



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

### CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

#### PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Titulo:

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO  
(ADN) DEL CYSTICERCUS TENUICOLLIS”**

Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de Médico Veterinario y Zootecnista

**Autor:**

Avila Rocha Christian Geovanny

**Tutor:**

Toro Molina Blanca Mercedes Dra. Mg.

**LATACUNGA – ECUADOR**

Marzo 2021

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

**CHRISTIAN GEOVANNY AVILA ROCHA** con cedula de ciudadanía 172179284-2 declaro ser autor del presente proyecto de investigación: “**Caracterización Molecular Del Ácido Desoxirribonucleico (Adn) Del Cysticercus Tenuicollis**”, siendo la Doctora Mg. Blanca Mercedes Toro Molina Tutora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 08 de marzo del 2021

Ávila Rocha Christian Geovanny  
C.C 172179284-2

Dra. Mg. Toro Molina Blanca M.  
C.C 050172099-9

## CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **CHRISTIAN GEOVANNYAVILA ROCHA** identificado con **cedula** de ciudadanía **172179284-2**, de estado civil soltero a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, el **Ph.D. NELSON RODRIGO CHIGUANO UMAJINGA**, en calidad de Rector encargado y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez Barrio El Ejido Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

### ANTECEDENTES:

**CLÁUSULA PRIMERA.** - **EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de **MEDICINA VETERINARIA** titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado **PROYECTO INVESTIGATIVO** la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad según las características que a continuación se detallan:

Historial académico. – Inicio de la Carrera: septiembre 2014 febrero 2015 – Finalización:

Octubre 2020 marzo 2021

Aprobación en el Consejo Directivo. – 26 de enero del 2021

Tutor. - **Doctora Mg. Blanca Mercedes Toro Molina**

Tema: “Caracterización Molecular del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) del *Cysticercus Tenuicollis*”

**CLÁUSULA SEGUNDA.** - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

**CLÁUSULA TERCERA.** - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

**CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin. b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

**CLÁUSULA QUINTA.** -El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

**CLÁUSULA SEXTA.** - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

**CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.** - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

**CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

**CLÁUSULA NOVENA.** - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

**CLÁUSULA DÉCIMA.** - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

**CLÁUSULA UNDÉCIMA.** - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 8 días del mes de marzo del 2021.

**Christian Geovanny Ávila Rocha**  
**EL CEDENTE**

**Ph.D. Nelson Chiguano Umajinga**  
**LACIONARIA**

## **AVAL DEL TUTOR DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN**

En calidad de Tutor del Trabajo de Investigación sobre el título:

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN) DEL CYSTICERCUS TENUICOLLIS”** de **Christian Geovanny Ávila Rocha**, de la carrera **MEDICINA VETERINARIA**, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 08 de marzo del 2021

Dra. Mg. Blanca Mercedes Toro Molina

Docente Tutor

C.I 050172099-9

## AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprueban el presente Informe de investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi, por la **Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Carrera de Medicina Veterinaria**; por cuanto el postulante: Ávila Rocha Christian Geovanny con el título de Proyecto de Investigación: “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN) DEL CYSTICERCUS TENUICOLLIS”, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de Sustentación de Proyecto.

Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, 08 de marzo del 2021

Lector 1

Dr. PhD. Edilberto Chacón Marcheco  
C.C: 175698569-1

Lector 2

Dr. PhD. Rafael Garzón Jarrin  
CC: 050109722-4

Lector 3

Dr. Mg. Xavier Quishpe Mendoza  
C.C: 050188013-2

## **AGRADECIMIENTO**

“El agradecimiento es la parte principal de un hombre de bien”

**Francisco de Quevedo**

Agradezco primero a Dios por darme el don de la perseverancia para alcanzar esta meta.

A la Universidad que me dio la oportunidad de formarme como profesional y con valores humanistas.

A todos mis docentes quienes al impartir su conocimiento me ayudaron a formarme y formar mi carácter.

A mi tutora Dra. Mercedes Toro que con su ayuda y conocimientos me guio para realizar y culminar con éxito la presente tesis.

A mis padres y hermanos ya que ellos me ayudaron a superar los obstáculos con su apoyo.

A mi hermana St. Katy Ávila, ya que su apoyo fue muy importante durante toda mi vida como estudiante, además que es mi mayor ejemplo a seguir.

Extiendo un agradecimiento especial a quienes me apoyaron dentro de mi proyecto de investigación por su motivación, apoyo y guía mil gracias.

A Veterinarios y operarios de la EMEAQ-EP, por todos los conocimientos que compartieron con mi persona.

**Christian Geovanny Ávila Rocha**



## **DEDICATORIA**

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y algunas libertades, pero al final de cuentas me motivaron constantemente para alcanzar mis metas.

A todos mis docentes y personas que estuvieron junto a mi apoyándome en todo momento sobre todo en los momentos más difíciles.

**Christian Geovanny Ávila Rocha**

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**TEMA:** “Caracterización Molecular Del Ácido Desoxirribonucleico (Adn) Del *Cysticercus Tenuicollis*”

**Autor:** Christian Geovanny Ávila Rocha

### RESUMEN

La presente investigación se ejecutó en la Provincia de Pichincha, en la Empresa Publica Metropolitana de Rastro Quito. EMRAQ-EP, el objetivo fue realizar la Tipificación genética de *L Cysticercus Tenuicollis*. Se recolectaron Quistes en la revisión post-mortem de 20 ovinos faenados, de ambos sexos, provenientes de varias ciudades de la sierra ecuatoriana. La población en estudio fue un total de 186 ovinos de los cuales dieron positivos a *Cysticercus Tenuicollis* 20 animales dándonos una frecuencia de periodo de 12.90% de la población puesta en estudio. Se recolectaron las vesículas que se encontraban en el epiplón e hígado de cada uno de los animales que se inspeccionaron, las cuales fueron preparadas en el Laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi, las mismas que fueron colocadas en un tobo de 1.5 ml con 1 ml de etanol al 70%. Para la tipificación molecular se envía la cabeza del Quiste al Laboratorio de Investigación de la UDLA, en un tubo de 1.5ml con 1ml de etanol al 70% para garantizar la integridad de la muestra biológica. Se determinó que de las 20 muestras reconocidas morfológicamente como *Cysticercus Tenuicollis* las 20 resultaron positivas al parásito en cuestión mediante la amplificación de bandas, lo cual representa el 100% de especificidad molecular demostrando así que el uso de PCR es más sensible y confiable.

**Palabras clave:** Tipificación genética, parásitos, *Toxocara canis*, PCR, electroforesis.

**TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI**  
**FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES**

**TOPIC: "Molecular Characterization Of Deoxirribonucleic Acid (Dna) From Cysticercus Tenuicollis"**

**Author:** Christian Geovanny Ávila Rocha

**ABSTRACT**

This research was carried out in the Province of Pichincha, in the Metropolitan Public Company of Rastro Quito. EMRAQ-EP, the objective was to perform the genetic typing of *Cysticercus Tenuicollis*. Cysts were collected in the post-mortem review of 20 slaughtered sheep, of both sexes, from several cities in the Ecuadorian highlands. The study population was a total of 186 sheep, of which 20 animals tested positive for *Cysticercus Tenuicollis*, giving us a frequency of 12.90% of the study population. The vesicles that were found in the epiplon and liver of each of the animals that were inspected were collected, which were prepared in the Laboratory of the Technical University of Cotopaxi, the same that were placed in a 1.5 ml tube with 1 ml 70% ethanol. For molecular typing, the cyst head is sent to the UDLA Research Laboratory, in a 1.5ml tube with 1ml of 70% ethanol to guarantee the integrity of the biological sample. It was determined that of the 20 samples recognized morphologically as *Cysticercus Tenuicollis*, the 20 were positive for the parasite in question by band amplification, which represents 100% molecular specificity, thus demonstrating that the use of PCR is more sensitive and reliable.

**Keywords:** Genetic typing, parasites, *Toxocara canis*, PCR, electrophoresis.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA .....	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR .....	iii
AGRADECIMIENTO .....	viii
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES.....	x
RESUMEN.....	x
ABSTRACT .....	xi
1. INFORMACIÓN GENERAL .....	1
2. JUSTIFICACION DEL PROYECTO.....	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO .....	3
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	3
5. OBJETIVOS .....	4
5.1. Objetivo General.....	4
5.2. Objetivos específicos.....	4
6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	4
6.1. Reseña histórica .....	4
6.2. <i>Cysticercus tenuicollis</i> .....	5
6.3. Diagnóstico Molecular de Parásitos referencias .....	12
7. HIPÓTESIS.....	19
8. METODOLOGÍA.....	19
8.1. Área De Investigación.....	19
8.2. Unidad Experimental.....	19
8.3. Materiales, Equipos E Instalaciones .....	19
Materiales de Laboratorio.....	20
Materiales de Oficina .....	20
9. DISEÑO DEL EXPERIMENTO .....	21
9.1. Aislamiento de la Muestra Biológica.....	21
9.2. Extracción de ADN.....	21
9.3. A Partir de Fenol-Cloroformo .....	21
9.4. Diseño y Selección de Primers.....	22
9.5. Amplificación de Fragmentos por PCR.....	23
9.6. Electroforesis .....	23
9.7. Secuenciación de ADN.....	24

10. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....	24
10.1. Recolección de los quistes de <i>Cysticercus Tenuicollis</i> .....	24
10.2. Disección del parásito para garantizar la integridad del ADN .....	24
10.3. Extracción de ADN .....	25
11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....	28
11.4. DISCUSIÓN .....	30
12. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS) .....	31
13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	31
13.1. CONCLUSIONES.....	31
13.2. RECOMENDACIONES.....	32
14. BIBLIOGRAFÍA .....	33
15. ANEXOS .....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características y aplicaciones de las diferentes clases de PCR .....	16
Tabla 2. DILUCIONES CISTICERCO .....	26
Tabla 3. Ensamblar los componentes para una PCR bajo las siguientes condiciones: .....	26
Tabla 4. Colocar las muestras en el termociclador .....	27
Tabla 5. Códigos y peso de la muestra parasitaria .....	28

## INDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1</b> .....	8
<b>Ilustración 2</b> .....	29

## **1. INFORMACIÓN GENERAL**

**1.1. Título del Proyecto:** “Caracterización Molecular Del Ácido Desoxirribonucleico (Adn) Del *Cysticercus Tenuicollis*”

**1.2. Fecha de inicio:** noviembre 2020

**1.3. Fecha de finalización:** marzo 2021

**1.4. Lugar de ejecución:** Provincia Cotopaxi

**1.5. Facultad que auspicia:** Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

**1.6. Carrera que auspicia:** Carrera de Medicina Veterinaria

**1.7. Proyecto de investigación vinculado:** Determinación de enfermedades infecciosas y parasitarias de los animales domésticos de la región 3 del Ecuador.

**1.8. Equipo de Trabajo:**

**Dra. Blanca Mercedes Toro Molina (Anexo 1)**

**Christian Geovanny Ávila Rocha (Anexo 2)**

**1.9. Área de Conocimiento:** Agricultura

**1.10. Línea de investigación:** Sanidad Animal

**1.11. Sub líneas de investigación de la Carrera:** Microbiología, parasitología, inmunología y sanidad animal

## 2. JUSTIFICACION DEL PROYECTO

Los cestodos ciclofilidianos incluyen los miembros más importantes del género *Taenia*. Las especies pertenecientes a este género son responsables de importantes pérdidas económicas y daños a la salud de los seres humanos y el ganado. *Taenia hydatigena*, que fue descubierta por Pallas (1766), es un carnívoro que infesta helminos universal y ampliamente distribuido como hospedador definitivo y con un metacestodo, *Cysticercus tenuicollis*, que puede infectar a herbívoros. (1) Los cánidos liberan segmentos grávidos en las heces, y los huevos, que se encuentran dispersos en el medio natural, son luego ingeridos incidentalmente por los hospedadores secundarios rumiantes. Las oncosferas descargadas se trasladan al hígado por medio del sistema circulatorio y causan lesiones hemorrágicas y fibróticas conocidas como hepatitis cisticercosa. (2) Esta condición puede resultar en la muerte de animales a edades tempranas debido a una hepatitis fibrosa grave o en la condenación del hígado después del sacrificio. (3)

Una caracterización precisa de los agentes causales de varias *Taenia* infecciones es fundamental para comprender la dinámica de transmisión y la epidemiología, y para el desarrollo de vacunas, el diagnóstico definitivo, el tratamiento y las medidas útiles de control y prevención de la especie taeniid. Los análisis genéticos comparativos brindan una diferenciación confiable de variantes genéticas y mejoran nuestra comprensión del carácter y la importancia (incluso para la salud animal y pública) de la diferencia intraespecífica. El análisis de la secuencia del ácido desoxirribonucleico de genes conservadores podría ser una herramienta sensible y confiable para estimar conexiones genéticas entre especies de helminos totalmente diferentes. Los genes mitocondriales se encuentran entre los marcadores más populares para los enfoques de base molecular para la ecología, la genética de poblaciones y la biología evolutiva y han sido objetivos populares para los métodos de identificación de especies de base molecular. (4,5,6)

El estudio molecular de aislamientos de *T. hydatigena* se ha realizado en varios lugares del mundo.

