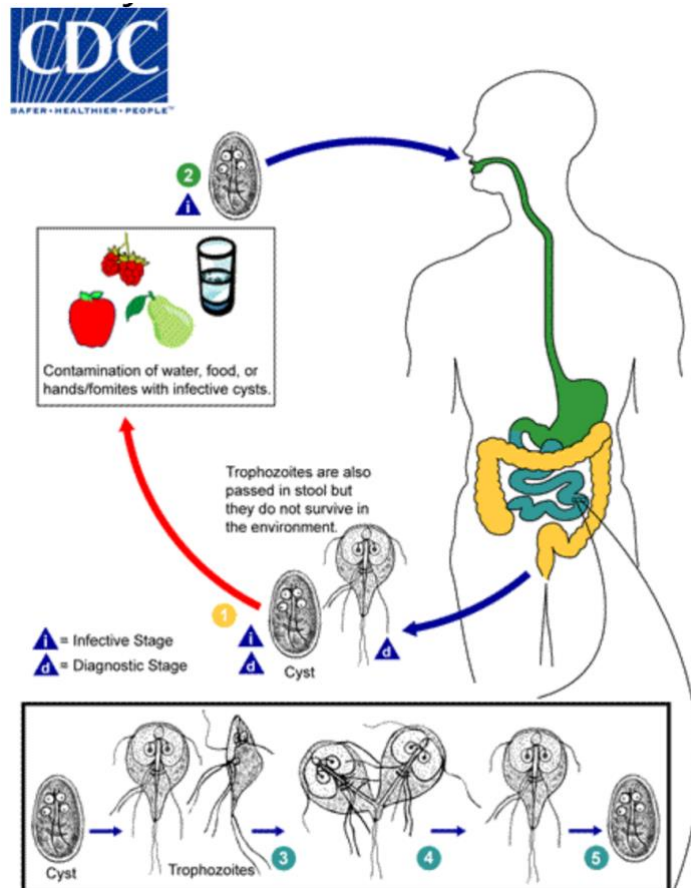


Figura 3. Ciclo biológico *Giardia* sp. Disponible en <https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html> (consultado el 2 de diciembre de 2019).

En cuanto a la sintomatología de las infecciones, varía mucho de unos individuos a otros y pueden ser tanto agudas como crónicas, habiendo incluso hospedadores que permanezcan asintomáticos. Se estima que entre un 2-3% de las diarreas del viajero están causadas por *Giardia* (A. M. S. E 2012).

Entre las manifestaciones clínicas destacan: náuseas, diarrea, gases, heces grasas con tendencia a la flotación, calambres, dolor abdominal y deshidratación. Otros síntomas menos comunes son: picazón, urticaria, hinchazón de los ojos y las articulaciones. Puede causar pérdida de peso y una disminución de la absorción de determinados nutrientes sobretodo vitaminas (CDC 2016).

Su distribución es muy amplia, lo podemos encontrar en todo el mundo, principalmente en zonas tropicales y subtropicales como son el Subcontinente Indio y África occidental. (A. M. S. E 2012).

En Canarias, se llevó a cabo un estudio de *Giardia* en roedores entre 2007 y 2011 (Fernández-Álvarez et al. 2013). En este estudio se detectó varios genotipos de *G. duodenalis*, entre los que se destacan el genotipo B detectado en roedores de la isla de La Palma, ya que éste es capaz de afectar a humanos, además de un nuevo genotipo previamente no descrito.

Hipótesis y objetivo:

Considerando el interés de *Giardia* desde el punto de vista sanitario y su carácter zoonótico, el objetivo del estudio fue analizar la prevalencia actual del parásito en roedores de Canarias y en concreto de las islas de El Hierro, Lanzarote y Tenerife, con el fin de analizar la evolución temporal y las posibles zonas de riesgo de transmisión del parásito. Otro de los objetivos planteados era el de analizar los genotipos presentes en estas islas, con el fin de localizar posibles genotipos de interés sanitario, tal y como ocurrió en la isla de La Palma. Sin embargo, este último objetivo no se pudo abordar debido al Estado de Alarma sanitaria.

