

**Epidemiología de los Genotipos de *Giardia intestinalis* en perros de
Medellín, Envigado y Bello, usando tres marcadores genéticos**

Giovanny Alexander Torres Lindarte

Trabajo de investigación realizado para optar el título de Magister en
microbiología y bioanálisis

Asesores

Dr. Marcos Restrepo Isaza, Médico parasitólogo
Asesor científico Instituto Colombiano de Medicina Tropical – Universidad CES

Mario Zapata, Bacteriólogo, MSc en ciencias básicas
Director del centro de investigación de la escuela de microbiología
Universidad de Antioquia

Leonardo Rios, Bacteriólogo. Esp. PhD
Investigador escuela de microbiología
Universidad de Antioquia

**Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología y Bioanálisis
Medellín
2011**

TABLA DE CONTENIDO

Portada	1
Lista de tablas	3
Lista de figuras	4
Título	5
Resumen	6
Abstract	7
1. Introducción	9
2. Materiales y métodos	12
2.1 Tipo de estudio.....	12
2.2 Diseño muestral	12
2.3 Análisis estadístico.....	12
2.4 Recolección de las muestras de materia fecal	13
2.5 Análisis parasitológico convencional.....	13
2.6 Encuesta	13
2.7 Concentración de quistes y extracción de ADN	14
2.8 Técnicas moleculares.....	14
3. Resultados	19
3.1 Características de los perros.....	19
3.2 Genotipificación.....	20
4. Discusión	25
Agradecimientos	32
Conflicto de intereses	33
Fuente de financiación	33
Referencias bibliográficas	33

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores empleados en las PCR.....	18
Tabla 2. Secuencias de la Ssu-rRNA obtenidas del GenBank	22
Tabla 3. Resultados de la genotipificación de los tres marcadores	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gel productos PCR marcador <i>bg</i>	30
Figura 2. Gel productos RFLP marcador <i>bg</i>	31
Figura 3. Gel productos PCR marcador Ssu-rRNA	31
Figura 4. Neighbour Joining de las secuencias Ssu-rRNA.....	24
Figura 5. Análisis genealógico de las secuencias Ssu-rRNA	25
Figura 6. Gel producto PCR marcador <i>tpi</i>	32

**Epidemiología de los Genotipos de *Giardia intestinalis* en perros de
Medellín, Envigado y Bello, usando tres marcadores genéticos**

**Epidemiology of the genotypes of *Giardia intestinalis* from dogs from
Medellín, Envigado and Bello, using three genetic markers**

Titulo abreviado: Genotipos de *G. intestinalis* en perros

**Giovanny Torres - Lindarte¹, Mario Zapata², Leonardo Rios², Juan
Guillermo Vergara – Tobón³, Isabel Rojas – Montoya³, Marcos Restrepo -
Isaza¹**

¹ Instituto Colombiano de Medicina Tropical – Universidad CES

² Escuela de Microbiología Universidad de Antioquia

³ Universidad CES

Giovanny Alexander Torres Lindarte

Carrera 43ª N° 52 sur 99, Sabaneta, Antioquia

Teléfono 3053500

Fax: 3014258

gtorres@ces.edu.co

Palabras clave: *Giardia lamblia*, genotipo, perros, marcadores genéticos,
zoonosis, parásito.

Keywords: *Giardia lamblia*, genotype, assemblages, molecular typing, genetic
markers, dogs.

Resumen

Introducción: *Giardia intestinalis* es un complejo de especies que comprende al menos siete genotipos (A-G), donde los genotipos A y B, considerados zoonóticos, son los únicos responsables de las infecciones en las personas, mientras que, los perros pueden ser infectados por los genotipos A, B, C y D, los dos últimos caracterizados como huésped-específicos.

Objetivo: evaluar la epidemiología de los genotipos zoonóticos y huésped específicos de especie de *G. intestinalis* en perros mascotas, del área metropolitana del Valle de Aburra, durante el periodo de Septiembre de 2009 - Octubre de 2010.

Materiales y métodos: inicialmente fueron evaluadas por microscopía 581 muestras de materia fecal de perros, de las cuales 62 muestras resultaron positivas para *G. intestinalis*. Cada muestra fue analizada con los marcadores genéticos β -giardina (*bg*), triosafosfato isomerasa (*tpi*) y la Subunidad pequeña del RNA ribosomal (Ssu-rRNA), mediante técnicas moleculares basadas en PCR.

Resultados: en total, 30 muestras de las 62 (48.4%) se genotipificaron, el 70% como D, el 20% como C, el 6,7% como B y el 3,3% como A; siendo los genotipos huésped específicos los más frecuentes entre los perros estudiados.

Conclusiones: los perros pueden infectarse con cualquiera de los cuatro genotipos de *G. intestinalis*; en el 90% de las muestras se detectaron los genotipos huésped específicos, sin embargo, en algunos perros se detectaron

los genotipos zoonóticos, identificando a los perros como un posible riesgo para la salud pública.

Abstract

Giardia intestinalis is a complex specie comprising at least seven genotypes (A-G). Dogs can be infected with A, B, C and D genotypes. However only the last two are host-specific and A and B genotypes are considered zoonotics and responsible for human infections.

Objective. To evaluate epidemiology of zoonotics and host-specific *G. intestinalis* genotypes responsible for infections of pet dogs attended during September 2009 to October 2011 in the metropolitan area of el Valle de Aburrá

Methods. 581 fecal samples from pet dogs were collected and evaluated by microscopy analyze. Sixty-two fecal samples were positive for *G. intestinalis*. Each of these samples was analyzed by PCR for three different markers: β -giardin (*bg*), triose phosphate isomerase (*tpi*) and small subunit rRNA (ssu-rRNA) genes.

Results. Genotyping was performed in 30 out of 62 (48.4%) samples. 70% were identified as genotype D; 20% as genotype C; 6.7% as genotype B and 3.3% as genotype A. Thus, host-specific genotypes were more frequent in the evaluated samples.

Conclusion. Pet Dogs are susceptible to four *Giardia intestinalis* genotypes. In 90% of the samples host-specific genotypes were found, although, in some pets

zoonotic genotypes were found. That probably indicates that pet dogs are a potential risk for public health.

1. Introducción

En años recientes, las zoonosis y las enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales han sido objeto de mayor atención en todo el mundo, sobre todo las zoonosis ligadas a los animales de compañía, ya que los cambios sociales y demográficos han intensificado su interés epidemiológico (1). Se ha demostrado que animales como los perros pueden transmitir un número significativo de enfermedades a los humanos, algunas de ellas consideradas un problema de salud pública, como es el caso de la giardiasis, parasitosis de gran importancia a nivel mundial por su alta prevalencia y su compleja epidemiología (2, 3).

