



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Asociación de *Giardia duodenalis* y diarreas en crías de
alpaca (*Vicugna pacos*) en los distritos de Maranganí
(Cusco) y Nuñoa (Puno)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

César Arturo VALDIVIA CARRERA

ASESOR

Luis Antonio GÓMEZ PUERTA

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Valdivia C. Asociación de Giardia duodenalis y diarreas en crías de alpaca (Vicugna pacos) en los distritos de Maranganí (Cusco) y Nuñoa (Puno) [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	César Arturo Valdivia Carrera
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47572753
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0002-2606-1891
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Luis Antonio Gómez Puerta
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10810335
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7909-979X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	María Elith Vásquez Cachay
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09945245
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Alfonso Chavera Castillo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07428322
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Sergio Danilo Pezo Carreón
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	24674530
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.4.1.5. Microbiología y Parasitología Veterinaria
Grupo de investigación	Ateneo Abocado a Responder Amenazas y Oportunidades del Sector Pecuario - ATENEO
Agencia de financiamiento	-
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Cusco - Puno Provincia: Canchis - Melgar

	Distrito: Maranganí (latitud: -14.3569; longitud:-71.1689) - Nuñoa (latitud: -14.4764; longitud: -70.6361)
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Enero 2019 - Febrero 2022
URL de disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **martes 24 de noviembre de 2022**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **0026-EPMV/FMV-2022**, integrado por los siguientes profesores:

MV. Dra. Vásquez Cachay, María Elith
MV. Mg. Gómez Puerta, Luis Antonio
MV. MSc. Chavera Castillo, Alfonso
MV. Mg. Pezo Carreon, Sergio Danilo

Presidente del Jurado
Asesor de la Tesis
Miembro del Jurado
Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **VALDIVIA CARRERA, CÉSAR ARTURO** para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“ASOCIACIÓN DE GIARDIA DUODENALIS Y DIARREAS EN CRÍAS DE ALPACA (*Vicugna pacos*) EN LOS DISTRITOS DE MARANGANÍ (CUSCO) Y NUÑO A (PUNO)”,

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **dieciocho (18)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:05 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:



Firmado digitalmente por VASQUEZ
CACHAY Maria Elith FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 29.05.2023 12:07:13 -05:00

.....
Vásquez Cachay, María Elith: MV. Dra. Prof. Principal DE

.....
Gómez Puerta, Luis Antonio: MV. Mg. Prof. Auxiliar TC

.....
Chavera Castillo, Alfonso: MV. Prof. Principal TC

.....
Pezo Carreon, Sergio Danilo: MV. Mg. Prof. Asociado DE



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ep.veterinaria@unmsm.edu.pe
"AÑO DE LA UNIVERSALIZACIÓN DE LA SALUD"



INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario

1. Facultad: Medicina Veterinaria
2. Escuela: Medicina Veterinaria
3. Autoridad académica que emite el informe de originalidad: Escuela Profesional de Medicina Veterinaria.
4. Apellidos y Nombres de la Autoridad Académica: Santiani Acosta, Alexei Vicent
5. Operador del Programa Informático de similitudes: Sandoval Monzón Rocío Silvia.
6. Documento evaluado: *"Asociación de la ocurrencia de Giardia duodenalis con la presentación de diarreas en crías de alpacas (Vicugna pacos) en los distritos Maranganí (Cusco) y Nuñoa (Puno)"*
7. Autor del documento: Valdivia Carrera, César Arturo
8. Fecha de recepción del documento: 15 de febrero del 2022
9. Fecha de aplicación del programa informático: 18 de febrero del 2022
10. Software utilizado
 - Turnitin
11. Configuración del programa detector de similitudes:
 - Excluye textos entrecomillados
 - Excluye bibliografía
 - Excluye cadenas menores de 40 palabras
 - Exclusión de fuentes para buscar similitud
12. Porcentaje de similitudes según programa detector de similitudes: 5%
13. Fuentes originales de similitudes encontradas:
 - Cybertesis.unmsm.edu.pe: 3%
 - www.scielo.org.pe <1%
 - Una Ryan, Alireza Zahedi. "Molecular epidemiology of giardiasis from a veterinary perspective", Elsevier BV, 2019: <1%
 - repositorioinstitucional.uson.mx: <1%
 - "Giardia", Springer Science and Business Media LLC, 2011: <1%
 - Simone M. Cacciò, Marco Lalle, Staffan G. Svärd. "Host specificity in the Giardia duodenalis species complex", Infection, Genetics and Evolution, 2017: <1%
 - flap2017.com: <1%
 - idoc.pub: <1%
 - researchrepository.murdoch.edu.au: <1%
 - www.upch.edu.pe: <1%
 - www.mla.com.ua: <1%

- eprints.ucm.es: <1%
- sedici.unlp.edu.ar: <1%

14. Observaciones: el mayor porcentaje de las similitudes halladas en la tesis evaluada se encuentra en la sección fuentes de internet.

15. Calificación de originalidad:

DOCUMENTO CUMPLE CRITERIOS DE ORIGINALIDAD, SIN OBSERVACIONES.

Fecha del informe: 18 de enero del 2022



Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta
Director EPMV

DEDICATORIA

A mis padres, Martha y César, por ser los artífices de cada uno de mis logros, entre los que se incluye este trabajo, y por representar el principal cimiento en la construcción de mi vida profesional.

A mis hermanos, Irma, Karil y Kevin, por brindarme su apoyo incondicional en aquellos difíciles momentos y por alentarme a conseguir mis ideales.

A cada uno de ellos, mi más profundo amor, agradecimiento y eterna admiración.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Luís Antonio Gómez Puerta, asesor de la tesis, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo el presente trabajo de investigación y por su constante orientación en el campo académico.

A la Dra. María Teresa López Urbina y al Dr. Armando Emiliano Gonzalez Zariquey, por permitirme el ingreso al laboratorio de Epidemiología y Economía Veterinaria, y por contribuir enormemente en mi formación profesional.

Al Dr. Johan Carrasco Osis por su completa disposición y colaboración en la obtención de las muestras para el presente estudio.

A los compañeros, Ana Vargas, Soraya Guevara y Luís Julca, por los gratos momentos y por el apoyo en la culminación de este trabajo tan relevante para mi persona.

A todos ellos, mi total agradecimiento y estima.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	4
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE CUADROS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE APÉNDICE.....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Generalidades.....	14
2.2. Clasificación taxonómica.....	15
2.2.1. Especies de <i>Giardia</i>	16
2.2.2. Ensamblajes (genotipos) de <i>Giardia duodenalis</i>	17
2.2.3. Diferencias entre los ensamblajes de <i>Giardia duodenalis</i>	19
2.2.3.1. Diferencias genómicas.	19
2.2.3.2. Diferencias biológicas.....	19
2.2.3.3. Diferencias en el espectro de la enfermedad.....	20
2.2.3.4. Factores y respuestas específicas del hospedador hacia un ensamblaje.....	21
2.2.3.5. Especificidad del ensamblaje hacia un hospedador.....	21
2.3. Características morfológicas.....	22
2.3.1. Morfología general del trofozoíto.....	23
2.3.2. Estructura y replicación nuclear.....	23
2.3.3. Citoesqueleto.....	24
2.3.3.1. Disco adhesivo ventral.....	24
2.3.3.2. Flagelos.....	25
2.3.3.3. Cuerpos medianos.....	26
2.3.4. Morfología general del quiste.....	26
2.4. Epidemiología.....	26
2.5. Ciclo de transmisión en el ganado.....	29
2.6. Ciclo biológico.....	32
2.7. Inmunología y fisiopatología.....	34

2.8. Lesiones histopatológicas.....	37
2.9. Signos clínicos.....	38
2.10. Técnicas diagnósticas.....	39
2.10.1. Técnicas diagnósticas convencionales.....	40
2.10.1.1. Microscopía óptica.....	40
2.10.1.2. Técnicas inmunológicas.....	41
2.10.2. Técnicas diagnósticas moleculares.....	43
2.10.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	43
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
3.1. Lugar de ejecución y periodo de duración.....	45
3.2. Descripción del material experimental.....	45
3.2.1. Muestras fecales.....	45
3.2.2. Componentes del “FastDNA SPIN® Kit for Soil (MP Biomedicals, USA)”.....	45
3.2.3. Componentes para la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada).....	46
3.2.4. Componentes para la electroforesis en gel de agarosa.....	46
3.2.5. Tamaño de muestra.....	46
3.3. Metodología.....	47
3.3.1. Colecta y conservación de las muestras.....	47
3.3.2. Selección de muestras fecales para el estudio.....	48
3.3.3. Extracción del material genético (ADN).....	48
3.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada).....	48
3.4. Análisis de información.....	50
3.5. Consideraciones éticas.....	50
IV. RESULTADOS.....	51
V. DISCUSIÓN.....	55
VI. CONCLUSIONES.....	60
VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	61
VIII. APÉNDICE.....	76

RESUMEN

La giardiasis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial caracterizada por ocasionar cuadros diarreicos tanto en humanos como en animales, donde los neonatos e individuos inmunocomprometidos representan la población de mayor riesgo. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar molecularmente la asociación de la ocurrencia de *Giardia duodenalis* con la presentación de diarreas en crías de alpacas (*Vicugna pacos*). Se recolectó aleatoriamente un total de 266 muestras fecales (133 normales y 133 diarreicas) de crías de alpaca menores de dos meses de edad, de ambos sexos y de las razas huacaya y suri, procedentes de los distritos de Maranganí (Cusco) y Nuñoa (Puno). El diagnóstico se realizó a través de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada), amplificando parcialmente el gen β -Giardina. Se determinó que el 36.5% (97/266) de individuos analizados resultaron positivos a *G. duodenalis*. El mayor porcentaje de animales infectados correspondía al grupo de animales con diarrea (65%; n=63) respecto al grupo de individuos con ausencia de diarreas (35%; n=34). El análisis de regresión logística múltiple determinó que la chance de desarrollar diarreas en las crías de alpacas positivas a *G. duodenalis* es 3.85 veces la chance de desarrollar diarreas en las crías negativas a *G. duodenalis*, ajustado por sexo, raza y localidad de procedencia (IC 95%: 1.97 – 7.55; $p < 0.001$). Asimismo, la prueba de chi cuadrado demostró la asociación entre el desarrollo de diarreas y la localidad de procedencia ($p < 0.001$). Por otra parte, el análisis de regresión logística múltiple concluyó que la chance de presentar *G. duodenalis* en las crías con diarreas es 3.79 veces la chance de presentar *G. duodenalis* en las crías con heces normales, ajustado por sexo, raza y localidad de procedencia (IC 95%: 1.94 – 7.37; $p < 0.001$). Finalmente, el mayor número de diarreas y la mayor prevalencia se observaron en las localidades de Machu Kuma (67.1%) y Sillacunca (52.4%), respectivamente.

Palabras clave: *Giardia duodenalis*, giardiasis, diarrea, *Vicugna pacos*, alpaca, PCR anidada

ABSTRACT

Giardiasis is a worldwide parasitic disease characterized by causing diarrhea in both humans and animals, where newborns and immunocompromised individuals represent the population at greatest risk. The aim of this study was to molecularly evaluate the association of the occurrence of *Giardia duodenalis* with the presentation of diarrhea in alpaca crias (*Vicugna pacos*). A total of 266 faecal samples (133 normal and 133 diarrheal) were randomly collected from alpaca crias under two-months-old from the districts of Maranganí (Cusco) and Nuñoa (Puno). The diagnosis was performed using a nested polymerase chain reaction (nested PCR) protocol, partially amplifying the β -Giardin gene. Infection by *G. duodenalis* was determined in 36.5% (97/266) of individuals analyzed. The highest percentage of infected animals corresponded to the animal group with diarrhea (65%; n = 63) compared to the group with absence of diarrhea (35%; n = 34). The multiple logistic regression analysis determined that the chance of developing diarrhea in *G. duodenalis*-positive alpaca cria is 3.85 times the chance of developing diarrhea in *G. duodenalis*-negative cria, adjusted for sex, breed and locality of origin (95% CI : 1.97 - 7.55; p = <0.001). Likewise, the chi-squared test showed the association between the development of diarrhea and the locality of origin (p<0.001). On the other hand, the multiple logistic regression analysis concluded that the chance of presenting *G. duodenalis* in crias with diarrhea is 3.79 times the chance of presenting *G. duodenalis* in crias with normal feces, adjusted for sex, breed and locality of origin (95% CI : 1.94 - 7.37; p = <0.001). Finally, the highest number of diarrheas and the highest prevalence were observed in the localities of Machu Kuma (67.1%) and Sillacunca (52.4%), respectively.

Key words: *Giardia duodenalis*, giardiasis, diarrhea, *Vicugna pacos*, alpaca, nested PCR

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de <i>Giardia</i> y sus respectivos hospedadores.....	16
Cuadro 2. Ensamblajes (genotipos) de <i>Giardia duodenalis</i> y sus respectivos hospedadores.....	17
Cuadro 3. Características de la población en estudio y análisis bivariado.....	52
Cuadro 4. Muestras positivas a <i>Giardia duodenalis</i> según la consistencia de las heces, sexo, raza y localidad.....	53
Cuadro 5. Factores independientemente asociados a la presentación de diarrea en análisis de regresión logística múltiple.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relaciones genéticas de los ensamblajes de <i>Giardia duodenalis</i> determinados por el análisis NJ de las distancias de Roger calculadas a partir de estudios de electroforesis enzimática.....	18
Figura 2. Características generales del trofozoíto de <i>Giardia duodenalis</i>	24
Figura 3. Vista ventral de un trofozoíto de <i>Giardia duodenalis</i> donde se indican el disco adhesivo ventral (DAV) y los flagelos anterolaterales (FAL), posterolaterales (FPL), ventrales (FV) y caudales (FC).....	25
Figura 4. Los cuatro grandes ciclos de transmisión para el mantenimiento de <i>Giardia duodenalis</i> en diferentes hospedadores.....	27
Figura 5. La mayoría de las infecciones en humanos son antroponóticas e involucran a los sub-ensamblajes AI, AII, BII y BIV. El sub-ensamblaje AI tiene potencial zoonótico e involucra al ganado, rumiantes silvestres, primates no humanos, gatos y perros. Se ha reportado ocasionalmente de infecciones humanas provocados por los ensamblajes C, E y F, originados probablemente de animales específicos a estos ensamblajes.....	29
Figura 6. Ciclo biológico de <i>Giardia duodenalis</i>	33
Figura 7. Presencia de trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i> en el lumen intestinal. Tinción hematoxilina-eosina.	38
Figura 8. Visualización por microscopía óptica de trofozoíto de <i>Giardia duodenalis</i> teñido con Giemsa (400x).....	41
Figura 9. Visualización por microscopía de fluorescencia de quistes de <i>Giardia duodenalis</i> marcados con isotiocianato de fluoresceína.....	42
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR anidada para el gen β -Giardina de <i>Giardia duodenalis</i>	44
Figura 11. Diagnóstico específico de <i>Giardia duodenalis</i> a través de PCR anidada basado en el gen beta-giardina (β -giardina). Las muestras positivas evidencian una banda de aproximadamente 384 nucleótidos.....	52

LISTA DE APÉNDICE

Anexo 1. Manual del kit de extracción de ADN “FastDNA SPIN ® Kit for Soil” (MP Biomedicals, USA).....	76
Anexo 2. Aprobación del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA), de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).....	86

I. INTRODUCCIÓN

El Perú es el país con la mayor población y producción de camélidos sudamericanos a nivel mundial. Dentro de este grupo de animales, la alpaca (*Vicugna pacos*) constituye la especie de mayor importancia porque es considerado un recurso de importancia social, económica, cultural, genética y científica (FAO, 2005). Según el IV Censo Nacional Agropecuario, se indicó que la población de alpacas contabilizaba aproximadamente los 3.7 millones de ejemplares distribuidos principalmente en las regiones de Puno con 1.5 millones, seguido de Cusco con 546 mil y Arequipa con 468 mil individuos (Instituto Nacional de Estadística e Informática, 2012).

La alpaca representa una relevante fuente de ingresos económicos para la comunidad andina. La crianza alpaquera se encuentra distribuida en aproximadamente 82 000 unidades agropecuarias, constituidas principalmente por comunidades campesinas ubicadas en regiones bajo la pobreza o la pobreza extrema (Ministerio de Agricultura y Riego, 2018). Las comunidades campesinas desarrollan una crianza incipiente y desprovista de recursos técnicos, tecnológicos y sanitarios, lo que desecadena bajos niveles de producción. En contraste, el 15% de la población de alpacas restante se encuentran en manos de empresas privadas que aplican conocimiento, herramientas tecnológicas y controles sanitarios, lo que consecuentemente aumenta considerablemente sus índices productivos (Bustinza, 2001). Esto evidencia que la crianza de alpacas tiene una importancia económica considerable, lo cual no se debe de forma exclusiva a la producción de fibra, sino que va acompañado por la producción cárnica, vital fuente proteica al alcance de las comunidades campesinas, y de actividades artesanales procedentes de la producción de cueros y pieles, lo que promueve otras vías de

ingresos económicos para la comunidad (Ameghino y DeMartini, 1991).

La principal causa de pérdidas económicas en la crianza alpaquera es la mortalidad de las crías. Como se observa en la mayoría de especies domésticas, los neonatos presentan un mayor riesgo de adquirir enfermedades de etiología diversa durante los primeros meses de vida, siendo la diarrea una de las principales causas de morbilidad y mortalidad (Gómez-Couso *et al.*, 2012). La diarrea puede ser de etiología multifactorial, que abarca el manejo y factores nutricionales, así como una amplia variedad de microorganismos patógenos (Whitehead y Anderson, 2006). Asimismo, la infección por enteropatógenos podría estar determinado por las características geográficas y los hábitos de crianza de la explotación ganadera (Gómez-Puerta *et al.*, 2020). Una de las principales enfermedades en crías de alpaca es el complejo diarreico neonatal, al que se le asocian como potenciales patógenos a *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. y *Giardia duodenalis* (Rosadio *et al.*, 2012).

La giardiasis es una enfermedad parasitaria cosmopolita ocasionada por el protozooario *G. duodenalis*. La enfermedad varía desde casos asintomáticos hasta la presentación clínica que incluye diarrea, deshidratación, anorexia y falta de crecimiento (Feng y Xiao, 2011). La interacción de diversas características del hospedador y del parásito desencadena el curso clínico de la infección. Sin embargo, la comprensión de los procesos fisiopatológicos no se han dilucidado por completo. Cabe resaltar que las infecciones se caracterizan por presentar un curso autolimitante, aunque la enfermedad se torna crónica y severa en individuos jóvenes, gerontes, inmunosuprimidos o con condiciones médicas preexistentes (Einarsson *et al.*, 2016a).

En la actualidad, la aplicación de herramientas epidemiológicas moleculares, en regiones endémicas o en brotes repentinos, han proporcionado valiosa información que permite una comprensión cada vez mayor de cómo *G. duodenalis* se mantiene en al menos cuatro grandes ciclos de transmisión. No obstante, la interacción de estos ciclos y el rango de hospedadores para cada tipo de ensamblaje siguen, en parte, sin resolver (Thompson y Monis, 2004).

Los estudios de polimorfismo de proteínas (Monis *et al.*, 2003) y filogenéticos (Cacciò y Ryan, 2008) han identificado a *G. duodenalis* como un complejo de especies, cuyos miembros, a pesar de ser morfológicamente indistinguibles y mostrar especificidad

por el hospedador, se pueden clasificar en ocho genotipos o ensamblajes, separados por grandes variaciones genéticas (Heyworth, 2016). Los ensamblajes A y B se encuentran en humanos y una amplia variedad de mamíferos; los ensamblajes C y D en perros y cánidos silvestres; el ensamblaje E en ungulados; el ensamblaje F en gatos; el ensamblaje G en roedores; y el ensamblaje H en pinnípedos (Cacciò *et al.*, 2018). Por el momento, los factores que determinan el grado de especificidad hacia un determinado hospedador sólo se comprenden parcialmente y evidentemente involucran factores tanto del hospedador como del parásito (Heyworth, 2016). Por otro lado, diferentes estudios han demostrado la asociación entre *G. duodenalis* y el desarrollo de diarreas en animales de compañía (Janeczko y Griffin, 2010; Tangtrongsup y Scorza, 2010), ganado (Squire y Ryan, 2017) e incluso en humanos (Meng *et al.*, 2011; Muhsen y Levine, 2012). Aunque se han reportado a los ensamblajes E y A en alpacas (Gómez-Couso *et al.*, 2012; Gómez-Puerta *et al.*, 2014), las investigaciones que relacionan a *Giardia* con camélidos sudamericanos son limitadas, e incluso no existen estudios que asocien la ocurrencia de *G. duodenalis* con la presentación de diarreas en crías de alpacas. Por ende, la información científica limitada imposibilita una correcta y completa comprensión de la dinámica de la enfermedad en dichas especies, y el riesgo que representan estas como potencial reservorio para infecciones humanas.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar la asociación estadística entre la presencia de *G. duodenalis* con el desarrollo de diarreas en crías de alpaca en los distritos de Marangani (Cusco) y Nuñoa (Puno), a través del diagnóstico molecular en muestras fecales.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. GENERALIDADES

El protozooario *Giardia duodenalis* es un parásito entérico bastante frecuente en humanos y animales. Se estima que *Giardia* produce anualmente 280 millones de infecciones humanas sintomáticas y es responsable de numerosos brotes transmitidos por el agua y los alimentos (Lane y Lloyd, 2002). Asimismo, se han reportado tasas de prevalencia humana que varían de 2 a 7% en los países industrializados y de 20 a 30% en la mayoría de los países en vías de desarrollo (Adam, 2001). Por otro lado, *G. duodenalis* es uno de los parásitos que con frecuencia son diagnosticados erróneamente, subdiagnosticados y sobrediagnosticados en prácticas veterinarias (Payne y Artzer, 2009). Las prevalencias reportadas en animales de abasto oscilan entre 1.1% hasta 74.2% para ganado bovino (Feng y Xiao, 2011; Feng *et al.*, 2019), de 1.5% a 89.2% en ovinos (Ryan *et al.*, 2005; Feng y Xiao, 2011), del 4% hasta el 43.5% en caprinos (Feng y Xiao, 2011) y entre 4.9% hasta 50% en alpacas (Trout *et al.*, 2008; Gómez-Couso *et al.*, 2012), mientras que en animales de compañía varía del 1.1% hasta el 45.9% (Ryan y Zahedi, 2019).