(7,8,9,10), a pesar de que aún *quedan* por realizar investigaciones moleculares exhaustivas sobre *T. hydatigena*. El objetivo del presente estudio fue caracterizar la cadena del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) del *Cysticercus Tenuicollis*, tomando como material muestras de ovejas sacrificadas en la EMEAQ-EP. Esta investigación proporcionó datos importantes sobre

la diseminación de cepas en el área de estudio y sugirió que esto podría ser comparable con el de las cepas en los países vecinos, lo que puede ayudar a crear un programa de comprensión y control de *T. hydatigena* Infección en el área investigada.

### **3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO**

#### **3.1. Directos**

- ✓ Los dueños de los caninos.

#### **3.2. Indirectos**

- ✓ Estudiantes de la carrera de Medicina Veterinaria en las asignaturas de microbiología, parasitología, inmunología y sanidad animal.
- ✓ El investigador principal del proyecto, requisito previo a la obtención del Título en Medicina Veterinaria y Zootecnia.

### **4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

El *Cysticercus tenuicollis* es un parásito cosmopolita, a su vez es capaz de infestar a un gran grupo de mamíferos como: el bovino, cerdos, cabras, caballos, etc. y entre ellos los seres humanos, quienes son propensos a contener el parásito en su organismo debido a que el Ecuador al ser un país en desarrollo existen muchas zonas rurales que no toman conciencia y otras que no conocen nada al respecto del parásito, no saben cómo se transmite hacia ellos y su ganado, dependiendo de la carga parasitaria que ingieran puede producir múltiples síntomas como: anorexia, fiebre, anemia e incluso la muerte debido a las lesiones que produce la larva en el intento de llegar a cumplir su ciclo biológico.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

Caracterizar la cadena del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) del *Cysticercus Tenuicollis*.

### 5.2. Objetivos específicos

- Realizar la disección de los quistes para proceder con el almacenamiento del material genético.
- Identificar el *Cysticercus Tenuicollis* mediante la amplificación de una región del genoma mediante el uso de primers específicos.
- Interpretar los resultados obtenidos de la región genómica puesta en estudio.

## 6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

### 6.1. Reseña histórica

En la investigación titulada “Detección molecular y caracterización del aislado de cabra de *Taenia hydatigena* en Turquía.” La cisticercosis por *Cysticercus tenuicollis* es una enfermedad prevalente en Turquía. (11) encontró una prevalencia del 56,7% en 252 corderos sometidos a necropsia. (12) estudió en 2484 ovejas, 311 cabras y 1941 bovinos para determinar la prevalencia del quiste hidatídico, *C. tenuicollis* y *C. bovis*. Según este estudio, *C. tenuicollis* fue la especie más prevalente y las tasas de prevalencia fueron del 26,7% en ovejas y del 27,9% en cabras. (13) examinaron 4931 ovejas, 366 bovinos, 113 búfalos y 112 cabras y encontraron una prevalencia de 31,8% en ovejas y 28,57% en cabras. No pudieron detectar *C. tenuicollis* en bovinos y búfalos. (14) estudiaron 220 bovinos, 1850 ovejas y 250 cabras, y encontraron tasas de prevalencia de 8,18%, 65,67% y 61,60%, respectivamente. (15) informaron hepatitis cisticercosa aguda y neumonitis cisticercosa en un cordero.

En la investigación denominada “Estudio molecular de *Cysticercus tenuicollis* de ovejas sacrificadas en la provincia de Sulaymaniyah, Irak” Hasta donde sabemos, este es el primer estudio sobre la diversidad genética y la estructura de la población de *C. tenuicollis* utilizando ARNr 12S. Mediante el análisis de secuencia de este gen de ARNr, se encontró que todos los quistes aislados eran *T. hydatigena*, lo que confirma el diagnóstico macroscópico. (16)

Algunas investigaciones anteriores basadas en elementos morfológicos y bioquímicos obtuvieron un conocimiento más exacto de la diversidad genética dentro de las especies de *Taenia*. (17,18,19) Los resultados del estudio actual indicaron diferencias de nucleótidos relativamente menores en el ARNr 12S entre *T. hydatigena* aislamientos de la región de estudio. La variación de nucleótidos por pares en el gen del ARNr 12S fue del 0,2% al 0,7% y no fue tan amplia como el 0,2% al 2,1% registrado entre los aislados iraníes (20). El polimorfismo en la diversidad de haplotipos observado para esta área puede estar relacionado con la alta prevalencia de helmintos, la epidemiología y la dispersión del huésped junto con los sistemas de cría. Las bajas diferencias intra e interespecíficas observadas en el presente estudio sugieren la ausencia de diferencias genéticas importantes entre *C. tenuicollis* aislado de ovejas en Sulaymaniyah, Irak.

## **6.2. *Cysticercus tenuicollis***

### **6.2.1. Importancia social**

Las enfermedades parasitarias por lo general provocan de una u otra forma que, al animal afectado, vaya disminuyendo paulatinamente su capacidad de producción, la cual es apreciable de acuerdo a la sintomatología que se presenta. Una enfermedad aguda puede producir alta y rápida mortalidad, en cambio en un cuadro crónico se observa una disminución de la producción por lo general acompañada de signos clínicos como anorexia, diarrea y enflaquecimiento. (21)

### **6.2.2. Generalidades**

El ganado ovino es un tipo de animal muy rustico a la vez que se adapta muy bien en la mayoría de terrenos, capaz de consumir cualquier planta y sacarle provecho nutricional por su excelente conversión alimenticia que posee pero, los costes de producción debido a las enfermedades en una explotación pueden llegar a ser lo suficientemente importantes como para hacerla inviable económicamente, entre las enfermedades de importancia para la producción se encuentran las enfermedades parasitarias, como: hidatidosis y cisticercosis ya que muchas veces pasan desapercibida por la baja mortalidad que suelen conllevar, pero cuya influencia en la producción está ampliamente demostrada y constatada. (22)

Con el nombre genérico de cisticercosis de los animales domésticos se conoce a infestaciones causadas por la presencia y acción de varias especies de estados larvarios de *Taenia* sp. En diferentes tejidos de bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, equinos, etc. La fuente de infestación

la constituyen principalmente el hombre, perros y gatos que actúan como huéspedes definitivos. (23)

### 6.2.3. Etiología

La cisticercosis de animales domésticos y salvajes está causada por las formas larvarias (metacestodos) de los cestodos (tenias), cuyas fases adultas se encuentran en el intestino de los perros y cánidos salvajes e incluso en gatos, La cisticercosis y la cenurosis de las ovejas y cabras (en músculos, cerebro, hígado y cavidad peritoneal) se deben a *T. ovis*, *T. multiceps* y *T. hydatigena*. La cisticercosis ocasiona pérdidas económicas por el rechazo de las carnes y despojos infectados. (24)

El agente etiológico que causa la cisticercosis hepatoperitoneal en los ovinos y pudiendo afectar otros mamíferos entre ellos el hombre, es el *Cysticercus tenuicollis* que es el metacestodo de la *Taenia Hydatigena*. (25)

Es una infección cosmopolita y asociada a los sistemas de explotación extensivos. (26)

### 6.2.4. Clasificación taxonómica del *Cysticercus tenuicollis*

Reino:	Animalia
Phylum:	Platyhelminthes
Clase:	Céstoda
Orden:	Cyclophyllidea
Familia:	Taeniidae
Género:	<i>Cysticercus</i>
Especie:	<i>tenuicollis</i>
Nombre Científico:	<i>Cysticercus tenuicollis</i> . (27)

### 6.2.5. Características del *Cysticercus tenuicollis* y el parásito adulto

*Taenia hydatigena* este céstodo se encuentra en el intestino delgado de perros, lobos, coyotes, zorros y otros cánidos, sin embargo, la fase larvaria, conocida como *Cysticercus tenuicollis* se encuentra en el hígado, mesenterio, de bovinos ovinos caprinos y otros animales como el cerdo. (28)

El parásito adulto que es la *Taenia hydatigena*, puede llegar a medir de 75 hasta los 500 cm de largo el cual se aloja a lo largo del intestino delgado del perro u otros carnívoros. En su parte inicial consta de un róstelo el cual tiene de 26 a 44 ganchos en una corona doble lo cual le permite al parásito adherirse a la mucosa del intestino en donde absorbe los nutrientes

necesarios para su desarrollo, los ganchos grandes miden de 0.17 a 0.22 mm de largo, los pequeños de 0.11 a 0.16 mm. Los proglótidos grávidos miden de 10 a 14 mm de largo por 4 y 7 mm de ancho, y el útero presenta entre 5 a 10 ramas sobre uno y otro lado. Los huevos son elípticos y miden entre 38 a 39 por 34 a 35 micras. (23)

*Cysticercus tenuicollis*, es la fase larval de la *Taenia hydatigena*, es una vesícula voluminosa de unos 5 cm de diámetro que puede llegar a tener unas dimensiones de hasta una manzana alojándose en diferentes áreas del abdomen de los ovinos u otros mamíferos. Se halla recubierta de una pared fina que contiene un líquido translucido. En términos vulgares, se conoce con el nombre de “bola de agua”. En el interior de la vesícula existe una invaginación cefálica que contiene un escólex con un largo cuello que flota en el líquido vesicular. Excepcionalmente el *Cysticercus tenuicollis* puede producir vesículas hijas internas unidas en el interior del cisticerco primario. (26)

#### **6.2.6. Ciclo evolutivo del *Cysticercus tenuicollis*.**

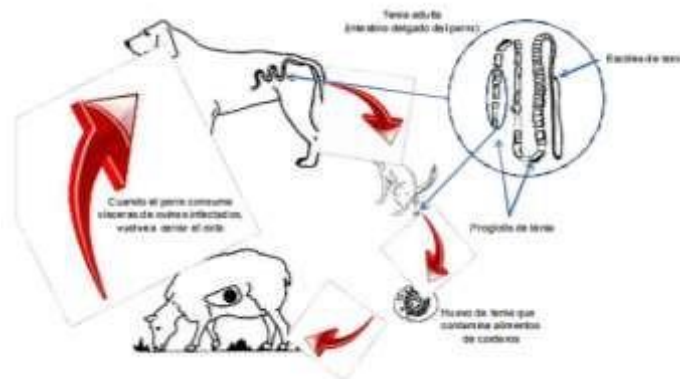
Los huevos o los proglótis grávidos son eliminados en las heces de los huéspedes definitivos (cánidos), en el suelo el proglótis se destruye por factores físicos y libera los huevos que contaminan el pasto, otros alimentos y el agua. Los huéspedes intermediarios son ovinos, caprinos, bovinos, cerdos, ardillas, y rumiantes salvajes. El perro, gato y hombre también se pueden infectar. La infección se realiza mediante la ingestión de los huevos, con el agua o los alimentos contaminados, y por la subsecuente liberación de la oncósfera a nivel intestinal. (28) Cuando un perro es alimentado con vísceras que contengan el cisticerco, los protoescolices se transforman en parásitos adultos, y comienza nuevamente el ciclo del parásito. (29)

El perro más común como hospedador definitivo alberga el cestodo adulto en su intestino, el cual ya se encuentra totalmente desarrollado puede llegar a eliminar 2-3 y hasta 9 proglótidos grávidos/día, del cual cada uno de ellos puede llegar a contener en su interior entre 15- 790 y hasta 83400 huevos y un 16 % de estos se encuentran libres en heces. El perro puede recorrer varios kilómetros o merodear por múltiples granjas pecuarias al día en el cual mediante sus heces infectadas contaminan los pastos donde se alimenta el ganado ovino u otro ganado, Cuando los hospedadores intermediarios ingieren los huevos y excepcionalmente los proglótis con huevos, se produce la disolución del embrióforo, las oncósferas liberadas penetran en los vasos de la mucosa del intestino delgado y llegan por vía sanguínea al hígado a través de la vena porta. Estas oncósferas perforan los vasos y migran a través del parénquima, formando

trayectos sinuosos sanguinolentos en dirección a la superficie inmadura, que a los 34 – 53 días post infección tiene desarrollado un escólex completo. (26)

El ciclo biológico del *Cysticercus tenuicollis* culmina cuando el canido consume el parásito directamente del cuerpo del ovino o cuando los despojos son arrojados en el suelo libremente, este acto es frecuentemente realizado en aquellas localidades donde los animales sacrificados, fuera de mataderos autorizados, por consiguiente, no se realiza inspección veterinaria. En donde los matarifes o faenadores lo llaman “bola o bolsa de agua” y se los dan de comer a los perros ya que no es de agrado a la vista del consumidor y por ende su precio se devaluaría pudiendo tener pérdidas considerables pérdidas económicas. (30)

Ilustración 1 Ciclo de vida del *Cysticercus tenuicollis* (*Taenia Hydatigena*)



Fuente: Fotografía. (31)

### 6.2.7. Epidemiología

La infección se mantiene entre los hospedadores definitivos e intermediarios. Los sistemas de explotación extensivos y diversos factores climáticos y de manejo, tanto del propio parásito como del hospedador contribuyen a mantener la infección. Por otra parte, tanto el alto potencial biótico de *Taenia hydatigena* como la resistencia de los huevos son factores de vital importancia en el mantenimiento de la infección. Cada proglotido contiene miles de huevos, las oncosferas permanecen activas durante 110 días. Diversas especies de dípteros contribuyen a la dispersión de los huevos. (26)