La giardiasis es causada por un protozoo flagelado del género *Giardia*, miembro de los diplomonadidos y por lo tanto del supergrupo Excavata (4), del cual se han reconocido seis especies; aunque, es solo *G. intestinalis* (sinónimo: *G. lamblia*, *G. duodenalis*) la de mayor importancia, debido a la capacidad que tiene de infectar al humano y a otros vertebrados (5). Estudios de genética molecular, basados principalmente en el análisis de los genes Triosafofato isomerasa, Glutamato deshidrogenasa, Beta-giardina, subunidad pequeña del RNA ribosomal y el factor de elongación 1-alfa, han demostrado que *G. intestinalis* es un complejo de especies que comprende al menos 7 genotipos, donde los genotipos A y B son los responsables de la infecciones en los humanos y en algunos animales, de ahí su potencial zoonótico; mientras que, los genotipos prevalentes en caninos, por ser los huéspedes específicos, son el C y el D, aunque, los zoonóticos (A o B) han sido frecuentemente reportados. Los otros tres (E, F y G) están restringidos a algunos animales

domésticos y silvestres (5-7). Recientemente se informó el hallazgo en vertebrados marinos de un nuevo genotipo, el cual fue designado como H (8). En América no hay suficiente información, comparado con otras zonas del mundo, sobre los genotipos que están circulando entre los perros. De acuerdo con una revisión sistemática hecha para determinar la distribución geográfica en el continente de los genotipos de *G. intestinalis* involucrados en las infecciones de perros, la cual incluyó literatura científica disponible desde 1990 hasta el 2009, y donde solo se encontraron 10 artículos relacionados, demostró que el genotipo más identificado fue el A (6/10 estudios), seguido de los huéspedes específicos C y D (3/10 estudios). El genotipo menos identificado fue el B, coincidiendo con lo descrito, pues éste genotipo no es tan común en los perros como el A. De Colombia no se encontraron reportes al respecto en las bases de datos consultadas (datos sin publicar). La evidencia que involucra a los perros como posible fuente de infección de *G. intestinalis* para los humanos ha incrementado en los últimos años, tanto que, algunos autores consideran que estos animales juegan un papel importante en la cadena de transmisión del parásito (9-12).

La transmisión de *G. intestinalis* básicamente se da por contacto directo con personas infectadas, o por la ingesta de quistes presentes en aguas, alimentos y fómites (13); sin embargo, para los investigadores que respaldan la transmisión zoonótica, los animales también participan activamente en la propagación del parásito. Ellos plantean la transmisión cruzada debido al estrecho vínculo que puede existir entre animales y humanos, como sucede con las mascotas, especialmente con los perros, ya que ellos pueden

contaminar, con trazas de materia fecal adheridas a su pelaje u hocico, elementos con los que luego estarán en contacto las personas (14, 15).

G. intestinalis, es uno de los parásitos más encontrados al coprológico de los caninos y su prevalencia varia alrededor del mundo (16). Estados Unidos reportó en el 2009 una prevalencia del 4% para este parásito, ocupando el segundo lugar después de *Cytoisospora* (4,4%); mientras que en Europa, según datos publicados en el 2010, fue del 24,8%. La prevalencia estimada en Canadá es del 7% y en México del 45% (14, 17-20). Aunque la giardiasis es común en los caninos, muchos países endémicos, donde se cree están los más altos índices de infección en estos animales, desconocen si los perros representan un riesgo significativo para la salud pública.

En Colombia, país endémico para esta parasitosis, los datos sobre la infección en perros son inciertos, pues los pocos estudios encontrados, realizados en Medellín y Bogotá, mostraron diversas prevalencias, entre 1 y 20% (21, 22), pero ninguno de ellos identificó el genotipo causante de la infección. Este desconocimiento no ha permitido aclarar el papel de nuestros caninos como posibles fuentes de infección para las personas. De ahí que, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la epidemiología de los genotipos zoonóticos y huésped específicos de especie de *G. intestinalis* en perros mascotas, del área metropolitana del Valle de Aburra, durante el periodo de Septiembre de 2009 - Octubre de 2010.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal para identificar los genotipos de *Giardia intestinalis* en los perros incluidos, así como, aspectos del animal y de su entorno que pudieran estar asociadas con la infección.

2.2 Diseño muestral

Diseño no probabilístico y de selección por conveniencia. Se colectaron, por un periodo de 12 meses, un total de 581 muestras de tres laboratorios veterinarios ubicados en área metropolitana del Valle de Aburra, Colombia. Los perros de los cuales se obtuvo la muestra de materia fecal fueron aquellos que asistieron a los laboratorios, entre Septiembre de 2009 y Octubre de 2010, de cualquier raza o edad y que fueron reconocidos por una persona o familia como de su propiedad y que decidieron participar en el estudio, firmando el respectivo consentimiento informado.

2.3 Análisis estadístico

El procesamiento y análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 18 (SPSS Inc. Chicago, USA). Para el análisis de la información se realizó un análisis univariado mediante análisis de estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central, dispersión y análisis de frecuencias absolutas y relativas; así como, un análisis bivariado mediante las pruebas Chi-cuadrado y el test exacto de Fisher, con el objetivo de buscar posibles asociaciones entre las variables de estudio.

2.4 Recolección de las muestras de materia fecal

Las muestras, emitidas espontáneamente por los animales, fueron recogidas, sin ningún conservante, en recipientes plásticos por sus dueños o por personal a cargo de la investigación y luego llevadas al laboratorio para su análisis por técnicas parasitológicas convencionales y moleculares. Los participantes ingresaron al estudio en forma consecutiva hasta completar el tamaño de la muestra.

2.5 Análisis parasitológico convencional

Cada muestra se analizó mediante un examen microscópico directo y empleando el método de concentración de Willis-Molloy, el cual es usado de rutina en los laboratorios de diagnóstico veterinarios, teniendo en cuenta los protocolos establecidos (13)

2.6 Encuesta

A cada dueño de perro que fue positivo para la presencia de *Giardia intestinalis* evaluada por las técnicas de análisis parasitológico convencional se le aplicó una encuesta semiestructurada, para indagar sobre aspectos relacionados con su mascota, como raza, sexo, edad, frecuencia de baño, síntomas y algunos hábitos de comportamiento del perro dentro del hogar; en total fueron evaluadas 12 variables.

2.7 Concentración de quistes y extracción de ADN

Después de confirmar la presencia de *G. Intestinalis* con las técnicas convencionales, se procedió a concentrar los quistes utilizando el método comercial Parasep® (DiaSys Europe, Workingham, UK) teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante. El ADN se extrajo a partir de los quistes previamente concentrados, empleando el estuche comercial QIAamp DNA stool minikit (QIAGEN, Hilden, Germany), de acuerdo con su protocolo. El ADN fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

2.8 Técnicas moleculares

Cada una de las 62 muestras se analizó con los marcadores genéticos β -giardina (*bg*), Triosafosfato isomerasa (*tpi*) y Subunidad pequeña del RNA ribosomal (*ssu-rRNA*), mediante técnicas moleculares basadas en PCR. Estos genes son frecuentemente usados en los estudios de genotipificación de *G. intestinalis*. Las amplificaciones se realizaron en un termociclar TECHNE TC-512 (TECHNE DUXFORD, Cambridge, UK). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis a 80 voltios por 1 hora, en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