La giardiasis, tanto en humanos como en animales, varía desde casos asintomáticos hasta la presentación de diarrea y falta de crecimiento (Feng y Xiao, 2011). La comprensión de los procesos fisiopatológicos no se han dilucidado por completo, pero se sabe que la combinación de diversas características del hospedador (nivel inmunológico) y del parásito (nivel de patogenicidad y la concentración de quistes en el medio ambiente) son las responsables del desarrollo de la enfermedad (Einarsson *et al.*, 2016a). A pesar que Anton van Leeuwenhoek identificó por primera vez a *Giardia* en sus

heces diarreicas en 1681, y en 1859 se realizó la primera descripción a detalle, no fue hasta 1981 que fue reconocido oficialmente como enteropatógeno (Geurden *et al.*, 2010b; Bartelt y Sartor, 2015). Las repercusiones negativas de la giardiasis sobre la salud pública y el desarrollo socioeconómico han determinado que se le incluya en la iniciativa de Enfermedades Desatendidas impulsada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Savioli *et al.*, 2006).

Los estudios epidemiológicos y moleculares han proporcionado una visión más diferenciada y detallada del potencial zoonótico de *G. duodenalis*, debido a la ocurrencia de diferentes ensamblajes o genotipos (Geurden *et al.*, 2010b), y sugieren que los animales domésticos y silvestres representan un potencial reservorio zoonótico de infecciones humanas (Ryan y Zahedi, 2019). Las evidencias obtenidas de diversos trabajos, acompañado al potencial riesgo de transmisión directa a los propietarios a partir de sus mascotas y por la masiva contaminación ambiental procedente del ganado, proporcionan suficientes argumentos para el tratamiento de animales domésticos (Montoya *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2008; Geurden *et al.*, 2014). Es precisamente toda esta información referente a los efectos negativos de *Giardia* sobre la salud pública, lo que ha determinado que este parásito tome un papel de mayor relevancia en Medicina Veterinaria (Geurden *et al.*, 2010c). Desde una perspectiva veterinaria, la variabilidad de los signos clínicos y la resolución espontánea de la giardiasis, hacen sospechar sobre su verdadera importancia y grado de impacto en los animales de compañía y en el ganado (Taminelli *et al.*, 1989; Xiao *et al.*, 1994b). Sin embargo, una amplia cantidad de estudios indican las consecuencias adversas sobre la salud y el deterioro de los parámetros productivos en los animales de abasto (Xiao, 1994; Lipoldova, 2014).

2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Las relaciones filogenéticas de *Giardia* son controvertidas. Mientras que algunos investigadores postulan que *Giardia* es un microorganismo eucariota primitivo de ramificación temprana, otros argumentan que *Giardia* comprende uno de los muchos linajes eucariotas divergentes que se adaptaron a hábitos microaerofílicos de supervivencia (Thompson y Monis, 2004; Morrison *et al.*, 2007). La antigua clasificación taxonómica basada exclusivamente en características morfológicas, determinaba que *Giardia* pertenecía al Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora (= Flagellata), Clase Zoomastigophorea, Orden Diplomonadida y Familia Hexamitidae (Morrison *et al.*,

2007). En la actualidad, gracias a los análisis moleculares integrados a estudios genéticos, estructurales y bioquímicos, se ha logrado una clasificación más precisa estableciendo que *Giardia* pertenece al Filo Metamonada, Subfilo Trichozoa, Superclase Eopharyngia, Clase Treponomadea, Subclase Diplozoos, Orden Giardiida y Familia Giardiidae (Cavalier-Smith, 2003).

2.2.1. ESPECIES DE *Giardia*

Inicialmente, se describieron incorrectamente hasta 51 especies de *Giardia* sobre la base de una supuesta especificidad de hospedador y diferencias morfológicas sutiles (Lyu *et al.*, 2018). En la actualidad se reconocen como válidas ocho especies de *Giardia*, las que incluyen a *Giardia duodenalis* Lambl, 1859 en mamíferos, *Giardia agilis* Künstler, 1882 en anfibios, *Giardia ardeae* Filice, 1952 y *Giardia psittaci* Filice, 1952 en aves, *Giardia muris* Filice, 1952 y *Giardia microti* Filice, 1952 en roedores, (Monis *et al.*, 2009; Ryan y Cacciò, 2013), y las especies recientemente descritas, *Giardia peramelis* Hillman, 2016 (conocido anteriormente como "genotipo Quenda") en bandicut marrón meridional (*Isoodon obesulus*) y *Giardia cricetidarum* Lyu, 2018 en hámster ruso (*Phodopus sungorus*) (Hillman *et al.*, 2016; Lyu *et al.*, 2018) (Cuadro 1). De estas especies, *G. duodenalis* presenta el rango más diverso de hospedadores que incluye a humanos y una amplia variedad de mamíferos (Chilvers *et al.*, 2010). Es necesario acotar que los nombres *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia* y *Giardia enterica* son utilizados indistintamente para referirse a la misma especie que afecta tanto a humanos como a animales (Xiao y Fayer, 2008; Bowman, 2014). Por lo tanto, y para efectos de uniformidad, en el presente manuscrito se ha decidido emplear *G. duodenalis*.

Cuadro 1. Especies de *Giardia* y sus respectivos hospedadores (Ryan y Zahedi, 2019)

ESPECIES	HOSPEDADORES
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos
<i>G. agilis</i>	Anfibios
<i>G. microti</i>	Roedores
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. peramelis</i>	Bandicut marrón meridional (<i>Isoodon obesulus</i>)
<i>G. cricetidarum</i>	Hámster ruso (<i>Phodopus sungorus</i>)

2.2.2. ENSAMBLAJES (GENOTIPOS) DE *Giardia duodenalis*

Debido a su relevancia como enteropatógeno humano y animal, la gran mayoría de estudios se han centrado en la caracterización de *G. duodenalis*. Los estudios de polimorfismo de proteínas (Monis *et al.*, 2003) y filogenéticos (Cacciò y Ryan, 2008) han identificado a *G. duodenalis* como un complejo de especies, cuyos miembros, a pesar de ser morfológicamente indistinguibles y mostrar especificidad por el hospedador, se pueden clasificar en ocho genotipos o ensamblajes, separados por grandes variaciones genéticas (Heyworth, 2016) (Figura 1). Los ensamblajes A y B se encuentran en humanos y otros mamíferos, los ensamblajes C y D en perros y cánidos silvestres; el ensamblaje E en ungulados, el ensamblaje F en gatos, el ensamblaje G en roedores, y el ensamblaje H en pinnípedos (Cacciò *et al.*, 2018) (Cuadro 2). Por el momento, los factores que determinan el grado de especificidad hacia un determinado hospedador sólo se comprenden parcialmente y evidentemente involucran factores tanto del hospedador como del parásito (Heyworth, 2016).

Cuadro 2. Ensamblajes (genotipos) de *Giardia duodenalis* y sus respectivos hospedadores (Heyworth, 2016)

ENSAMBLAJES	HOSPEDADORES
A	Humano, perro, gato, vaca, alpaca, ciervo, hurón, cerdo, castor, chinchilla, jaguar, caballo, marsupiales, oveja, cabra, buey, primates no humanos, cetáceos, foca, lobo marino, ratón, reno, gallina, gaviota
B	Humano, vaca, perro, gacela, ciervo, caballo, castor, rata almizclera, chinchilla, hurón, conejo, jutía conga, marsupiales, cobayo, damán roquero, primates no humanos, gallina, oveja, foca, cerdo, lobo marino, avestruz, delfín, marsopa, gaviota
C	Perro, canguro, vaca, cerdo, cetáceos
D	Perro, chinchilla, canguro, vaca, cetáceos, zorro
E	Vaca, oveja, cerdo, alpaca, cabra, caballo, yak, zorro, ciervo, gato
F	Gato, cetáceos, cerdo
G	Rata, ratón
H	Foca gris, gaviota

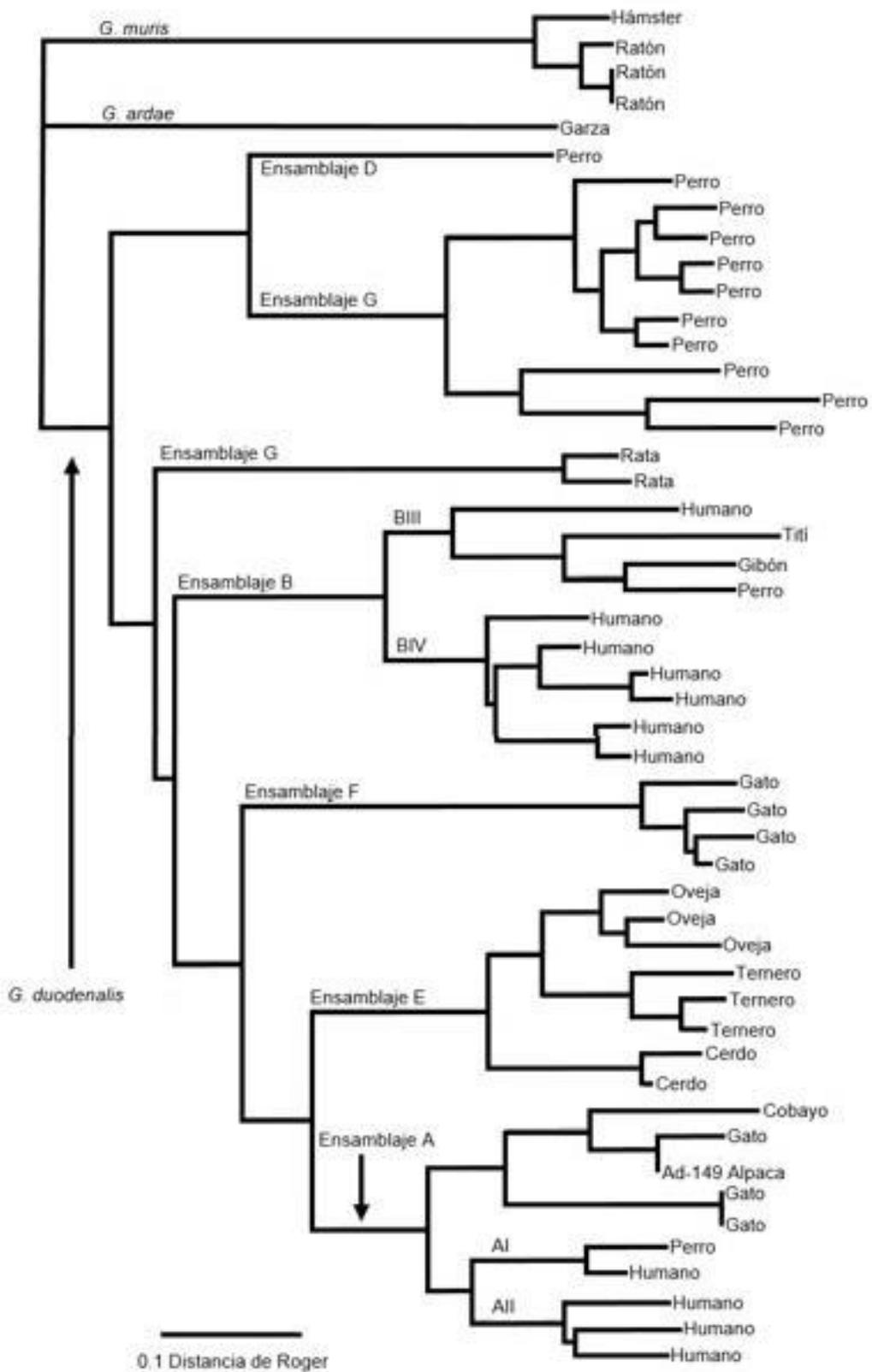


Figura 1. Relaciones genéticas de los ensamblajes de *Giardia duodenalis* determinados por el análisis NJ de las distancias de Roger calculadas a partir de estudios de electroforesis enzimática (Monis *et al.*, 2009)

Adicionalmente, los ensamblajes A y B se han clasificado en al menos cinco sub-ensamblajes (AI, AII, AIII, BIII y BIV) basados en análisis de los genes beta-giardina (β -giardina), glutamato deshidrogenasa (GDH), triosa fosfato isomerasa (TPI), factor de elongación-1 alfa (EF-1 α) y la subunidad menor ARNr (SSU ARNr) (Feng y Xiao, 2011). A pesar que los sub-ensamblajes AI y AII se encuentran en humanos y animales, parece que el sub-ensamblaje AI predomina en los animales, mientras que el sub-ensamblaje AII afecta principalmente a los humanos. El sub-ensamblaje AIII se encuentra restringido a ungulados silvestres (Cacciò y Ryan, 2008). Por otro lado, se ha observado que el ensamblaje E expone altos niveles de diversidad genética, lo que hace que se encuentre clasificado en 11 sub-ensamblajes (EI-EXI) (Feng *et al.*, 2008). Las razones que expliquen este elevado grado de diversidad son desconocidos, pero se postula que la causa sería la recombinación genética (Feng *et al.*, 2019).

2.2.3. DIFERENCIAS ENTRE LOS ENSAMBLAJES DE *Giardia duodenalis*

2.2.3.1. DIFERENCIAS GENÓMICAS

Diversos estudios sugieren grandes diferencias en las secuencias genéticas de los ensamblajes A y B. Por ejemplo, el análisis del gen triosa fosfato isomerasa (TPI) mostró sólo un 81% de identidad entre ambos ensamblajes (Lu *et al.*, 1998), lo cual se ha confirmado evaluando otros tipos de genes (von Allmen *et al.*, 2005; Teodorovic *et al.*, 2007). Las diferencias genómicas entre los ensamblajes A y B pueden explicar algunas de las diferencias biológicas y en el desarrollo de la infección. La variación observada en la secuencia de los nucleótidos sería, basado en la taxonomía para varios otros microorganismos, suficiente para categorizar a los ensamblajes A y B como especies diferentes de *Giardia* (Nash *et al.*, 1987; Franzén *et al.*, 2009). Además, se han identificado 3 y 28 proteínas únicas para los ensamblajes A y B, respectivamente. Esto podría sugerir que la pérdida o ganancia de genes se relacionaría a adaptaciones metabólicas (Franzén *et al.*, 2009).

2.2.3.2. DIFERENCIAS BIOLÓGICAS

Las propiedades y diferencias biológicas de los ensamblajes potencialmente zoonóticos de *G. duodenalis* se han estudiado *in vitro* y en infecciones experimentales en humanos y diversos modelos animales. Por ejemplo, en un ensayo realizado en humanos sanos voluntarios se demostró que el ensamblaje B siempre infectó a los individuos

desafiados, en comparación con el sub-ensamblaje A1 que no pudo inducir infecciones (Nash *et al.*, 1987). Del mismo modo, Bénéré *et al.* (2012) realizaron un estudio comparativo entre los ensamblajes A (AI y AII), B y E. El ensamblaje B y, menor medida, el sub-ensamblaje AI, causaron un mayor grado de patogenicidad acompañado de alteraciones en la mucosa intestinal, mayor reducción de la actividad de las enzimas del borde en cepillo e infiltración de células inflamatorias en la lámina propia del duodeno. Es de destacar que el ensamblaje B produjo mayores cargas de trofozoítos y durante un período de tiempo más largo. Los resultados de este trabajo también han sido corroborados en otros ensayos realizados en humanos, ratones y jerbos (Aggarwal y Nash 1987; Nash *et al.*, 1987; Solaymani-Mohammadi y Singer, 2011).

Otra diferencia entre ensamblajes podría estar relacionada a la expresión de determinados factores de virulencia. La variación antigénica superficial hace que los ensamblajes A y B expongan repertorios de proteínas de superficie variables (VSP) completamente diferentes (Nash *et al.* 1990b). Esta notable diferencia también se aprecia en el grado de patogenicidad e incluso en la tasa de variación antigénica, que es mucho más rápida para el ensamblaje B (promedio de 6 generaciones) que para el ensamblaje A (promedio de 13 generaciones) (Nash *et al.* 1990a).

Relativamente son escasos los estudios donde se ha comparado características biológicas de ensamblajes distintos al A y B. Por lo tanto, aún no se sabe cuál de estas diferencias biológicas pueden generalizarse a sus respectivos ensamblajes y cuáles son diferencias específicas de los mismos (Adam *et al.*, 2013).

2.2.3.3. DIFERENCIAS EN EL ESPECTRO DE LA ENFERMEDAD

Los factores asociados a la variabilidad de las manifestaciones clínicas de la giardiasis son poco conocidos. Se reconoce que los ensamblajes A y B son capaces de producir enfermedad y se ha informado infecciones de diferente presentación con el mismo ensamblaje (Einarsson *et al.*, 2016a). Existe evidencia que respalda la asociación de la sintomatología de la giardiasis y el mayor número de casos con el ensamblaje B (Pijnacker *et al.*, 2016). Sin embargo, se ha demostrado que los signos clínicos y una mayor prevalencia se encuentran asociados al ensamblaje A (Pérez Córdón *et al.*, 2008). Es oportuno indicar que los estudios sobre la asociación entre la sintomatología de la enfermedad y el ensamblaje responsable han generado resultados contradictorios, que

pueden relacionarse al diseño de estudio, la población considerada, la definición de los signos clínicos y la exclusión activa de coinfecciones con otros enteropatógenos (Cacciò *et al.*, 2018).

2.2.3.4. FACTORES Y RESPUESTAS ESPECÍFICAS DEL HOSPEDADOR HACIA UN ENSAMBLAJE

Las diferencias observadas en el curso de la enfermedad puede ser explicado por las diferencias entre los ensamblajes de *G. duodenalis* y por la variabilidad de factores y respuestas específicas para cada hospedador (Cacciò *et al.*, 2018). Durante el proceso de interacción entre el epitelio intestinal humano con los trofozoítos del ensamblaje A se produce la síntesis y secreción de quimiocinas (péptidos de señalización inmunológica) en respuesta a la infección parasitaria (Roxström-Lindquist *et al.*, 2005). Por el contrario, no se producen quimiocinas en las células epiteliales intestinales de ratones infectados con el mismo ensamblaje de *G. duodenalis* (Ma'ayeh y Brook-Carter, 2012). Además, se ha demostrado que los ensamblajes A y B inducen diferentes expresiones génicas en cultivos celulares. Por otra parte, se ha observado que los trofozoítos del ensamblaje A degradan la glicoproteína secretora Mucina-2 (MUC2) encargada de la síntesis de mucus que protege el epitelio intestinal, mientras que el ensamblaje B es incapaz de realizar dicha acción (Amat *et al.*, 2017). El ensamblaje B ha demostrado una mayor capacidad infectiva en ratones que el ensamblaje A, y se supone que esta diferencia puede estar determinada por la variación en la composición de la microbiota intestinal durante la infección (Barash *et al.*, 2017; Bartelt *et al.*, 2017; Beatty *et al.*, 2017). Asimismo, el ensamblaje B induce una respuesta de mayor intensidad y es más resistente a las especies reactivas de oxígeno (ERO) y óxido nítrico (NO) (Eckmann *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha sugerido que los hospedadores infectados desencadenan respuestas inmunológicas específicas debido a los diferentes repertorios de VSP expresados en los ensamblajes de *G. duodenalis* (Cacciò *et al.*, 2018).

2.2.3.5. ESPECIFICIDAD DEL ENSAMBLAJE HACIA UN HOSPEDADOR

El aislamiento de ensamblajes, considerados específicos para determinadas especies, en humanos y ciertos animales cada vez con mayor frecuencia, comienza a cuestionar el grado de especificidad hacia un determinado hospedador. No obstante, es

válido destacar que la mayoría de reportes basan sus hallazgos únicamente en la detección de ADN en muestras fecales, y no lo acompañan de pruebas complementarias. De esta manera, es difícil demostrar si los hospedadores realmente se encuentran infectados o sólo transportan mecánicamente al parásito (Cacciò *et al.*, 2018).

Aparte de los ensamblajes A y B, varios estudios han reportado en humanos la presencia de ensamblajes específicos de animales. En Etiopía, un estudio llevado a cabo en zonas rurales y urbanas identificó el ensamblaje F, específico para gatos, en humanos con cuadros diarreicos (Gelanew *et al.*, 2007). En Brasil y Australia se informó la presencia del ensamblaje E en humanos procedentes de comunidades pobres o rurales (Fantinatti *et al.*, 2016; Zahedi *et al.*, 2017). Es interesante indicar que los ensamblajes A y E exponen un mayor grado de similitud genética que alcanza el 90%, en comparación con los ensamblajes A y B que muestran entre un 78-81% de identidad (Lu *et al.*, 1998; Lebbad *et al.*, 2010). También se han reportado casos humanos por los ensamblajes caninos C y D (Soliman *et al.*, 2011; Broglia *et al.*, 2013).

La variación en la especificidad de los ensamblajes también se observa en animales. Los ensamblajes caninos C y D se han detectado en vacas, ovejas y cerdos en el Reino Unido (Minetti *et al.*, 2014) y en cabras de Australia (Ng *et al.*, 2011). En Uganda, el ensamblaje E se encontró en monos colobos rojos (*Procolobus badius tephrosceles*) y se supone que la transmisión surgió del ganado (Johnston *et al.*, 2010). Se han informado infecciones mixtas por los ensamblajes C y E para chinchillas (*Chinchilla lanigera*) mascotas en Bélgica (Levecke *et al.*, 2011) y por los ensamblajes D y E en un cerdo de Brasil (Fava *et al.*, 2013). Finalmente, el ensamblaje F ha sido reportado en ganado de España (Cardona *et al.*, 2015).

2.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Giardia es un microorganismo enigmático debido a que posee varias características morfológicas únicas e inusuales que lo diferencian de otros protozoarios. Las características morfológicas más relevantes incluyen la presencia de un par de núcleos y de una estructura accesoria única, el disco adhesivo ventral (Thompson y Monis, 2004; Morrison *et al.*, 2007).

2.3.1. MORFOLOGÍA GENERAL DEL TROFOZOÍTO

El trofozoíto de *Giardia duodenalis* exhibe una apariencia morfológica distintiva y característica. Presenta una morfología piriforme, usualmente con 10-15 μm . de longitud y 6-10 μm . de ancho, con cuatro pares de flagelos (anterolaterales, posterolaterales, ventrales y caudales) (Figura 2), un par de cuerpos medianos distintivos y una estructura accesoria única para *G. duodenalis*, el disco adhesivo ventral (Adam, 2001; Cordero del Campillo *et al.*, 2001). Se observan dos núcleos sin nucleolos, de disposición simétrica respecto al eje longitudinal y de localización anterior (Adam, 2001).

2.3.2. ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN NUCLEAR

Dentro de las características únicas del trofozoíto de *Giardia*, resalta la presencia de dos núcleos. Estos son casi idénticos estructuralmente, se replican aproximadamente al mismo tiempo y son transcripcionalmente activos. Ambos núcleos tienen aproximadamente la misma cantidad de ADN nuclear y de secuencias de ADN ribosómico (ADNr) (Adam, 2001; Bernander *et al.*, 2001).