### 6.2.8. Fuente de infección y modo de transmisión.

El ganado ovino como hospedador intermediario e incluso el hombre pueden adquirir la cisticercosis por ingestión de huevos provenientes del intestino de los canidos, ya sea por el

consumo de alimentos como verduras o frutas, agua contaminada, o por medio de las manos contaminadas. Los huevos liberados en el exterior por los proglótidos grávidos contaminan el suelo y los cursos de agua dando oportunidad a que el animal se infecte por coprofagia y el hombre por fecalismo. (32)

Los seres humanos en convivencia con los animales domésticos es un punto clave para que adquieran la infección a través del contacto estrecho y descuidado con sus mascotas como: perros y gatos que están parasitados, en este sentido, la niñez es la etapa de la vida donde generalmente se produce la infección, al igual que en el ganado. (29)

### **6.2.9. La enfermedad en el hombre**

La cisticercosis humana se presenta en todo el mundo, pero es especialmente importante en las áreas rurales de los países en desarrollo, entre ellos, los de América Latina. Obviamente, su prevalencia es paralela a la del parásito adulto. Se informa que existe un caso individual de infección humana el cual contenía un cisticerco de la *Taenia hydatigena* en el hígado de una persona. (32)

La cisticercosis es una enfermedad de gravedad variable según la localización del parásito. El hombre puede albergar desde un cisticerco a varios centenares, localizados en diversos tejidos y órganos. La localización que con mayor frecuencia constituye motivo de consulta médica es la del sistema nervioso central (neurocisticercosis) y, en segundo lugar, la del ojo y sus apéndices (cisticercosis ocular y periocular). Las localizaciones en los músculos y en el tejido conjuntivo subcutáneo no se manifiestan generalmente en forma clínica, a menos que la infección se deba a un número elevado de cisticercos; cuando ello ocurre, se presentan dolor muscular, calambres y cansancio. (32)

### **6.2.10. La enfermedad en los animales**

El ganado ovino al igual que otros animales domésticos como: bovino, porcino etc. Desempeñan el papel de hospedador intermediario de varias tenias parásitas del intestino del perro, albergando sus larvas infectantes en diversos tejidos. Estas larvas originan procesos morbosos manifiestos (cenurosis) o trastornos orgánicos de curso subclínico que revisten una gran importancia desde el punto de vista de la higiene de la carne (cisticercosis *hydatigena*, equinocosis hidatídica). La cisticercosis ovina ocasiona importantes pérdidas económicas en los rebaños. (33)

En el tracto digestivo se libera la oncósfera por acción enzimática, pasa la pared del intestino y llega al torrente sanguíneo vía porta. Algunas veces pasa a la vena cava posterior en donde es transportado a varias partes del cuerpo, pero por lo general emigra por el hígado y llega a la superficie, luego pasa la cavidad abdominal, en donde se desarrolla en 3 a 4 semanas. (23)

En un estudio de toxicidad para una evaluación de la seguridad de un producto farmacéutico realizado en China, se presenció una vesícula de color amarillo pálido en la cavidad abdominal de un macaco macho de 5 años de edad como huésped intermediario, el macaco habría nacido y criado en una colonia de primates en china, al animal se le realizó la autopsia y en su momento visualizaron la vesícula unida al epiplón, lo diferenciaron por su doble capa, una unida al omento y otra era la vesícula con un escólex muy bien desarrollado. (34)

#### **6.2.11. Efecto del *Cysticercus tenuicollis* en el ovino**

Las oncósferas que llegan al hígado por la circulación porta, vagan por el parénquima hepático por espacio de un mes antes de que perforen la cápsula del hígado y se adhieran al peritoneo, en el cual crecen hasta alcanzar el estado de larva de *Taenia hydatigena*. Las partes de la serosa en las que hay la mayor parte de cisticercos son el omento y el mesenterio, pero también se les puede encontrar solos o en racimos en cualquier serosa abdominal. Estos cisticercos son de los más grandes que se conocen, y se identifican fácilmente porque son quistes grandes, semitransparentes, de 7 a 8 cm y que presentan un solo escólex. (28)

El desplazamiento del parásito en el hígado deja rastros hemorrágicos que después adquieren un color verde/marrón acompañado de una inflamación y que posteriormente se vuelven blancos debido a la fibrosis. (24)

Las lesiones de hepatitis traumática se desarrollan concomitantes a las migraciones de los embriones en el parénquima, en dirección a la superficie de la víscera y en forma de trayectos sinuosos de 1 – 2 mm de diámetro, a lo largo de estos trayectos de migración se produce una reacción inflamatoria subaguda con eosinofilia local. Si se trata de una infección masiva, se producen focos hemorrágicos y destrucción del parénquima por metacestodos. (26)

A los 7- 35 días se observan canales hemorrágicos en el parénquima hepático y bajo la superficie. A los 10 días produce peritonitis serofibrinosa que aumenta en intensidad los días 15- 16. La mayoría de los conductos perforados se retraen paulatinamente después de unos 25 días. En la cavidad abdominal se produce exudado y los cisticercos están adheridos a la serosa, intestino y omento. Los efectos patógenos más graves se producen a los 8 y 11 días post infección con dosis de 1000 huevos/ kg de peso. (26)

El *Cysticercus tenuicollis* es un parásito común de pequeños rumiantes, que generalmente afecta la zona abdominal de ovinos y cabras donde las vesículas del parásito se ven unidos a los omentos, mesenterios o también encontrado en el hígado. En la oveja, las lesiones de tejidos se han asociado con los quistes degenerativos o con las migraciones causadas por las oncósfera. Muy aparte de los característicos órganos que afecta el *Cysticercus tenuicollis* se han descrito localizaciones inusuales. Las localizaciones más frecuentes, se encuentran en los pulmones, los riñones y el cerebro siendo este último de importancia pública puesto que se sabe que el humano es propenso a adquirir esta enfermedad lo cual podría tener fatales consecuencias. (35)

Otras ubicaciones menos comunes se han notificado al tener la presencia del *Cysticercus tenuicollis* en los ovarios, los cuernos uterinos, útero, cuello uterino y vagina pudiendo repercutir en la fertilidad y la capacidad de reproducirse del animal. En este estudio de prevalencia existe el reporte de un caso por primera vez, siendo esta una ubicación aberrante de una vesícula de *Cysticercus tenuicollis*, la cual se hallaba dentro de la membrana corionlantoidea del feto de una cabra, la cabra presentaba una gestación gemelar de aproximadamente 70 días. Lo cual pone en discusión que, encontrar una vesícula de *Cysticercus tenuicollis* dentro de las membranas fetales advierte de la posibilidad de migraciones de larvas en las estructuras fetales durante el embarazo, lo que es particularmente preocupante en las poblaciones humanas que están infestadas. (35)

En el peritoneo se produce exudado sanguinolento afectando al mesenterio, peritoneo visceral y epiplón. Por otra parte, pueden encontrarse localizaciones erráticas en pulmón o cerebro y ovario cursando con endometritis y melanosis uterina. Los metacestodos que no alcancen su madurez se calcifican, esto depende del sistema inmune del anfitrión. (26)

#### **6.2.12. Síntomas en el ovino**

La evolución de la infección, tanto en el ganado ovino como en el caprino, depende de la dosis infectante; en infecciones experimentales altas produce un síndrome anémico febril 3 días post infección, alcanzando un máximo de 8 días, pudiendo provocar la muerte. En dosis experimentales bajas solamente produce anemia crónica sin estado febril además de adelgazamiento y eosinofilia. La infección natural suele ser asintomática. Solamente las infecciones masivas provocan en los corderos y cabritos lesiones hepáticas y peritonitis graves que días después mueren por falta de apetito y fiebre. (26)

La migración en el hígado de gran número de larvas puede causar perjuicios graves asociados con hepatitis traumática, anemia, fiebre, pérdida del apetito e incluso muertes, sobre todo en



corderos y lechones. Los cisticercos en la cavidad abdominal no producen síntomas. El daño económico mayor proviene de la condena de órganos en matadero. (36)

Puede producirse una retención biliar seguida de fotosensibilización, debido a un cisticerco que provoque la oclusión del conducto colédoco, una oclusión intestinal llega a ser mortal. Los animales adultos son mucho más resistentes, de manera que no se observan síntomas ni muerte y *Cysticercus Tenuicollis* solo se advierte como hallazgo secundario en el matadero. Una de las complicaciones más frecuentes suele ser la hepatitis necrótica infecciosa producida por el *Clostridium novyi* tipo B produciendo múltiples infartos hepáticos a consecuencia de las lesiones producidas en el parénquima hepático por el paso de los estadios juveniles de *Taenia hydatigena*. (26)

#### **6.2.13. Diagnóstico de *Cysticercus tenuicollis* en el ovino**

El diagnóstico se realiza en el examen post-mortem. Las localizaciones típicas en el hígado, el carácter translucido del quiste y su flacidez, son suficientes para diferenciarlos de los quistes hidatídicos. Por otra parte, las localizaciones erráticas están siempre acompañadas de la presencia de cisticercos en el hígado y peritoneo. Se advierte la presencia del *Cysticercus tenuicollis* en el hígado porque en el órgano se observa manchas de leche que es producido por que existe una moderada infiltración leucocitaria. (26)

#### **6.2.14. Tratamiento.**

No se realizan tratamientos en animales infectados naturalmente, entre otras razones porque el diagnóstico se realiza en el matadero. En animales infectados experimentalmente se ha ratificado la eficacia (100%) del praziquantel, (60 mg/kgpv.) y de benzimidazoles como mebendazol y albendazol. (26)

### **6.3. Diagnóstico Molecular de Parásitos referencias**

Los métodos de biología molecular se caracterizan por ser específicos y poseer elevada sensibilidad, ya que detectan el ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito, aunque exista una cantidad pequeña de estos en la circulación sanguínea. En un principio se usaron las técnicas de hibridación y actualmente el diagnóstico molecular se basa en la detección de fragmentos específicos de ADN del genoma del parásito mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés “Polymerase Chain Reaction”. que tiene como finalidad amplificar varias veces un pequeño fragmento de ADN, para obtener múltiples copias

resultando muy sensible, ya que detecta poca cantidad de ADN, debido a la amplificación de una secuencia específica del ADN de *Toxocara canis*. (37)

### **6.3.1. Métodos moleculares para tipificación**

Se denomina tipificación a la identificación y caracterización de microorganismos patógenos que permite establecer la identidad de los microorganismos causantes de brotes infecciosos, determinando la fuente de infección y sus posibles patrones de diseminación; asimismo establece la prevalencia del agente infeccioso en una población; la técnica de tipificación a emplear dependerá de los requerimientos y características del sistema analizado; sin embargo, cualquiera que sea el método de tipificación, debe ser evaluado previamente en cuanto a su capacidad para generar la información epidemiológica requerida. (38)

### **6.3.2. Métodos moleculares fenotípicos y genotípicos**

Los métodos fenotípicos se basan en la determinación de características bioquímicas y/o fisiológicas, constituyen la primera herramienta para la comparación de microorganismos que incluye la determinación de actividades enzimáticas, la capacidad metabólica y los determinantes antigénicos o susceptibilidad a agentes bactericidas; sin embargo, con este tipo de métodos no se pueden identificar genes, polimorfismo o mutaciones que determinen la expresión de las características visibles en medios de cultivos, pruebas bioquímicas y de susceptibilidad. (38)

Los métodos genotípicos estudian el genoma del microorganismo causal de la enfermedad y posibilitan el análisis de características de polimorfismo genético concurrente en los agentes etiológicos. Se basan en la localización del material genético del organismo, lo que permite generar nuevos cambios en el patrón de expresión genética, y brinda alternativas más estables y reproducibles. (39)

Dentro de las técnicas empleadas en genotipificación se describen: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuencia del genoma que implica la secuenciación NGS y pirosecuencia, hibridación con sondas de ADN, RAPD y RFLP. (40)

#### **6.3.2.1. PCR**

La técnica de PCR fue inventada por Kary Mullis a mediados de los años 80 que consistía en lograr la multiplicación in vitro de fragmentos definidos de ADN sin necesidad de recurrir a los vectores y su replicación en bacterias. Esta técnica permite multiplicar ("amplificar" es, en realidad, el término que se ha impuesto) pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles y

millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud. El segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas. (41)

Las pruebas de PCR utilizan iniciadores, cebadores o “primers” para delimitar la amplificación de un segmento determinado del ADN utilizando una ADN polimerasa termorresistente. El resultado de la prueba es la amplificación de un fragmento de ADN específico, de tamaño conocido, detectado a través de la electroforesis en geles de agarosa donde es visualizado como una banda discreta mediante la fluorescencia a la luz UV luego del tratamiento del gel con compuestos fluorescentes intercaladores de ADN seguido por un registro fotográfico. (37)

### **6.3.2.2. Procedimiento de PCR**

Este paso consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96 °C ó 98 °C si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos 35. Esto sólo es necesario para ADN polimerasas que requieran activación por calor 31. En el proceso de desnaturalización, las dos cadenas del ADN se separan una de la otra y permiten que la matriz (“template”) se encuentre como cadena simple, necesaria para la actividad llevada a cabo por la polimerasa termoestable durante los pasos de amplificación. (42)