2.8.1 Marcador β -Giardina.

Este gen ha sido mapeado en el cromosoma 4, tiene una longitud de 90 kb y se caracteriza por codificar una proteína estructural del disco ventral, específica de éste parásito (23), así como por ser moderadamente variable. Para su análisis se utilizó una PCR anidada con posterior digestión del producto con enzima de

restricción (PCR-RFLP); protocolo previamente descrito que permite identificar los siete genotipos (A-G) (24, 25). Inicialmente, se amplificó un fragmento de 753 pb con los iniciadores G7 y G759 (cuadro 1), teniendo en cuenta las siguientes condiciones: un volumen final de reacción de 50 μ l compuesto por: buffer (KCl) a una concentración de 1X, $MgCl_2$ a 1.5 mM, 0.3 μ M de cada uno de los iniciadores, 0.25 μ M de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 1U de *Taq* polimerasa (Fermentas, Foster City, Cal. USA) y 5 μ l de ADN. En la segunda PCR se generó un producto de 511 pb con los iniciadores β GiarF y β GiarR (cuadro 1), bajo las mismas condiciones de la primera reacción. El perfil térmico empleado consistió en: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos (G7-G759) o 55°C por 30 segundos (β GiarF- β GiarR) y 72°C por 30 segundos; por último, una extensión a 72°C por 1 minuto. Para la RFLP, 10 μ l del producto de la última PCR fue digerido con la enzima BsuRI (Hae III) (Fermentas, Foster City, Cal. USA. Cat. ER0151) en un volumen final de 21 μ l por 4 horas a 37°C. El producto de la digestión se separó por electroforesis a 80 voltios por 2 horas, en geles de agarosa al 2.5% teñidos con bromuro de etidio. Los tamaños de bandas esperados para cada uno de los genotipos de interés fueron: Genotipo A, 201, 150, 110 y 50 pb; Genotipo B, 150, 117, 110, 84, 26 y 24 pb; Genotipo C, 194, 150, 102, 50 y 15 pb; Genotipo D, 200, 194 y 117 pb.

2.8.2 Marcador Triosafosfato isomerasa

La longitud del gen es de 200 kb, codifica para una enzima involucrada en el metabolismo de la glucosa, se localiza en el cromosoma 5 y se considera muy variable (23). En este caso se usó una PCR semianidada, definida anteriormente, utilizada para identificar solo los genotipos zoonóticos (A o B) (26, 27). En la primera PCR se amplificó, individualmente, un fragmento de 576 pb para el genotipo A con los iniciadores TPIAIF - TPIAR y de 208 pb para el B con los iniciadores TPIBIF – TPIBR (cuadro 1). La mezcla de trabajo, igual para ambas reacciones, estuvo compuesta por: buffer (KCl) a una concentración de 1X, MgCl₂ a 2.7 mM, 0.3 µM de cada uno de los iniciadores, 0.25 µM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 1.5U de *Taq* polimerasa (Fermentas, Foster City, Cal. USA), albumina de suero bovino (BSA, Fermentas, Foster City, Cal. USA. Cat. B14) a 0.1 µg/µl y 3 µl de ADN, para un volumen final de 30 µl. Los productos de la segunda ronda de amplificación fueron de 476 pb empleando los iniciadores TPIAIF - TPIAR y de 140 pb con los iniciadores TPIBIF - TPIBR, respectivamente. La mezcla utilizada en esta fase fue igual a la anterior, excepto, por el uso del MgCl₂ a una concentración final de 1.25 mM. El perfil térmico aplicado durante las amplificaciones consistió en: una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos (TPIAIF – TPIAR y TPIBIF - TPIBR) o 54°C por 30 segundos (TPIAIF – TPIAR y TPIBIF - TPIBR) y 72°C por 1 minuto; por último, una extensión a 72°C por 10 minutos.

2.8.3 Marcador subunidad pequeña del rRNA

La mayoría de copias del gen que codifica para la ssu-rRNA, alrededor de 60, han sido mapeadas en el cromosoma 1 (23). Las secuencias de rRNA son conservadas a nivel de especies y por lo tanto es un buen marcador molecular para estudios genéticos (6). Para el análisis del marcador ssu-rRNA se realizó la amplificación de secuencias mediante PCR y posteriormente la purificación y secuenciación de los productos, esto con el fin de identificar los siete genotipos (A-G) descritos para *Giardia intestinalis* (28). Se amplificó un fragmento de 292 pb usando los iniciadores RH11 y RH4 (cuadro 1) y las condiciones del perfil térmico descritas previamente (28). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl, que contenía buffer (KCl) a 1X, MgCl₂ a 1.5 mM, 0.12 µM de cada uno de los iniciadores, 0.25 µM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 0.7U de *Taq* polimerasa (Fermentas, Foster City, Cal. USA), Dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma, St. Louis, MO, USA) al 5% y 5 µl de ADN. El perfil térmico utilizado fue: desnaturalización inicial a 96°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos a 96°C por 20 segundos, 59°C por 20 segundos y 72°C por 30 segundos, con una extensión final a 72°C por 7 minutos. Los productos de PCR obtenidos se enviaron a purificar y secuenciar en ambas direcciones en la compañía Macrogen en Corea. La edición de las secuencias se realizó con el programa BioEdit® (Sequence Alignment Editor. Versión 7.0.5.3) y el alineamiento múltiple se realizó con ClustalW® (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Luego de este análisis se seleccionó una secuencia de cada grupo que presentó un 100% de identidad en las comparaciones de nucleótidos, esto con el fin de realizar un BLASTn

(Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), como una primera aproximación metodológica para determinar el genotipo de *G. intestinalis* correspondiente a las muestras amplificadas y secuenciadas en este estudio. Adicionalmente, se descargaron del GenBank varias secuencias de referencia correspondientes a los genotipos A, B, C y D (Cuadro 2). A partir de las secuencias obtenidas en este trabajo y las secuencias de referencia se construyó un árbol filogenético basado en distancias genéticas usando el algoritmo de Neighbour joining (NJ) bajo el modelo Tamura Nei, con un Bootstrap de 1000 réplicas en el programa MEGA versión 3.1 (MEGA 3.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA). Así mismo, se realizó un análisis genealógico usando todas las secuencias (de este estudio y de referencia) mediante el método de parsimonia estadística (Intervalo de confianza de 95%) usando el programa TCS (Phylogenetic network estimation using statistical parsimony. Version 1.21) (29)

Tabla 1. Iniciadores empleados en las PCR

MARCADOR	INICIADOR	ORIENTACIÓN	SECUENCIA	PRODUCTO
<i>bg</i>	G7	F	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC	753
	G759	R	GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC	
	BGiarF	F	GAACGAGATCGAGGTCCG	511
	BGiarR	R	CTCGACGAGCTTCGTGTT	
ssu-rRNA	RH11	F	CATCCGGTCGATCCTGCC	292
	RH4	R	AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG	

<i>tpi</i>	TPIAF-I	F	CGAGACAAGTGTTGAGATG	576
	TPIA-R	R	GGTCAAGAGCTTACAACACG	
	TPIAF-II	F	CCAAGAAGGCTAAGCGTGC	476
	TPIBF-I	F	GTTGCTCCCTCCTTTGTGC	208
	TPIB-R	R	CTCTGCTCATTGGTCTCGC	
	TPIBF-II	F	GCACAGAACGTGTATCTGG	