Respecto a la replicación del material genético, se ha observado que durante la fase tardía del proceso de enquistamiento, el trofozoíto sufre la división de ambos núcleos, con su respectivo ADN ($2n$), formando un prequiste con ploidía de $4 \times 2n$. Posteriormente, se produce otra ronda de replicación del ADN para cada núcleo lo que da como resultado un quiste completamente diferenciado que contiene cuatro núcleos, cada uno con una ploidía de $4n$, lo que resulta en un quiste con una ploidía de $16n$ (Bernander *et al.*, 2001). Por otro lado, los organismos eucariotas superiores tienen nucleolos, fácilmente reconocibles, donde se produce la transcripción de ARNr. La fibrilarina representa un importante componente de los nucleolos que es requerido para el procesamiento previo del ARNr. A pesar que no se han identificado nucleolos en los núcleos de *G. duodenalis*, la evidencia de fibrilarina sugiere que la transcripción y procesamiento de ARNr se produce en regiones difusas del núcleo (Adam, 2001).

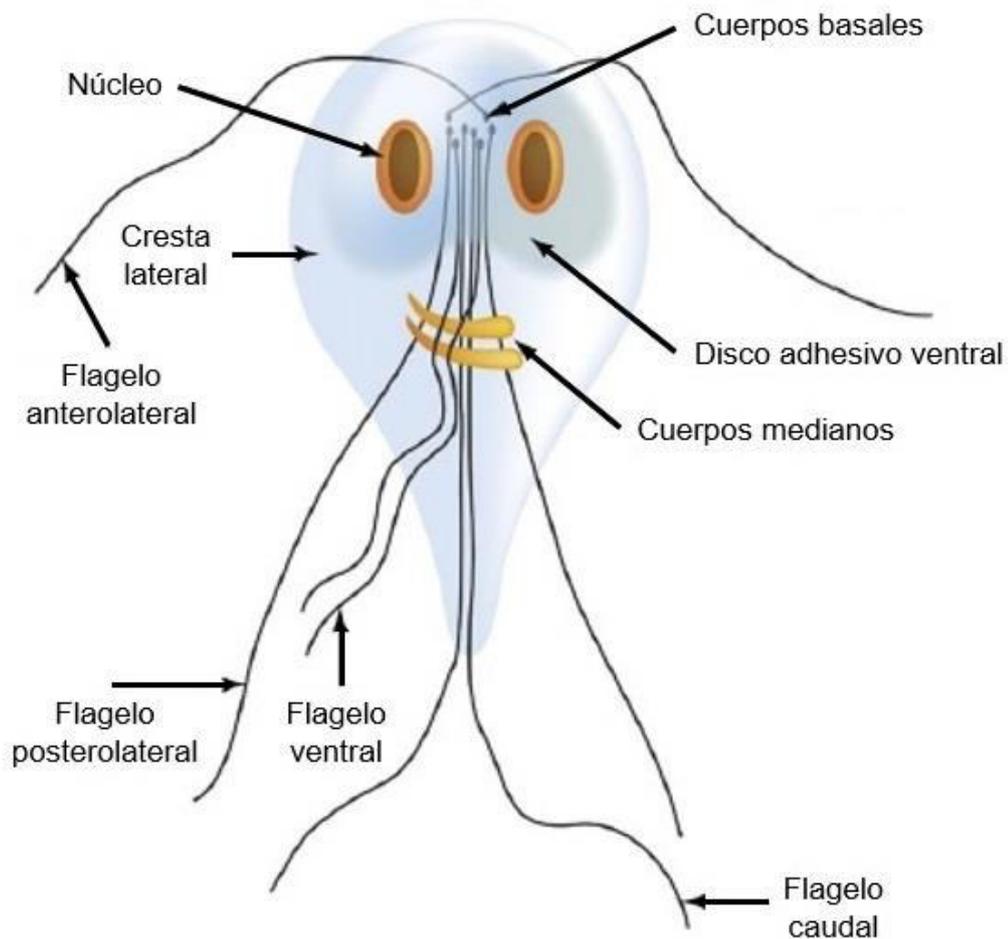


Figura 2. Características generales del trofozoíto de *Giardia duodenalis* (Monis *et al.*, 2009)

2.3.3. CITOESQUELETO

El citoesqueleto de *Giardia* consta de tres sistemas de organelas compuestos de microtúbulos: disco adhesivo ventral, flagelos y cuerpos medianos. Es de resaltar que el principal componente del citoesqueleto es la tubulina, proteína utilizada como objetivo para el tratamiento farmacológico de la giardiasis (Peattie, 1990).

2.3.3.1. DISCO ADHESIVO VENTRAL

El disco adhesivo ventral (Figura 3) es una estructura única, compleja, relativamente rígida e importante del citoesqueleto de *G. duodenalis*, que es utilizada para distinguir a *Giardia* del resto de protozoarios flagelados (Adam, 2001). El disco contiene proteínas contráctiles como actinina, α -actinina, miosina y tropomiosina, las cuales intervienen en la adhesión sobre el epitelio intestinal durante el proceso de colonización (Feely *et al.*, 1982).

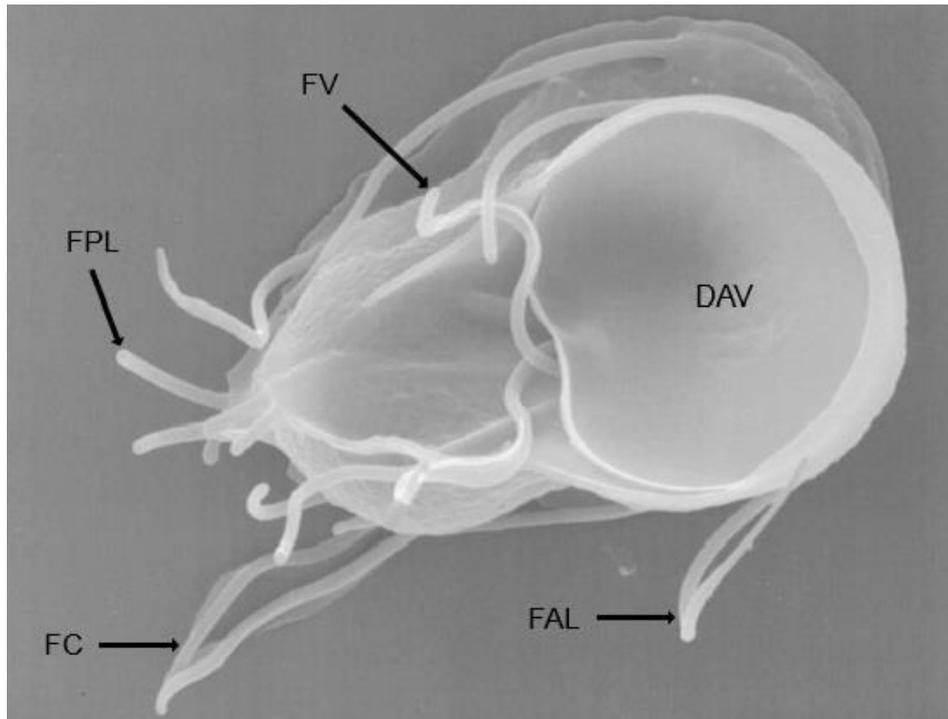


Figura 3. Vista ventral de un trofozoíto de *Giardia duodenalis* donde se indican el disco adhesivo ventral (DAV) y los flagelos anterolaterales (FAL), posterolaterales (FPL), ventrales (FV) y caudales (FC) (Gardner y Hill, 2001)

Al igual que en el citoesqueleto, la tubulina es una proteína de gran importancia estructural y metabólica en el disco adhesivo ventral. Esta característica es aprovechada por los tratamientos farmacológicos. Se sabe que el albendazol se dirige a la tubulina y altera las funciones dependientes de dicha proteína, lo que consecuentemente genera la fragmentación y desacoplamiento del disco adhesivo ventral e inhibe la polimerización del citoesqueleto y reduce la absorción de glucosa. De esta manera, los trofozoítos son incapaces de adherirse a la mucosa intestinal (Adam, 2001).

2.3.3.2. FLAGELOS

El trofozoíto tiene cuatro pares de flagelos (Figura 2) que se originan a nivel de los cuerpos basales, que se encuentran en la línea media y en la región anteroventral al núcleo. Cada par de flagelos sobresale por las regiones anterior, posterior, caudal y ventral del trofozoíto, y cada uno de estos se encuentran formados por nueve pares de microtúbulos que envuelven a un par de microtúbulos. Los flagelos intervienen en la motilidad de *Giardia* pero no en el proceso de adhesión, y su mantenimiento durante el enquistamiento sugiere cierto grado de importancia para dicho proceso (Adam, 2001).

2.3.3.3. CUERPOS MEDIANOS

Los cuerpos medianos son estructuras únicas que forman parte del citoesqueleto de *Giardia*, se encuentran localizados en la línea media y en la región dorsal a los flagelos caudales. La descripción de los cuerpos medianos ayuda a definir las características morfológicas de las diferentes especies de *Giardia*. Los trofozoítos de *G. duodenalis* presentan dos cuerpos medianos en forma de martillo y consisten en un grupo de microtúbulos muy contraídos (Adam, 2001). Aunque su función es desconocida, se ha propuesto a los cuerpos medianos como la región donde se produce el ensamblaje de los microtúbulos que conforman el disco adhesivo ventral (Meng *et al.*, 1996).

2.3.4. MORFOLOGÍA GENERAL DEL QUISTE

El quiste generalmente presenta 8-10 μm . de largo y 7-10 μm . de ancho. Se encuentra rodeado por una pared robusta de aproximadamente 0.3-0.5 μm . de espesor formada por una doble membrana conformada por carbohidratos y proteínas (Adam, 2001; Einarsson *et al.*, 2016b). En el interior del quiste, se aprecia 2-4 núcleos (lo cual dependerá si la división nuclear se ha completado), cuerpos medianos, flagelos retraídos y estructuras del disco adhesivo ventral (Adam, 2001).

2.4. EPIDEMIOLOGÍA

En la actualidad, la aplicación de herramientas epidemiológicas, en regiones endémicas o en brotes repentinos, han proporcionado valiosa información que permite una comprensión cada vez mayor de cómo *Giardia duodenalis* se mantiene en al menos cuatro grandes ciclos de transmisión (Figura 4). Sin embargo, la interacción de estos ciclos y el rango de hospedadores para cada tipo de ensamblaje, siguen en parte sin resolver (Thompson y Monis, 2004).

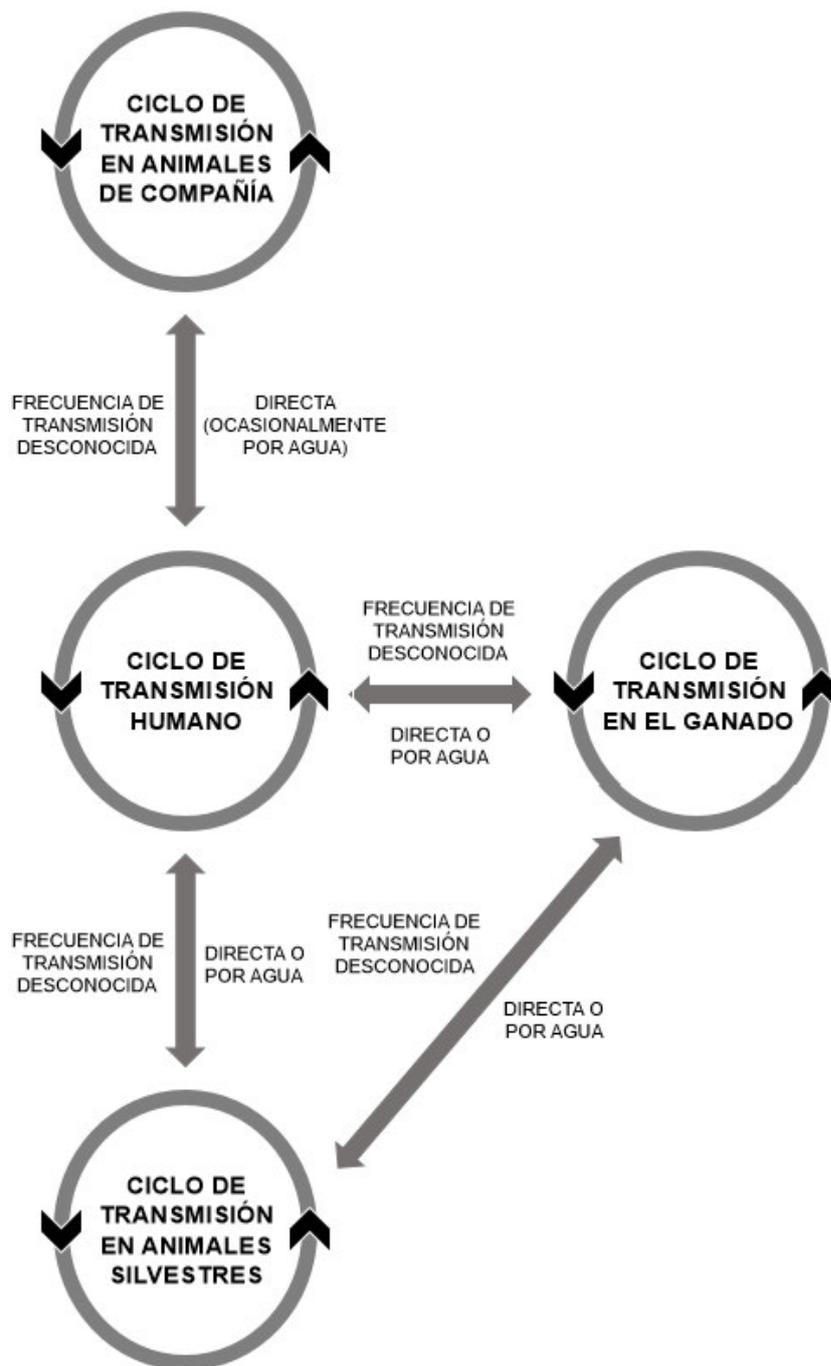


Figura 4. Los cuatro grandes ciclos de transmisión para el mantenimiento de *Giardia duodenalis* en diferentes hospedadores (Thompson y Monis, 2004)

La transmisión zoonótica de *G. duodenalis* ha sido un tema controvertido durante muchos años, incluso, se han considerado como potenciales reservorios a animales de compañía, ganado y fauna silvestre (Figura 5). De hecho, la relación entre animales silvestres y los brotes de giardiasis humana por contaminación del agua, fue lo que

determinó que la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificara a *Giardia* como un parásito zoonótico (Cacciò y Ryan, 2008).

Los trabajos que han analizado la transmisión cruzada de *G. duodenalis* han utilizado, por lo general, aislamientos que no estaban caracterizados genéticamente, por lo tanto, no es posible establecer una relación de especificidad entre los hospedadores y los ensamblajes. Otra limitación de estos estudios es el uso de elevadas dosis de quistes para simular infecciones cruzadas, lo cual es poco probable que represente una infección natural (Thompson y Monis, 2004). Además, el estado de maduración de los quistes y la variabilidad genética del parásito, sumado a la edad y estado inmunitario del hospedador, son factores que complican la interpretación de los resultados de estos estudios (Cacciò y Ryan, 2008).

La intervención de las herramientas moleculares en diversos estudios ha permitido identificar aislamientos genéticamente similares en diferentes especies animales, incluidos en humanos. No obstante, el hallazgo de genotipos genéticamente similares no representa una evidencia concluyente de que se esté produciendo transmisión zoonótica (Feng y Xiao, 2011). Ante esto, los estudios epidemiológicos pueden brindar una evaluación más profunda debido a que examinan la dinámica de transmisión de *Giardia* entre hospedadores que viven en la misma región geográfica o en focos endémicos. La validación de estos estudios sólo puede ser proporcionada por técnicas moleculares suficientemente precisas y rigurosas para garantizar que los aislamientos no se clasifiquen incorrectamente y para detectar la diversidad genética (Thompson y Monis, 2004).

Respecto a los ensamblajes específicos en animales, existe un amplio suministro de información, en base a análisis moleculares, que relacionan a los ensamblajes C y D con perros y cánidos silvestres, el ensamblaje E a ungulados domésticos y silvestres, el ensamblaje F a los gatos, el ensamblaje G a roedores y el ensamblaje H a pinnípedos (Cacciò *et al.*, 2018). A pesar de esto, las investigaciones que relacionan a *Giardia* con camélidos sudamericanos son limitadas, lo cual no permite una correcta y completa comprensión de la dinámica de la enfermedad en dichas especies, y el riesgo que representan estas como potencial reservorio para infecciones humanas (Gomez-Puerta *et al.*, 2014).

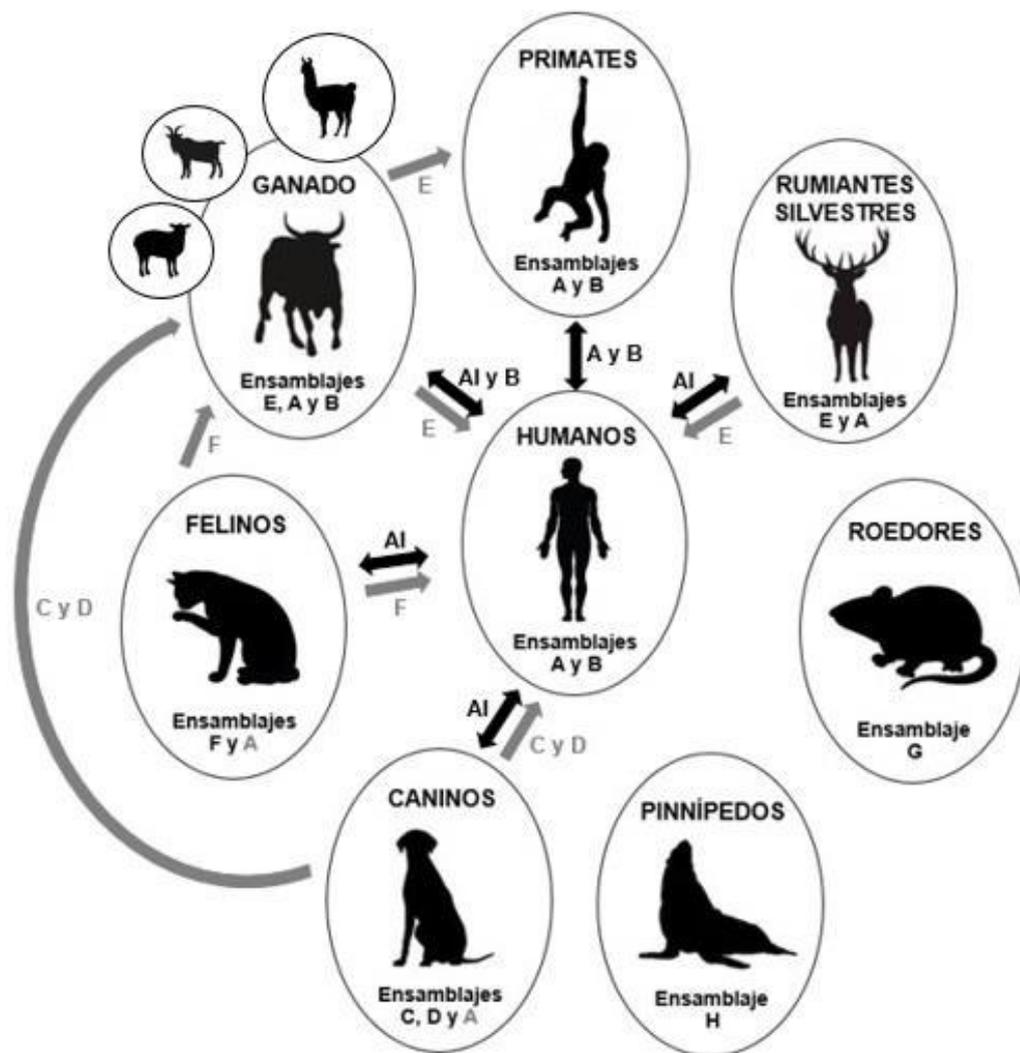


Figura 5. La mayoría de las infecciones en humanos son antroponóticas e involucran a los sub-ensamblajes AI, AII, BII y BIV. El sub-ensamblaje AI tiene potencial zoonótico e involucra al ganado, rumiantes silvestres, primates no humanos, gatos y perros. En humanos, se ha reportado ocasionalmente los ensamblajes C, D, E y F, originados probablemente de animales específicos a estos ensamblajes (Cacciò *et al.*, 2018)

2.5. CICLO DE TRANSMISIÓN EN EL GANADO

Giardia duodenalis es uno de los parásitos protozoarios que se identifica con mayor frecuencia en el ganado, principalmente en vacas y ovejas. Por lo general, las infecciones son asintomáticas pero la diarrea es la mayor expresión clínica de la enfermedad que perjudica el crecimiento y desarrollo en terneros (Geurden *et al.*, 2010b). Se ha recomendado el uso de programas sanitarios que incluyan la administración de antiparasitarios y la reducción de la contaminación ambiental con el objetivo de minimizar las reinfecciones (Aloisio *et al.*, 2006, Geurden *et al.*, 2010b). Sin embargo,

esto no ha logrado evitar la propagación de *Giardia* (O'handley *et al.*, 2000). Además, se ha demostrado que las moscas son capaces de vehiculizar los quistes de *Giardia* en granjas lecheras, lo cual complica aún más los esfuerzos por controlar y prevenir la infección (Zhao *et al.*, 2014).

El ensamblaje E es el que se reporta con mayor frecuencia en el ganado y, a pesar del grado de especificidad, este ensamblaje también se ha informado en casos humanos (Zahedi *et al.*, 2017), lo cual hace sospechar de su posible transmisión zoonótica (Fantinatti *et al.*, 2016). Es interesante indicar que los ensamblajes E y A exponen un mayor grado de similitud a nivel genómico en comparación con el ensamblaje B. Los estudios moleculares han revelado un 90% de identidad entre los ensamblajes E y A, mientras que los ensamblajes A y B muestran entre un 78-81% de identidad (Lu *et al.*, 1998; Lebbad *et al.*, 2010).

La prevalencia de *G. duodenalis* en bovinos oscila entre 1.09-74.2% a nivel mundial (Feng y Xiao, 2011; Feng *et al.*, 2019), aunque por lo general estos valores se incrementan en terneros y en vacunos lecheros en comparación con ganado cárnico (Abeywardena *et al.*, 2015; Mahato *et al.*, 2018). El ensamblaje E es el que se diagnostica con mayor frecuencia, seguido por el ensamblaje A (sub-ensamblajes AI y AIII) y esporádicamente el ensamblaje B (sub-ensamblajes BIII y BIV) (Lichtmannsperger *et al.*, 2019; Ryan y Zahedi, 2019). Asimismo, se han reportado los ensamblajes C, D y F en ganado bovino del Reino Unido (Minetti *et al.*, 2014) y también se reportó el ensamblaje F en vacunos asintomáticos de España (Cardona *et al.*, 2015). Trabajos realizados en Europa indican que el ganado vacuno podría actuar como reservorio de *Giardia* para la población humana. El análisis genético de los ensamblajes A y B aislados tanto de vacas como de humanos arrojó un 100% de identidad (Khan *et al.*, 2011; Bartley *et al.*, 2019).