En el siguiente paso del ciclo, la temperatura se reduce a un valor que oscila en el rango de los 40 °C a los 60 °C. A esta temperatura, cada uno de los oligonucleótidos (primers) hibrida con la secuencia complementaria en cada una de las cadenas simples de ADN, que se han separado en el paso anterior, y sirven como cebadores para la síntesis, por la polimerasa termoestable. La síntesis de ADN se inicia cuando la temperatura de la reacción llega al valor óptimo para la actividad de la polimerasa. Para la mayoría de las polimerasas esta temperatura se encuentra en, aproximadamente los 72 °C. Luego se permite la síntesis durante 30 s a 2 min. Este paso completa un ciclo y el siguiente ciclo se inicia con el retorno a los 94-95 °C para la desnaturalización. (43)

La cantidad de amplificado resultante va a depender de la disponibilidad de sustrato para la reacción por eso, los oligonucleótidos y los desoxirribonucleótidos trifosforilados se añaden en exceso respecto al ADN a amplificar. Como es fácil inferir, la concentración de ADN, oligonucleótidos, de y ADN polimerasa activa disminuyen después de cada ciclo debido a la síntesis que se está produciendo por lo que la reacción lleva a un máximo de amplificación, luego del cual el rendimiento y el número de copias obtenidas no aumentan. A esto se lo conoce

como el efecto “Plateau”. En la reacción de PCR ideal, existen tres fragmentos de ácidos nucleicos. El fragmento de ADN de doble cadena a ser amplificado (molécula blanco o target) y dos oligonucleótidos de cadena simple que hibridizan en alguna región del ADN blanco (iniciadores o primers). (43)

La primera ronda de síntesis resulta en la generación de cadenas de ADN nuevas sin una longitud determinada, las cuales, como las cadenas parentales, se pueden hibridizar a los primers luego de la desnaturalización e hibridización. Estos productos se acumulan con una progresión aritmética a través de los ciclos siguientes. (43)

Sin embargo, el segundo ciclo de desnaturalización, hibridización y síntesis, produce dos productos de cadena simple que componen en conjunto un producto de doble cadena en el cual posee la longitud exacta del fragmento original delimitado entre los primers. Cada cadena de este producto discreto es complementaria a uno de los dos primers incluidos en la reacción y puede en consecuencia participar como blanco en los ciclos subsiguientes. (43)

### 6.3.2.3. Tipos de Técnicas

1) PCRs para la amplificación de un solo sitio conocido del genoma (locus). Estos PCRs requieren conocer la secuencia que se trabaja (por ejemplo, cuando amplificamos un gen específico como el 16S), en cuyo caso se utilizan oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de ese gen y se obtiene un solo fragmento de un tamaño ya conocido. Con este tipo de PCRs es posible hacer filogenias, y para obtener los datos hay distintos caminos: desde hacer geles especiales que detectan cambios hasta de una sola base entre las secuencias (SSCP), hasta utilizar enzimas de restricción para generar patrones de cada individuo, aunque lo ideal es obtener la secuencia completa del gen que amplificamos, sobre todo cuando se desea responder a preguntas relacionadas con las fuerzas evolutivas que han actuado sobre él. (44)

2) PCRs en los que no es necesario conocer la región que se está amplificando (se amplifican regiones no conocidas, como zonas hipervariables del genoma), por lo cual no se sabe el tamaño del fragmento (o fragmentos) que se esperan. Éstos se utilizan para determinar polimorfismo genómico y son los más comunes para fingerprint, ya que es sencillo obtener los datos (un gel de agarosa después del PCR es suficiente), se observan varios loci simultáneamente y la información de las zonas variables permite inferir los datos necesarios para análisis de genética de poblaciones. En general este tipo de PCRs utiliza un solo oligonucleótido con 2 características importantes: que sea de pequeño a mediano (de 6 a 18 bases) y sobre todo que su secuencia esté presente muchas veces en el ADN del organismo que

estudiamos. (44) Existen zonas repetidas hipervariables del ADN que pueden amplificarse de esta manera, por ejemplo, los sitios que sirven para iniciar la síntesis de ADN en los cromosomas, conocidas como microsatélites. En el primer ciclo de reacción lo que sucederá es que el oligonucleótido utilizado hibridará en distintas zonas del ADN, y primero comenzarán a sintetizarse fragmentos de tamaños variables e indefinidos (hasta donde la polimerasa logre copiarlos). En el segundo ciclo las cadenas sintetizadas a partir de las primeras copias formadas serán del tamaño que existe entre dos oligonucleótidos que no estén muy alejados entre sí. Estos fragmentos se copiarán una y otra vez, y de esta manera al final obtendremos muchos fragmentos de tamaños diferentes, de los que conoceremos la secuencia con que inician y terminan, pero no la secuencia completa de cada uno. (44)

**Tabla 1 Características y aplicaciones de las diferentes clases de PCR**

<b>TIPO DE PCR</b>	<b>Características</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>PCR estándar</b>	Amplificación de un segmento de ADN utilizando dos cebadores. La detección de la amplificación es mediante Detección cualitativa de un gel de agarosa o poliacrilamida empleados para el segmento de ADN observaciones de regiones pequeñas en número de pares de bases	
<b>PCR anidada</b>	En esta variante el producto de amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con segmento de ADN, altamente iniciadores que se van a ubicar dentro de la primera sensible y específico. secuencia amplificada.	Detección cualitativa de un
<b>PCR in situ</b>	Los productos generados a partir de muestras biológicas como secreciones y tejidos pueden visualizarse en el sitio de amplificación, y permiten la detección de cantidades pequeñas de material genético.	
<b>PCR Múltiple</b>	Amplificación de dos o más segmentos de ADN utilizando varios cebadores en una sola reacción de amplificación. La detección de la amplificación se visualiza mediante geles de agarosa	Detección cualitativa de varios segmentos de ADN en una sola reacción de PCR
<b>PCR - RFLP (polimorfismos de longitus de fragmentos de restricción)</b>	PCR estándar con paso posterior de digestión con enzimas de restricción.	Detección de polimorfismos tipo RFLPs.
<b>PCR con transcriptasa inversa (RT - PCR)</b>	Este tipo de PCR utiliza como molde inicial el ARN y se requiere una transcriptasa inversa para realizar la conversión del ARN a un tipo de ADN llamado ADNc (ADN complementario)	Expresión de genes. Detección de virus ARN
<b>PCR - RT (Real Time) o qPCR</b>	PCR estándar donde se utilizan funciones o sondas con fluoróforos para la detección de los fragmentos amplificados; puede ser del tipo múltiple	Detección cualitativa de uno o varios segmentos de ADN. Cuantificación de ADN en la muestra (cargas) o expresión de genes.)

Fuente: (44)

**Para cada aplicación de la PCR es necesario ajustar las condiciones y el diseño de la reacción, por ejemplo: (45)**

- La duración de las fases de apareamiento y elongación.
- El tipo de cebadores o primers empleados y sus temperaturas de fusión.
- El tipo de polimerasa utilizada.
- La cantidad de los reactivos y de ADN molde.
- La longitud del amplicón o producto de PCR obtenido.

 $T_m$ 

#### **6.3.2.4. La Taq polimerasa**

Al igual que la replicación de ADN en un organismo, la PCR requiere de una enzima ADN polimerasa que produzca nuevas cadenas de ADN mediante el uso de las cadenas existentes como molde. La ADN polimerasa que normalmente se utiliza en la PCR se llama Taq polimerasa, por la bacteria tolerante al calor de la que se aisló (*Thermus aquaticus*).

(46)

La Taq polimerasa es ideal para la PCR gracias a esta estabilidad térmica. Como veremos, la PCR utiliza altas temperaturas repetidamente para desnaturalizar el molde de ADN o separar sus cadenas. (46)

#### **6.3.2.5. 6.2.2.3. Primers**

Un iniciador o cebador es una secuencia corta de ADN de cadena simple que se utiliza en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el método PCR se emplea un par de cebadores para hibridar con el ADN de la muestra y definir la región del ADN que será amplificada. También se les conoce como oligonucleótidos. (47)

Un iniciador o cebador se refiere a un número reducido de nucleótidos del ADN, por lo general de 18 a 24 pares de bases de longitud. Un cebador puede ser utilizado para muchos procesos experimentales diferentes. Se puede utilizar en una reacción de PCR para llegar a un locus determinado y así amplificarlo para su posterior análisis. Es una manera de seleccionar una secuencia muy específica del ADN. (47)

#### **6.3.2.6. Longitud del primer**

Un primer debe ser lo suficientemente complejo de tal manera que la probabilidad de anillamiento con una secuencia diferente a la de nuestro interés sea muy baja. Como se anotó anteriormente una secuencia de 16 pb de longitud tiene una probabilidad de ser encontrada una

vez cada 4 16 pares de bases. Por esta razón es muy recomendable que un primer tenga, como mínimo, 17 bases de longitud. (48)

#### **6.3.2.7. Temperatura y tiempo de elongación del primer**

Por lo general se encuentra entre los 70-72°C durante 0.5-3 minutos. Si la polimerasa tiene una actividad específica a 37°C. (40)

#### **6.3.2.8. Número de ciclos de amplificación**

El número de ciclos de amplificación necesarios para obtener una banda visible depende en gran medida de la concentración inicial de nuestro DNA a amplificar. Se recomiendan de 40-45 ciclos para amplificar 50 moléculas y entre 25-30 para amplificar 3-5 moléculas, a la misma concentración (plateau effect). (48)

#### **Consejos generales para el diseño de primers:**

1. Los primers deben tener una longitud de 17-28b
2. El contenido de G+C debe estar alrededor del 50-60%.
3. Los Tms entre 55-80oC son deseables.
4. Se deben evitar secuencias de 3 o más Cs o Gs en las regiones terminales 3'.
5. Las terminaciones 3' no deben ser complementarias, ya que esto puede llevar a la formación de dímeros.
6. Debe evitarse los primers que formen secuencias auto complementarias (habilidad para formar estructuras 2°).

#### **6.3.3. Tipos de primers que existen para la identificación molecular de *Cysticercus Tenuicollis***

Amplificación por PCR y purificación de ARNr 12S mitocondrial. Se usó un conjunto de cebadores, 12SRF (directo): 5 "-AGGGGATAGGACACAGTGCCAGC-3" y 12SRR (inverso): 5 "-CGGTGTGTACATGAG CTAAAC-3" para amplificar un fragmento del gen de rRNA 12S. La amplificación del ADN se realizó usando *f-Pfu* ADN polimerasa (SBS Genetech Co., Beijing, China) en un termociclador (Techne, Stone, Reino Unido) en las condiciones descritas previamente por Rostami *et al.* (20) Los amplicones se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p / v) usando GoodView Nucleic Acid Stain (SBS Genetech Co.).

## **7. HIPÓTESIS**

**7.1.** La tipificación molecular permitirá la identificación específica del *Cysticercus tenuicollis* a partir de muestra biológica a través del uso de PCR.

**7.2.** La tipificación molecular no permitirá la identificación específica del *Cysticercus tenuicollis* a partir de muestra biológica a través del uso de PCR.

## **8. METODOLOGÍA**

El trabajo se sustenta en una investigación de campo de tipo no experimental que permite identificar el Ácido Desoxirribonucleico (ADN) del *Cysticercus Tenuicollis*.

### **8.1. Área De Investigación**

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la Universidad de las Américas.

La Provincia de Pichincha está localizada en la región Sierra de país, hacia el norte del territorio ecuatoriano, se encuentra a 2.816 metros sobre el nivel del mar. En General la provincia posee una temperatura media anual de 16 °C, por lo que cuenta con un clima templado, frío y cálido húmedo. Con una población total 2'576.287 habitantes, densidad 268,03 hab/km<sup>2</sup>, superficie total 9.612 km<sup>2</sup>

### **8.2. Unidad Experimental**

El trabajo de investigación se realizará con una cantidad de 20 muestras recolectadas de diferentes ovinos de matadero.

### **8.3. Materiales, Equipos E Instalaciones**

Para el presente trabajo investigativo se utilizó los siguientes materiales, equipos e instalaciones entre los que tenemos:

#### **8.3.1. Materiales**

Material Biológico

- ✓ 186 ovinos



- ✓ 20 quistes de *Cysticercus Tenuicollis*

### **Materiales de Laboratorio**

- ✓ Frascos de muestras de orina
- ✓ Jeringas de 20 ml
- ✓ Pinzas anatómicas
- ✓ Tubos Eppendorf 1.5 mL
- ✓ Couler para transporte
- ✓ Guantes
- ✓ Mandíl
- ✓ Mango de bisturí
- ✓ Hojas de bisturí

### **Materiales de Oficina**

- ✓ Libreta de notas
- ✓ Computadora
- ✓ Impresora
- ✓ Cámara de fotos

#### **8.3.2. Insumos**

- ✓ 1 L de Etanol al 70%
- ✓ Primers forward 5'-AGTCCTGATGCTTTTGGGTTCTATGGA-3' (200 nmol)
- ✓ Primers reverse 5'-AAGCATGATGCAAAGGCAAATAAACC-3' (200 nmol)
- ✓ Proteínasa K
- ✓ Buffer de Extracción
- ✓ Fenol/Cloroformo/Isoamílico
- ✓ Agua Milli Q o TE
- ✓ BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit
- ✓ Qiagen Multiplex MasterMix
- ✓ Agarosa en TBE teñido con SYBR safe

#### **8.3.3. Equipos**

- ✓ Balanza
- ✓ Estereomicroscopio

- ✓ Balanza analítica
- ✓ Incubadora
- ✓ Vortex de ADN
- ✓ Termociclador
- ✓ Pie de rey

#### **8.3.4. Instalaciones**

- ✓ Empresa Publica Metropolitana de Rastro Quito. EMRAQ-EP
- ✓ Laboratorio de Parasitología de la Universidad Técnica de Cotopaxi
- ✓ Laboratorio de Investigación de Biología Molecular de la Universidad de las Américas

## **9. DISEÑO DEL EXPERIMENTO**

Luego de la recolección de los quistes del *Cysticercus Tenuicollis* se colocó en etanol al 70% para preservar la integridad del mismo.