3. RESULTADOS

3.1 Características de los perros

De las 581 muestras de perros que fueron evaluadas por las técnicas parasitológicas convencionales, solo el 10,67% (62/581) fueron positivos para *G. intestinalis*, de estos, el 59,6% (34/62) tenían más de un año de edad, el 56,5% (35/62) eran hembras y el 43,5% (27/62) machos. La raza más frecuente fue la criolla con un 33,9% (21/62) seguido de la Poodle con un 16,1% (10/62). La mayoría, el 79% (49/62), habitaban en domicilios de la ciudad de Medellín, el resto, en domicilios de algunos municipios del área metropolitana. También se encontró que el 96,8% (60/62) de estos animales nunca habían sido vacunados contra *Giardia* y el 62,1% (36/62) se habían desparasitado en los últimos 6 meses. El 56,5% (35/62) presentó algún síntoma, siendo la pérdida de apetito el más reportado con un 19,4% (12/62). Casi la mitad de los perros, el 48,4% (30/62), defecaban dentro de la casa, los demás lo hacían fuera de ella. La frecuencia de baño en el 74,2% (46/62) de los perros fue igual o menor a 15 días. El 61,3% de estos animales mantenía

una estrecha convivencia con sus dueños, pues permanecían dentro de la casa compartiendo los mismos espacios con ellos. En este estudio no se encontró asociación entre síntomas, edad, sexo, raza, lugar donde permanecía el perro dentro de la casa, lugar donde defecaba y el genotipo identificado.

3.2 Genotipificación

3.2.1 Marcador *bg*

El 45,2% (28/62) de las muestras amplificó con este marcador (Figura 1), donde el 75% (21/28) fue clasificado, de acuerdo con la RFLP (Figura 2), como genotipo D, el 14,3% (4/28) como C, el 7,1% (2/28) como B y el 3,6% (1/28) como A (Cuadro 3).

3.2.2 Marcador *ssu-rRNA*

Del total de muestras positivas para *G. intestinalis*, se logró la amplificación y secuenciación del marcador *ssu-rRNA* en el 22,6% (14/62) de las muestras (Figura 3). Al comparar las 14 secuencias obtenidas en este trabajo con las secuencias de referencia para los genotipos A, B, C y D obtenidas del GenBank (Cuadro 4), se determinó que el 42,9% (6/14) corresponden al genotipo D, el 35,7% (5/14) al C, el 14,3% al B y el 7,1% (1/14) al A (Cuadro 3).

En concordancia con el análisis BLASTn, el árbol filogenético construido por el método de Neighbour joining y la genealogía de los genotipos encontrados, mostraron el agrupamiento de las secuencias pertenecientes a los mismos genotipos, independientemente del lugar de procedencia de la muestra. Así, la secuencia identificada en este trabajo como genotipo A (60GENAMED) agrupó

con las 10 secuencias obtenidas desde el GenBank registradas como genotipo A de muestras de USA, Australia, Holanda, China y Corea; las dos identificadas como B (16GENBMED Y 20GENBMED) lo hicieron con las ocho registradas como B de muestras de USA, Australia y Holanda; las cinco identificadas como C (23GENCMED, 37GENCMED, 30GENCMED, 19GENCMED Y 27GENCMED) agruparon con las dos registradas bajo este genotipo pertenecientes a muestras de Australia; y las seis restantes identificadas como D lo hicieron con las tres registradas con este mismo genotipo de muestras de Australia y Holanda (Figura 4 y 5). Las 14 secuencias obtenidas en este estudio mostraron 100% de identidad, según el genotipo identificado, con las 23 secuencias obtenidas del GenBank. En conjunto, estos resultados validan el proceso de genotipificación de *G. intestinalis* aislada de perros de Envigado y Medellín, ya que se pudo evidenciar que cada genotipo identificado coincidió con las secuencias reportadas en el GenBank.

3.2.3 Marcador *tpi*

Dado que con este marcador solo se podía identificar los genotipos zoonóticos (A o B), únicamente se logró amplificar el 3,2% (2/62) de las muestras (Figura 6), específicamente las dos identificadas como genotipo B, ya que la muestra genotipificada como A con los otros dos marcadores, no amplificó el producto esperado para éste marcador (Cuadro 3).

En total, 30 muestras de las 62 (48.4%) pudieron genotipificarse, el 70% (21/30) como D, el 20% (6/30) como C, el 6,7% (2/30) como B y el 3,3% (1/30)

como A; es decir, en el 90% (27/30) se identificó genotipos huésped específicos y en el 10% genotipos zoonóticos (Cuadro 3).

Tabla 2. Secuencias de la ssu-rRNA obtenidas del GenBank usadas en los alineamientos

Nº ACCESO GenBank	GENOTIPO	FUENTE	PAÍS DE ORIGEN
M54878	A	Humano	USA
AF199446, X52949	A	Humano	Australia
AY826204, AY826206, AY826205	A	Humano	Holanda
AJ293296, AJ293298, AJ293297	A	Humano	China
AJ293301	A	Humano	Corea
AF199447, L29192, AF113898	B	Humano	Australia
U09492	B	Humano	USA
U09491, AY826201, AY826202, AY826207	B	Humano	Holanda
AF199449, AF113899	C	Perro	Australia
AF199443, AF113900, AY827496	D	Perro	Australia

Tabla 3. Resultados de la genotipificación de *Giardia intestinales* usando los marcadores *bg*, *ssu-rRNA* y *tpi*

CÓDIGO MUESTRA	MUNICIPIO	<i>bg</i> Genotipo	<i>ssu-rRNA</i> Genotipo	<i>tpi</i> Genotipo	GENOTIPO DEFINITIVO
1	Envigado	D	D	-	D
2	Medellín	C	-	-	C
5	Medellín	D	-	-	D
12	Medellín	D	D	-	D

15	Medellín	D	D	-	D
16	Medellín	B	B	B	B
19	Envigado	-	C	-	C
20	Medellín	B	B	B	B
23	Medellín	C	C	-	C
25	Medellín	D	D	-	D
26	Medellín	D	-	-	D
27	Medellín	C	C	-	C
29	Medellín	D	-	-	D
30	Medellín	-	C	-	C
34	Medellín	D	-	-	D
36	Medellín	D	D	-	D
37	Medellín	C	C	.	C
41	Medellín	D	-	-	D
43	Medellín	D	-	-	D
47	Medellín	D	-	-	D
48	Medellín	D	D	-	D
49	Envigado	D	-	-	D
51	Bello	D	-	-	D
53	Bello	D	-	-	D
54	Medellín	D	-	-	D
55	Medellín	D	-	-	D