Material y métodos:

Se estudiaron un total de 42 muestras mediante microscopía procedentes de roedores capturados en Tenerife, Lanzarote y El Hierro. Las heces fueron colectadas y conservadas en dicromato potásico hasta su estudio.

Parte de la muestra se concentra mediante un proceso de sedimentación:

- En primer lugar, en un tubo de 15ml, se coloca 20-100 µL de heces en dicromato, según la disponibilidad de la muestra.
- En segundo lugar, se añade hasta 14 ml de PBS 1x y se mezcla.
- A continuación, se lleva los tubos a centrifugar 10 minutos a 3.500 rpm y una vez terminado el centrifugado se retira el sobrenadante, la muestra quedará en el fondo del tubo.
- Al tubo que contiene la muestra en el fondo se le añaden: 7 ml de Acetato de Etilo y 7 ml de PBS 1x. Se mezcla bien y se lleva a centrifugar 10 min a 3.500 rpm.
- Una vez centrifugado, se retira de nuevo el sobrenadante. Se añade hasta 14 ml de PBS x1 y se mezcla.

- Se centrifuga 10 minutos a 1.500 rpm. Se elimina casi todo el sobrenadante y se deja un poco para poder mezclar el pellet. En el caso en el que nos quedemos sin sobrenadante podemos añadir unas gotas de PBS 1x hasta el volumen deseado.
- Por último, se pone una gota entre cubre y portaobjetos y se mira al microscopio para la búsqueda de quistes.

Para el cálculo de prevalencias por islas, que se corresponde con el porcentaje de positivos; se divide el número de muestras positivas en isla X/ animales analizados en isla X x 100. En cuanto a la especie del roedor, se calcula su prevalencia de igual forma. En este caso; se divide el número de positivos del roedor X / roedores X analizados en x 100, siendo la prevalencia total el número de positivos de roedores / roedores analizados analizados x 100.

Se utilizó la prueba estadística chi cuadrado para evaluar los resultados parasitológicos y ver si las diferencias entre las dos especies de roedores y entre islas eran significativa. Todo valor de probabilidad inferior a 0,05 se consideró como estadísticamente significativo.

Resultados:

De las 42 muestras analizadas procedentes de roedores de las especies *Mus musculus domesticus* y *Rattus rattus*, 13 de ellas fueron positivas para *Giardia*, de las cuales 9 se correspondían con *R. rattus* y las 4 restantes con *M. m. domesticus* (Tabla 2) (Figura 4) (Figura 5).

	Roedores estudiados	Roedores con <i>Giardia</i>	Prevalencia (%) de roedores con <i>Giardia</i>
<i>Mus musculus domesticus</i>	27	4	14,81%
<i>Rattus rattus</i>	15	9	60%
TOTAL	42	13	30,95%