La prevalencia de *G. duodenalis* en ovejas varía entre 1.5-89.2%, donde los corderos presentan siete veces más probabilidades de infectarse en relación con las ovejas adultas (Ryan *et al.*, 2005; Feng y Xiao, 2011). Aparte de la sintomatología, la giardiasis repercute negativamente en aspectos productivos como un menor peso de la carcasa y una menor ganancia de peso respecto al tiempo de vida (Jacobson *et al.*, 2016). Los ensamblajes E y A (AI y AII) son los que se reportan con mayor frecuencia en ovinos, mientras que el ensamblaje B se ha informado ocasionalmente. Sin embargo, se ha

reportado un brote de giardiasis en ovejas ocasionado por el ensamblaje B (Aloisio *et al.*, 2006).

A pesar que la giardiasis caprina no se encuentra tan estudiada, en comparación con la de otros rumiantes domésticos, se informan prevalencias que varían del 4% hasta el 43.5%. El ensamblaje E en conjunto con los sub-ensamblajes AI y AII son los que se reportan con mayor frecuencia (Feng y Xiao, 2011). Existe un reporte del ensamblaje D en cabras, aunque se especula que estas transportan mecánicamente los quistes y que la aparente infección es producto de la ingestión de heces caninas contaminadas (Utaaker *et al.*, 2017).

La prevalencia de *G. duodenalis* en cerdos oscila entre 3.5% y 31.1%. Los ensamblajes A, B (BII y BIV), D y E han sido reportados y, como sucede en otros animales, predomina el ensamblaje E, seguido del ensamblaje A. Se ha asociado la presencia del ensamblaje E con cuadros diarreicos en cerdos (Feng y Xiao, 2011).

En la actualidad, los datos relacionados a la infección por *Giardia* en alpacas reportan prevalencias que oscilan desde 4.9% hasta el 50% (Trout *et al.*, 2008; Gómez-Couso *et al.*, 2012), y al igual que en el resto de especies, los individuos jóvenes representan la población más afectada (Gómez-Puerta *et al.*, 2014). Aunque los trabajos de investigación son escasos, se ha logrado identificar a los ensamblajes A y E de *G. duodenalis* en alpacas. Un estudio en dos regiones andinas del Perú aisló los ensamblajes A y E en crías de alpaca (Gómez-Couso *et al.*, 2012). De la misma manera, el estudio de Gómez-Puerta *et al.* (2014), realizado en Cusco, Puno y Huancavelica, logró resultados más precisos al identificar a los sub-ensamblajes AI y AII en crías y madres, y el ensamblaje E exclusivamente en crías de alpacas.

La diarrea es una causa importante de morbilidad y mortalidad en crías de alpaca y su etiología puede ser multifactorial, incluyendo el manejo y los factores nutricionales, así como una amplia variedad de microorganismos patógenos. Hallazgos clínicos han establecido a *Giardia* como potencial agente etiológico de cuadros diarreicos en alpacas neonatas (Cebra *et al.*, 2003; Whitehead y Anderson, 2006). Sin embargo, las evidencias de trabajos realizados en el Perú no han logrado demostrar dicha asociación (Gómez-Couso *et al.*, 2012; Gómez-Puerta *et al.*, 2014). Cabe recalcar que ninguno de los trabajos

mencionados anteriormente han sido diseñado para determinar la asociación entre la presencia de *G. duodenalis* y el desarrollo de diarreas en crías de alpaca.

El ensamblaje E es el que se reporta con mayor frecuencia en el ganado, seguido por el ensamblaje A (Ryan y Zahedi, 2019). Los resultados de Gómez-Couso *et al.* (2012) obtenidos en alpacas coinciden con trabajos previos en animales de abasto, lo cual podría justificarse por el tipo de manejo. Es frecuente apreciar que las explotaciones alpaqueras alberguen rebaños mixtos, que incluyan ovejas y vacas en las mismas parcelas donde se encuentran las alpacas. Por ende, la proximidad de estas especies favorecería la transmisión cruzada de *G. duodenalis* (Gómez-Puerta, 2013). Por otro lado, el reporte de una mayor proporción de infecciones por ensamblaje A sugiere que la intervención humana favorecería la dinámica de transmisión de dicho ensamblaje hacia las alpacas (Gómez-Puerta, 2013; Gómez-Puerta *et al.*, 2014).

2.6. CICLO BIOLÓGICO

Giardia duodenalis presenta un ciclo biológico directo con dos estadios evolutivos, el trofozoíto proliferativo y el quiste infectivo, los cuales difieren en características morfológicas y metabólicas (Cordero del Campillo *et al.*, 2001) (Figura 6). Los trofozoítos altamente móviles son los encargados de colonizar el intestino delgado y de desencadenar los signos clínicos, mientras que los quistes son los responsables de la propagación y transmisión de la enfermedad (Adam, 2001).

El progreso del tránsito intestinal genera variaciones en el entorno, como el aumento del pH y en la concentración de sales biliares, que son detectadas por el trofozoíto promoviendo la formación del quiste (Cordero del Campillo *et al.*, 2001). Luján *et al.* (1996) indican que la falta de colesterol, como fuente alimenticia para los trofozoítos, es el factor desencadenante para iniciar el proceso de enquistamiento, el cual podría dividirse en dos fases, temprana y tardía. Cabe mencionar que se producen drásticas variaciones en la expresión génica para llevar a cabo cada una de estas fases (Einarsson *et al.*, 2016b).

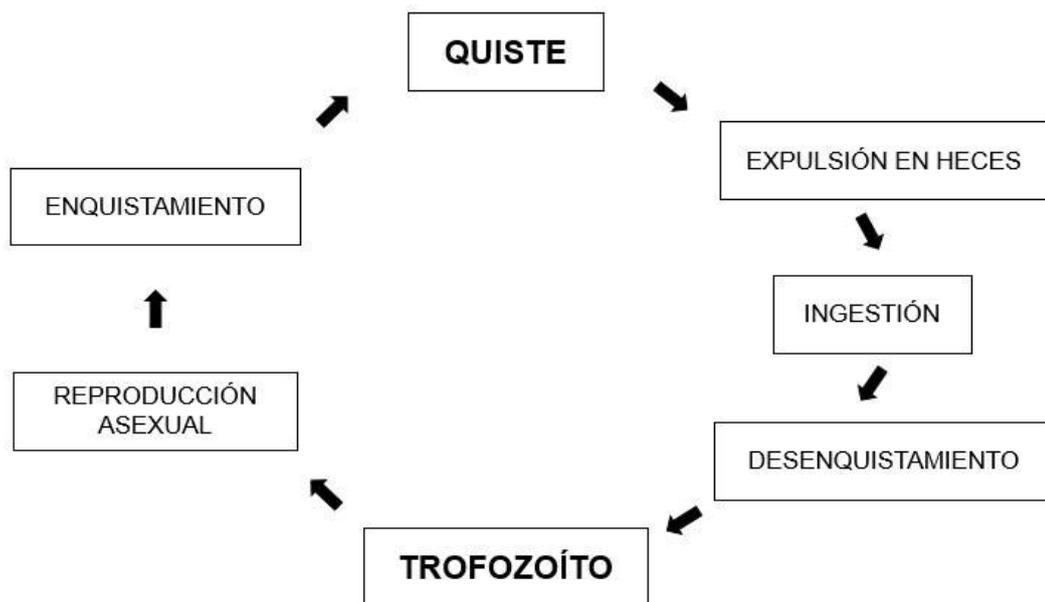


Figura 6. Ciclo biológico de *G. duodenalis* (O'handley y Olson., 2006)

La fase temprana inicia con la desarticulación del citoesqueleto y del disco adhesivo ventral. Además, el trofozoíto pierde su estructura convencional, adquiere una morfología esférica e inicia la formación de la pared quística. El quiste se caracteriza por presentar una pared robusta conformada por una doble membrana cubierta por una capa externa filamentosa que está compuesta de carbohidratos (60%) y proteínas (40%) (Einarsson *et al.*, 2016b).

Durante la fase tardía, el trofozoíto sufre la división de ambos núcleos con su respectivo material genético ($2n$) formando un prequiste con ploidía de $4 \times 2n$. Posteriormente, se produce otra ronda de replicación del ADN para cada núcleo lo que da como resultado un quiste completamente diferenciado que contiene cuatro núcleos, cada uno con una ploidía de $4n$, lo que resulta en un quiste con una ploidía de $16n$ (Bernander *et al.*, 2001).

A diferencia de los helmintos y algunas coccidias, los quistes de *Giardia* no requieren un periodo de maduración cuando son excretados en conjunto con las heces, son inmediatamente infecciosos y sobreviven en el medio ambiente, particularmente en lugares con condiciones frescas y húmedas (Farthing, 1996). En individuos con diarrea intensa, los trofozoítos no alcanzan a enquistarse debido al aumento del peristaltismo intestinal, lo que reduce significativamente su capacidad de sobrevivencia en el medio

ambiente. Por lo tanto, este estadio evolutivo es incapaz de diseminar y transmitir la enfermedad (Tangtrongsup y Scorza, 2010).

La pared quística protege al parásito contra todo aquello que lo destruiría, como las variaciones en la temperatura ambiental o frente a algunos tratamientos químicos utilizados en el agua potable (Thompson, 2004). Se ha demostrado que los quistes son capaces de persistir en aguas superficiales con temperaturas que oscilan de 0° a 40 ° C durante más de dos meses. A 8°C resisten 77 días, a 21°C, 5-24 días y a 37°C, en agua destilada, cuatro días (Cordero del Campillo *et al.*, 2001). Asimismo, los quistes son relativamente resistentes a la cloración del agua potable. Esto hace de las fuentes de agua una importante ruta de transmisión para *G. duodenalis* (Feng y Xiao, 2011). Por el contrario, los quistes de *Giardia* son altamente sensibles a la desecación. Además, el agua hirviendo los destruye rápidamente al igual que las soluciones de fenol, amonio cuaternario o lisol (Cordero del Campillo *et al.*, 2001).

2.7. INMUNOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA

La fisiopatología y patogenicidad de la giardiasis son procesos multifactoriales que se encuentran influenciados por diversos factores, que incluyen la dosis infecciosa, variabilidad genética de los ensamblajes de *G. duodenalis*, presencia concurrente de otros enteropatógenos, composición de la microbiota intestinal, respuesta inmunológica de la mucosa intestinal mediada genéticamente por el parásito y estado nutricional del hospedador (Einarsson *et al.*, 2016a; Certad *et al.*, 2017). Estos factores representan una de las principales dificultades para explicar la fisiopatología de la giardiasis en humanos y animales, debido a que generan un amplio espectro de expresión de la enfermedad, que abarca desde el transporte asintomático del microorganismo hasta la severa sintomatología evidenciada por diarrea crónica y malabsorción (Liu *et al.*, 2018).

El proceso fisiopatológico se inicia con la ingestión del quiste infectivo, y posterior liberación y fijación de los trofozoítos vegetativos sobre la mucosa intestinal (Adam, 2001). Los trofozoítos de *Giardia* estimulan el reclutamiento inicial de linfocitos T CD8+, y luego se produce la transición a linfocitos T CD4+ (Vinayak *et al.*, 1991). Los linfocitos T CD4+ son células esenciales para contrarrestar el curso de la infección (Singer y Nash, 2000b). A partir los linfocitos T CD4+, y a través de la intervención de la IL-6 y el TGF- β (factor de crecimiento transformante beta), se diferencian los

linfocitos Th17. Los linfocitos Th17 producen la IL-17, la cual es una citoquina proinflamatoria esencial en la inmunidad frente a una infección por *Giardia*. Un estudio en ratones reveló que la IL-17 fue necesaria para el transporte de inmunoglobulina A (IgA) a la luz intestinal, ya que su deficiencia condujo a una reducción marcada de los niveles de IgA fecal (Dann *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha demostrado que la IL-6, sintetizada específicamente por las células dendríticas, tiene un importante efecto regulador sobre la respuesta inmune frente a *Giardia*. Mientras que la IL-6 secretada por macrófagos, mastocitos, linfocitos T y células epiteliales intestinales no son necesarias para el control de la infección (Bleier *et al.*, 2004).

Los linfocitos T CD8+ son los responsables de inducir la atrofia del borde en cepillo de las vellosidades intestinales y reducir la actividad enzimática apical, principalmente de las disacaridasas (Scott *et al.*, 2004). Asimismo, los trofozoítos destruyen la glicoproteína secretora Mucina-2 (MUC2) encargada de sintetizar el mucus que recubre a las células epiteliales intestinales (Amat *et al.*, 2017). La destrucción del epitelio intestinal y la alteración de la actividad enzimática conducen a una disminución en el área total de absorción del intestino delgado. Esto conlleva a una digestión y absorción deteriorada de agua, electrolitos, vitaminas (A y B12), lípidos, aminoácidos y glucosa (Buret *et al.*, 1992; Troeger *et al.*, 2007). Además, se ha observado que *Giardia* induce la secreción de cloruro en las células colónicas (Troeger *et al.*, 2007). Por lo tanto, el gradiente osmótico, resultante de la combinación de malabsorción e hipersecreción de electrolitos, es el responsable de la acumulación de líquidos en la luz intestinal y aumento del peristaltismo, lo que a su vez conduce a la diarrea (Buret *et al.*, 1992). La diarrea mucosa acompañada de esteatorrea, que generalmente se observan en la giardiasis clínica, son atribuidas a la actividad reducida de la enzima lipasa y al aumento de la producción de mucina por las células caliciformes (Kahn y Line, 2010).

Estudios previos indican un papel crucial de los linfocitos B en la giardiasis. La infección por *Giardia* estimula la síntesis y secreción de IgA por los linfocitos B (Cerutti y Rescigno, 2008). Los enterocitos movilizan la IgA hacia el lumen intestinal, a través de un receptor polimérico de inmunoglobulina (pIgR), lo que permite la fijación de diversos microorganismos para repeler la adhesión sobre la mucosa intestinal (Strugnell y Wijburg, 2010). Se ha demostrado que la deficiencia de IgA y de pIgR se asocia a infecciones crónicas por *Giardia* (Langford *et al.*, 2002), y que la deficiencia de IL-17

posiblemente reduzca los niveles de IgA. Esto hace sospechar que el transporte de IgA a la luz intestinal se encuentra señalizado, en parte, por la IL-17 (Dann *et al.*, 2015). Además, la actividad de los anticuerpos es crucial en la detección de las proteínas de superficie variables (VSP) (Singer y Nash, 2000b). Por otra parte, se observó que los eosinófilos participan en la producción de IgA específica contra *Giardia* (Jung *et al.*, 2015), así como en la activación de otras células involucradas en la respuesta inmune (linfocitos Th17 y linfocitos T gamma/delta) (Coccia *et al.*, 2012).

La exposición a *G. duodenalis*, o a sus proteasas de cisteína, producto de excreción-secreción, provoca un efecto proteolítico sobre las quimiocinas celulares e induce diversas reorganizaciones en el citoesqueleto y en las uniones intercelulares de los enterocitos (Liu *et al.*, 2018). Estos procesos, en conjunto, aumentan considerablemente la permeabilidad del epitelio intestinal, la cual se encuentra asociada con una resistencia eléctrica transepitelial reducida (Teoh *et al.*, 2000). Adicionalmente, las proteasas de cisteína inducen alteraciones en la microbiota intestinal lo que da como resultado la apoptosis del revestimiento epitelial, la destrucción de uniones intercelulares y la invasión bacteriana a través de las lesiones de la barrera intestinal (Beatty *et al.*, 2017).

G. duodenalis exhibe otras estructuras que alteran la integridad del epitelio intestinal. El disco adhesivo ventral es una estructura de fijación mecánica sobre las células epiteliales intestinales, que permite a *Giardia* obtener los nutrientes necesarios y evitar el desplazamiento más allá del yeyuno. Por lo tanto, el disco juega un papel determinante en la supervivencia de *Giardia* en el ambiente intestinal y en el desarrollo de la enfermedad porque causa daño mecánico al interrumpir y distorsionar las microvellosidades donde se produce la interacción con la membrana celular (Adam, 2001).

La pérdida de la integridad de la barrera epitelial permite que *G. duodenalis* propicie la activación de genes específicos implicados en la cascada de apoptosis enterocítica alterando determinados procesos fisiológicos de gran relevancia para el equilibrio intestinal del hospedador (Roxström-Lindquist *et al.*, 2005). En respuesta a la colonización intestinal, las células epiteliales sintetizan péptidos antimicrobianos específicos, como las α -defensinas, capaces de reducir la viabilidad de *Giardia* (Aley *et al.*, 1994). Además, los enterocitos sintetizan y secretan especies reactivas de oxígeno (ERO) y óxido nítrico (NO) (Eckmann *et al.*, 2000). Se sabe que el NO inhibe el

desarrollo de los trofozoítos y los procesos de desenquistamiento y enquistamiento. Sin embargo, *G. duodenalis*, a través de la enzima nitrorreductasa, puede prevenir la formación de NO al consumir la arginina, sustrato crucial que necesita la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) de los enterocitos para sintetizar NO (Eckmann *et al.*, 2000).

En respuesta a la pérdida de células epiteliales por la giardiasis, las criptas intestinales se hacen más profundas y se produce una mayor proliferación celular en las mismas. De esta manera, las microvellosidades intestinales son repobladas por enterocitos fisiológicamente inmaduros con limitada capacidad de absorción (Buret *et al.*, 1992).

Dentro de la fisiopatología de la giardiasis, es necesario considerar qué ensamblaje es el causante de la infección o si esta se ha producido por la asociación de dos ensamblajes. Se ha demostrado que el ensamblaje B induce relativamente una mayor patogenicidad respecto a los sub-ensamblajes AI y AII y al ensamblaje E (Bénére *et al.*, 2012). A pesar que la mayor variabilidad genética es encontrada en el ensamblaje B, se requiere mayor evidencia que determine si esta característica influye directamente sobre la patogenicidad ya que los resultados de diversos estudios son contradictorios (Sprong *et al.*, 2009). Por otro lado, se demostró que las infecciones mixtas por los ensamblajes A y B de *G. duodenalis* son capaces de provocar significativamente un mayor grado de trastornos epiteliales que una monoinfección con cualquiera de los mismos ensamblajes. Aún no se ha explicado cómo una infección mixta por estos dos ensamblajes puede provocar mayores daños que las monoinfecciones. Se requiere mayor investigación para determinar si la mayor patogenicidad es provocada por el efecto sinérgico de un entorno competitivo, el efecto en conjunto de los productos secretores-excretores, la regulación de la virulencia intraparasitaria, o incluso la modulación de la respuesta del hospedador durante las infecciones combinadas (Koh *et al.*, 2013).

2.8. LESIONES HISTOPATOLÓGICAS

A pesar que existe evidencia que indica las mínimas o nulas alteraciones inflamatorias intestinales durante la infección por *Giardia duodenalis* en humanos y animales, diferentes estudios histopatológicos demuestran diversos grados de acortamiento de las microvellosidades intestinales y destrucción del borde en cepillo de los enterocitos (Panarelli *et al.*, 2017) (Figura 7). Ocasionalmente se observan agrupaciones o “parches” irregulares de linfocitos intraepiteliales en la lámina propia, inflamación de la lámina

propia, desprendimiento de células epiteliales degeneradas, presencia de gotas de mucus entre las microvellosidades (Panarelli *et al.*, 2017) y enterocitos con morfología cuboide (Kahn y Line, 2010). Además, el aumento en el número de enterocitos inmaduros parece estar asociado con la hiperplasia de las criptas intestinales (Buret *et al.*, 1992).

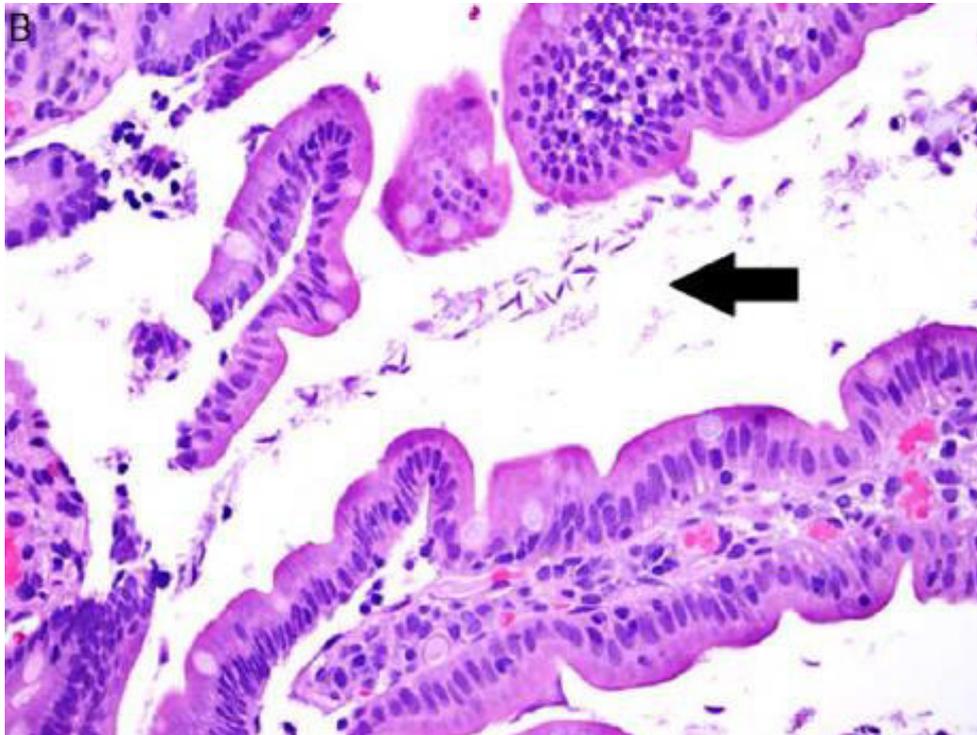


Figura 7. Presencia de trofozoítos de *Giardia duodenalis* en el lumen intestinal. Tinción hematoxilina-eosina (Panarelli *et al.*, 2017)

Excepcionalmente, un estudio reveló que terneros con giardiasis presentaron una inflamación difusa moderada a severa en el corion yeyunal acompañado de una marcada infiltración de linfocitos en la lámina propia. La atrofia de las microvellosidades y la distorsión de las criptas fueron hallazgos comunes. Además, la criptitis purulenta varió de rara a multifocal en el yeyuno proximal. Todas estas alteraciones se observaron en menor medida en el duodeno, íleon y colon (Geurden *et al.*, 2010c).

2.9. SIGNOS CLÍNICOS

La giardiasis es una enfermedad multifactorial que refleja la compleja interacción entre el hospedador y el parásito protozoario (Einarsson *et al.*, 2016a). Esto hace que los signos clínicos varíen sustancialmente entre especies e incluso dentro de individuos de la misma especie (Gómez-Puerta, 2013). La intervención de determinados factores, como la variabilidad genética de los ensamblajes de *Giardia duodenalis*, estado nutricional del

hospedador, composición de la microbiota intestinal, coinfección por enteropatógenos, respuestas inmunológicas de la mucosa intestinal mediada genéticamente por el hospedador y modulación inmunológica por *Giardia*, influyen en las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Certad *et al.*, 2017).