57	Enviado	D	-	-	D
58	Medellín	D	-	-	D
60	Medellín	A	A	-	A
61	Medellín	D	-	-	D

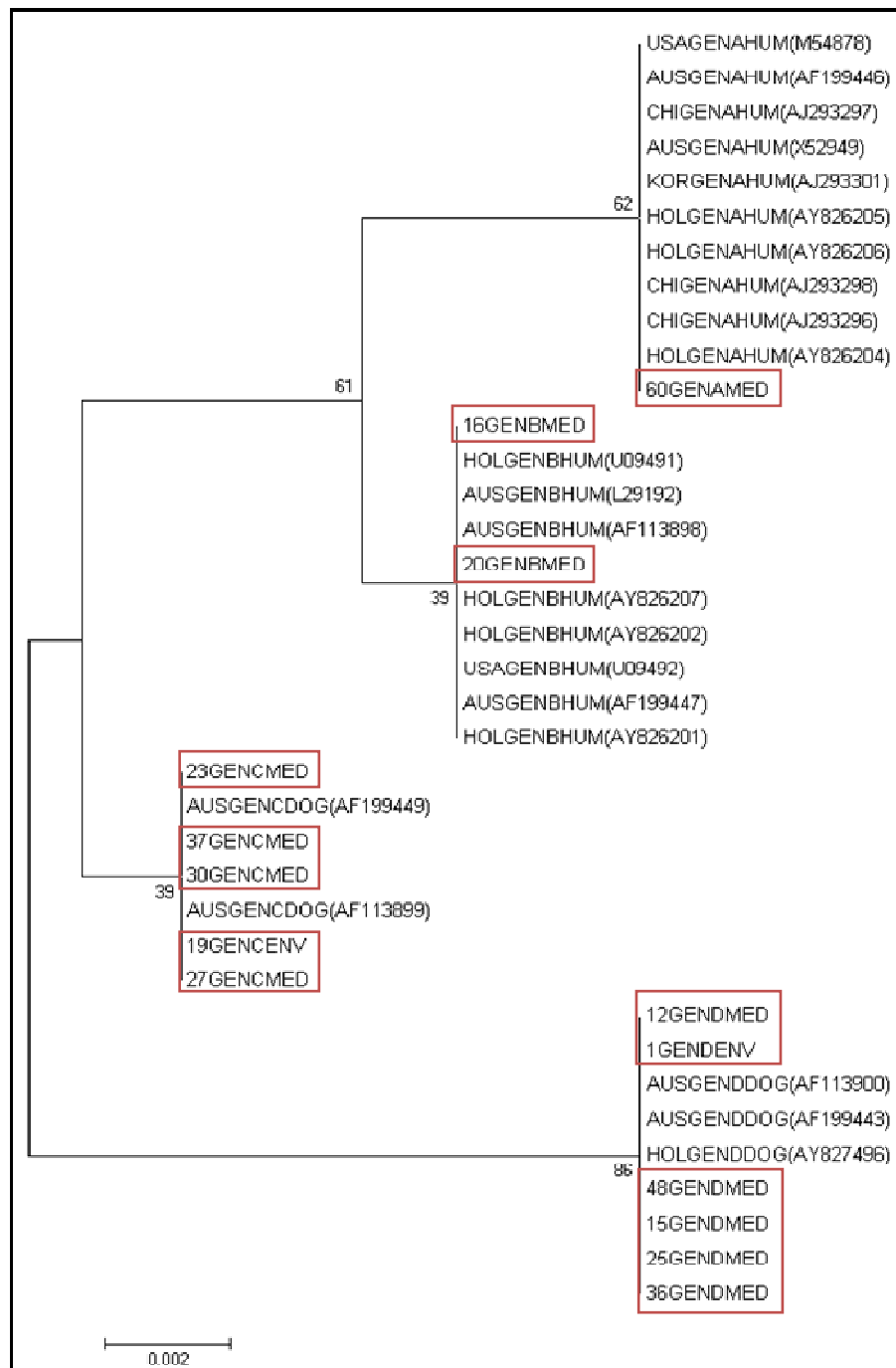


Figura 4. Neighbour Joining (NJ) basado en las distancias genéticas estimadas con las secuencias de la ssu-rRNA obtenidas en este estudio (recuadro rojo) y del GenBank (cuadro 2) bajo el modelo Tamura Nei, con un Bootstrap de 1000 réplicas.

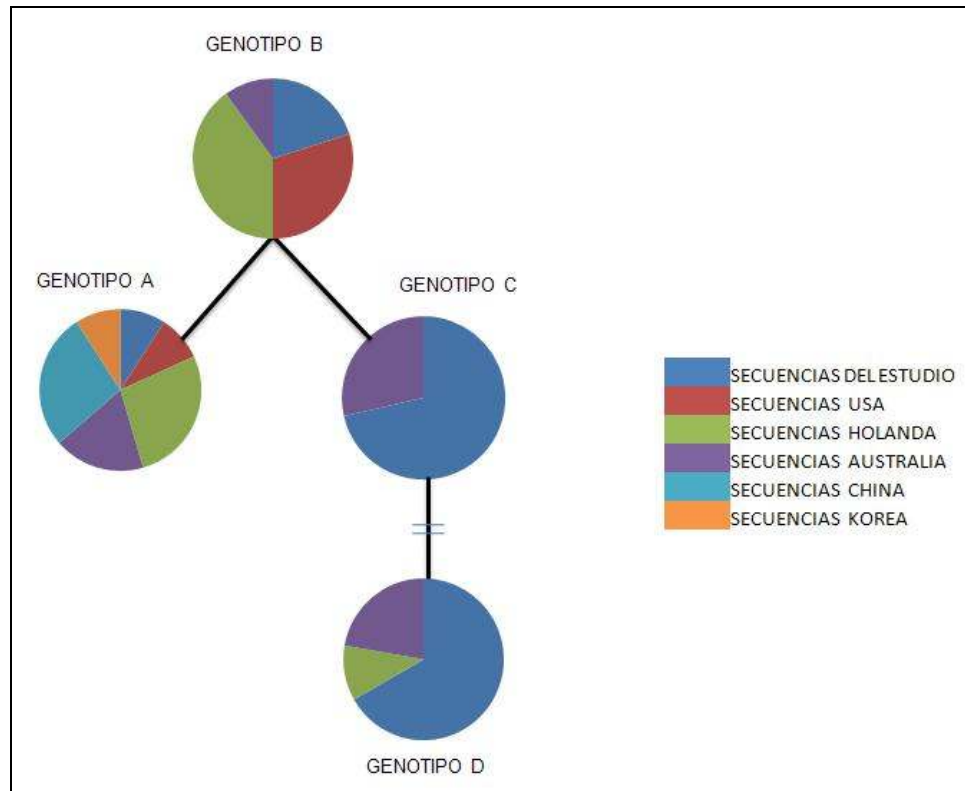


Figura 5. Análisis genealógico de las secuencias de la ssu-rRNA obtenidas en este estudio y del GenBank. Los círculos representan cada genotipo de *G. intestinalis* y las porciones en las que esta dividido cada círculo es proporcional al número de secuencias incluidas en el análisis y cada color el origen de estas. Las barras horizontales representan pasos mutacionales.