Tabla 2. Prevalencia de *Giardia* en roedores de Canarias



Figura 4. Quiste de *Giardia* sp en *Rattus rattus*

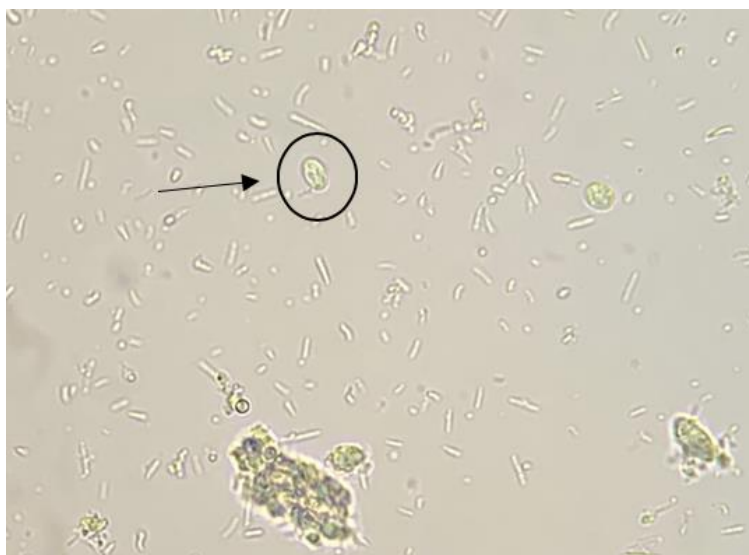


Figura 5. Quiste de *Giardia* sp en *Mus musculus domesticus*

De esas 42 muestras; 29 eran de Lanzarote, 10 de El Hierro y 3 de Tenerife de las cuáles 7 fueron positivas en Lanzarote, 6 en El Hierro y 0 en Tenerife (Tabla 3).

Por lo tanto, se obtuvo una prevalencia de 24,24% en Lanzarote y del 60% en El Hierro (Figura 6) (Figura 7) (Figura 8). En Tenerife no se obtuvo muestras positivas, sin embargo, este dato no es representativo, al haber analizado únicamente tres muestras, por lo que no aparecerán en los gráficos.

Isla	Roedores estudiados	Roedores con <i>Giardia</i>	Prevalencia (%) de roedores con <i>Giardia</i>
Lanzarote	29	7	24,14 %
El Hierro	10	6	60 %
Tenerife	3	0	0 %
TOTAL	42	13	30,95 %

Tabla 3. Roedores con *Giardia* en Lanzarote, Tenerife y El Hierro y prevalencia (%) de roedores con *Giardia*.