En rumiantes, se reporta la excreción de quistes en terneros de tan sólo 4 días de edad, pero clínicamente la enfermedad se manifiesta en animales mayores de 1 mes (Geurden *et al.*, 2006). La giardiasis clínica evidencia heces líquidas o pastosas, fétidas y con aspecto mucoso, deshidratación, dolor y distensión abdominal, apatía y alteración del apetito. En corderos con giardiasis se observó que los animales requirieron un mayor tiempo para alcanzar el peso adecuado para el sacrificio y se redujo el peso de la canal (Olson *et al.*, 1995). Además, Aloisio *et al.* (2006) indicaron que corderos infectados naturalmente con *Giardia* mostraron síndrome de malabsorción y disminución de la ganancia de peso y de la eficacia alimenticia. La diarrea es la mayor expresión clínica de la giardiasis y diversos estudios han demostrado la asociación entre el parásito y las diarreas en ganado bovino y ovino (O'Handley *et al.*, 1999; Squire y Ryan, 2017). No obstante, otros trabajos no lograron identificar la asociación entre *Giardia* y cuadros diarreicos en terneros y corderos (Xiao *et al.*, 1994b; Huetink *et al.*, 2001).

En lo que respecta a los camélidos sudamericanos, se informa que la infección por *G. duodenalis* desencadena diarrea, deshidratación y pérdida de peso (Whitehead y Anderson, 2006). Aunque varios estudios no encontraron una asociación entre la infección por *G. duodenalis* y la presentación de diarreas en alpacas (Gómez-Couso *et al.*, 2012; Gómez-Puerta *et al.*, 2014), existen reportes clínicos que indican lo contrario. Cebra *et al.* (2003) identificaron a *Giardia* como el enteropatógeno involucrado en el 18% de los casos de diarrea en crías de alpaca y llama. De la misma manera, Whitehead y Anderson (2006) revelaron que el 32.8% de los cuadros diarreicos en alpacas menores de cuatro meses de edad fueron positivos a *Giardia*.

2.10. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

Las prevalencias reportadas de *Giardia duodenalis* varían de acuerdo al número de muestras fecales analizadas por individuo, la edad y el estado inmunológico del paciente, el área geográfica estudiada y el método diagnóstico utilizado (Koehler *et al.*, 2014; Ryan y Zahedi, 2019). Tradicionalmente, las técnicas basadas en microscopía,

anticuerpos y enzimas presentan considerables limitaciones en la detección o diagnóstico específico en protozoarios (Koehler *et al.*, 2014). Frente a esta situación, el advenimiento de las técnicas moleculares, en particular las basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, han mejorado drásticamente nuestra capacidad para detectar infecciones causadas por parásitos. Los importantes avances en *Giardia* respecto a la taxonomía y diagnóstico, aspectos considerados problemáticos anteriormente, ilustran claramente el progreso de las herramientas moleculares (Cacciò, 2004).

2.10.1. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS CONVENCIONALES

2.10.1.1. MICROSCOPIA ÓPTICA

Los métodos basados en microscopía óptica (Figura 8) se han utilizado ampliamente para la detección de quistes de *Giardia* en muestras de agua, alimentos, tejidos y heces (Soares y Tasca, 2016). Aunque el diagnóstico por microscopía óptica se basa principalmente en la identificación de las características morfológicas típicas de los quistes, es posible hallar trofozoítos en muestras de heces diarreicas debido al aumento del peristaltismo intestinal (Tangtrongsup y Scorza, 2010). La evaluación de la muestra fecal se puede realizar directamente mediante la preparación inmediata de un frotis con solución salina tibia (37° C) a partir de heces frescas o emplear métodos de concentración que utilizan sulfato de zinc o sacarosa. Además, existe la alternativa de añadir técnicas de tinciones en el protocolo de procesamiento para facilitar la identificación de quistes y trofozoítos de *Giardia* y para diferenciarlos de otros microorganismos y desechos fecales o ambientales (Ament, 1972; Thornton *et al.*, 1983). Por otro lado, la microscopía electrónica podría ser útil para la identificación de determinadas especies de *Giardia*, pero su uso rutinario en el ámbito clínico no es aplicable (Adam, 2001).

Debido a la naturaleza intermitente de la excreción de quistes en individuos con giardiasis, un resultado negativo no es excluyente y conviene repetirlo mínimo tres veces en días alternos (Cordero del Campillo, 2001). Por lo tanto, el rendimiento diagnóstico de la microscopía convencional parece ser mayor si se dispone de una mayor cantidad de muestras para examinar (Cartwright, 1999).



Figura 8. Visualización por microscopía óptica de trofozoíto de *G. duodenalis* teñido con Giemsa (400x) (Thompson, 2004)

El reducido costo de reactivos hace de la microscopía óptica una alternativa rentable. Sin embargo, dentro de las desventajas de este método encontramos que los resultados obtenidos son relativos porque se rigen a la formación y experiencia del observador, debido a que este debe ser capaz de diferenciar los quistes de *Giardia* de otras estructuras como levaduras y restos de plantas o materia fecal (Dryden *et al.*, 2006). Además, se requiere una mayor cantidad de tiempo para el análisis en laboratorio y su sensibilidad es menor en relación a pruebas inmunológicas y moleculares (Geurden *et al.*, 2004; Heyworth, 2014).

2.10.1.2. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

Existen diversas técnicas inmunodiagnósticas disponibles para la giardiasis, como la microscopía de inmunofluorescencia (IFA) (Figura 9), ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) e inmunocromatografía cualitativa en fase sólida. Estas técnicas son utilizadas cada vez con mayor frecuencia en el diagnóstico clínico. Estos métodos ofrecen varias ventajas sobre la microscopía óptica en términos de sensibilidad

y especificidad para la detección de quistes y trofozoítos de *Giardia* en diversos tipos de muestras (Koehler *et al.*, 2014).

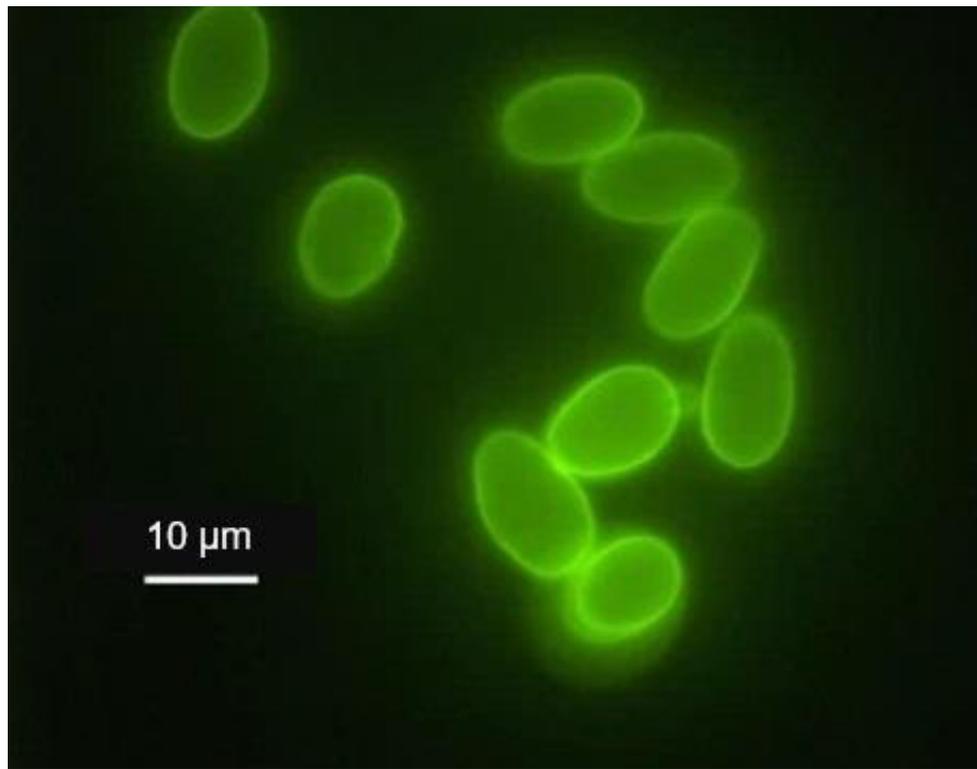


Figura 9. Visualización por microscopía de fluorescencia de quistes de *G. duodenalis* marcados con isotiocianato de fluoresceína (Gómez-Puerta, 2013)

En animales de compañía, la IFA, el ELISA y la inmunocromatografía (Rimhanen-Finne *et al.*, 2007; Geurden *et al.*, 2008) han demostrado ser valiosas alternativas para el diagnóstico clínico. De la misma manera, la IFA y el ELISA han probado ser técnicas inmunodiagnósticas altamente sensibles y específicas para la detección de *Giardia* en terneros (Geurden *et al.*, 2004). Actualmente, la IFA es considerada como la mejor opción para el diagnóstico clínico de la giardiasis (Geurden *et al.*, 2010a).

Dentro de las ventajas de las técnicas inmunodiagnósticas, la IFA hace que la identificación de quistes resulte más fácil debido a los anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína-isotiocianato que emiten fluorescencia cuando reaccionan a una determinada longitud de onda. Además, la IFA exhibe una mayor sensibilidad y especificidad en relación a otras técnicas inmunodiagnósticas, lo cual podría deberse a la etapa previa de concentración de la muestra (Geurden *et al.*, 2008). Por el contrario, estudios indican que el ELISA es más sensible que la IFA dado a la detección de proteínas

de la pared quística, las cuales se secretan en grandes cantidades cuando los trofozoítos atraviesan el proceso de enquistamiento, mientras que la IFA probablemente sólo detecta los quistes mas no a los trofozoítos (Boone *et al.*, 1999; Geurden *et al.*, 2004). Sin embargo, tanto el ELISA como la IFA requieren una mayor cantidad de tiempo para el procesamiento y análisis de muestras, así como de personal y equipamiento especializados. Por lo tanto, el elevado costo de estos métodos hace poco práctico su uso en el diagnóstico clínico rutinario y restringe su aplicación a estudios de investigación (Uehlinger *et al.*, 2017). Frente a esta situación, los ensayos inmunocromatográficos representan una opción viable porque son fáciles y rápidos de realizar, el procesamiento se encuentra sujeto a una menor cantidad de equipos y puede ser aplicado en muestras congeladas (Weitzel *et al.*, 2006). Asimismo, la utilización de pruebas inmunocromatográficas rápidas resultan más convenientes para la práctica clínica ya que son fáciles de ejecutar y la detección de copro-antígenos hace que no se requiera la identificación morfológica de los quistes. Incluso, estos métodos son capaces de detectar la excreción de quistes cuando su concentración en las heces es mínima o cuando sólo el copro-antígeno se encuentra presente (Vidal y Catapani, 2005).

2.10.2. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS MOLECULARES

2.10.2.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se han realizado importantes avances en el desarrollo de herramientas moleculares específicas y sensibles para la clasificación taxonómica de *Giardia* y el diagnóstico de la giardiasis. La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Figura 10), ha llevado a mejorar el conocimiento y comprensión de la sistemática, biología, epidemiología, ecología y genética de poblaciones de *G. duodenalis*, lo que consecuentemente apoya la prevención y el control de la giardiasis (Koehler *et al.*, 2014). Además, la PCR tiene el potencial de dilucidar información relacionada a la compleja red de factores biológicos y ecológicos que intervienen en las interacciones entre *Giardia*, los hospedadores y el medio ambiente (Cacciò y Sprong, 2010; Koehler *et al.*, 2014). En la actualidad, se dispone de varios marcadores moleculares, como beta-giardina (β -giardina), glutamato deshidrogenasa (GDH), triosa fosfato isomerasa (TPI), factor de elongación-1 alfa (EF-1 α) y la subunidad menor ARNr (SSU ARNr), que pueden ser utilizados como ensayos de la PCR para la detección molecular de *G. duodenalis* (Cacciò y Ryan, 2008). Dentro de estos, los genes β -giardina y TPI son los que mejores resultados

han proporcionado (Cacciò y Sprong, 2010). Sin embargo, el uso de la PCR exhibe limitaciones, entre las que destacan los elevados costos y la necesidad de contar con operarios y equipos especializados, lo cual hace que su aplicación sea insostenible en regiones con recursos limitados y que su uso no se encuentre tan extendido en la práctica veterinaria (Cacciò y Sprong, 2010; Gómez-Puerta, 2013).

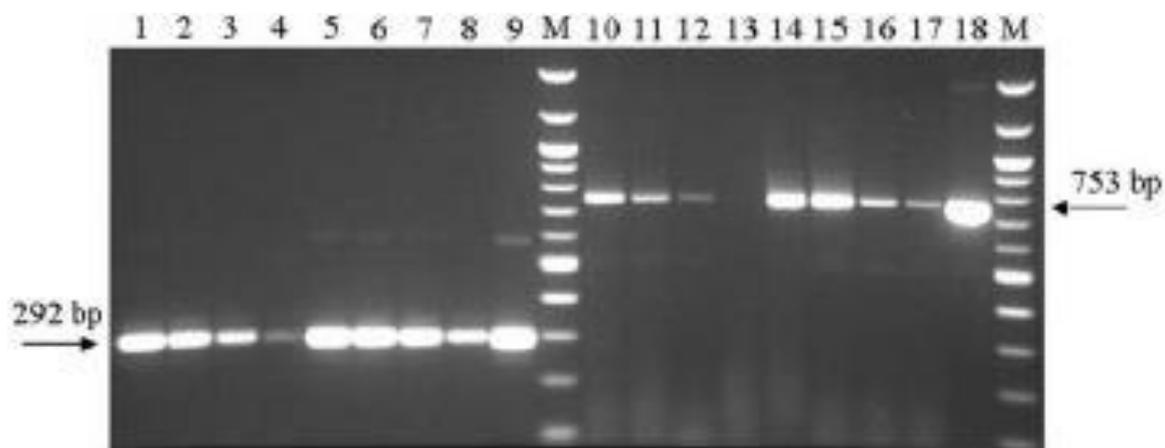


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR anidada para el gen β -Giardina de *Giardia duodenalis* (Cacciò *et al.*, 2002)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN Y PERIODO DE DURACIÓN

El trabajo de investigación se realizó en las localidades de Machu Kuma, Paqchapata, Quero Tauca, Sillacunca y Tumuyo, todas ubicadas en el distrito de Nuñoa (provincia de Melgar, región Puno), y en la localidad de Quenamari situada en el distrito de Maranganí (provincia de Canchis, región Cusco). Las muestras fueron procesadas y analizadas en el Laboratorio de Epidemiología y Economía Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, localizada en el distrito de San Borja, provincia de Lima, región Lima. El estudio se llevó a cabo desde enero del 2019 hasta julio del 2021

3.2. DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL

3.2.1. MUESTRAS FECALES

Se colectaron muestras fecales, normales y diarreicas, de crías de alpaca menores a dos meses de edad durante los meses de enero y febrero, coincidentes con la temporada de parición y época lluviosa del año 2019 (precipitación en Cusco: 138 mm, precipitación en Puno: 161 mm) (Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú, 2022).

3.2.2. COMPONENTES DEL KIT DE EXTRACCIÓN DE ADN "FastDNA SPIN® Kit for Soil" (MP Biomedicals, USA)

Indicados por el fabricante (Anexo 1).

3.2.3. COMPONENTES PARA LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA ANIDADA (PCR ANIDADA)

➤ Mezcla Maestra Verde (GoTaq® Green Master Mix, 2X (Promega, Madison, WI, USA)): contiene ADN Taq polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y tampones de reacción a concentraciones óptimas para la amplificación correcta de plantillas de ADN por PCR. Además, contiene dos colorantes (azul y amarillo) que permiten el monitoreo del progreso durante la electroforesis.

➤ Cebadores (iniciadores, partidores o primers en inglés):

Para la amplificación parcial del gen β -Giardina de *Giardia duodenalis* se utilizaron los siguientes cebadores (Cacciò *et al.*, 2002):

CEBADORES PARA PCR PRIMARIO (OUTERS):	
β -Giardina G7 Forward (F1)	5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3'
β -Giardina G759 Reverse (R1)	5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'
CEBADORES PARA PCR SECUNDARIO (INNERS):	
β -Giardina Forward (F2)	5'-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3'
β -Giardina Reverse (R2)	5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3'

3.2.4. COMPONENTES PARA LA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA), agarosa, bromuro de etidio y marcador de peso molecular (ladder).

3.2.5. TAMAÑO DE MUESTRA

El cálculo del tamaño de muestra se realizó en base a la fórmula para estudios epidemiológicos caso-control no pareado (Rothman y Greenland, 1998). Se utilizó un nivel de confianza del 95%, una potencia del 80% y una proporción de casos expuestos del 57.9% (Gómez-Couso *et al.*, 2012). La chance que se usó en el cálculo fue de 2, debido a que se esperó encontrar que la chance de las muestras diarreicas en el grupo positivo a *G. duodenalis* sea dos veces la chance de las muestras diarreicas en el grupo negativo a *G. duodenalis*.

[1] Tamaño de muestra. Estudio caso-control. Grupos independientes:

Datos:

Proporción de casos expuestos:	57,900%
Proporción de controles expuestos:	40,746%
Chance a detectar:	2,000
Número de controles por caso:	1
Nivel de confianza:	95,0%

Resultados:

Potencia (%)	Tamaño de muestra		
	Casos	Controles	Total
80,0	133	133	266

En el presente estudio epidemiológico caso-control, la variable desenlace (dependiente) fue la diarrea, por lo tanto, se seleccionó un grupo con 133 crías de alpaca con diarreas y otro grupo con 133 crías sin diarreas. Sin embargo, las demás variables (sexo, raza y localidad de procedencia) fueron obtenidas aleatoriamente y, por ende, mostradas en los resultados.

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. COLECTA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras fecales fueron colectadas directamente del recto del animal por personal orientado y capacitado profesionalmente (equipo de investigación, incluyendo al tesista, y trabajadores de la explotación alpaquera). Se utilizaron bolsas de polipropileno estériles y se rotuló cada una de estas con los datos respectivos del animal. Posteriormente, las muestras se clasificaron de acuerdo a su consistencia en normales o diarreicas y se colocaron en viales de 15 mL. con dicromato de potasio al 2.5%. Las muestras se conservaron a temperatura de refrigeración (4°C). Finalmente, las muestras fueron remitidas al Laboratorio de Epidemiología y Economía Veterinaria, para su procesamiento, diagnóstico y análisis molecular. Las muestras se almacenaron a 4°C por

un periodo menor a dos meses. La manipulación de las muestras fecales siguió un protocolo estricto con la finalidad de evitar la infección del operario y la contaminación de la muestra.

3.3.2. SELECCIÓN DE MUESTRAS FECALES PARA EL ESTUDIO

Las muestras fecales se clasificaron, de acuerdo a su consistencia, en normales y diarreicas. En cada grupo se seleccionaron 133 muestras de forma aleatoria, para lo cual se utilizó una función del programa de Microsoft Excel.

3.3.3. EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO (ADN)

Se realizó la extracción de ADN para cada muestra fecal siguiendo el protocolo indicado en el “FastDNA SPIN® Kit for Soil (MP Biomedicals, USA)” (Anexo 1). Al finalizar el procedimiento, se obtuvo 100 µL. de eluido de cada muestra, los cuales se mantuvieron a -20 °C para su conservación.

3.3.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA ANIDADA (PCR ANIDADA) (Cacciò *et al.*, 2002)

➤ PCR Primaria

Para cada muestra de ADN se amplificó parcialmente un segmento de 753 nucleótidos del gen β -Giardina. Los cebadores utilizados en la PCR Primaria fueron los siguientes:

CEBADOR	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS
β -Giardina G7 Forward (F1)	5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3'
β -Giardina G759 Reverse (R1)	5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'

Mezcla de reacción de la PCR Primaria para cada muestra:

COMPONENTE	CANTIDAD
β -Giardina G7 Forward (F1) (0.25 µM)	0.7 µL
β -Giardina G759 Reverse (R1) (0.25 µM)	0.7 µL
Mezcla Maestra Verde (Promega, USA)	12.5 µL
Agua libre de ADNasas	9 µL
ADN	2 µL
TOTAL	25 µL

Condiciones utilizadas en el termociclador para la PCR Primaria:

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	
Iniciación	94°C	5 minutos	
Desnaturalización	94°C	30 segundos	} 36 ciclos
Alineamiento	65°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Elongación final	72°C	7 minutos	
Conservación	4°C	Infinito	

➤ PCR Secundaria

Después de concluir la PCR Primaria, el producto se utilizó como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se posicionaron dentro de la primera secuencia amplificada, con la finalidad de lograr una mayor sensibilidad y especificidad. En la PCR Secundaria se amplificó un segmento formado por 384 nucleótidos, para lo cual se utilizaron los siguientes cebadores:

CEBADOR	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS
β-Giardina Forward (F2)	5'-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3'
β-Giardina Reverse (R2)	5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3'

Mezcla de reacción de la PCR Secundaria para cada muestra:

COMPONENTE	CANTIDAD
β-Giardina Forward (F2) (0.25 μM)	1.3 μL
β-Giardina Reverse (R2) (0.25 μM)	1.3 μL
Mezcla Maestra Verde (Promega, USA)	25 μL
Agua libre de ADNAsas	18.4 μL
ADN	4 μL
TOTAL	50 μL

Condiciones utilizadas en el termociclador para la PCR Secundaria:

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	
Iniciación	94°C	5 minutos	
Desnaturalización	94°C	30 segundos	} 36 ciclos
Alineamiento	65°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Elongación final	72°C	7 minutos	

3.4. ANÁLISIS DE INFORMACIÓN

La evaluación de *G. duodenalis* como factor de riesgo para la presentación de diarrea neonatal en alpacas se determinó mediante el cálculo de estimación del riesgo (chance). Para lo cual se utilizó el análisis de regresión logística múltiple para caso-control, empleando el programa estadístico STATA v. 15.0. Se determinó la chance de diarrea en crías de alpaca con y sin *G. duodenalis* ajustado a las variables sexo, raza y procedencia geográfica. La edad no fue considerada una variable debido a la falta de información en los registros. La totalidad de los resultados fueron interpretados con un intervalo de confianza del 95%.

3.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

La manipulación de los animales y la colecta de las muestras fecales se realizaron por personal orientado y capacitado profesionalmente (equipo de investigación, incluyendo al tesista, y trabajadores de la explotación alpaquera). El presente trabajo contó con la aprobación, bajo constancia N°020-04-19, del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) (Anexo 2).

IV. RESULTADOS

Se analizó un total de 266 muestras fecales de crías de alpaca menores de dos meses de edad. La distribución de los individuos en relación al sexo demostró que de la totalidad de muestras colectadas, 128 (48.1%) eran machos y 138 (51.9%) hembras. Respecto a la consistencia de las heces, se determinó que 69 (53.9%) hembras y 64 (46.4%) machos presentaron heces diarreicas (Cuadro 3).