4. DISCUSIÓN

En nuestro trabajo fueron utilizados tres marcadores moleculares lo que proporcionó la información necesaria para determinar correctamente el

genotipo de cada aislado, a diferencia de algunos estudios, dónde fue difícil concretar el genotipo debido a variaciones en los resultados; es el caso de una investigación realizada en India, donde se identificó en humanos los genotipos C y D con el marcador *ssu-rRNA*, mientras que, con los marcadores *tpi* y *ef-1* dieron genotipos zoonóticos (10). Algo similar ocurrió en Etiopía, con el marcador *bg* se clasificó aislados de humanos como genotipo F, pero no se pudo confirmar estos resultados con otros marcadores (30). Este fenómeno lo único que ha permitido es generar más preguntas acerca de las técnicas de genotipificación, la biología del parásito, su taxonomía y por supuesto su epidemiología. En ocasiones, el empleo de un solo marcador para caracterizar molecularmente a *G. intestinalis* puede generar resultados confusos; de ahí que en la actualidad sean muy recomendados los estudios multilocus, como los utilizados en nuestro estudio, dado que presentan un alto poder discriminatorio y no permiten asignar equivocadamente el genotipo (10, 30, 31).

En nuestro estudio, el 90% (27/30) de las muestras amplificadas, se genotipificaron como C y D. Entre los genotipos huésped específicos del perro, el D parece ser el más frecuente de los dos, tal como se observó en este trabajo y en otros que han involucrado aislados recuperados de estos animales, pues en Tailandia el genotipo D se encontró en el 31% de los animales estudiados y el C en el 12%, al igual que en Brasil y Nicaragua, donde el D estuvo presente en el 74,1% y el 62,5%, mientras que, el genotipo C, se halló en el 25,9% y el 37,5%, respectivamente (11, 25, 32-34). En este trabajo se encontró algunos perros infectados con los genotipos zoonóticos, lo cual sugiere, la posible transmisión cruzada de estos genotipos entre humanos y

perros debido a la cercanía en la que conviven, pues los tres animales donde fueron identificados los genotipos A y B permanecían solo dentro de la casa. Estos resultados difieren de los encontrados en otros países endémicos para el parásito, como México, Brasil, Tailandia e India, donde prevalecen los genotipos zoonóticos en los caninos (10, 11, 35-37); pero también demuestran, que los genotipos no están restringidos a una sola zona geográfica y que su prevalencia varía entre países.

Interesantemente, se halló en este trabajo el predominio de los genotipos huésped específicos entre perros que habitan áreas urbanas y que comparten espacios con sus dueños, contrario a lo que han documentado algunos autores, los cuales afirman que estos genotipos son más frecuentes en animales de áreas rurales, pues en estos ambientes los caninos, generalmente, no conviven en estrecho contacto con los humanos, como si sucede en las áreas urbanas (3, 15, 37). Este comportamiento probablemente se deba, según Thompson y colaboradores, a que los genotipos huésped específicos, mejor adaptados y por exclusión competitiva, no han permitido que los genotipos A y B, quienes no son propios de los animales, colonicen el intestino de los perros; o porque la frecuencia de transmisión de los genotipos zoonóticos es baja entre los humanos que habitan con ellos, lo cual hace que predomine el genotipo de mayor circulación, que en este caso serían los genotipos huésped específicos del perro (15). Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que perros infectados con los genotipos zoonóticos, como los que encontramos en este estudio, sirvan como fuentes de infección para otros perros así como para los humanos, y que con el tiempo estos

genotipos lleguen a desplazar del todo a los huéspedes específicos, como se cree a sucedido en algunas zonas del mundo donde predominan estos; hecho que modificaría la epidemiología de este parásito entre ambos huéspedes en nuestro medio, pues los perros bajo estas circunstancias se convertirían en un riesgo potencial para los humanos, incluso, bajo condiciones higiénico sanitarias favorables.

Con el marcador *bg* se logró mejores resultados en la amplificación que con el de la *ssu-rRNA*, el 45,2% (28/62) y el 22,6% (14/62) de las muestras, respectivamente, 12 de ellas amplificadas por ambos marcadores (cuadro 3). Algunas de las causas reportadas por las cuales, probablemente, no se pudo obtener los amplificados esperados son: destrucción de los quistes, sobre todo en muestras con baja concentración y almacenadas por largo periodo; quistes no viables; degradación del DNA y la presencia de inhibidores (27, 38-40); aunque, también se reportan elementos propios del marcador a los que se les ha atribuido este tipo de inconveniente, como son, el alto contenido de Guanina y Citosina, en el caso del marcador *ssu-rRNA*, o polimorfismos sobre la secuencia blanco de los iniciadores que no permiten el correcto alineamiento (5, 24, 27, 41). A pesar de implementar medidas para controlar estas variables, como el procesamiento de las muestras (extracción de ADN y PCR) después de recibidas, el uso de un estuche de extracción con un método de remoción de inhibidores de la materia fecal, la dilución de cada una de estas, el uso de ciertos reactivos (BSA, DMSO) y la reamplificación de algunos productos, no fue posible genotipificar un mayor número aislados. Resultados similares se han presentado en algunos estudios que han utilizado los mismos marcadores.

En India, solo se amplificó 8 de las 23 muestras estudiadas con el marcador *ssu-rRNA* y 17 de 29 con el *tpi* (10). En Argentina, durante dos estudios realizados, ambos usando el marcador *tpi*, se amplificó 28 de 34 muestras en uno y en el otro 43 de 60 (27, 42). Incluso, también se han presentado los mismos inconvenientes con marcadores diferentes a los usados en este estudio, es el caso de un trabajo realizado en Cuba, que empleó el marcador *gdh*, donde solo se amplificó 20 de las 95 muestras incluidas (39). Lo anterior demuestra, que la no amplificación de los diferentes marcadores es uno de los problemas con los que se tiene que enfrentar los investigadores al momento de genotipificar *G. intestinalis*.

Según los resultados conseguidos, no se presentó infecciones por dos genotipos al tiempo, es decir, infecciones mixtas, como si se ha visto en otros trabajos, donde también han genotipificado *G. intestinalis* de perros pertenecientes a zonas urbanas, pues en Alemania, un estudio encontró el 28% de los perros infectados con dos genotipos y uno realizado en Tailandia encontró el 33% (11, 12).

La frecuencia de infección por *G. intestinalis* en este trabajo fue del 10,67%, concordando con las reportadas en algunos países de América con condiciones socioeconómicas similares a Colombia. En Brasil se han registrado frecuencias entre un 10% y 30%, en México de 45% y en Perú entre un 9% y 15%% (14, 43-45). Sin embargo, es importante mencionar que los perros diagnosticados en este estudio, fueron animales, que en su mayoría, presentaron algún síntoma, no se tuvo en cuenta los asintomáticos, donde

probablemente se encuentre un número importante de caninos infectados, lo que podría aumentar esta frecuencia.

En conclusión, este es el primer reporte en Colombia que aporta información acerca de genotipos de *G. intestinalis* en perros. Los estudios multilocus presentan un alto poder discriminatorio y permiten interpretar los resultados con mayor seguridad. Los cuatro genotipos que pueden infectar a los caninos están circulando entre perros de Medellín. Aunque, se encontró pocos animales infectados con los genotipos zoonóticos, éstos pueden representar un riesgo para la salud pública, ya que es probable que actúen como fuentes de infección para los humanos, incluso, para otros animales. Nuevas investigaciones que involucren diferentes huéspedes de *G. intestinalis* son requeridas para seguir comprendiendo la transmisión y su compleja epidemiología, pero también, para determinar el verdadero potencial zoonótico de este parásito, tema que en la actualidad está siendo cuestionado.