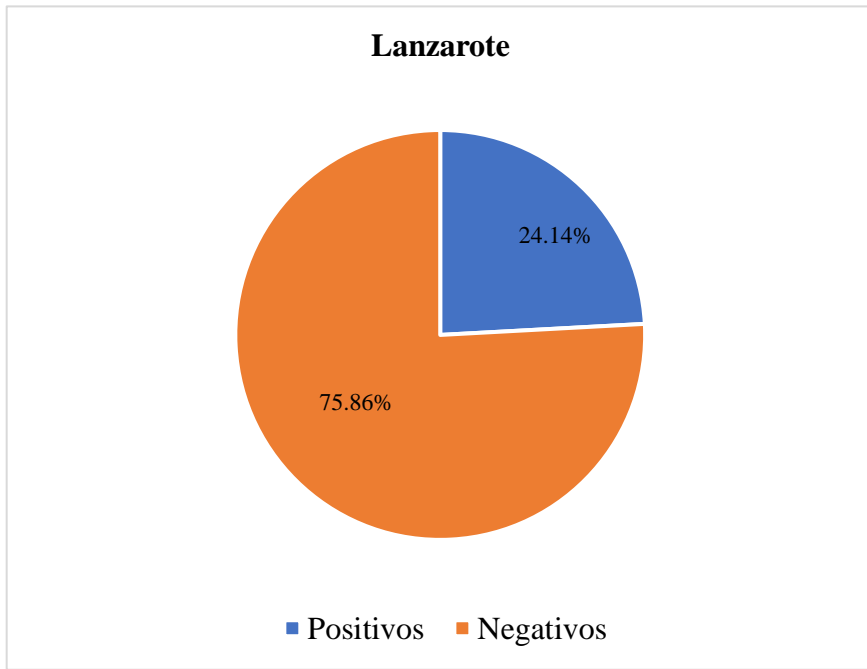


Figura 6. Prevalencia (%) de *Giardia* en Lanzarote

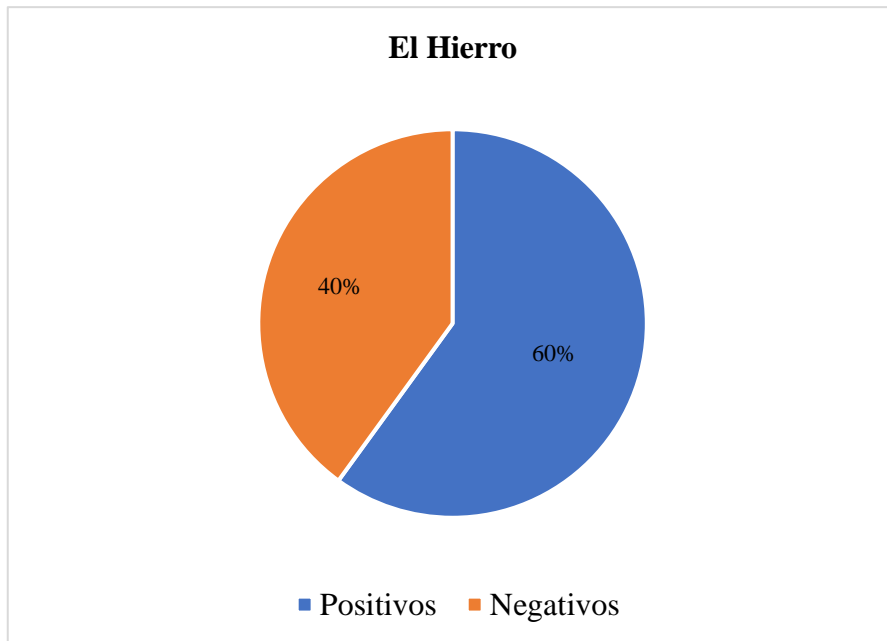


Figura 7. Prevalencia (%) de *Giardia* en El Hierro

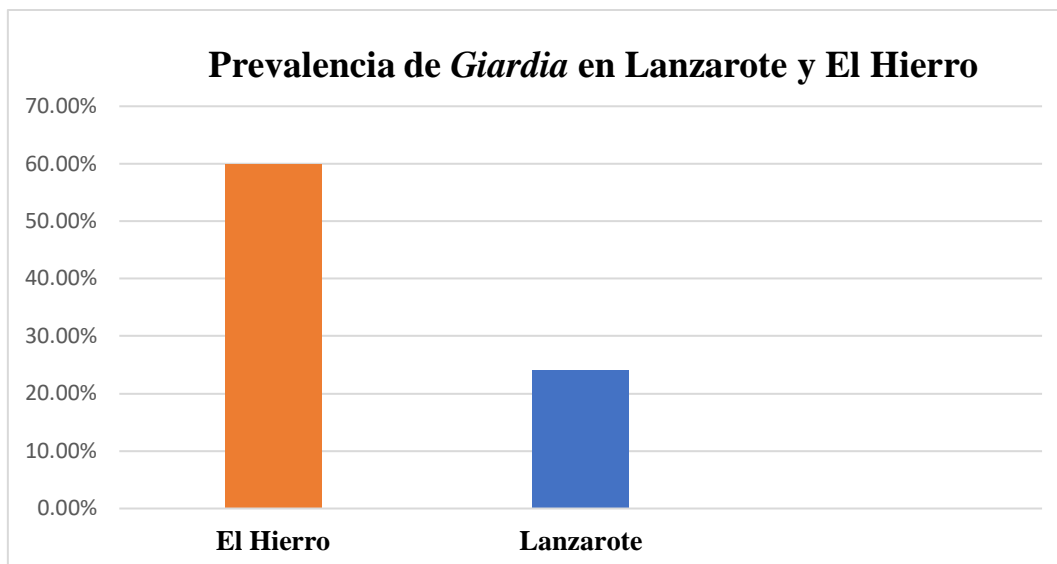


Figura 8. Prevalencia (%) de *Giardia* en Lanzarote y El Hierro

En cuanto a la especie del roedor , la prevalencia total en *R. rattus* (59,93%) fue superior a la de *M. m. domesticus* (14,81%) (valor de $p < 0,05$) ; y si se compara la prevalencia del roedor por islas en Lanzarote la prevalencia de *R. rattus* (70%) es mayor frente a la prevalencia de *M. m. domesticus* (0%) y en el caso de El Hierro se corresponde con un. 66,6% para *M. m. domesticus* y 50% para *R. rattus*. (Tabla 4).