### **9.1. Aislamiento de la Muestra Biológica**

Las muestras biológicas se recolectaron de un centro de faenamiento en el cual se faenaron 186 animales de los cuales logramos recolectar 20 quistes; se coloca en un frasco de plástico con etanol al 70% para su conservación y transporte. Una vez extraída la cabeza de la vesícula del quiste, se procede a tomar el peso en la balanza analítica y medir la longitud con el pie de rey para introducir en un tubo Eppendorf de 1,5 mL al cual se va a añadir 1 mL de etanol al 70% como requisito para conservar el ADN de la muestra. Finalmente se procede a cerrar el tubo y se etiqueta con el código CT 021 – 040 respectivamente.

### **9.2. Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN se realizó a partir de fenol cloroformo que permite obtener un alto rendimiento de la calidad de ADN sin embargo es frecuente que restos de solventes orgánicos contaminen la muestra

### **9.3. A Partir de Fenol-Cloroformo**

En este protocolo el lisado celular se mezcla con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico para la separación de los ácidos nucleicos y las proteínas; para esto se transfiere la muestra de tejido del parásito re suspendido en alcohol a un tubo de 1,5 µL donde se lava con agua libre de nucleasas para ser colocadas en el buffer de extracción macerando con una punta de pipeta

durante 5 minutos en un bloque frío en el cual se va a tener una fase acuosa superior que contiene los ácidos nucleicos; se realiza vortex por 1 minuto se coloca proteinasa K incubando las muestras toda la noche a una temperatura de 56° C en el thermomixer. Al día siguiente se añade fenol/cloroformo/isoamílico en una proporción de (25:24:1) realizando vortex hasta formar una emulsión lechosa que luego se centrifuga durante 10 minutos a una temperatura de 4°C a máxima velocidad que va a dar paso a una fase orgánica que contiene las proteínas disueltas en el fenol y los lípidos en el cloroformo. Se agita bien y se coloca a temperatura ambiente por dos horas continuando con la centrifugación por 30 minutos a 4°C a 15000 rpm descartando el sobrenadante sin topar el pellet; se añade etanol 70% helado y se centrifuga por 15 minutos a 12000 rpm, descartando el sobrenadante y dejar secar. Posterior a esto se re suspende en 40 µL de Agua Milli Q o TE y se incuba la muestra a 37°C por dos horas para proceder a la cuantificación de la concentración de ADN.

La pureza de las muestras obtenidas con este método presenta una relación A260/280 con valores en torno a >1.7, aunque es relativamente frecuente observar en la relación A260/230 valores inferiores a 1.5; mientras que para verificar la integridad de las muestras se lo realiza al observar una banda definida en la parte superior del gel de agarosa tras la migración electroforética

#### **9.4. Diseño y Selección de Primers**

La selección de oligonucleótidos iniciadores es fundamental para la PCR en la hibridación con sondas y secuenciación de ADN para que sea exitosa en el laboratorio en cuanto al diseño de primers se lo realiza según la cadena de secuencia que se quiere codificar para un elemento específico como en este caso el ADN de *Cysticercus Tenuicollis*.

La selección de primers se realiza según el uso, para PCR el fin es amplificar un locus por lo que la posición de los primers debe ser relativa a los codones de inicio y terminación. Es recomendable que el primer "forward" se encuentre más o menos a 35 pb del inicio de la secuencia que codifica, de la misma forma el primer "reverse" debe localizarse 35 pb después de la región que codifica y si los primers son para secuenciación se obtiene la secuencia de ADN es recomendable que los primers se localicen por lo menos 50 pb antes de la región que se desea secuenciar, esto para el primer forward" cuando hay uno, y 50 pb después de la región a secuencias para el primer "reverse", cuando hay uno. (49)

La selección de primers se debe realizar mediante el diseño específico de primer dependiendo la especie a va hacer estudiada y la otra opción es seleccionar primers ya estandarizados por otros investigadores y que se encuentran disponibles en las bases de datos genómicos.

### **9.5. Amplificación de Fragmentos por PCR**

Para la amplificación de fragmentos de ADN es necesario diluir las muestras de ADN hasta alcanzar una concentración de 5 ng/ $\mu$ L para así continuar a ensamblar los componentes para una PCR utilizando componentes como Agua MQ, los primers forward y reverse, master mix y la muestra de ADN.

Las muestras van a ser colocadas en el termociclador con el fin de realizar la denaturación inicial que consiste en separar las cadenas de ADN y se lleva a cabo elevando la temperatura a 95.0°C durante un ciclo de 15 minutos para posteriormente disminuir la denaturación un grado de temperatura durante 30 segundos durante 38 ciclos. Una vez separadas las cadenas de ADN se va a proceder a la alineación aplicando un descenso de la temperatura a 57.0°C durante 1 minuto aplicando los 38 ciclos correspondientes para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al molde de ADN; a partir de la fase de elongación se va a establecer una temperatura de 72.0°C durante 1 minuto y 38 ciclos aplicando la enzima Taq polimerasa que incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. Por último, la elongación final se realiza a 72.0°C durante 10 minutos que va a dar paso a la fase final de reposo a una temperatura de 4.0°C por 10 minutos.

### **9.6. Electroforesis**

La electroforesis es un método de separación de biomoléculas como el ADN o ARN de acuerdo a su tamaño que consiste en el aislamiento de la zona de interés ya que cada fragmento se separa en el gel por su tinción con bromuro de etidio que hace que el ADN sea fluorescente mediante la emisión de luz ultravioleta cuando una corriente eléctrica se aplica sobre el gel de agarosa la carga negativa va a migrar hacia el polo positivo; dicho gel va a estar disuelto en un buffer y se funde usando un microondas hasta obtener una solución homogénea y transparente. Esta disolución se vacía en un molde y se coloca un peine que va a formar pozos donde se depositan las muestras; dejando enfriar para polimerizar y así formar una matriz porosa variando el tamaño del poro según la concentración de agarosa contenida en la disolución. La migración del colorante contenido en el buffer de carga en un gel con 0.5–1.4% Agarosa van a partir del mismo punto que el ADN ayudando a indicar la posición de corrimiento del ADN; es decir se observa como una única banda de elevado peso molecular.

### **9.7. Secuenciación de ADN**

La secuenciación del ADN consiste en que las cuatro bases nitrogenadas se van a unir con la misma pareja para formar “pares de bases” que van a ser copiadas de manera idéntica cuando las células se dividen. La realización de este procedimiento es reservada por el Laboratorio de Investigación de Biología Molecular de la Universidad de las Américas siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## **10. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **10.1. Recolección de los quistes de *Cysticercus Tenuicollis***

- ✓ Los quistes de *Cysticercus Tenuicollis*, se obtienen de ovinos faenados en la Empresa Publica Metropolitana de Rastro Quito. EMRAQ-EP
- Los quistes fueron recolectados tras la inspección post mortem de las vísceras en los órganos donde se aojan los cuales son hígado, mesenterio epiplón y peritoneo.
- Luego de la recolección se lavan con agua y se introducen en un frasco plástico con etanol al 70%.
- Se etiqueta y rotula los frascos con su respectivo código.

### **10.2. Disección del parásito para garantizar la integridad del ADN**

- Los quistes del *Cisticercos Tenuicollis* deben ser mantenidos a temperatura ambiente.
- Se toma el quiste y se coloca en la balanza, digitando el peso correspondiente en la computadora.
- Se procede a extraer todo el líquido que se encuentra dentro de la vejiga para extraer la cabeza de la vejiga,
- La cabeza se pesa en la balanza analítica.
- Dichos materiales genéticos se colocan en el tubo Eppendorf previamente esterilizado y se añade 1 mL de etanol al 70%.
- Posterior a esto se sellan los tubos y se rotulan con el código asignado CT y el número de muestra.
- Las muestras son enviadas en un couler para su procesamiento al Laboratorio de Investigación de Biología Molecular de la Universidad de las Américas en el campus

QUERI ubicado en la dirección José Queri y Av. de los Granados en el Distrito Metropolitano de Quito.

### **10.3. Extracción de ADN**

La extracción de ADN se lo realizó utilizando el método a partir de fenol – cloroformo, detallado a continuación.

#### **10.3.1. Partir de Fenol-Cloroformo**

1. Diseccionar 2mm de la muestra de tejido y transferirla a un nuevo tubo de 1.5mL.
2. Añadir 500 µL de Buffer de Extracción y macerar con una punta de pipeta o pistilo por 5 minutos al interior de un bloque frío.
3. Realizar vortex por 1 minuto y colocar 5 µL de Proteinasa K (20 mg/mL).
4. Incubar las muestras a 56°C toda la noche en agitación, a 300 rpm.
5. Sacar las muestras del termobloque, dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir 750 µL de Fenol/Cloroformo/Isoamílico y realizar vortex hasta formar una emulsión lechosa.
7. Centrifugar 10 minutos a 4°C a máxima velocidad. Transferir toda la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1.5 mL.
8. Añadir a esa fase, 500 µL de Cloroformo: Isoamílico, homogenizar en vortex.
9. Centrifugar 10 minutos a 4°C a máxima velocidad. Transferir toda la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1.5 mL.
10. Añadir al nuevo microtubo, 400 µL Isopropanol 100% y 40 µL de NaCl 3M.
11. Agitar bien y dejar reposar a temperatura ambiente por dos horas.
12. Centrifugar por 30 minutos a 4°C a 15000 rpm.
13. Descartar el sobrenadante con mucho cuidado de no alterar el pellet.
14. Agregar 1000 uL de Etanol 70% helado y centrifugar por 15 min a 15000 rpm.
15. Descartar el sobrenadante y dejar secar.
16. Re suspender en 40 µL de Agua Milli Q o TE e incubar la muestra a 37°C por dos horas.
17. Cuantificar la concentración de ADN.

### 10.3.2. Cuantificación y dilución de muestras de extractos de ADN:

Cuantificar mediante espectrofotómetro – nanodrop las concentraciones de ADN obtenidos en el procedimiento anterior, y diluir hasta alcanzar una concentración final de 5 ng/uL, almacenando ambas muestras (ADN concentrado y ADN diluido):

**Tabla 2. DILUCIONES CISTICERCO**

VOLÚMEN FINAL (µL)			20
CONCENTRACIÓN FINAL (ng/µL)			5
ID MUESTRA	C. INIAL	V. ADN	V. AGUA
CT021	15,2	6,58	13,42
CT022	47,5	2,11	17,89
CT023	42,9	2,33	17,67
CT024	13,9	7,19	12,81
CT025	59,7	1,68	18,32
CT026	71,2	1,4	18,6
CT027	10,8	9,26	10,74
CT028	53,4	1,87	18,13
CT029	12,3	8,13	11,87
CT030	29,7	3,37	16,63
CT031	42,7	2,34	17,66
CT032	41,5	2,41	17,59
CT033	48,5	2,06	17,94
CT034	37	2,7	17,3
CT035	12,9	7,75	12,25
CT036	60,8	1,64	18,36
CT037	55,3	1,81	18,19
CT038	47,3	2,11	17,89
CT039	71,4	1,4	18,6
CT040	22,2	4,5	15,5

**Fuente directa**

### 10.3.3. Amplificación de fragmentos por PCR

**Tabla 3. Ensamblar los componentes para una PCR bajo las siguientes condiciones:**

COMPONENTE	C. Inicial	C. Final	Vol. 1 Rx (µL)	Vol. 60 Rx (µL)
Agua MQ			8,8	528
Buffer	10X	1X	1,5	90
MgCl <sub>2</sub>	50 Mm	1,5 mM	0,45	27
dNTP Mix	10 mM	0,2	0,3	18
Primer Fw	20 µM	0,5 µM	0,375	22,5
Primer Rv	20 µM	0,5 µM	0,375	22,5
Taq Polimerasa*	10 U/uL	2 U/uL	0,2	12
ADN	5 ng/µL	1 ng/µL	3	
Volumen Final			15	

**Platinum® Taq DNA polymerase, Ref: 10966-034 Fuente directa**

**Tabla 4. Colocar las muestras en el termociclador, estableciendo los siguientes parámetros:**

Paso	T (°C)	Tiempo	No. Ciclos
Denaturación Inicial	94.0	0:02:00	1
Denaturación	94.0	0:00:30	35
35 Annealing	58.0	0:00:30	
Elongación	72.0	0:01:00	
Elongación final	72.0	0:05:00	1
Reposo	4.0	0:10:00	1

**Fuente directa**

### 10.3.4. SECUENCIACIÓN

Purificar los productos de PCR mediante purificación enzimática; y realizar la secuenciación Sanger, matriz BigDye 3.1 según recomendaciones del fabricante.



## 11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 11.1. Identificación morfológica y recolección de Quiste del *Cysticercus Tenuicollis* de ovinos faenados en la Empresa Publica Metropolitana de Rastro Quito. EMRAQ-EP.