La distribución de las crías en relación a la raza precisó que 186 (69.9%) muestras fecales correspondieron a la raza huacaya y 80 (30.1%) a la raza suri. Se observó que 100 (53.8%) individuos de la raza huacaya y 33 (41.3%) de la raza suri padecieron heces diarreicas (Cuadro 3).

Se recolectaron 79 (29.7%) muestras de Machu Kuma, 70 (26.3%) de Paqchapata, 12 (4.5%) de Quenamari, 17 (6.4%) de Quero Tauca, 61 (22.9%) de Sillacunca y 27 (10.2%) de Tumuyo. La distribución de las crías de cada localidad muestreada y su relación con heces diarreicas identificó el mayor número y porcentaje en la localidad de Machu Kuma con 53 (67.1%) muestras, seguido por Paqchapata y Sillacunca con 43 (61.4%) y 36 (59.0%) individuos, respectivamente (Cuadro 3).

Utilizando la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada) se determinó que, de la totalidad de individuos en estudio, 97 (36.5%) muestras fueron positivas a *Giardia duodenalis*, mientras que 169 (63.5%) muestras resultaron negativas a la prueba (Figura 11). En relación a los animales positivos a la infección, 63 (65.0%) individuos evidenciaron heces diarreicas y los 34 (35.0%) restantes mostraron heces normales (Cuadro 3).

La prueba de chi cuadrado demostró la asociación entre el desarrollo de diarreas y la infección en crías de alpaca. De la misma manera, se observó una asociación entre las diarreas y la localidad de procedencia.

Cuadro 3. Características de la población en estudio y análisis bivariado

VARIABLES	N (%)	CASOS (n=133)	CONTROLES (n=133)	p*
		n (%)	n (%)	
SEXO				0.220
Hembra	128 (48.1)	69 (53.9)	59 (46.1)	
Macho	138 (51.9)	64 (46.4)	74 (53.6)	
RAZA				0.061
Huacaya	186 (69.9)	100 (53.8)	86 (46.2)	
Suri	80 (30.1)	33 (41.3)	47 (58.7)	
LOCALIDAD				<0.001
Machu Kuma	79 (29.7)	53 (67.1)	26 (32.9)	
Paqchapata	70 (26.3)	43 (61.4)	27 (38.6)	
Quenamari	12 (4.5)	0 (0.0)	12 (100.0)	
Quero Tauca	17 (6.4)	1 (5.9)	16 (94.1)	
Sillacunca	61 (22.9)	36 (59.0)	25 (41.0)	
Tumuyo	27 (10.2)	0 (0.0)	27 (100.0)	
<i>Giardia duodenalis</i>				<0.001
Positivo	97 (36.5)	63 (65.0)	34 (35.0)	
Negativo	169 (63.5)	70 (41.4)	99 (58.6)	

*Prueba de chi cuadrado.

N: número total de animales.

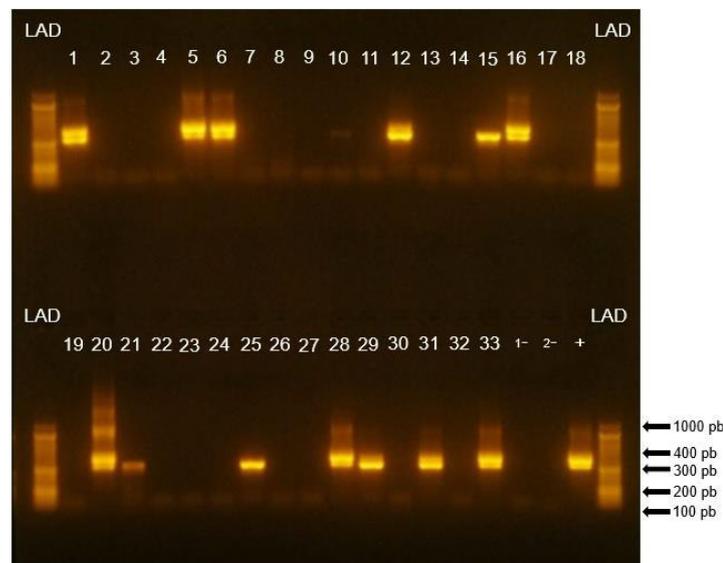


Figura 11. Diagnóstico específico de *Giardia duodenalis* a través de PCR anidada basado en el gen beta-giardina (β -giardina). Las muestras positivas evidencian una banda intensa de aproximadamente 384 nucleótidos

La distribución de las muestras positivas a *G. duodenalis*, de acuerdo a la consistencia de las heces, sexo, raza y localidad, se precisa en el Cuadro 4. Por medio del análisis de regresión logística múltiple, se precisó la chance para asociar determinadas variables con el desarrollo de diarreas en crías de alpaca. Se determinó que la chance de desarrollar diarreas en las crías de alpaca positivas a *G. duodenalis* es 3.85 veces la chance de desarrollar diarreas en las crías negativas a *G. duodenalis*, ajustado por sexo, raza y localidad de procedencia (IC 95%: 1.97 – 7.55; $p < 0.001$). En relación a la localidad de procedencia, se observó que las crías de la localidad de Machu Kuma (localidad de referencia) presentaron un mayor riesgo de desarrollar diarreas en comparación con las de Quero Tauca (OR=0.03; $p=0.001$) (Cuadro 5).

Cuadro 4. Muestras positivas a *Giardia duodenalis* según la consistencia de las heces, sexo, raza y localidad.

	POSITIVO n (%)	NEGATIVO n (%)	N (%)
HECES			
Diarreica	63 (47.4)	70 (52.6)	133 (100)
Normal	34 (25.6)	99 (74.4)	133 (100)
SEXO			
Hembra	44 (34.3)	84 (65.7)	128 (100)
Macho	53 (38.4)	85 (61.6)	138 (100)
RAZA			
Huacaya	55 (29.6)	131 (70.4)	186 (100)
Suri	42 (52.5)	38 (47.5)	80 (100)
LOCALIDAD			
Machu Kuma	31 (39.2)	48 (60.8)	79 (100)
Paqchapata	16 (22.9)	54 (77.1)	70 (100)
Quenamari	1 (8.3)	11 (91.7)	12 (100)
Quero Tauca	4 (23.6)	13 (76.4)	17 (100)
Sillacunca	32 (52.4)	29 (47.6)	61 (100)
Tumuyo	13 (48.1)	14 (51.9)	27 (100)

N: número total de animales.

Asimismo, a través del análisis de regresión logística múltiple, se concluyó que la chance de presentar *G. duodenalis* en las crías con diarreas es 3.79 veces la chance de presentar *G. duodenalis* en las crías con heces normales, ajustado por sexo, raza y localidad de procedencia (IC 95%: 1.94 – 7.37; $p < 0.001$). Respecto a la localidad de procedencia, se evidenció que las crías de Machu Kuma (localidad de referencia) presentaron un mayor

riesgo de presentar *G. duodenalis* en relación con las de Paqchapata (OR=0.46, $p=0.043$) (Cuadro 6).

Cuadro 5. Factores independientemente asociados a la presentación de diarrea en análisis de regresión logística múltiple

VARIABLES	ANÁLISIS MÚLTIPLE		
	OR	IC 95%	p*
<i>Giardia duodenalis</i>			
Negativo	Ref.		
Positivo	3.85	1.97 - 7.55	<0.001
SEXO			
Hembra	Ref.		
Macho	1.01	0.56 - 1.80	0.891
RAZA			
Huacaya	Ref.		
Suri	0.53	0.08 - 3.49	0.513
LOCALIDAD			
Machu Kuma	Ref.		
Paqchapata	0.94	0.47 - 1.90	0.874
Quenamari	1	-	-
Quero Tauca	0.03	0.00 - 0.27	0.001
Sillacunca	1	0.16 - 6.42	0.996
Tumuyo	1	-	-

OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; Ref.: referencia

*Ajustado por sexo, raza y localidad de procedencia.

Cuadro 6. Factores independientemente asociados a la presentación de *Giardia duodenalis* en análisis de regresión logística múltiple

VARIABLES	ANÁLISIS MÚLTIPLE		
	OR	IC 95%	p*
HECES			
Normal	Ref.		
Diarreica	3.79	1.94 - 7.37	<0.001
SEXO			
Hembra	Ref.		
Macho	1.22	0.71 - 2.12	0.475
RAZA			
Huacaya	Ref.		
Suri	1.99	0.55 - 7.20	0.293
LOCALIDAD			
Machu Kuma	Ref.		
Paqchapata	0.46	0.22 - 0.97	0.043
Quenamari	0.35	0.04 - 3.07	0.346
Quero Tauca	0.97	0.26 - 3.69	0.969
Sillacunca	1.07	0.27 - 4.25	0.924
Tumuyo	2.00	0.46 - 8.71	0.356

OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; Ref.: referencia

*Ajustado por sexo, raza y localidad de procedencia.

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación es el primero en evaluar la asociación estadística de la presencia de *Giardia duodenalis* con la presentación de cuadros diarreicos en crías de alpaca en regiones altoandinas del Perú. El análisis estadístico de regresión logística múltiple para estudios epidemiológicos caso-control determinó que la chance de desarrollar diarreas en las crías de alpaca positivas a *G. duodenalis* es 3.85 veces las chance de desarrollar diarreas en las crías negativas a *G. duodenalis*. Estos resultados se complementan con hallazgos clínicos reportados en estudios previos que resaltan la potencial asociación de *Giardia* y otros patógenos infecciosos (*Cryptosporidium* spp., coccideas, helmintos, rotavirus y coronavirus) con la presencia de diarreas en crías lactantes de alpaca y llama (Cebra *et al.*, 2003; Whitehead y Anderson, 2006). Por su parte, Gómez-Couso *et al.* (2012) y Gómez-Puerta *et al.* (2014) no lograron determinar una asociación entre la infección por *Giardia* y las diarreas en alpacas neonatas. No obstante, es necesario recalcar que ambas investigaciones, mencionadas anteriormente, no se diseñaron bajo el criterio para determinar dicha asociación, por esta razón, no es posible extrapolar estos resultados a la población.

Estudios realizados en otras especies de abasto también han demostrado la asociación de la giardiasis con la presentación de diarreas. Un estudio en una zona agroecológica de Ghana realizado en ganado ovino, caprino y bovino, indicó la asociación significativa entre individuos con diarreas y la presencia de *G. duodenalis* (Squire y Ryan, 2017). De la misma manera, un trabajo llevado a cabo en terneros Holstein de una granja lechera, demostró que *Giardia* se asoció con el desarrollo de diarreas, las cuales podrían volverse crónicas (O'Handley *et al.*, 1999). Sin embargo, la variabilidad de las

manifestaciones clínicas y el curso autolimitante de la infección, hacen sospechar sobre la verdadera importancia sanitaria de la giardiasis en el ganado.

Una investigación realizada en un establecimiento lechero demostró que la infección por *G. duodenalis* no se asoció con diarreas en terneros (Huetink *et al.*, 2001). De igual modo, Xiao *et al.* (1994b) no lograron determinar si la diarrea que padecían unos corderos era desencadenada por la presencia del protozooario. Una explicación plausible para las conclusiones de ambos estudios podría ser el diseño del estudio y la intervención de otros enteropatógenos. Todos estos estudios que no encontraron asociación entre *Giardia* y las diarreas podrían tener una posible explicación en la presencia de otros enteropatógenos, el estado inmunológico del hospedador durante la exposición, el sistema de explotación donde se realizó el estudio o la temporada del año. Por otra parte, investigaciones realizadas sobre la giardiasis en humanos revela resultados contradictorios. Por un lado, diversos estudios señalan un OR combinado de 0.60, lo cual propone que la infección por *Giardia* reduce la posibilidad de padecer diarrea en niños de países en vías de desarrollo (Meng *et al.*, 2011; Muhsen y Levine, 2012). Por el contrario, otras investigaciones indican un OR combinado de 3.18, lo que sugiere que la presencia del protozooario aumenta significativamente la probabilidad de desarrollar diarreas (Bhandari *et al.*, 1999; Muhsen y Levine, 2012).

En este estudio, sólo el 36.5% (97/266) de animales se encontró infectado por *G. duodenalis*, valor que se encuentra entre los obtenidos en estudios previos realizados en las mismas regiones geográficas. Tanto el trabajo de Gómez-Couso *et al.* (2012) como el de Gómez-Puerta *et al.* (2014) determinaron que el 50.7 % (105/207) y el 30.3% (20/66) de crías de alpaca fueron positivas molecularmente a *G. duodenalis*, respectivamente. Al parecer, la giardiasis es una infección frecuente en alpacas. Esto es respaldado, no sólo por trabajos ejecutados en territorio peruano, sino por investigaciones de otros países. Tal es el caso del estudio en la Universidad Estatal de Ohio, donde se demostró que el 32.8% de las crías menores de cuatro meses resultaron positivas a la infección (Whitehead y Anderson, 2006). Por su parte, el trabajo de Cebra *et al.* (2003), en Oregon, identificó a *Giardia* como el enteropatógeno involucrado en el 18.0% de los casos de diarrea en alpacas menores de siete meses. Además, se estableció molecularmente que el 7.4% de granjas en Australia reportaron casos de giardiasis (Koehler *et al.*, 2018).

El trabajo se llevó a cabo en los departamentos de Cusco y Puno, donde la altitud oscila entre los 3800 a 5000 metros sobre el nivel del mar. Cusco presenta una topografía montañosa, mientras que Puno se caracteriza por ser una meseta montañosa (Gómez-Puerta *et al.*, 2020). En la presente investigación, la prueba de chi cuadrado demostró la asociación entre el desarrollo de diarreas y la localidad de procedencia ($p < 0.001$). Las localidades de Machu Kuma, Paqchapata y Sillacunca registraron el mayor número de casos de diarreas en relación a las localidades de Quenamari, Quero Tauca y Tumuyo (Cuadro 3). Una explicación plausible para la asociación entre diarreas y localidad de procedencia podría encontrarse en el manejo y hábitos de crianza observados en las explotaciones alpaqueras (Gómez-Puerta *et al.*, 2020). Además, es necesario considerar que la época lluviosa coincidente con la temporada de parición ocasionan la acumulación de agua en el terreno llano y el incremento del número de crías dentro de los corrales, respectivamente (Quiso, 2014; Gómez-Puerta *et al.*, 2020). En las localidades de Machu Kuma, Paqchapata y Sillacunca se observó que los corrales, ubicados en terreno llano, presentaban una elevada concentración de animales y el estancamiento de agua y barro. Ambos factores contribuyen en una mayor contaminación ambiental y en la transmisión de microorganismos causantes de diarreas (Kistemann *et al.*, 2002; Cebra *et al.*, 2003). En contraste, las localidades de Quero Tauca, Quenamari y Sillacunca presentaron una adecuada gestión en la explotación alpaquera y un mejor aprovechamiento de las características geográficas del lugar. En dichas localidades se observó que los ganaderos utilizan las pendientes de las montañas para instalar los corrales de los animales. Por lo tanto, no se produce el estancamiento de agua y barro durante la temporada lluviosa y, consecuentemente, se reduce la transmisión de patógenos. Además, la densidad de individuos dentro de los corrales era la adecuada.

Paralelamente, en las localidades bajo estudio se observó una posible asociación de la crianza mixta de ganado con la presentación de diarreas en crías de alpaca. Las características de la ganadería andina, especialmente en las explotaciones alpaqueras, muestran que el rebaño campesino es de composición mixta: alpacas, llamas, ovinos; y en algunas zonas se complementan con vacunos (Instituto Nacional de Innovación Agraria, 1996; Quiso, 2014). Como se sabe, diversos estudios han demostrado la ocurrencia de *G. duodenalis* en ovinos y bovinos (Aloisio *et al.*, 2006; Feng y Xiao, 2011; Bartley *et al.*, 2019). Incluso, algunos trabajos han señalado elevadas prevalencias en dichas especies. Por ejemplo, el trabajo realizado por Ryan *et al.* (2005) en Australia

Occidental reveló que *Giardia* se detectó en el 44.0% de ovinos muestreados. Igualmente, Feng *et al.* (2019) detectaron la ocurrencia de *Giardia* en el 74.2% de terneros lecheros predestetados de Guangdong, China. Estos resultados indicarían la potencial transmisión cruzada de ensamblajes entre las diferentes especies de ganado, y por ende, la transmisión hacia las crías de alpaca. Asimismo, los estudios de Gómez-Couso *et al.* (2012) y Gómez-Puerta *et al.* (2014) sobre *G. duodenalis* en crías de alpaca del altiplano peruano, señalan la presencia del ensamblaje A en un 27.1% y 26.2%, respectivamente. Como es conocido, los estudios moleculares han revelado que el ensamblaje A es prevalente en humanos (Lee *et al.*, 2016), lo que indicaría la posible transmisión entre humanos y crías de alpaca. Dicho enunciado es reforzado por estudios sobre *Giardia* llevados a cabo en niños de Cusco, donde se indicaron prevalencias del 27.5% y 27.8% (Cabada *et al.*, 2014; 2015). Además, los ensamblajes E y A se han reportado en perros (Heyworth, 2016; Ryan y Zahedi, 2019). Por lo tanto, es posible que estos animales, encargados de resguardar al ganado, intervengan en la transmisión de *G. duodenalis* hacia las alpacas.

Como se indicó anteriormente, los resultados demostraron la asociación entre la presencia de *G. duodenalis* y las diarreas en crías de alpacas. Sin embargo, también se identificaron infecciones en el 25.5% (34/133) de individuos aparentemente sanos. Este hallazgo se posiciona entre los resultados de estudios anteriores. Tanto el trabajo de Gómez-Couso *et al.* (2012) como el de Gómez-Puerta (2013) determinaron que el 45.7% (84/184) y el 33.3% (32/96) de crías aparentemente sanas resultaron positivas a *Giardia*, respectivamente. Desde un punto de vista epidemiológico, es posible que la relevancia de los individuos aparentemente sanos radique en su comportamiento asintomático, lo cual contribuye en la difusión de la enfermedad hacia las crías recién nacidas. Se ha observado que la excreción de quistes puede prolongarse más allá del término del periodo de diarreas y realizarse de forma intermitente (Cordero del Campillo *et al.*, 2001; Gómez-Couso *et al.*, 2012). Por otro lado, y en relación al control del parásito, la ausencia de manifestaciones clínicas en individuos infectados es inadvertida por los Médicos Veterinarios y operarios, por lo tanto, no es posible realizar un correcto y completo manejo de la giardiasis.

La detección de *G. duodenalis* se realizó a través de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada), para lo cual se utilizó como marcador molecular una región del gen beta-giardina (β -giardina). El gen β -giardina ha proporcionado buenos

resultados y ya se ha aplicado en estudios relacionados a ganado (Cacciò y Sprong, 2010; Lichtmannsperger *et al.*, 2019). En diversos trabajos se ha reportado que la PCR muestra una mayor sensibilidad que la microscopía o inmunodiagnóstico, y que debe ser utilizado como técnica diagnóstica de primera línea (Soares y Tasca, 2016). Por su parte, Gotfred-Rasmussen *et al.* (2015) no encontraron una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos por PCR e inmunofluorescencia (IFA). La IFA ha demostrado ser una importante herramienta altamente sensible y específica para la detección de *Giardia* en animales de compañía y terneros (Geurden *et al.*, 2004; Rimhanen-Finne *et al.*, 2007), incluso es considerada como la mejor opción para el diagnóstico clínico de la giardiasis (Geurden *et al.*, 2010a). Sin embargo, la PCR representa la mejor opción para la identificación de especies y ensamblajes de *Giardia* en estudios taxonómicos y epidemiológicos (Gómez-Puerta, 2013)

Los resultados del trabajo de investigación demostraron la presencia de *G. duodenalis* en crías de alpaca al igual que su asociación con el desarrollo de diarreas. Además, las características geográficas, las medidas de gestión y la crianza mixta de ganado observados en las explotaciones alpaqueras podrían favorecer la transmisión cruzada de ensamblajes de *G. duodenalis* hacia las crías. Sin embargo, aún no se ha determinado las vías de transmisión hacia las crías, los reservorios del parásito en las regiones altoandinas y el grado de participación de las llamas en la giardiasis. Precisamente, la importancia de esta especie de camélido sudamericano radica en que comparte zonas de pastoreo con las alpacas, y además, la falta de estudios en su hábitat natural no permite una correcta y completa comprensión de la dinámica de transmisión de la enfermedad. Frente a este contexto, será necesario realizar futuros estudios epidemiológicos moleculares que permitan identificar los ensamblajes en las crías de alpaca y comprender la situación actual de la giardiasis en la regiones de Cusco y Puno. Finalmente, y en base a los resultados, se debería considerar a *G. duodenalis* como un agente causal del complejo entérico neonatal de alpacas andinas y, por lo tanto, realizar un programa sanitario para la prevención y control de este enteropatógeno.

VI. CONCLUSIONES

El análisis estadístico demostró que la chance de desarrollar diarreas en las crías de alpaca positivas a *Giardia duodenalis* es 3.85 veces las chance de desarrollar diarreas en las crías negativas a *G. duodenalis*., ajustado por sexo, raza y localidad de procedencia (IC 95%: 1.97 – 7.55; $p < 0.001$).

La prueba de chi cuadrado demostró la asociación entre el desarrollo de diarreas y la localidad de procedencia ($p < 0.001$).

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abeywardena H, Jex AR, Gasser RB. 2015.** A perspective on Cryptosporidium and Giardia, with an emphasis on bovines and recent epidemiological findings. *Adv Parasitol.* 88: 243–301. doi: 10.1016/bs.apar.2015.02.001.
2. **Adam RD. 2001.** Biology of Giardia lamblia. *Clin Microbiol Rev.* 14(3): 447–475. doi: 10.1128/CMR.14.3.447-475.2001.
3. **Adam RD, Dahlstrom EW, Martens CA, Bruno DP, Barbian KD, Ricklefs SM, Hernandez MM, Narla NP, Patel RB, Porcella SF, Nash TE. 2013.** Genome sequencing of Giardia lamblia genotypes A2 and B isolates (DH and GS) and comparative analysis with the genomes of genotypes A1 and E (WB and Pig). *Genome Biol Evol.* 5(12): 2498–2511. doi: 10.1093/gbe/evt197.
4. **Aley SB, Zimmerman M, Hetsko M, Selsted ME, Gillin FD. 1994.** Killing of Giardia lamblia by cryptdins and cationic neutrophil peptides. *Infect Immun.* 62(12): 5397–5403. doi: 10.1128/iai.62.12.5397-5403.1994.
5. **Aloisio F, Filippini G, Antenucci P, Lepri E, Pezzotti G, Cacciò SM, Pozio E. 2006.** Severe weight loss in lambs infected with Giardia duodenalis assemblage B. *Vet Parasitol.* 142(1–2): 154–158. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.06.023.
6. **Amat CB, Motta J-P, Fekete E, Moreau F, Chadee K, Buret AG. 2017.** Cysteine Protease-Dependent Mucous Disruptions and Differential Mucin Gene Expression in Giardia duodenalis Infection. *Am J Pathol.* 187(11): 2486–2498. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.07.009.