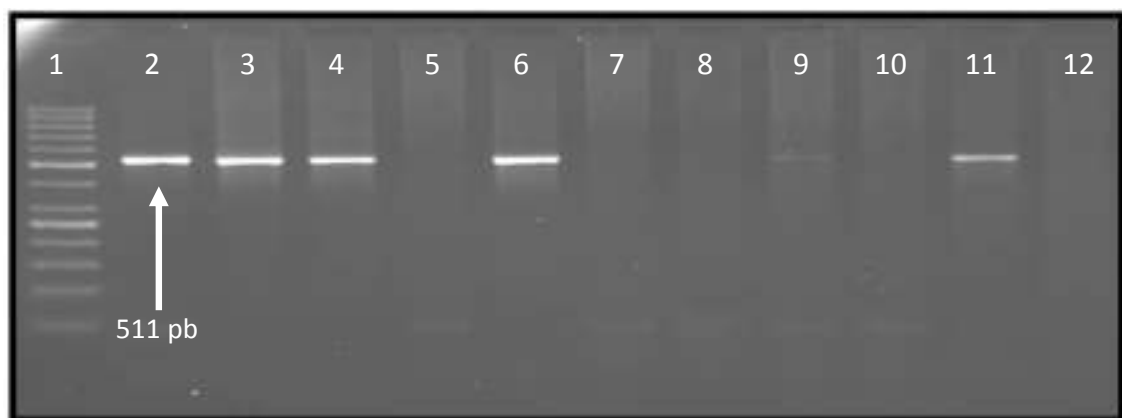


Figura 1. Productos PCR anidada marcador *bg*; carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb); carril 2: control positivo (cepa WB *G. intestinalis*); carril 3 a 11: muestras de perros; carril 12: control negativo.

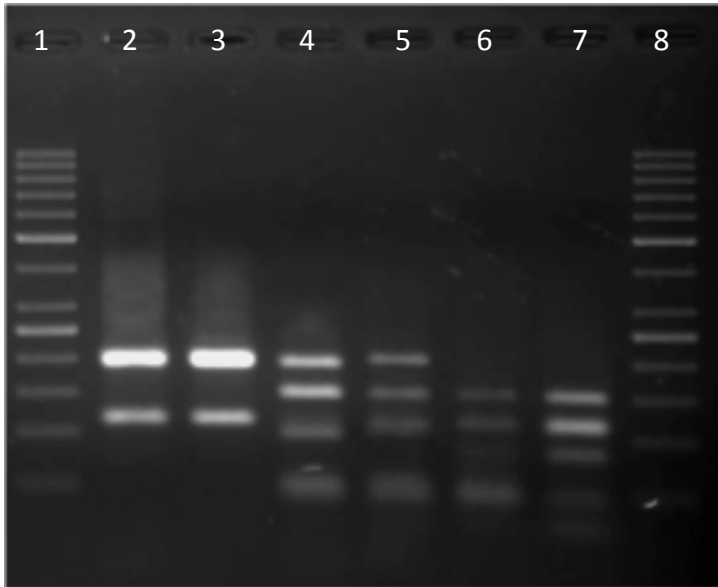


Figura 2. Productos RFLP marcador *bg*; carril 1 y 8: Marcador de peso molecular (50 pb); carril 2 y 3: genotipo D; carril 4: genotipo C; carril 5: genotipo A; carril 6 y 7: genotipo B.

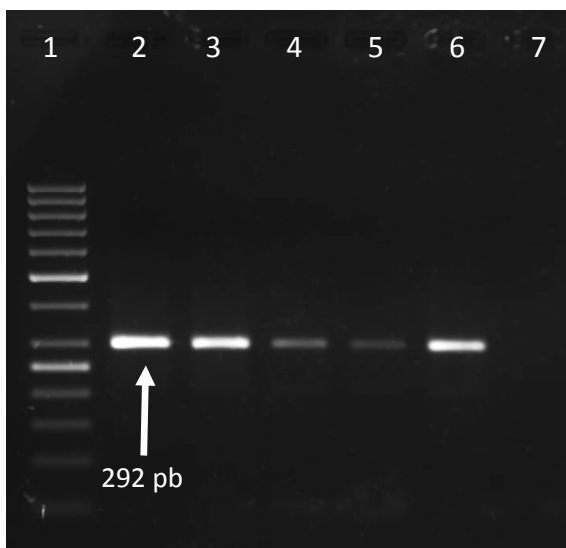


Figura 3. Productos PCR marcador *ssu-rRNA*; carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb); carril 2: control positivo (cepa WB *G. intestinalis*); carril 3 a 6: muestras de perros; carril 7: control negativo.

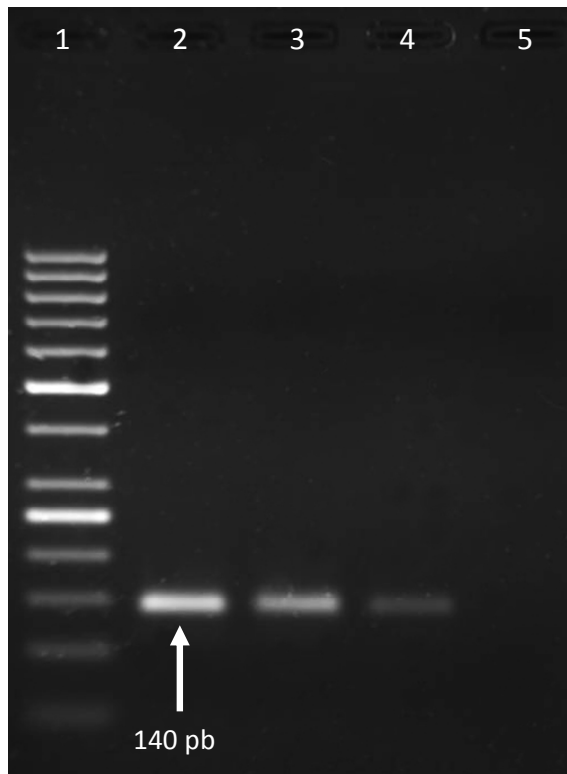


Figura 6. Productos PCR semianidada marcador *tpi* para genotipo B; carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb); carril 2: control positivo (cepa GS *G. intestinalis*); carril 3 y 4: muestras de perros; carril 5: control negativo.

AGRADECIMIENTOS

A la dirección de investigación y a la facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la universidad CES, así como, al Instituto Colombiano de Medicina Tropical por el apoyo recibido; al Bacteriólogo Arley Caraballo y a los laboratorios veterinarios del ICMT, Veterlab, Bioanálisis y TestLab, por su aporte en la consecución de las muestras; a Miryan Margot Sánchez por sus aporte y orientación durante el proyecto, a Lina Gutiérrez por su colaboración en los análisis de las secuencias; al grupo de investigación LIBBIQ-UN de la

Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá y al Doctor Hugo Luján por la donación de las cepas de referencia.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que no existen conflictos de intereses.