La recolección del Quiste se realizó de un total de 186 ovinos faenados en la EMRAQ-EP los cuales fueron examinados post-mortem de los cuales 24 fueron positivos a la presencia del cisticerco del modo que se obtuvo una frecuencia de periodo del 12.90% en la población. En la identificación morfológica nos basamos en teorías ya publicadas las cuales nos menciona que los quistes tienen forma de una vesícula de agua que puede medir de 3 cm hasta alcanzar el diámetro de una manzana, dentro de esta vesícula encontramos una invaginación cefálica que contiene un escólex con un cuello largo que flota dentro del líquido vesicular, alojándose en diferentes áreas del abdomen principalmente en el epiplón así como también en diferentes órganos tales como el hígado, mesenterio y peritonio. (26)

### 11.2. Protocolo de disección ideal de la muestra biológica para conservar la integridad del ADN del parásito requerida para la identificación molecular.

El rango de peso de cada muestra varía según lo indica la Tabla 5. Obteniendo un promedio de peso de la muestra de 0,02471 gramos, y un promedio de longitud de 0.4225 centímetros y para preservar su integridad se añadió etanol al 70%; determinando así que el protocolo de disección de *Cysticercus Tenuicollis* fue el ideal para su conservación.

**Tabla 5. Códigos y peso de la muestra parasitaria**

Código del tubo	Peso de vesícula con líquido Gr	Peso de vesícula sin líquido Gr	Cantidad de líquido extraído ml	Peso de la muestra Gr	Diámetro de la muestra cm
CT021	6,1	0,4	5	0,0155	0,5
CT022	4,3	0,3	3	0,0235	0,4
CT023	5,2	0,3	2,5	0,109	0,4
CT024	2	0,9	2	0,0143	0,4
CT025	5,6	0,1	1	0,0145	0,5
CT026	5,4	0,27	1,5	0,0117	0,4
CT027	19,31	0,76	16	0,0109	0,45
CT028	0,63	0,19	1	0,0075	0,3
CT029	10,23	0,67	9	0,0104	0,4

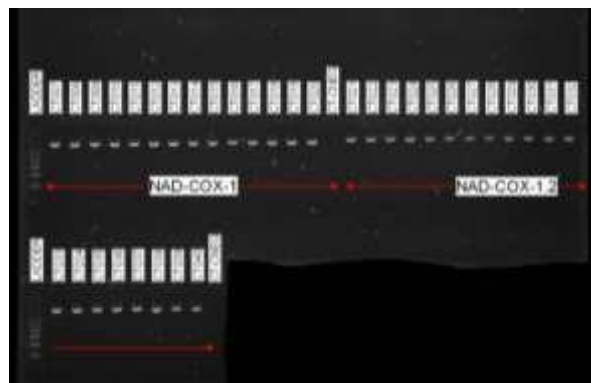
CT030	9,12	0,55	8	0,145	0,5
CT031	8,2	0,11	2,2	0,0131	0,6
CT032	4,29	0,73	2	0,0122	0,3
CT033	9,23	0,97	8	0,009	0,6
CT034	1,5	0,32	1	0,0182	0,4
CT035	4,74	0,32	5	0,0102	0,3
CT036	43,27	1,3	15	0,0121	0,5
CT037	3,2	0,37	3	0,0151	0,4
CT038	3,5	0,81	2	0,0112	0,4
CT039	8,26	0,52	8	0,0164	0,3
CT040	2,42	0,26	2	0,0144	0,4

Fuente: Directa

### 11.3. Identificación de *Cysticercus Tenuicollis* mediante la amplificación de una región conservada del genoma mediante el uso de primers específicos para reconocer el género parasitario.

La identificación molecular de *Cysticercus Tenuicollis* a través de la amplificación de una región conservada del genoma utilizando primers específicos para detectar el parásito de interés resultaron ser los correctos para su tipificación; determinando que del total de 20 muestras procesadas todas fueron identificadas como *Cysticercus Tenuicollis* lo cual representa el 100% de especificidad molecular con el parásito de estudio.

**Ilustración 2** Resultados de amplificación de las muestras CT021 a CT040, extraídas por el método de fenolcloroformo.



Fuente: Directa

Los resultados de la amplificación de las muestras de CT021 a CT040 fueron extraídas por el método de fenol-cloroformo, se realizó una corrida de control negativo para verificación de contaminación, dando como resultado que cada una de las muestras pertenecen a *Cysticercus Tenuicollis* ya que en la lectura de bandas de electroforesis se encuentran teñidas con gel de agarosa en su totalidad; es decir los primers seleccionados fueron los específicos para detectar el ADN del parásito tanto en la lectura forward como en la lectura reverse.

#### 11.4. DISCUSIÓN

La elección de un buen protocolo para la extracción de ADN es decisiva para la amplificación de ADN mediante PCR. La técnica más utilizada es la de solventes orgánicos como fenol/cloroformo sin embargo esta técnica presenta ciertos inconvenientes en cuanto a tiempo y toxicidad por lo que no sería factible en su totalidad ya que los protocolos de extracción deben ser sencillos, alérgicos y reproducibles manteniendo la seguridad e integridad de la muestra. Por tal motivo, se decidió utilizar el protocolo de extracción de ADN del parásito; el cual está basado en la extracción con solventes orgánicos fenol/cloroformo.

Las 20 muestras fueron analizadas mediante el protocolo seleccionado obteniendo un rendimiento del 100% es decir 20 muestras se identificaron con los primers específicos de *Cysticercus Tenuicollis*; por lo cual el protocolo elegido para la extracción del ADN fue el ideal, sin embargo, en un estudio realizado por María López et. al (50) se determinó que este protocolo clásico obtuvo un bajo rendimiento que podría atribuirse a la posible oxidación del fenol utilizado; además que incluye gran cantidad de pasos que lo hacen largo y laborioso, por lo que puede ocurrir pérdida del ADN en los diferentes pasos de la técnica; incluyendo que se utilizan solventes contaminantes y tóxicos. No obstante; la integridad del ADN se mantuvo en condiciones óptimas notándose una banda única de gran tamaño al igual que en las muestras procesadas de *Cysticercus Tenuicollis*.

El presente estudio nos dio como resultado que los primers (cebadores) utilizados en la investigación titulada **“Estudio molecular de *Cysticercus tenuicollis* de ovejas sacrificadas en la provincia de Sulaymaniyah, Irak”** fueron los específicos para el paracito que estamos estudiando y de esa manera logramos identificar a todas las muestras enviadas al laboratorio de investigación de la UDLA como Quistes de la Familia Taeniidae, Género *Cysticercus*, Especie *tenuicollis*. (51)

## **12. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)**

Esta investigación genera nuevos temas para seguir un estudio que permita identificar el género del *Cysticercus Tenuicollis* que toma como hospedador a los ovinos y los daños que puedan estos afectar a los mismos.

El impacto que genera el presente proyecto incurre en la salud animal, ya que al contraer parásitos gastrointestinales la vitalidad y bienestar de los caninos disminuye además de convertirse en un factor zoonótico relacionado con los problemas de Salud Pública ya que los ovinos pueden ingerir sus huevos expulsados en las heces de los caninos infectados.

El impacto ambiental se produce cuando los huevos del parásito son expulsados a través de las heces y se diseminan en el entorno, los mismos que producirán una re infestación tanto en animales de producción tales como (ovinos, bovinos y porcinos) así como también en el ser humano dando paso a la continuación del ciclo biológico del parásito.

Al ser una enfermedad que afecta al animal y deteriora su estado de salud, ocasiona un impacto económico ya que el diagnóstico y tratamiento del canino merma la economía del propietario, y en la mayoría de casos no serán tratados.

El impacto técnico se evidencia en la realización del diagnóstico molecular del parásito para generar datos específicos de la identificación del género *Cysticercus Tenuicollis* en los ovinos que son faenados.

Finalmente se debe tomar en cuenta el impacto social al dar a conocer a los propietarios de las mascotas sobre los resultados encontrados en el diagnóstico de laboratorio y la identificación molecular para posteriormente informarles sobre los síntomas y lesiones que causan el deterioro de la salud del animal y el posible contagio a través de la propagación de una zoonosis.

## **13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **13.1. CONCLUSIONES**

- El protocolo de disección de la muestra biológica fue completamente adecuado ya que al recuperar la muestra que fue enviada al laboratorio se logró preservar la integridad de la muestra de DNA garantizando así la calidad al momento de la identificación molecularmente.

- En la identificación del *Cysticercus Tenuicollis* de la región genómica por medio de primers específicos logramos tener una amplificación del 100 % de las muestras que pusimos en estudio.
- En la interpretación de los resultados podemos ver que los primers utilizados en el presente trabajo son los específicos para el género de paracito de interés ya que obtuvimos que el total de muestras amplificadas nos dieron positivos a *Cysticercus Tenuicollis*.

### **13.2. RECOMENDACIONES**

- Conseguir los conocimientos primordiales sobre los diferentes temas de parasitología e identificación molecular.
- Realizar una adecuada inspección post-mortem de los animales faenados en las diferentes empresas de rastro que funcionan en el Ecuador.
- Implementar campañas de desparasitación como cuidado profiláctico en animales de compañía para evitar el desencadenamiento de una zoonosis.

## 14. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO/FAO/OIE Guidelines for the Surveillance, Prevention, and Control of Taeniosis/Cysticercosis. OIE. 2005;: p. 139.
2. Kara M., Dođanay A. Investigation of antigenic specificity against *Cysticercus tenuicollis* cyst fluid antigen in dogs experimentally infected with *Taenia hydatigena*. Turk J Vet Anim Sci. 2005; 29: p. 835–840.
3. Jepson P., Hinton M. An inquiry into the causes of liver damage in lambs. Vet Rec. 1986; 118: p. 584–587.
4. Hajibabaei M. SGA,HPD,HDA. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trends Genet. 2007; 23: p. 167–172.
5. Hebert P.D., Gregory T.R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. Syst Biol. 2005; 54: p. 852–859.
6. Will K.W., Mishler B.D., Wheeler Q.D. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. Syst Biol. 2005; 54: p. 844–851.
7. Kedra A.H., Tkach V.V., Swiderski Z., Pawłowski Z. Intraspecific variability among NADH dehydrogenase subunit 1 sequences of *Taenia hydatigena*. Parasitol Int. 2001; 50: p. 145–148.
8. Lavikainen A., Haukisalml V., Lehtinen M.J., Henttonen H., Oksanen A., Meri S. A phylogeny of members of the family Taeniidae based on the mitochondrial *cox1* and *nad1* gene data. Parasitology. 2008; 135: p. 1457–1467.
9. Okamoto M., Agatsuma T., Kurosawa T., Ito A. Phylogenetic relationships of three hymenolepidid species inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. Parasitology. 1997; 115: p. 661–666.
10. Zhang L., Hu M., Jones A., Allsopp B.A., Beveridge I., Schindler A., Gasser R.B. Characterization of *Taenia madoquae* and *Taenia regis* from carnivores in Kenya using genetic markers in nuclear and mitochondrial DNA, and their relationships with other selected taeniids. Mol Cell Probes. 2007; 21: p. 379–385.
11. Zeybek H. Samsun yöresi koyun ve kuzularında paraziter fauna saptama çalışmaları Ankara. Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 1980; 27: p. 215-236.
12. Öge H, Kalınbacak F, Gıcık Y, et al. Ankara yöresinde kesilen koyun, keçi ve sığırlarda bazı metasestodların (Hidatid kist, *Cysticercus tenuicollis* , *Cysticercus bovis* ) yayılışı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 1998; 43: p. 123-130.
13. Sarımehmetođlu HO, Gönenç B, Pişkin Ç, et al. Koyun, keçi, sığır ve mandalarda *Cysticercus tenuicollis* 'en yayılışı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 1993; 40: p. 488–496.

14. Değer S, Biçek K. Tatvan belediye mezbahasında kesilen koyun, keçi ve siğirlarda larva cestodiosis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2005; 16: p. 45–47.
15. Yıldırım A, Iça A, Beyaz L, Atasaver A. Bir kuzuda akut hepatitis cysticercosa ve pneumonitis cysticercosa: olgu sunumu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 2006; 30(2): p. 108-111..
16. Utuk AE, Piskin FC. Detección molecular y caracterización de un aislado de cabra de *Taenia hydatigena* en Turquía. *Sci World J*. 2012; 2: p. 1–4.
17. Gasser RB, Zhu X., McManus DP. secuencias de la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa y de la subunidad I de la citocromo c oxidasa comparadas para miembros del género *Taenia* (Cestoda). *Int J Parasitol*. 1999; 29: p. 1965-1970.
18. Hustead S., Williams J. Estudios de permeabilidad en metacestodos de taeniid: I. Captación de proteínas por etapas larvianas de *Taenia taeniaeformis* , *T. crassiceps* y *Echinococcus granulosus*. *J Parasitol*. 1977;; p. 314–321.
19. Mills GL, Coley SC, Williams JF. Composición química de gotitas de lípidos aisladas de larvas de *Taenia taeniaeformis*. *J Parasitol*. 1983; 69: p. 850–856.
20. Rostami S., Salavati R., Beech RN, Babaei Z., Sharbatkhori M., Baneshi M., Hajjalilo E., Shad H., Harandi M. Caracterización molecular y morfológica de la tenia *Taenia hydatigena* (Pallas, 1766) en ovejas de Irán. *J Helminthol*. 2015; 89: p. 150-157.
21. González H. Pérdidas económicas producidas por las parasitosis de los rumiantes. 1982..
22. Frontera, E., Bravo, D., Blanco, J., Herrador, P., Calero, R., Serrano, F., Pérez, J., Reina, D. Las Parasitosis Porcinas y sus Repercusiones Económicas. [Online].; 2012. Available from: <http://www.ivis.org/journals/suis/87/1.pdf>.
23. Quiroz, H. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. 1st ed. México, DF: Trillas,; 1984.
24. Organización Mundial de Sanidad Animal. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. (OIE). 2008.; 2: p. 1;8-9.
25. Moreno, G. 2003. Higiene e inspección de carnes. Bases científicas y legales de los dictámenes de matadero. Díaz de Santos S.A. ; Vol. II.
26. Cordero del campillo, M.; Rojo Vázquez, F. 1999. Parasitología Veterinaria. 1st ed. Madrid, España.: Me Graw Hill edit..
27. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. (IBUNAM). [Online].; 2006 [cited 2020 12 30. Available from: .
28. Quiroz, H.; Figueroa, J.; Ibarra, F.; López, M. Epidemiología de Enfermedades Parasitarias en Animales Domésticos. 1st ed.: s.l. México, DF. s.e.; 2011.