7. **Ameghino E, DeMartini J. 1991.** Mortalidad de crías de alpacas. Bol Div IVITA, Lima. p 71-80.
8. **Ament ME. 1972.** Diagnosis and treatment of giardiasis. J Pediatr. 80(4): 633–637. doi: 10.1016/s0022-3476(72)80061-1.
9. **Bartley PM, Roehe BK, Thomson S, Shaw HJ, Peto F, Innes EA, Katzer F. 2019.** Detection of potentially human infectious assemblages of *Giardia duodenalis* in fecal samples from beef and dairy cattle in Scotland. Parasitology. 146(9): 1123–1130. doi: 10.1017/S0031182018001117.
10. **Beatty JK, Akierman S V, Motta J-P, Muise S, Workentine ML, Harrison JJ, Bhargava A, Beck PL, Rioux KP, McKnight GW, Wallace JL, Buret AG. 2017.** *Giardia duodenalis* induces pathogenic dysbiosis of human intestinal microbiota biofilms. Int J Parasitol. 47(6): 311–326. doi: 10.1016/j.ijpara.2016.11.010.
11. **Bénére E, Van Assche T, Van Ginneken C, Peulen O, Cos P, Maes L. 2012.** Intestinal growth and pathology of *Giardia duodenalis* assemblage subtype A(I), A(II), B and E in the gerbil model. Parasitology. 139(4): 424–433. doi: 10.1017/S0031182011002137.
12. **Bernander R, Palm JE, Svärd SG. 2001.** Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. Cell Microbiol. 3(1): 55–62. doi: 10.1046/j.1462-5822.2001.00094.x.
13. **Bhandari N, Bahl R, Dua T, Kumar R, Srivastava R. 1999.** Role of protozoa as risk factors for persistent diarrhea. Indian J Pediatr. 66(1): 21–26. doi: 10.1007/BF02752345.
14. **Bleier JI, Pillarisetty VG, Shah AB, DeMatteo RP. 2004.** Increased and long-term generation of dendritic cells with reduced function from IL-6-deficient bone marrow. J Immunol. 172(12): 7408–7416. doi: 10.4049/jimmunol.172.12.7408.
15. **Boone JH, Wilkins TD, Nash TE, Brandon JE, Macias EA, Jerris RC, Lyerly DM. 1999.** TechLab and alexon *Giardia* enzyme-linked immunosorbent assay kits detect cyst wall protein 1. J Clin Microbiol. 37(3): 611–614. doi: 10.1128/JCM.37.3.611-614.1999.
16. **Broglia A, Weitzel T, Harms G, Cacció SM, Nöckler K. 2013.** Molecular typing of *Giardia duodenalis* isolates from German travellers. Parasitol Res. 112(10): 3449–3456. doi: 10.1007/s00436-013-3524-y.

17. **Buret A, Hardin JA, Olson ME, Gall DG. 1992.** Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterology*. 103(2): 506–513. doi: 10.1016/0016-5085(92)90840-u.
18. **Bustinza V. 2001.** La alpaca: conocimiento del gran potencial andino. Puno, Perú: Univ Nac del Altiplano. 496 p.
19. **Cabada MM, Goodrich MR, Graham B, Villanueva-Meyer PG, Lopez M, Arque E, White ACJ. 2014.** Fascioliasis and eosinophilia in the highlands of Cuzco, Peru and their association with water and socioeconomic factors. *Am J Trop Med Hyg*. 91(5): 989–993. doi: 10.4269/ajtmh.14-0169.
20. **Cabada MM, Goodrich MR, Graham B, Villanueva-Meyer PG, Deichsel EL, Lopez M, Arque E, Clinton White Jr A. 2015.** Prevalence of intestinal helminths, anemia, and malnutrition in Paucartambo, Peru. *Rev Panam Salud Pública* 37 (2): 69-75.
21. **Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. 2002.** Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol*. 32(8): 1023–1030. doi: 10.1016/s0020-7519(02)00068-1.
22. **Cacciò, 2004.** New methods for the diagnosis of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Parasitologia* 46 (1-2): 151-155.
23. **Cacciò SM, Ryan U. 2008.** Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol*. 160(2): 75–80. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.04.006.
24. **Cacciò SM, Sprong H. 2010.** *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol*. 124(1): 107–112. doi: 10.1016/j.exppara.2009.02.007.
25. **Cacciò SM, Lalle M, Svärd SG. 2018.** Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. *Infect Genet Evol*. 66: 335–345. doi: 10.1016/j.meegid.2017.12.001.
26. **Cardona GA, de Lucio A, Bailo B, Cano L, de Fuentes I, Carmena D. 2015.** Unexpected finding of feline-specific *Giardia duodenalis* assemblage F and *Cryptosporidium felis* in asymptomatic adult cattle in Northern Spain. *Vet Parasitol*. 209(3–4): 258–263. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.02.028.
27. **Cartwright CP. 1999.** Utility of multiple-stool-specimen ova and parasite examinations in a high-prevalence setting. *J Clin Microbiol*. 37(8): 2408–2411. doi:

- 10.1128/JCM.37.8.2408-2411.1999.
28. **Cavalier-Smith T. 2003.** Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *Eur J Protistol.* 39(4): 338–348. doi: 10.1078/0932-4739-00002.
 29. **Cebra CK, Mattson DE, Baker RJ, Sonn RJ, Dearing PL. 2003.** Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc.* 223(12): 1806–1808. doi: 10.2460/javma.2003.223.1806.
 30. **Certad G, Viscogliosi E, Chabé M, Cacciò SM. 2017.** Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol.* 33(7): 561–576. doi: 10.1016/j.pt.2017.02.006.
 31. **Cerutti A, Rescigno M. 2008.** The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity.* 28(6): 740–750. doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.001.
 32. **Coccia M, Harrison OJ, Schiering C, Asquith MJ, Becher B, Powrie F, Maloy KJ. 2012.** IL-1 β mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells. *J Exp Med.* 209(9): 1595–1609. doi: 10.1084/jem.20111453.
 33. **Cordero del Campillo M, Rojo FA, Martínez AR, Sánchez C, Hernández S, Navarrete S, Díez P, Quiroz H, Carvalho M. 2001.** *Parasitología Veterinaria*. 1ª ed. Aravaca, Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, SAU. 221-223 p.
 34. **Dann SM, Manthey CF, Le C, Miyamoto Y, Gima L, Abraham A, Cao AT, Hanson EM, Kolls JK, Raz E, Cong Y, Eckmann L. 2015.** IL-17A promotes protective IgA responses and expression of other potential effectors against the lumen-dwelling enteric parasite *Giardia*. *Exp Parasitol.* 156: 68–78. doi: 10.1016/j.exppara.2015.06.003.
 35. **Dryden MW, Payne PA, Smith V. 2006.** Accurate diagnosis of *Giardia* spp. and proper fecal examination procedures. *Vet Ther* 7 (1):4-14.
 36. **Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, Gillin FD. 2000.** Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol* 164 (3): 1478-1487. doi: 10.4049/jimmunol.164.3.1478.
 37. **Einarsson E, Ma'ayeh S, Svärd SG. 2016a.** An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology* 34: 47–52. doi: 10.1016/j.mib.2016.07.019.

38. **Einarsson E, Troell K, Hoepfner MP, Grabherr M, Ribacke U, Svärd SG. 2016b.** Coordinated changes in gene expression throughout encystation of *Giardia intestinalis*. PLoS Negl Trop Dis 10 (3): 1-22. doi: 10.1371/journal.pntd.0004571.
39. **Fantinatti M, Bello AR, Fernandes O, Da-Cruz AM. 2016.** Identification of *Giardia lamblia* assemblage E in humans points to a new anthroponotic cycle. J Infect Dis 214 (8): 1256-1271. doi: 10.1093/infdis/jiw361.
40. **[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2005.** Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú: Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina. Roma: FAO. Servicio de gestiones de publicaciones. 11-12 p.
41. **Farthing MJ. 1996.** Giardiasis. Gastroenterol Clin North Am 25 (3): 493-515. doi: 10.1016/s0889-8553(05)70260-0.
42. **Fava NMN, Soares RM, Scalia LA, Kalapothakis E, Pena IF, Vieira CU, Faria ES, Cunha MJ, Couto TR, Cury MC. 2013.** Performance of glutamate dehydrogenase and triose phosphate isomerase genes in the analysis of genotypic variability of isolates of *Giardia duodenalis* from livestock. Biomed Res Int 2013 (875048): 1-9. doi: 10.1155/2013/875048.
43. **Feely DE, Schollmeyer JV, Erlandsen SL. 1982.** *Giardia* spp.: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. Exp Parasitol 53 (1): 145-154. doi: 10.1016/0014-4894(82)90100-x.
44. **Feng Y, Xiao L. 2011.** Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clin Microbiol Rev 24 (1): 110-140. doi: 10.1128/CMR.00033-10.
45. **Feng Y, Gong X, Zhu K, Li N, Yu Z, Guo Y, Weng Y, Kváč M, Feng Y, Xiao L. 2019.** Prevalence and genotypic identification of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in pre-weaned dairy calves in Guangdong, China. Parasites & Vectors 12 (1): 1-9. doi: 10.1186/s13071-019-3310-5.
46. **Franzén O, Jerlström-Hultqvist J, Castro E, Sherwood E, Ankarklev J, Reiner DS, Palm D, Andersson JO, Andersson B, Svärd SG. 2009.** Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species?. PLoS Pathog 5 (8): 1-14. doi: 10.1371/journal.ppat.1000560.

47. **Gardner TB, Hill DR. 2001.** Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 14 (1): 114-128. doi: 10.1128/CMR.14.1.114-128.2001.
48. **Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM. 2007.** Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop* 102 (2): 92-99. doi: 10.1016/j.actatropica.2007.04.003.
49. **Geurden T, Claerebout E, Vercruysse J, Berkvens D. 2004.** Estimation of diagnostic test characteristics and prevalence of *Giardia duodenalis* in dairy calves in Belgium using a bayesian approach. *Int J Parasitol* 34 (10): 1121-1127. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.05.007.
50. **Geurden T, Vercruysse J, Claerebout E. 2006.** Field testing of a fenbendazole treatment combined with hygienic and management measures against a natural *Giardia* infection in calves. *Vet Parasitol* 142 (3-4): 367-371. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.07.019.
51. **Geurden T, Berkvens D, Casaert S, Vercruysse J, Claerebout E. 2008.** A bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Parasitol* 157 (1-2): 14-20. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.07.002.
52. **Geurden T, Leveccke B, Pohle H, De Wilde N, Vercruysse J, Claerebout E. 2010a.** A beyesian evaluation of two dip-stick assays for the on-site diagnosis of infection in calves suspected of clinical giardiasis. *Vet Parasitol* 172 (3-4): 337-340. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.05.01.
53. **Geurden T, Vercruysse J, Claerebout E. 2010b.** Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Experimental Parasitology* 124 (1): 98–106. doi: 10.1016/j.exppara.2009.03.001.
54. **Geurden T, Vandenhoute E, Pohle H, Casaert S, De Wilde N, Vercruysse J, Claerebout E. 2010c.** The effect of a fenbendazole treatment on cyst excretion and weight gain in calves experimentally infected with *Giardia duodenalis*. *Vet Parasitol* 169 (1-2):18-23. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.12.027.
55. **Geurden T, Olson ME, O'Handley RM, Schetters T, Bowman D, Vercruysse J. 2014.** World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP): guideline for the evaluation of drug efficacy against non-coccidial gastrointestinal protozoa in livestock and companion animals. *Vet Parasitol* 204 (3-4): 81-86.

56. **Gómez-Couso H, Ortega-Mora LM, Aguado-Martínez A, Rosadio-Alcántara R, Maturrano-Hernández L, Luna-Espinoza L, Zanabria-Huisa V, Pedraza-Díaz S. 2012.** Presence and molecular characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. *Veterinary Parasitology* 187 (3-4): 414– 420. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.01.025.
57. **Gómez-Puerta LA. 2013.** Caracterización molecular de genotipos de *Enterocytozoon bieneusi* y ensamblajes de *Giardia duodenalis* aislados de heces de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de Magíster en Salud Animal. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 47 p.
58. **Gómez-Puerta LA, Lopez-Urbina MT, Alarcon V, Cama V, Gonzalez AE, Xiao L. 2014.** Occurrence of *Giardia duodenalis* assemblages in alpacas in the Andean región. *Parasitology International* 63 (1): 31–34. doi: 10.1016/j.parint.2013.10.003.
59. **Gómez-Puerta LA, Gonzalez AE, Vargas-Calla A, López-Urbina MT, Cama V, Xiao L. 2020.** *Cryptosporidium parvum* as a risk factor of diarrhea occurrence in neonatal alpacas in Peru. *Parasitol Res* 119 (1): 243-248. doi: 10.1007/s00436-019-06468-7.
60. **Heyworth MF. 2014.** Diagnostic testing for *Giardia* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 108 (3): 123-125. doi: 10.1093/trstmh/tru005.
61. **Heyworth MF. 2016.** *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite* 23 (13): 1-5. doi: 10.1051/parasite/2016013.
62. **Hillman A, Ash A, Elliot A, Lymbery A, Perez C, Thompson RCA. 2016.** Confirmation of a unique species of *Giardia*, parasitic in the quenda (*Isoodon obesulus*). *Int J Parasitol Parasites Wildl* 5 (1): 110–115. doi: 10.1016/j.ijppaw.2016.01.002.
63. **Huetink REC, van der Giessen JWB, Noordhuizen JPTM, Ploeger HW. 2001.** Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Vet Parasitol* 102 (1-2): 53-67. doi: 10.1016/s0304-4017(01)00514-3.
64. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2012.** Resultados definitivos: IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Lima: INEI. CENAGRO. 47 p.
65. **[INIA] Instituto Nacional de Innovación Agraria. 1996.** Manual del alpaquero. Lima: INIA. Proyecto ALPACAS. 43, 88 p.
66. **Jacobson C, Williams A, Yang R, Ryan U, Carmichael I, Campbell AJ, Gardner GE. 2016.** Greater intensity and frequency of *Cryptosporidium* and *Giardia* oocyst

- shedding beyond the neonatal period is associated with reductions in growth, carcass weight and dressing efficiency in sheep. *Vet Parasitol* 228: 42-51. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.08.003.
67. **Janeczko S, Griffin B. 2010.** *Giardia* Infection in Cats. *Compend Contin Educ Vet* 32 (8): E4.
68. **Jung Y, Wen T, Mingler MK, Caldwell JM, Wang YH, Chaplin DD, Lee EH, Jang MH, Woo SY, Seoh JY, Miyasaka M, Rothenberg ME. 2015.** IL-1 β in eosinophil-mediated small intestinal homeostasis and IgA production. *Mucosal Immunol* 8 (4): 930-942. doi: 10.1038/mi.2014.123.
69. **Kahn C, Line S. 2010.** The Merck Veterinary Manual. Merck and Company Inc. New Jersey, USA. Giardiasis [Internet], [21 junio 2020]. Disponible en: <https://www.merckvetmanual.com/>
70. **Khan SM, Debnath C, Pramanik AK, Xiao L, Nozaki T, Ganguly S. 2011.** Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in west Bengal, India. *Vet Parasitol* 178 (3-4): 342-345. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.01.029.
71. **Kistemann T, Classen T, Koch C, Dangendorf F, Fischeder R, Gebel J, Vacata V, Exner M. 2002.** Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. *Appl Environ Microbiol* 68 (5): 2188-97. doi: 10.1128/aem.68.5.2188-2197.2002.
72. **Koehler AV, Jex AR, Haydon SR, Stevens MA, Gasser RB. 2014.** *Giardia*/giardiasis-A perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnol Adv* 32 (2): 280-289. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.10.009.
73. **Koehler AV, Rashid MH, Zhang Y, Vaughan JL, Gasser RB, Jabbar A. 2018.** First cross-sectional, molecular epidemiological survey of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon* in alpaca (*Vicugna pacos*) in Australia. *Parasit Vectors* 11 (1): 498-505. doi: 10.1186/s13071-018-3055-6.
74. **Koh WH, Geurden T, Paget T, O'Handley R, Steuart RF, Thompson RCA, Buret AG. 2013.** *Giardia duodenalis* assemblage-specific induction of apoptosis and tight junction disruption in human intestinal epithelial cells: effects of mixed infections. *J Parasitol* 99 (2): 353-358. doi: 10.1645/GE-3021.1.
75. **Lane S, Lloyd D. 2002.** Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol*. 28(2): 123–147. doi: 10.1080/1040-840291046713.

76. **Langford TD, Housley MP, Boes M, Chen J, Kagnoff MF, Gillin FD, Lars Eckmann L. 2002.** Central importance of immunoglobulin a in host defense against *Giardia* spp. *Infection and immunity* 70 (1): 11-18. doi: 10.1128/iai.70.1.11-18.2002.
77. **Lebbad M, Mattsson JG, Christensson B, Ljungström B, Backhans A, Andersson JO, Svärd SG. 2010.** From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Veterinary Parasitology* 168 (3-4): 231-239. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.11.003.
78. **Lee MF, Auer H, Lindo JF, Walochnik J. 2016.** Multilocus sequence analysis of *Giardia* spp. isolated from patients with diarrhea in Austria. *Parasitol Res* 116 (2): 477-481. doi: 10.1007/s00436-016-5306-9.
79. **Levecke B, Meulemans L, Dalemans T, Casaert S, Claerebout E, Geurden T. 2011.** Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A, B, C and E infections in pet chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in Flanders (Belgium). *Vet Parasitol* 177 (1-2): 166-170. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.11.027.
80. **Lichtmannsperger K, Hinney B, Joachim A, Wittek T. 2019.** Molecular characterization of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* from calves with diarrhoea in Austria and evaluation of point-of-care tests. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 66: 101333. doi: 10.1016/j.cimid.2019.101333.
81. **Liu J, Ma'ayeh S, Peirasmaki D, Lundström-Stadelmann B, Hellman L, Svärd SG. 2018.** Secreted *Giardia intestinalis* cysteine proteases disrupt intestinal epithelial cell junctional complexes and degrade chemokines. *Virulence* 9 (1): 879-894. doi: 10.1080/21505594.2018.1451284.
82. **Lu SQ, Baruch AC, Adam RD. 1998.** Molecular comparison of *Giardia lamblia* isolates. *Int J Parasitol* 28 (9): 1341-1345. doi: 10.1016/s0020-7519(98)00098-8.
83. **Luján HD, Mowatt MR, Byrd LG, Nash TE. 1996.** Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (15): 7628-7633. doi: 10.1073/pnas.93.15.7628.
84. **Lyu Z, Shao J, Xue M, Ye Q, Chen B, Qin Y, Wen J. 2018.** A new species of *Giardia* Künstler, 1882 (Sarcocystidophora: Hexamitidae) in hamsters. *Parasit Vectors* 11 (1): 1-8. doi: 10.1186/s13071-018-2786-8.
85. **Ma'ayeh SY, Brook-Carter PT. 2012.** Representational difference analysis identifies specific genes in the interaction of *Giardia duodenalis* with the murine intestinal

- epithelial cell line, IEC-6. *Int J Parasitol* 42 (5): 501-509. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.04.004.
86. **Mahato MK, Singh DK, Rana HB, Acharya KP. 2018.** Prevalence and risk factors associated with *Giardia duodenalis* infection in dairy cattle of Chitwan, Nepal. *J Parasit Dis* 42 (1): 122-126. doi: 10.1007/s12639-017-0975-6.
87. **Meng CY, Smith BL, Bodhidatta L, Richard SA, Vansith K, Thy B, Srijan A, Serichantalergs O, Mason CJ. 2011.** Etiology of diarrhea in young children and patterns of antibiotic resistance in Cambodia. *Pediatr Infect Dis J* 30 (4): 331-5. doi: 10.1097/INF.0b013e3181fb6f82.
88. **Meng TC, Aley SB, Svärd SG, Smith MW, Huang B, Kim J, Gillin FD. 1996.** Immunolocalization and sequence of caltractin/centrin from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 79 (1):103-108. doi: 10.1016/0166-6851(96)02636-9.
89. **[MINAGRI] Ministerio de Agricultura y Riego. 2018.** Situación de la alpaca en el Perú. Lima: INEI. Censos agropecuarios. 1-3 p.
90. **Minetti C, Taweanan W, Hogg R, Featherstone C, Randle N, Latham SM, Wastling JM. 2014.** Occurrence and diversity of *Giardia duodenalis* assemblages in livestock in the UK. *Transbound Emerg Dis* 61 (6): 60-67. doi: 10.1111/tbed.12075.
91. **Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. 2003.** Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol* 3 (1): 29-38. doi: 10.1016/s1567-1348(02)00149-1.
92. **Monis PT, Cacciò SM, Thompson RCA. 2009.** Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* 25 (2): 93-100. doi: 10.1016/j.pt.2008.11.006.
93. **Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamanek NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svärd SG, Sogin ML. 2007.** Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317 (5846):1921- 1926. doi: 10.1126/science.1143837.

- 94. Muhsen K, Levine MM. 2012.** A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clin Infect Dis* 4 (4): 271-93. doi: 10.1093/cid/cis762.
- 95. Nash TE, Herrington DA, Losonsky GA, Levine MM. 1987.** Experimental human infections with *Giardia Lamblia*. *J Infect Dis* 156 (6): 974-984. doi: 10.1093/infdis/156.6.974.
- 96. Nash TE, Banks SM, Alling DW, Merritt Jr JW, Conrad JT. 1990a.** Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol* 71 (4): 415-421. doi: 10.1016/0014-4894(90)90067-m.
- 97. Nash TE, Conrad JT, Merritt, Jr JW. 1990b.** Variant specific epitopes of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 42 (1): 125-132. doi: 10.1016/0166-6851(90)90120-b.
- 98. Ng J, Yang R, Whiffin V, Cox P, Ryan U. 2011.** Identification of zoonotic *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes infecting animals in Sydney's water catchments. *Exp Parasitol* 128 (2):138-144. doi: 10.1016/j.exppara.2011.02.013.
- 99. O'Handley RM, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Morck DW, Olson ME. 1999.** Duration naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 214 (3): 391-6.
- 100. O'Handley RM, Cockwill C, Jelinski M, McAllister TA, Olson ME. 2000.** Effects of repeat fenbendazole treatment in dairy calves with giardiasis on cyst excretion, clinical signs and production. *Vet Parasitol* 89 (3): 209-218. doi: 10.1016/s0304-4017(00)00200-4.
- 101. O'Handley RM, Olson ME. 2006.** Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 22 (3): 623-643. doi: 10.1016/j.cvfa.2006.07.002.
- 102. Olson ME, McAllister TA, Deselliers L, Morck DW, Cheng KJ, Buret AG, Ceri H. 1995.** Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. *Am J Vet Res* 56 (11): 1470-1474.
- 103. Panarelli NC, Gobara N, Hoda RS, Chaump M, Jessurun J, Yantiss RK. 2017.** Cytology preparations of formalin fixative aid detection of *Giardia* in duodenal biopsy samples. *Am J Surg Pathol* 41 (4): 570-574. doi: 10.1097/PAS.0000000000000817.