Isla	Roedores estudiados	Prevalencia (%) <i>M. m. domesticus</i>	Prevalencia (%) <i>R. rattus</i>
Lanzarote	29	0 %	70%
El Hierro	10	66,6%	50%
TOTAL	39	14,81%	59,93%

Tabla 4. Prevalencia (%) de *M. m. domesticus* y *R. rattus* en Lanzarote, El Hierro y total.

Discusión:

En el presente estudio, las muestras fueron recogidas a partir de animales capturados entre 2018 y 2019 con un número de casos positivos de 13 frente a 42 muestras analizadas con una prevalencia de 30,95%. Este número de positivos si se compara con el estudio anterior realizado con animales capturados entre 2007 y 2010 (Fernández-Álvarez et al. 2013) en el que el número de positivos fue de 72 frente a 284 animales analizados con una prevalencia de 25,4% se puede ver cómo las prevalencias son similares entre un estudio y otro.

A raíz de los resultados obtenidos se puede observar como existe una mayor prevalencia de *Giardia* sp. en roedores de la isla del Hierro (60%) frente a la isla de Lanzarote (24,24%), a diferencia del estudio de Fernández - Álvarez et al. (2013) donde la mayor prevalencia entre estas dos islas se encuentra en Lanzarote con un porcentaje de positivos de 25,6% frente a un 19,4 % en El Hierro. Por otro lado, se confirma la prevalencia de *Giardia* encontrada en Lanzarote, siendo igual en las dos épocas. La mayor prevalencia encontrada esta vez en El Hierro puede ser debida a diferentes factores, uno de ellos podría ser la época del año en que se tomaron las muestras en los dos estudios, ya que la prevalencia puede fluctuar en función de las condiciones ambientales.

Respecto a la prevalencia total de *Giardia*, por especie hospedadora, en este estudio fue superior en *R. rattus* frente a *M. m. domesticus* ($p < 0,05$), coincidiendo con los datos publicados en 2013 (Fernández – Álvarez et al. 2013). Si se compara la prevalencia de los roedores con *Giardia* por isla, se puede ver como fue mayor en *R. rattus* frente a *M. m. domesticus* (valor de $p < 0,05$) en los roedores de Lanzarote e inferior en el caso de El Hierro siendo *M. m. domesticus* superior en este caso. Sin embargo, con respecto a los resultados del estudio de Fernández- Álvarez et al. (2013), la diferencia entre las prevalencias de *R. rattus* frente a *M. m. domesticus* no fue significativa en ninguna de estas dos islas.

Por lo tanto, en los dos estudios *R. rattus* fue superior en Lanzarote mientras que para el El Hierro los resultados de ambos estudios no coinciden, ya que en nuestro análisis *M. m. domesticus* es superior y en el estudio de Fernández- Álvarez et al. (2013) la prevalencia es mayor en *R. rattus*.

En estudios previos realizados para *Giardia* en roedores, se hallaron prevalencias globales entre 22,2% y 100%. En el presente estudio, la prevalencia global de *Giardia* spp que se obtuvo, 30,95%, fue inferior que la observada en roedores de otras regiones, como Bélgica (66,3% en *Chinchilla lanigera*), Polonia (58,3% y 93,9% en *Myodes glareolus* y 48,3%, 74,2% y 87% en *Apodemus flavicollis*, *Microtus arvalis* y *Ondatra zibethicus*, respectivamente) y Estados Unidos (65,9%, 73,3%, 100% y 100% en *O. zibethicus*, *Myocastor coypus*, *M. glareolus* y *M. arvalis*, respectivamente). Aunque esta prevalencia media observada en nuestro estudio fue similar a las observado en otros casos, como *A. flavicollis* y *Castor canadensis* en los Estados Unidos (33,3% y 33%, respectivamente) y *Mesocricetus auratus*, *Phodopus sungorus*, *Phodopus campbelli* y *Phodopus roborovskii* en China (22,2%) (ver Fernández- Álvarez et al. 2013).