29. Fernández, C. Guía para el Equipo de Salud, Argentina. [Online].; 2012 [cited 2021 1 05]. Available from: [http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/guia-medica\\_hidatidosis.pdf](http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/guia-medica_hidatidosis.pdf).
30. Velasco, L. Madrid. Neografis. [Online].; 1978. [cited 2021 01 05]. Available from: [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1978\\_19.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1978_19.pdf).
31. Hanse, J.; Perry, B. Addis Ababa, Etiopia. [Online].; 1994. [cited 2021 01 06]. Available from: <mailto:http://www.fao.org/wairdocs/ilri/x5492e/x5492e04.htm%232.6.3.2%20abdominal%20cysticercosis>.
32. Acha P, Sifres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Parasitosis. 2003.; III: p. 171-179.
33. Martínez, J.; Pérez, J.; Cámara, S.; Millán, Y.; Borge, C. Organismo de la Unidad Nacional de Ovinocultores (UNO). [Online].; 2014. [cited 2021 01 05]. Available from: [http://www.asmexcriadoresdeovinos.org/empezar/enfer\\_parasitarias.html#cisticercos](http://www.asmexcriadoresdeovinos.org/empezar/enfer_parasitarias.html#cisticercos).
34. Tsubota, K., Nakatsuji, S., Matsumoto, M., Fujihira, S., Yoshizawa, K., Okazaki, Y., Murakami, Y., Anagawa, A., Oku, Y. & Oishi, Y. Abdominal cysticercosis in a cynomolgus monkey. Veterinary Parasitology. 2009;; p. 339-341.
35. Payan-Carreira, R., Silva, F., Rodrigues, M. & dos Anjos Pires, M. Cysticercus tenuicollis vesicle in fetal structures: Report of a case. Reproduction in Domestic Animals. 2008; 43: p. 764– 76.
36. Junquera, P. CYSTICERCUS TENUICOLLIS, gusano cestodo parásito del ganado bovino, ovino y caprino. biología, prevención y control. 2013.
37. Mullis K. y F. Faloona. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology. 1987.; 155: p. 335-350.
38. Ferrer E. SABER Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente. [Online].; 2015 [cited 2021 01 28]. Available from: <http://www.redalyc.org/pdf/4277/427743080002.pdf>.
39. Yopez R, Caicedo N, Ríos H. [Online].; 2012 [cited 2021 02 22]. Available from: <http://grupobiotec.blogspot.com/p/marco-teorico.html>.
40. Partida L. Sección III. Análisis de Ácidos Nucleicos. 2016.
41. Cortazar A, Silva E. Métodos Físico - Químicos en Biotecnología. [Online].; 2004 [cited 2021 02 05]. Available from: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>.
42. Equipo y Laboratorio C.. Etapas de un Proceso PCR. [Online].; 2011 [cited 2021 01 28]. Available from: [https://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos\\_mo.php?it=16764](https://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=16764).



43. Giorgio E. Introducción al diseño de primers. [Online].; 2015 [cited 2021 02 09. Available from: <http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/claroline/backends/download.php?url=L0Z1bmRhbWVudG9zX3Rl83JpY29zX2RlX2xhX3JlYWNjafNuLnBkZg%3D%3D&cidReset=true&cidReq=BIOWINFO>.
44. Espinosa L.. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L., V. Souza y. o, D. F., México: Universidad Nacional, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ecología; 2007.
45. Contreras B.. Diseño de primers para PCR. [Online].; 2017 [cited 2021 01 30. Available from: [https://eead-csic-compbio.github.io/bioinformatica\\_estructural/node28.html](https://eead-csic-compbio.github.io/bioinformatica_estructural/node28.html).
46. Reece J. Khan Academy. [Online].; 2018. Available from: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcrelectrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>.
47. Loftus S. [Online].; 2018 [cited 2021 02 15. Available from: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Iniciador-o-cebador>.
48. Pinzón A. Bogota. [Online].; 2006 [cited 2021 02 10. Available from: <http://bioinf.ibun.unal.edu.co/cbib/estudiantes/1-07/primerDesign.pdf>.
49. Balagurasamy N GEP. [Online].; 2015 [cited 2021 02 12. Available from: [https://www.academia.edu/28667914/PRIMERS\\_DEFINICI%C3%93N\\_CRITERIOS\\_DE\\_SELECCI%C3%93N\\_Y\\_DISE%C3%91O](https://www.academia.edu/28667914/PRIMERS_DEFINICI%C3%93N_CRITERIOS_DE_SELECCI%C3%93N_Y_DISE%C3%91O).
50. 51. López M ea. Comparación de dos protocolos de extracción de ADN de Trypanosoma cruzi cultivados en medio axénico. Rev. Med. 2014.
51. Aram Ahmad Mohammed. Estudio molecular de Cysticercus tenuicollis de ovejas sacrificadas en la provincia de Sulaymaniyah, Irak. Revista de investigación veterinaria. 2020 May 12; 64(2).

## 15. ANEXOS

## Anexo 1.

**HOJA DE VIDA****1.- DATOS PERSONALES:**

**Nombre:** TORO MOLINA BLANCA  
MERCEDES.

Apellido Paterno Apellido Materno Nombres

**Lugar y fecha de Nacimiento:** Latacunga, 20 de noviembre de 1970

**Edad:** 50 años **Género:** Femenina

**Nacionalidad:** Ecuatoriana **Tiempo de Residencia en el Ecuador**

**(Extranjeros):**

**Dirección Domiciliaria:** Cotopaxi Latacunga La Matriz  
Provincia Cantón Parroquia

La Estación, Gnral Julio Andrade y Marco A.

Dirección

**Teléfono(s):** 032234418 0995272516  
Convencionales Celular o Móvil

**Correo electrónico:** blanca.toro@utc.edu.ec **Cédula de Identidad o Pasaporte:** 0501720999

**Tipo de sangre:** A+ **Estado Civil:** Soltera

**Personas con discapacidad:** N° de carné del CONADIS: NO POSEE

**INSTRUCCIÓN FORMAL:**

Nivel	Título	Institución de Educación Superior	Tipo	Número de Registro	Fecha de Registro
TERCER	DOCTORA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA	UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL	Nacional	1006-02283706	2002-1004
CUARTO	DIPLOMADO SUPERIOR EN ANESTESIOLOGIA Y CIRUGIA DE PEQUEÑAS ESPECIES	UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR	Nacional	1005-04-498652	2004-04-28

DIPLOMADO SUPERIOR EN MEDICINA Y MANEJO DE URGENCIAS EN PERROS Y GATOS	UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR	Nacional	1005-05-610370	2005-09-22
MAGISTER EN CLINICA Y CIRUGIA CANINA	UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR	Nacional	1018-14-86050818	2014-08-28
DIPLOMA SUPERIOR EN DIDACTICA DE LA EDUCACION SUPERIOR	UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI	Nacional	1020-12-86029975	2012-12-06
MAGISTER EN GESTION DE LA PRODUCCION	UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI	Nacional	1020-07-667220	2007-10-01

**DECLARACIÓN:** DECLARO QUE, todos los datos que incluyo en este formulario son verdaderos y no he ocultado ningún acto o hecho, por lo que asumo cualquier responsabilidad.  
Dra. Blanca Mercedes Toro Molina.

## Anexo 2.

### Hoja de vida



#### DATOS PERSONALES:

APELLIDOS : Ávila Rocha  
 NOMBRES : Christian Geovanny  
 FECHA DE NACIMIENTO : 20/02/88  
 EDAD : 32 años  
 TIPO DE SANGRE : O Positivo  
 ESTADO CIVIL : Soltero  
 CARGAS FAMILIARES : Ninguna  
 NACIONALIDAD : ecuatoriano  
 DOMICILIO ACTUAL : Quito, calle Balzar y Zumbagua casa S15-19  
 TELEFONO CELULAR : 0979037636  
 CEDULA : 1721792842  
 CORREO : [christian.avila2@utc.edu.ec](mailto:christian.avila2@utc.edu.ec)

#### ESTUDIOS REALIZADOS

Primaria : Escuela particular San Jorge.  
 Secundaria : Instituto Técnico Superior Cinco de Junio  
 Superior : Universidad Técnica de Cotopaxi (EGRESADO) proceso de titulación

#### TITULOS OBTENIDOS:

CONTADOR BACHILLER EN CIENCIAS DE COMENRCIO Y ADMINISTRACION

EGRESADO DE MEDICINA VETERINARIA

#### CURSOS Y CERTIFICACIONES REALIZADOS

Licencia de conducir tipo C 2013  
 Jornadas académicas de la carrera de Medicina Veterinaria de la UTC 2016  
 Certificado campaña masiva de vacunación antirrábica 2018  
 Seminario internacional de nutrición animal 2018  
 1er Simposio de introducción a las especialidades de pequeños animales UCE 219  
 Certificado por la participación en la feria interna UTCina 2019  
 Certificado I Congreso Binacional Ecuador-Perú “AGROPECUARIA, MEDIO AMBIENTE Y TURISMO 2019”  
 LIII Curso Practico “PRODUCCIÓN Y REPRODUCCIÓN PORCINA” 2020  
 English language certificate (C.E.F.R. –B1) 2020

#### EXPERIENCIA LABORAL

**Hacienda "SAMARA"**

Sr. Nelson Anguisaca : 0999940432

Practicas preprofesionales

**Pelú-Can Veterinaria**

Sr Carlos Guamán Paredes

Encargado Consultorio veterinario : 0991908962

Desde 25-06-2020 hasta la fecha

**Médico Veterinario Tratante**

Srta. María Fernanda Quezada : 0988498353

**REFERENCIAS PERSONALES**

MVZ. Vannessa Andrade : 0998279251

St. Katy Avila : 0990840775

MVZ. Geovanny Alvares ; 0995616574

## Anexo 3.

Bitácora de recolección de Quistes de <i>Cysticercus Tenuicollis</i> en Ovinos						
Fecha	Introduccion	Procedencia	Sexo	Edad	Total, de muestras recolectadas por día	Total, animales faenados
1/12/2020	Narcisa Gallardo	Feria/Salcedo	M	2 años	3	23 animales
	Discarbis	Rancho San Miguel/El chaupi	H	2 años		32 animales
			H	2 años		
3/12/2020	Marina Tapia	Marina Tapia/El Chaupi	M	2 años	2	8 animales
			M	2 años		
4/12/2020	Martha Tapia	Feria/Saquisilí	M	2 años	2	13 animales
			H	1 a 6 m		
	Juan Cuñas	Feria/Toacaso	M	2 años	2	3 animales
			M	1 a 6 m		
	Ana Masabanda	Feria/Toacaso	H	2 años	1	2 animales
	Patricia Changoluisa	Beaterio/Guamaní	H	2 años	2	9 animales
H			3 años			
11/12/2020	Sandra Reyes	Feria/Salcedo	H	2 años	2	10 animales
			M	1 año		
	Discarbis	Rancho San Miguel/El chaupi	H	3 años	6	55 animales
			M	1 año		
			H	2 años		
			H	2 años		
			M	2 años		
			H	2 años		
	Paco Bravo	Paco Bravo/La moya alta	M	2 años	4	31 animales
			M	2 años		
			M	2 años		
H			2 años			
		Total, de muestras recolectadas			24 muestra	
		Total, de animales faenados				186 animales

Nombre: Dr. Cristian Navarro  
 Jefe del departamento de Médicos Veterinarios de la EMRAQ-EP  
 C.C: 0502975287  
 Teléfono: 099-503-3025

## Anexo 4.



COTIZACIÓN #: DGI-STOX-19-002

FECHA: 04 diciembre de 2019

VALIDEZ: 30 días

ATENCIÓN: Mercedes Toro  
 E-MAIL: [blanca.toro@ufc.edu.ec](mailto:blanca.toro@ufc.edu.ec)  
 TELÉFONO: -  
 DIRECCIÓN: -

Estimada Dra. Toro,

Por medio de la presente, le ofrecemos nuestros servicios de Secuenciación Sanger de *Toxocara canis*.