- 104. Payne PA, Artzer M. 2009.** The Biology and Control of *Giardia* spp and *Trichostrongylus axei*. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 39 (6): 993-1007. doi: 10.1016/j.cvsm.2009.06.007.
- 105. Peattie DA. 1990.** The giardiasis of *Giardia lamblia*: Genes and proteins with promise. *Parasitol Today* 6 (2): 52-56. doi: 10.1016/0169-4758(90)90070-k.
- 106. Pijnacker R, Mughini-Gras L, Heusinkveld M, Roelfsema J, van Pelt W, Kortbeek T. 2016.** Different risk factors for infection with *Giardia lamblia* assemblages A and B in children attending day-care centres. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35 (12): 2005-2013. doi: 10.1007/s10096-016-2753-2.
- 107. Quiso, V. 2014.** La sabiduría andina en la sanidad de alpacas y llamas en las comunidades de Cangalli – Ilave – El Collao – Puno. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Puno: Univ. Nac del Altiplano. 6, 97 p.
- 108. Rimhanen-Finne R, Enemark HL, Kolehmainen J, Toropainen P, Hänninen ML. 2007.** Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. *Vet Parasitol* 145 (3-4): 345-348. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.01.008.
- 109. Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Luna L. 2012.** El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. *Rev Inv Vet Perú* 23 (3):261-271.
- 110. Rothman K, Greenland S. 1998.** Modern epidemiology. Boston: Lippincott–Raven. 711 p.
- 111. Roxström-Lindquist K, Ringqvist E, Palm D, Svärd S. 2005.** *Giardia lamblia*-induced changes in gene expression in differentiated Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 73 (12): 8204-8208. doi: 10.1128/IAI.73.12.8204-8208.2005.
- 112. Ryan UM, Bath C, Robertson I, Read C, Elliot A, McInnes L, Traub R, Brown Besier B. 2005.** Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9): 4992–4997. doi: 10.1128/AEM.71.9.4992-4997.2005.
- 113. Ryan UM, Zahedi A. 2019.** Molecular epidemiology of giardiasis from a veterinary perspective. *Advances in Parasitology* 106: 209-254. doi: 10.1016/bs.apar.2019.07.002.

- 114. Savioli L, Smith H, Thompson A. 2006.** *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘Neglected Diseases Initiative’. *Trends in Parasitology* 22 (5): 203-208. doi: 10.1016/j.pt.2006.02.015.
- 115. Servicio Nacional de Meteriología e Hidrología del Perú. 2022.** Lima: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. [Internet], [23 junio 2022]. Disponible en: <https://www.senamhi.gob.pe/?p=descarga-datos-hidrometeorologicos>.
- 116. Scott KGE, Yu LC, Buret AG. 2004.** Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun* 72 (6): 3536-3542. doi: 10.1128/IAI.72.6.3536-3542.2004.
- 117. Singer SM, Nash TE. 2000.** T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun* 68 (1): 170-175. doi: 10.1128/iai.68.1.170-175.2000.
- 118. Soares R, Tasca T. 2016.** Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. *J Microbiol Methods* 129: 98-102. doi: 10.1016/j.mimet.2016.08.017.
- 119. Solaymani-Mohammadi S, Singer SM. 2011.** Host immunity and pathogen strain contribute to intestinal disaccharidase impairment following gut infection. *J Immunol* 187 (7): 3769-3775. doi: 10.4049/jimmunol.1100606.
- 120. Soliman RH, Fuentes I, Rubio JM. 2011.** Identification of a novel assemblage B subgenotype and a zoonotic assemblage C in human isolates of *Giardia intestinalis* in Egypt. *Parasitol Int* 60 (4): 507-11. doi: 10.1016/j.parint.2011.09.006.
- 121. Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JWB, ZOOPNET network and partners. 2009.** Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 3 (12): 1-12. doi: 10.1371/journal.pntd.0000558.
- 122. Squire SA, Ryan U. 2017.** *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. *Parasit Vectors* 10 (1): 1-32. doi: 10.1186/s13071-017-2111-y.
- 123. Strugnell RA, Wijburg OL. 2010.** The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Rev Microbiol* 8 (9): 656-667. doi: 10.1038/nrmicro2384.
- 124. Tangtrongsup S, Scorza V. 2010.** Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp. infections in dogs and cats. *Top Companion Anim Med* 25 (3): 155-162. doi: 10.1053/j.tcam.2010.07.003.

- 125. Teodorovic S, Braverman JM, Elmendorf HG. 2007.** Unusually low levels of genetic variation among *Giardia lamblia* isolates. *Eukaryot Cell* 6 (8): 1421-1430. doi: 10.1128/EC.00138-07.
- 126. Teoh DA, Kamieniecki D, Pang G, Buret AG. 2000.** *Giardia lamblia* rearranges f-actin and α -actinin in human colonic and duodenal monolayers and reduces transepithelial electrical resistance. *J Parasitol* 6 (4): 800-806. doi: 10.1645/0022-3395(2000)086[0800:GLRFAA]2.0.CO;2.
- 127. Thompson RCA. 2004.** The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol* 126 (1-2): 15-35. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.09.008.
- 128. Thompson RCA, Monis PT. 2004.** Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol* 58: 69-137. doi: 10.1016/S0065-308X(04)58002-8.
- 129. Thompson RCA, Palmer CS, O’Handley R. 2008.** The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The Veterinary Journal* 177 (1): 18–25. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.09.022.
- 130. Thornton SA, West AH, DuPont HL, Pickering LK. 1983.** Comparison of methods for identification of *Giardia lamblia*. *Am J Clin Pathol* 80 (6): 858-860. doi: 10.1093/ajcp/80.6.858.
- 131. Trout JM, Santín M, Fayer R. 2008.** Detection of assemblage A, *Giardia duodenalis* and *Eimeria* spp. in alpacas on two Maryland farms. *Vet Parasitol* 153 (3-4): 203-208. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.02.006.
- 132. Uehlinger FD, Naqvi SA, Greenwood SJ, McClure JT, Conboy G, O’Handley R, Barkema HW. 2017.** Comparison of five diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in fecal samples from young dogs. *Vet Parasitol* 244: 91-96. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.07.030.
- 133. Utaaker KS, Myhr N, Bajwa RS, Joshi H, Kumar A, Robertson LJ. 2017.** Goats in the city: prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in extensively reared goats in northern India. *Acta Vet Scand* 59 (1): 1-9. doi: 10.1186/s13028-017-0354-4.
- 134. Vidal AMB, Catapani WR. 2005.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing

- giardiasis. Sao Paulo Med J 123 (6): 282-285. doi: 10.1590/S1516-31802005000600006.
- 135. Vinayak VK, Khanna R, Kum K. 1991.** Kinetics of intraepithelium and lamina propria lymphocyte responses during *Giardia lamblia* infection in mice. Microb Pathog 10 (5): 343-350. doi: 10.1016/0882-4010(91)90079-p.
- 136. von Allmen N, Bienz M, Hemphill A, Müller N. 2005.** Quantitative assessment of sense and antisense transcripts from genes involved in antigenic variation (Vsp Genes) and encystation (Cwp 1 Gene) of *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7. Parasitology 130 (4): 389-396. doi: 10.1017/s0031182004006742.
- 137. Weitzel T, Dittrich S, Möhl I, E. Adusu E, Jelinek T. 2006.** Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. Clin Microbiol Infect 12 (7): 656-659. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01457.x.
- 138. Whitehead CE, Anderson DE. 2006.** Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. Small Rumin Res 61 (2): 207-215. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.07.012.
- 139. Xiao L. 1994.** *Giardia* infection in farm animals. Parasitology Today 10 (11): 436-438. doi: 10.1016/0169-4758(94)90178-3.
- 140. Xiao L, Herd RP, McClure KE. 1994.** Periparturient rise in the excretion of *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts as a source of infection for lambs. J Parasitol 80 (1): 55-59.
- 141. Xiao L, Fayer R. 2008.** Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. Int J Parasitol 38 (11): 1239-1255. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.03.006.
- 142. 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.
- 143. Zhao Z, Dong H, Wang R, Zhao W, Chen G, Li S, Qi M, Zhang S, Jian F, Zhao J, Zhang L, Wang H, Liu A. 2014.** Genotyping and subtyping *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* carried by flies on dairy farms in Henan, China. Parasit Vectors 7: 1-6. doi: 10.1186/1756-3305-7-190.

VIII. APÉNDICE

FastDNA® SPIN Kit for Soil

*Rapid Isolation of PCR-Ready Genomic DNA
from Soil Samples Using the FastPrep® System*

50 Preps

Storage:
Ambient temperature (15 – 30°C)

Catalog # 6560-200

Revision # 6560-200-07DEC

www.mpbio.com



TABLE OF CONTENTS

1. Introduction to the FastDNA® SPIN Kit for Soil and the FastPrep® Instruments..... 5

2. Kit Components and User Supplied Materials..... 5

 2.1 FastDNA® SPIN Kit for Soil Components 5

 2.2 User Supplied Materials..... 6

3. Important Considerations Before Use 6

 3.1 Preparation of SEWS-M Wash Solution 6

 3.2 Sample Lysis with the FastPrep® Instrument..... 6

4. Safety Precautions 6

5. Protocol 7

6. Example Data : DNA Isolation from various Soil Samples and Gel Electrophoresis 8

7. Recommended Reference Format for Publication 9

8. References 9

9. Related Products 10

10. Product Use Limitation & Warranty 11

www.mpbio.com



1. Introduction to the FastDNA® SPIN Kit for Soil and the FastPrep® Instruments

The FastDNA® SPIN Kit for Soil quickly and efficiently isolates PCR-ready genomic DNA directly from soil samples in less than 30 minutes. Designed for use with the FastPrep® Instruments from MP Biomedicals, plant and animal tissues, bacteria, algae, fungi spores and other members of a soil population are easily lysed within 40 seconds. These benchtop devices use a unique, optimized motion to homogenize samples by multidirectional, simultaneous impaction with lysing matrix particles. FastPrep® Instruments provide an extremely quick, efficient and highly reproducible homogenization that surpasses traditional extraction methods using enzymatic digestion, sonication, blending, douncing and vortexing. Samples are placed into 2.0 ml tubes containing Lysing Matrix E, a mixture of ceramic and silica particles designed to efficiently lyse all soil organisms including historically difficult sources such as eubacterial spores and endospores, gram positive bacteria, yeast, algae, nematodes and fungi. Homogenization in the FastPrep® Instrument with Lysing Matrix E takes place in the presence of MT Buffer and Sodium Phosphate Buffer, reagents carefully developed to protect and solubilize nucleic acids and proteins upon cell lysis. These reagents work together to allow extraction of genomic DNA with minimal RNA contamination.

Following lysis, samples are centrifuged to pellet soil, cell debris and lysing matrix. DNA is purified from the supernatant with a silica-based GENECLAN® procedure using SPIN filters. Eluted DNA is ready for PCR, restriction digest, electrophoresis and any other desired application.

2. Kit Components and User Supplied Materials

2.1 FastDNA® SPIN Kit for Soil Components

Lysing Matrix E	50x 2.0 ml tubes
Sodium Phosphate Buffer	60 ml
MT Buffer	8 ml
PPS Solution	25 ml
Binding Matrix	66 ml
SPIN Modules	50 each
Catch Tubes	50 each
Concentrated SEWS-M	12 ml
DES	20ml
BBS Gel Loading Dye	200 µl
User manual	1 each
MSDS	1 each
Certificate of Analysis	1 each

www.mpbio.com

5



FastDNA® Spin Kit for Soil

2.2 User Supplied Materials

FastPrep® Instrument (see Section 9)
Microcentrifuge that can freely spin 2.0 ml tubes
Microcentrifuge tubes (2.0 ml and 1.5 ml)
Clean 15 ml tubes for DNA binding
Rotator or low-speed vortex

3. Important Considerations Before Use

3.1 Preparation of SEWS-M Wash Solution

The FastDNA® SPIN Kit for Soil contains a bottle with 12 ml of Concentrated SEWS-M Wash Solution. Before using this solution, add 100 ml of 100% ethanol and mark on the bottle label the date ethanol was added. Ensure that the bottle is securely closed to prevent evaporation, mix and store at room temperature.

3.2 Sample Lysis with the FastPrep® Instrument

The fill volume in the lysing matrix tube after the addition of the Sodium Phosphate and MT Buffers to the sample should allow sufficient air space in the sample tube for efficient FastPrep® Instrument processing. MP Biomedicals recommends using 500 mg of starting material as long as there is between 250 – 500 µl of empty space in the tube. Sample loss or tube failure may result from overfilling the matrix tube. The matrix tube caps must be secure, but not over-tightened, to prevent sample leakage. If the sample is too large for processing in a single tube, divide the sample and process using multiple tubes.

MP Biomedicals' Lysing Matrix particles and tubes have been rigorously tested and validated in the FastPrep® Instrument. The use of other products with the FastPrep® Instrument is not recommended and may result in sample loss or instrument failure.

A single 40 second run at a speed setting of 6.0 in the FastPrep® Instrument is sufficient to lyse almost all samples. If the user experimentally determines that additional processing time is required, the sample should be incubated on ice in the Lysing Matrix E tube for at least 2 minutes between successive FastPrep® Instrument homogenizations to prevent overheating the sample and tube.

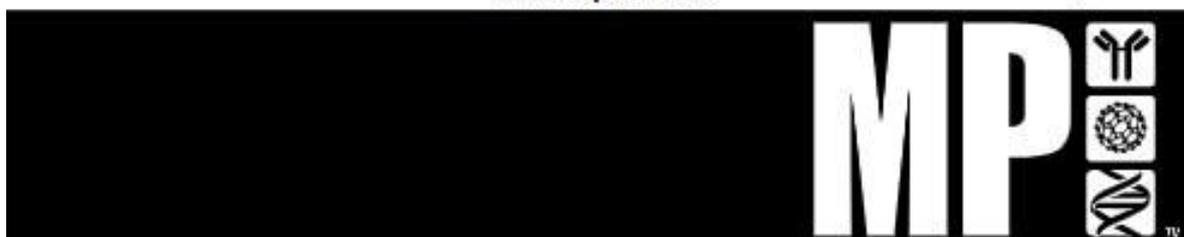
4. Safety Precautions

Binding Matrix contains components that, when in contact with human tissue, may cause irritation. Wear personal protective equipment to prevent contact with the skin or mucous membranes (gloves, lab coat, and eye protection). Consult the enclosed Material Safety Data Sheet for additional details.



5. Protocol

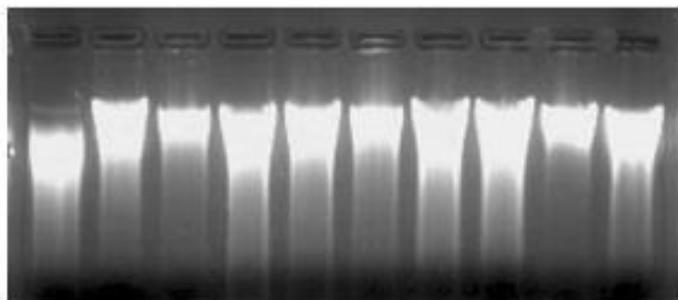
1. Add up to 500 mg of soil sample to a Lysing Matrix E tube.
NOTE: See section 3.2 for important guidelines.
2. Add 978 μ l Sodium Phosphate Buffer to sample in Lysing Matrix E tube.
3. Add 122 μ l MT Buffer.
4. Homogenize in the FastPrep® Instrument for 40 seconds at a speed setting of 6.0.
5. Centrifuge at 14,000 x g for 5-10 minutes to pellet debris.
NOTE: Extending centrifugation to 15 minutes can enhance elimination of excessive debris from large samples, or from cells with complex cell walls.
6. Transfer supernatant to a clean 2.0 ml microcentrifuge tube. Add 250 μ l PPS (Protein Precipitation Solution) and mix by shaking the tube by hand 10 times.
7. Centrifuge at 14,000 x g for 5 minutes to pellet precipitate. Transfer supernatant to a clean 15 ml tube. NOTE: While a 2.0 ml microcentrifuge tube may be used at this step, better mixing and DNA binding will occur in a larger tube.
8. Resuspend Binding Matrix suspension and add 1.0 ml to supernatant in 15 ml tube.
9. Place on rotator or invert by hand for 2 minutes to allow binding of DNA. Place tube in a rack for 3 minutes to allow settling of silica matrix.
10. Remove and discard 500 μ l of supernatant being careful to avoid settled Binding Matrix.
11. Resuspend Binding Matrix in the remaining amount of supernatant. Transfer approximately 600 μ l of the mixture to a SPIN™ Filter and centrifuge at 14,000 x g for 1 minute. Empty the catch tube and add the remaining mixture to the SPIN™ Filter and centrifuge as before. Empty the catch tube again.
12. Add 500 μ l prepared SEWS-M and gently resuspend the pellet using the force of the liquid from the pipet tip.
NOTE: Ensure that ethanol has been added to the Concentrated SEWS-M.
See section 3.1.



FastDNA® Spin Kit for Soil

13. Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute. Empty the catch tube and replace.
14. Without any addition of liquid, centrifuge a second time at 14,000 x g for 2 minutes to "dry" the matrix of residual wash solution. Discard the catch tube and replace with a new, clean catch tube.
15. Air dry the SPIN™ Filter for 5 minutes at room temperature.
16. Gently resuspend Binding Matrix (above the SPIN filter) in 50-100 µl of DES (DNase/Pyrogen-Free Water).
NOTE: To avoid over-dilution of the purified DNA, use the smallest amount of DES required to resuspend Binding Matrix pellet.
NOTE: Yields may be increased by incubation for 5 minutes at 55°C in a heat block or water bath.
17. Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute to bring eluted DNA into the clean catch tube. Discard the SPIN filter. DNA is now ready for PCR and other downstream applications. Store at -20°C for extended periods or 4°C until use.

6. Example Data: DNA Isolation from various Soil Samples and Gel Electrophoresis



*DNA from various soil samples extracted with the FastDNA® SPIN Kit for Soil.
20% of the DNA isolated from 500mg soil was loaded on a 1.2% agarose gel (0.5X TAE).*

Soil was taken from:

Lane 1: tomato pot; Lane 2: sludge;

Lane 3: sandy soil; Lane 4: under pine tree;

Lane 5: under palm tree; Lane 6: green garden;

Lane 7: Nile Lilly pot; Lane 8: lawn grass;

Lane 9: citrus tree; Lane 10: avocado tree. DNA ranges from 4-20 kb.

7. Recommended Reference Format for Publications

DNA was isolated from (specific sample) using the FastDNA® SPIN Kit for Soil and the FastPrep® Instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA).

8. References

Soil -

Jacob Bælum et al. (2006). *Appl. Envir. Microbiol.*, Vol 72: 1476 - 1486.

Sediment -

Tracy J. Mincer et al. (2005). *Appl. Envir. Microbiol.*, Vol 71: 7019 - 7028.

Snow samples -

Takahiro Segawa et al. (2005). *Appl. Envir. Microbiol.*, Vol 71: 123 - 130.

Feces -

Alice Layton et al. (2006). *Appl. Envir. Microbiol.*, Vol 72: 4214 - 4224

Sediments and Soil -

Francis C.A. et al. (2005). *PNAS*. Vol 102: 14683 - 14688

Soil -

Akira Ando et al. (2005). *Appl. Envir. Microbiol.*, Vol. 71: 7075-7082



9. Related Products

Description	Size	Catalog #
FastPrep® 24 Instrument	100-230V	6002-500
FastPrep® FP100A Instrument	100V	6001-100
FastPrep® FP120A Instrument	120V	6001-120
FastPrep® FP220A Instrument	220V	6001-220
FastDNA® Kit	100 preps	6540-400
FastDNA® SPIN Kit	100 preps	6540-600
FastRNA® Pro Soil-Direct Kit	50 preps	6070-050
FastRNA® Pro Soil-Indirect Kit	50 Preps	6075-050
FastRNA® Pro Red Kit (Yeast & Fungus)	50 preps	6035-050
FastRNA® Pro Green Kit (Plant & Animal)	50 preps	6045-050
FastRNA® Pro Blue Kit (Bacteria)	50 preps	6025-050
FastProtein™ Blue Matrix	50 preps	6550-400
FastProtein™ Red Matrix	50 preps	6550-600
Lysing Matrix E	50 x 2 ml tubes	6914-050
Lysing Matrix E	100 x 2 ml tubes	6914-100
Lysing Matrix E	500 x 2 ml tubes	6914-500



10. Product Use Limitation & Warranty

Unless otherwise indicated, this product is for research use only. Purchase of MP Biomedicals products does not grant rights to reproduce, modify, or repackage the products or any derivative thereof to third parties. MP Biomedicals makes no warranty of any kind, expressed or implied, including merchantability or fitness for any particular purpose, except that the products sold will meet our specifications at the time of delivery. Buyer's exclusive remedy and the sole liability of MP Biomedicals hereunder shall be limited to, at our discretion, no replacement or compensation, product credits, refund of the purchase price of, or the replacement of materials that do not meet our specification. By acceptance of the product, Buyer indemnifies and holds MP Biomedicals harmless against, and assumes all liability for, the consequence of its use or misuse by the Buyer, its employees or others, including, but not limited to, the cost of handling. Said refund or replacement is conditioned on Buyer notifying MP Biomedicals, Inc. within thirty (30) days of receipt of product. Failure of Buyer to give said notice within thirty (30) days shall constitute a waiver by the Buyer of all claims hereunder with respect to said material(s).

FastDNA®, FastRNA®, FastPrep® and BIO 101® Systems are registered trademarks of MP Biomedicals, LLC.



Anexo 2. Aprobación del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH)



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

CONSTANCIA 020-04-19

El Presidente del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética, bajo la categoría de revisión **EXPEDITA**. La aprobación será ratificada en la sesión del comité más próxima a la fecha de emisión de este documento.

Título del Proyecto : "Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. Y factores de riesgo asociados en alpacas neonatas del altiplano del Perú".

Código de inscripción : 103637

Investigadores : Vargas Calla, Ana Miluska

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. **Protocolo de investigación**, versión recibida en fecha 23 de enero del 2019.
2. **Consentimiento informado**, versión 1.0 de fecha 24 de enero del 2019

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **16 de marzo del 2020**. Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 17 de marzo del 2019.


Dr. Carlos Espinoza Montoya
Presidente
Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales



DIRECCIÓN UNIVERSITARIA DE INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y
TECNOLOGÍA (DUICT)

Av. Honorio Delgado 430, SMP 
(511) 319-0000 anexo 201352 
duict@oficinas-upch.pe 
www.cayetano.edu.pe 