El hecho de que la mayor prevalencia de *Giardia* tenga lugar en El Hierro frente a Lanzarote puede ser debido en parte a las condiciones climatológicas de la isla ya que presenta un clima más húmedo y una mayor vegetación, ideal para la convivencia de este parásito (Fernández-Álvarez et al. 2013).

Estos resultados indican que tanto *R. rattus* como *M. m. domesticus* están infectados con *Giardia* sp. que se ha visto que es algo muy común en todo el archipiélago canario suponiendo por tanto un riesgo potencial de transmisión de roedores a humanos y un importante factor de riesgo para la salud que es necesario controlar.

Agradecimientos:

El estudio fue financiado por el proyecto ProID2017010092 Proyectos I + D de la Consejería de Economía, Industria, Comercio y Conocimiento de la Comunidad Autónoma de Canarias and FEDER 2014-2020.

Referencias:

- Alcaraz Soriana, M. (2002). *Giardia* y giardosis. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 9 (6): 1-6. Consultado el día 2 de abril de 2020, disponible en <https://seimc.org>.
- A.M.S.E (Asociación de médicos de sanidad exterior). Giardiasis. Epidemiología y situación mundial. (2012). Consultado el 2 de diciembre de 2019, disponible en <https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/187-giardiasis-epidemiologia-y-situacion-mundial>.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Giardiasis. (2019). Consultado el 2 de diciembre de 2019, disponible en <https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html>.
- Cielosyk, J. (2016). Caracterización molecular de especies, genotipos y subtipos de *Cryptosporidium* spp. aislados en humanos en España e identificación de *Giardia duodenalis* por técnicas moleculares. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Dobell C. (1920). The discovery of the intestinal protozoa of man. The Royal Society of Medicine. 13 (15): 1-15.
- Doménech, J. (2003). *Cryptosporidium* y *Giardia*, problemas emergentes en el agua de consumo humano. SESA (Sociedad Española de Salud Ambiental). 5(5): 1-5.
- Elmendorf HG, Dawson SC, McCaffery JM (2003) The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. International Journal for Parasitology 33 (25): 3-28.
- Fernández-Álvarez, Á., Martín-Alonso, A., Abreu-Acosta, N., Feliu, C., Hugot, J., Valladares, B., & Foronda, P. (2013). Identification of a novel assemblage G subgenotype and a zoonotic assemblage B in rodent isolates of *Giardia duodenalis* in the Canary Islands, Spain. Parasitology. 10 (4): 1-4.
- Lyu, Z., Shao, J., Xue, M., Ye, Q., Chen, B., Qin, Y., & Wen, J. (2018). A new species of *Giardia* Künstler, 1882 (Sarcomastigophora: Hexamitidae) in hamsters. Parasites & Vectors. 8 (6): 1-6.
- Monis PT, Caccio SM, Thompson RCA (2009) Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. Trends in Parasitology. 25 (2): 93-100.
- Rajurkar MN, Lall N, Basak S, Mallick SK (2012) A simple method for

demonstrating the *Giardia lamblia* trophozoite. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 6 (9): 1492-1494.

- Sprong, H., Caccio, S. M. and van der Giessen, J.W. (2012). Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. PLoS Neglected Tropical Diseases 3, e558. doi: 10.1371/journal.pntd.0000558.
- Thompson, RCA., Ash, A. (2019). Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections - What's new? Infection, Genetics and Evolution. 5 (1): 2.