FUENTE DE FINANCIACIÓN

Este estudio fue financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad CES y por el Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES.

REFERENCIAS

1. Acha P, Szyfres B, Bureau P. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre ya los animales: Pan Amer Health Org; 2003.
2. Pacheco R. Mascotas en los hogares: enfermedades de los niños adquiridos por convivencia con animales. *Enferm Infec Microbiol.* 2003; 23(4): 137-48.
3. Thompson R. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol.* 2000; 30: 1259-67.
4. Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2005; 52(5): 399-451.
5. Adam R. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews.* 2001; 14(3): 447-75.
6. Wielinga C, Thompson R. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology.* 2007; 134(12): 1795-821.

7. Thompson R, Hopkins R, Homan W. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today*. 2000; 16(5): 210-3.
8. Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol*. 2010; 40(9): 1063-74.
9. Traub R, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson R. 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*. 2002; 67(5): 539-45.
10. Traub R, Monis P, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson R. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology*. 2004;128(3): 253-62.
11. Traub R, Inpankaew T, Reid S, Sutthikornchai C, Sukthana Y, Robertson I, et al. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in Temple communities in Bangkok a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Trop*. 2009;111(2): 125-32.
12. Leonhard S, Pfister K, Beelitz P, Wielinga C, Thompson R. The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Vet Parasitol*. 2007; 150(1-2): 33-8.

13. Botero D. Parasitosis humanas: Corporación para investigaciones Biológicas; 2006.
14. Ponce-Macotela M, Peralta-Abarca G, Martínez-Gordillo M. *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico City. *Veterinary parasitology*. 2005; 131(1-2): 1-4.
15. Thompson R. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary parasitology*. 2004; 126(1-2): 15-35.
16. Traub R, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson R. Canine gastrointestinal parasitic zoonoses in India. *Trends in parasitology*. 2005; 21(1): 42-8.
17. Little SE, Johnson EM, Lewis D, Jaklitsch RP, Payton ME, Blagburn BL, et al. Prevalence of intestinal parasites in pet dogs in the United States. *Veterinary Parasitology*. In Press, Corrected Proof.
18. Epe C, Rehker G, Schnieder T, Lorentzen L, Kreienbrock L. *Giardia* in symptomatic dogs and cats in Europe Results of a European study. *Veterinary Parasitology*. 2010; 173: 32-8.
19. Jacobs SR, Forrester CP, Yang J. A survey of the prevalence of *Giardia* in dogs presented to Canadian veterinary practices. *Can Vet J*. 2001; 42(1): 45-6.
20. Shukla R, Giraldo P, Kraliz A, Finnigan M, Sanchez AL. *Cryptosporidium* spp. and other zoonotic enteric parasites in a sample of domestic dogs and cats in the Niagara region of Ontario. *Can Vet J*. 2006; 47(12): 1179-84.

21. Caraballo AJ JA, Loaiza J. Prevalencia de parásitos intestinales en caninos atendidos en el centro de veterinaria y zootecnia de la universidad CES, 2007. Revista CES/Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2007; 14: 447-75.
22. Guzmán R. Estudio epidemiológico retrospectivo de enfermedades zoonóticas de 1997 a 2003 en Colombia (parte II); Rev med vet (Bogota). 2006; 11: 63-72.
23. Cacciò S, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. Molecular & Biochemical Parasitology. 2008; 160(2): 75-80.
24. Caccio S, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int J Parasitol. 2002; 32: 1023 - 30.
25. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò S. Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. Int J Parasitol. 2005; 35(2): 207-13.
26. Amar C, Dear P, Pedraza-Díaz S, Looker N, Linnane E, McLauchlin J. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. J Clin Microbiol. 2002; 40(2): 446-52.
27. Molina N, Polverino D, Minvielle M, Basualdo J. PCR amplification of triosephosphate isomerase gene of *Giardia lamblia* in formalin-fixed feces. Rev Latinoam Microbiol. 2007; 49(1-2): 6-11.

28. 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.
29. Clement M, Posada D, Crandall KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol.* 2000; 9(10): 1657-9.
30. Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop.* 2007; 102(2): 92-9.
31. Cacciò SM, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int J Parasitol.* 2008; 38: 1523-31.
32. Abe N, Kimata I, Iseki M. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. *J Vet Med Sci.* 2003; 65(1): 29-33.
33. Souza S, Gennari S, Richtzenhain L, Pena H, Funada M, Cortez A, et al. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Vet Parasitol.* 2007; 149(3-4): 258-64.
34. Lebbad M, Ankarklev J, Tellez A, Leiva B, Andersson J, Svärd S. Dominance of *Giardia* assemblage B in Leon, Nicaragua. *Acta Tropica.* 2008; 106(1): 44-53.

35. Eligio-García L, Cortes-Campos A, Jiménez-Cardoso E. Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasitol Res.* 2005; 97(1): 1-6.
36. Ponce-Macotela M, Martínez-Gordillo M, Bermúdez-Cruz R, Salazar-Schettino P, Ortega-Pierres G, Ey P. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *Int J Parasitol.* 2002; 32(9): 1201-2.
37. Eligio-García L, Cortes-Campos A, Cota-Guajardo S, Gaxiola S, Jiménez-Cardoso E. Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using beta-giardin restriction gene. *Vet Parasitol.* 2008; 156(3-4): 205-9.
38. Wilke H, Robertson LJ. Preservation of *Giardia* cysts in stool samples for subsequent PCR analysis. *J Microbiol Methods.* 2009; 78(3): 292-6.
39. Pelayo L, Nuñez F, Rojas L, Furuseth Hansen E, Gjerde B, Wilke H, et al. *Giardia* infections in Cuban children: the genotypes circulating in a rural population. *Ann Trop Med Parasitol.* 2008; 102(7): 585-95.
40. Robertson LJ, Hermansen L, Gjerde BK, Strand E, Alvsvåg JO, Langeland N. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(3) :2212-7.
41. Winkworth CL, Learmonth JJ, Matthaei CD, Townsend CR. Molecular characterization of *Giardia* isolates from calves and humans in a region

in which dairy farming has recently intensified. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(16): 5100-5.

42. Minvielle M, Molina N, Polverino D, Basualdo J. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(1): 98-103.
43. Meireles P, Montiani-Ferreira F, Thomaz-Soccol V. Survey of giardiasis in household and shelter dogs from metropolitan areas of Curitiba, Paraná state, Southern Brazil. *Vet Parasitol.* 2008; 152(3-4): 242-8.
44. Zárate D, Chávez A, Casas E, Falcón N. Prevalencia de *Giardia* sp. en canes de los distritos del Cono Sur de Lima Metropolitana. *Rev investig vet Perú.* 2003; 14(2): 134-9.
45. Araujo W, Chávez A, Casas E, Falcón N. Prevalencia de *Giardia* sp. en Canis familiaris de los distritos de la Provincia Constitucional del Callao. *Rev Inv Vet Perú.* 2004; 15(2): 145-50.