Nos es grato poner a su consideración la siguiente cotización:

Descripción	Costo por lote de 10 muestras	No. de muestras	Total
Extracción de ADN	\$ 69.00	100	\$ 690.00
PCR de Amplificación	\$ 46.00	100	\$ 460.00
Electroforesis en Agarosa	\$ 38.00	100	\$ 380.00
Purificación y Secuenciación SANGER (fwd y rev)	\$ 134.00	100	\$ 1340.00
<b>Total</b>	<b>\$ 299.00</b>	<b>100</b>	<b>\$ 2990.00</b>

Detalles adicionales:-

- Los precios incluyen IVA.
- El servicio se cotiza por lotes de 10 muestras. Si el cliente no entrega lotes en múltiplos de 10, se cobrará el valor de la fracción a la que corresponda (Ej. si se entregan 11 muestras, se cobrará por el valor del lote de 20 muestras).
- El costo por lote se mantiene en los grupos de 10 a 50 muestras (en un solo pedido).
- Se otorga un descuento del 5% en grupos de 60 a 100 muestras, y del 10% en grupos de muestras mayores a 100 (en un solo pedido).

Al contratar los servicios especificados en este documento, el cliente declara haber leído, entendido y aceptado los términos y condiciones que se adjuntan a esta cotización.

Atentamente,

**Gabriel Iturralde**  
 Coordinador de Laboratorios de Investigación UDLA  
 Servicio de Análisis de Metales



**SERVICIOS ESPECIALIZADOS DE LABORATORIO**

**LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN**



## TÉRMINOS Y CONDICIONES DE SERVICIOS

1. Las muestras deben ser entregadas en los Laboratorios de Investigación de UDLA (los Laboratorios). El contratante asume toda la responsabilidad sobre la recolección, almacenamiento y transporte de las muestras hasta ser entregadas en los Laboratorios. Los costos generados por cualquiera de estos procedimientos serán asumidos por el contratante.
2. El contratante suministrará los primers para la amplificación y lectura de las muestras. Por tanto, la UDLA no tiene responsabilidad sobre el diseño, síntesis o eventos no contemplados que dependan de la calidad de los primers, tanto en la amplificación de PCR, como la lectura subsecuente en la secuenciación.
3. Para realizar el pedido, el contratante debe completar y enviar el "Formulario de Solicitud de Servicio" que se adjunta a esta cotización. Enviarlo a la dirección [laboratorio.investigacion@udla.edu.ec](mailto:laboratorio.investigacion@udla.edu.ec)
4. Para el análisis molecular solicitado se requiere la entrega de muestras de la siguiente manera:
  - El cliente debe entregar el tejido diseccionando, empaquetado individualmente en microtubos de 1,5ml, conservado en etanol al 70% (NUNCA EN FORMOL).
  - Las muestras deben ser preservadas en cadena de frío de 20°C.
  - Cada tubo con muestra debe estar claramente identificado y debe coincidir con los códigos consignados en el "Formulario de Solicitud de Servicios".
5. Se recibirán muestras hasta las 4pm del día martes de cada semana, las cuales serán procesadas el día miércoles. Los resultados serán enviados al correo electrónico del contratante hasta quince días laborables después del día que se procesaron las muestras.
6. El contratante debe contar con toda la normativa legal respecto a las regulaciones sobre las muestras o la información enviada. La UDLA asume, de buena fe, que todas las muestras recibidas cuentan con el respaldo legal obtenido por el contratante en materia de permisos de obtención, manipulación y demás requerimientos establecidos en las normativas de la legislación ecuatoriana.
7. CONFIDENCIALIDAD: Los resultados obtenidos se tratarán como información confidencial. La UDLA ratifica que las muestras y resultados de los servicios tienen toda la autoría intelectual del contratante. Ya que los datos son anónimos, si no se recibe por vía oficial ninguna indicación especial por parte del contratante, las placas obtenidas del análisis podrán ser desechadas pasados cuatro semanas después del envío de resultados.
8. ENVÍO DE RESULTADOS: se enviará la información **ESTRICTA Y ÚNICAMENTE** al correo electrónico suministrado por el contratante. De requerirse una copia, se deberá solicitar desde el correo electrónico de quien contrata el servicio.
9. Confirmación y aceptación de la cotización, los términos y condiciones de los servicios, por parte de los solicitantes.

FRMA

Nombre

Ci:

NOTA: Enviar la cotización y los términos y condiciones de los servicios de análisis de metales firmados, conjuntamente con las muestras, para poder iniciar el servicio.

LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN - UDLA

Universidad de Las Américas - Quito, Ecuador - Sede Quito - Bloque 5

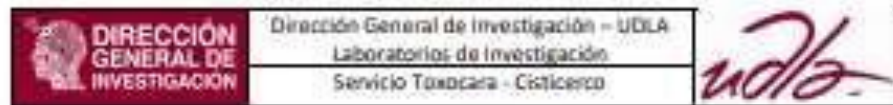
Teléfono +593 (2) 3981000 ext. 2584

[laboratorio.investigacion@udla.edu.ec](mailto:laboratorio.investigacion@udla.edu.ec)

Pág. 2 de 2



## Anexo 5.





## I. EXTRACCIÓN ORGÁNICA DE ADN: A PARTIR DE FENOL-CLOROFORMO

1. Diseccionar 2mm de la muestra de tejido y transferirla a un nuevo tubo de 1.5 mL.
2. Añadir 500 µL de Buffer de Extracción y macerar con una punta de pipeta o pistilo por 5 minutos al interior de un bloque frío.
3. Realizar vortex por 1 minuto y colocar 5 µL de Proteinasa K (20 mg/mL).
4. Incubar las muestras a 56°C toda la noche en agitación, a 300 rpm.
5. Sacar las muestras del termobloque, dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir 750 µL de Fenol/Cloroformo/Isoamílico y realizar vortex hasta formar una emulsión lechosa.
7. Centrifugar 10 minutos a 4°C a máxima velocidad. Transferir toda la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1.5 mL.
8. Añadir a esa fase, 500 µL de Cloroformo: Isoamílico, homogenizar en vortex.
9. Centrifugar 10 minutos a 4°C a máxima velocidad. Transferir toda la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1.5 mL.
10. Añadir al nuevo microtubo, 400 µL Isopropanol 100% y 40 µL de NaCl 3M.
11. Agitar bien y dejar reposar a temperatura ambiente por dos horas.
12. Centrifugar por 30 minutos a 4°C a 15000 rpm.
13. Descartar el sobrenadante con mucho cuidado de no alterar el pellet.
14. Agregar 1000 µL de Etanol 70% helado y centrifugar por 15 min a 15000 rpm.
15. Descartar el sobrenadante y dejar secar.
16. Re suspender en 40 µL de Agua Milli Q o TE e incubar la muestra a 37°C por dos horas.
17. Cuantificar la concentración de ADN.

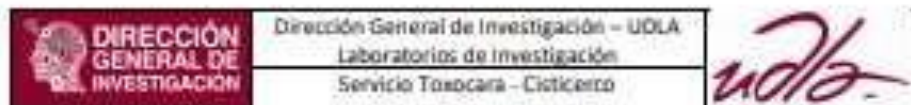
## II. CUANTIFICACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE EXTRACTOS DE ADN:

Cuantificar mediante espectrofotómetro – nanodrop las concentraciones de ADN obtenidos en el procedimiento anterior, y diluir hasta alcanzar una concentración final de 5 ng/µL, almacenando ambas muestras (ADN concentrado y ADN diluido):

DILUCIONES TOXOCARA / CISTICERCO			
VOLÚMEN FINAL (µL)			20
CONCENTRACIÓN FINAL (ng/µL)			5
ID MUESTRA	C. INIAL	V. ADN	V. AGUA
TD01	21	4,76	15,24
TD02	128,5	0,78	19,22
TD03	189,7	0,53	19,47
TD04	42,8	2,34	17,66
TD05	55,4	1,81	18,19
TD06	86,8	1,15	18,85
TD07	201,1	0,50	19,50

 <b>DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN</b>	Dirección General de Investigación – IIFE A		
	Laboratorios de Investigación		
	Servicio Toxicara - Cisticero		

T008	99	1,01	18,99
T009	18,6	5,38	14,62
T010	130,6	0,77	19,23
T011	159,7	0,63	19,37
T012	61,6	1,62	18,38
T013	55,1	1,81	18,19
T014	89,1	1,12	18,88
T015	224,8	0,44	19,56
T016	222,3	0,45	19,55
T017	80,6	1,24	18,76
T018	54,8	1,82	18,18
T019	237,5	0,42	19,58
T020	143,8	0,70	19,30
C001	73,3	1,36	18,64
C002	212,8	0,47	19,53
C003	305,4	0,33	19,67
C004	215,5	0,46	19,54
C005	150	0,67	19,33
C006	275,5	0,36	19,64
C007	126,2	0,79	19,21
C008	273,5	0,37	19,63
C009	236,5	0,42	19,58
C010	109,3	0,91	19,09
C011	136,3	0,73	19,27
C012	73,1	1,37	18,63
C013	124,8	0,80	19,20
C014	155,2	0,64	19,36
C015	107	0,93	19,07
C016	76,8	1,30	18,70
C017	101,6	0,98	19,02
C018	95,9	1,04	18,96
C019	109,3	0,91	19,09
C020	126,4	0,79	19,21
CT021	15,2	6,58	13,42
CT022	47,5	2,11	17,89
CT023	42,9	2,33	17,67
CT024	13,9	7,19	12,81
CT025	59,7	1,68	18,32
CT026	71,2	1,40	18,60
CT027	10,8	9,26	10,74
CT028	53,4	1,87	18,13
CT029	12,3	8,13	11,87
CT030	29,7	3,37	16,63



CT031	42,7	2,34	17,66
CT032	41,5	2,41	17,59
CT033	48,5	2,06	17,94
CT034	37	2,70	17,30
CT035	12,9	7,75	12,25
CT036	60,8	1,64	18,36
CT037	55,3	1,81	18,19
CT038	47,3	2,11	17,89
CT039	71,4	1,40	18,60
CT040	22,2	4,50	15,50

### III. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS POR PCR

1. Encambiar los componentes para una PCR bajo las siguientes condiciones:

COMPONENTE	C. Inicial	C. Final	Vol. 1 Rx (µL)	Vol. 60 Rx (µL)
Agua MQ			8,8	528
Buffer	10X	1X	1,5	90
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	0,45	27
dNTP Mix	10 mM	0,2	0,3	18
Primer Fw	20 µM	0,5 µM	0,375	22,5
Primer Rv	20 µM	0,5 µM	0,375	22,5
Taq Polimerasa*	10 U/µL	2 U/µL	0,2	12
ADN	5 ng/µL	1 ng/µL	3	
Volumen Final			15	

\*. Platinum® Taq DNA polymerase, Ref: 10966-034

2. Colocar las muestras en el termociclador, estableciendo los siguientes parámetros:

Paso	T (°C)	Tiempo	No. Ciclos
Denaturación Inicial	94.0	00:02:00	1
Denaturación	94.0	00:00:30	35
Annealing	58.0	00:00:30	
Elongación	72.0	00:01:00	
Elongación final	72.0	00:05:00	1
Reposo	4.0	00:10:00	1

### IV. VERIFICACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN

Verificar la amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR Safe.

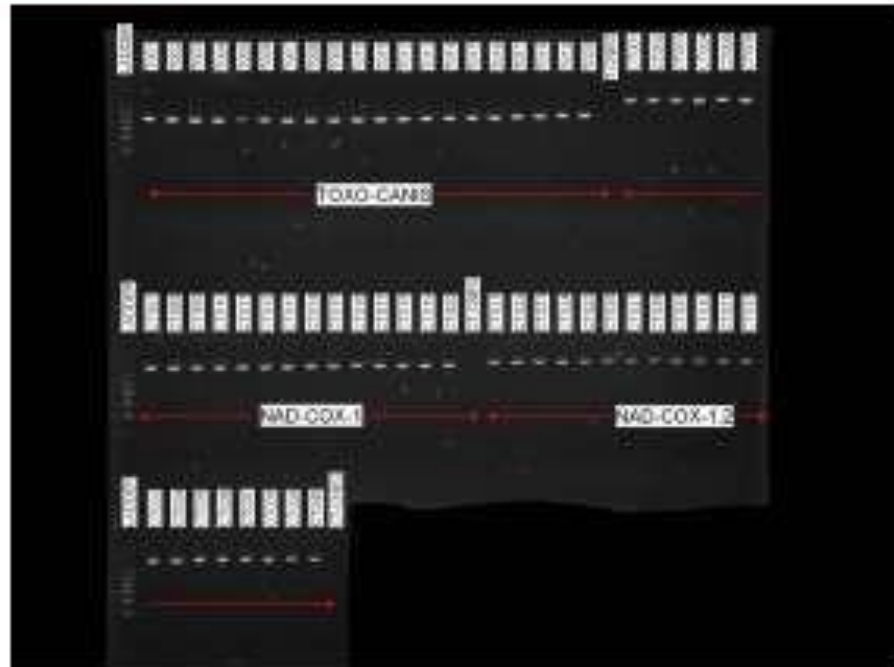
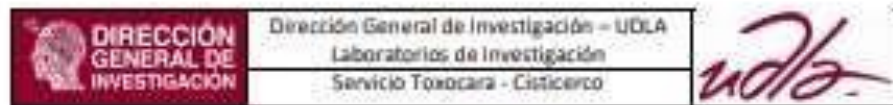


Fig. 1: Resultados de amplificación de muestras: T001 - T020 con el par de primers TOXO-CAMS Fw/Rv, CT001 - CT020 con el par de primers NAD-COX1 Fw/Rv, C1001 - C1040 con el par de primers NAD-COXL2 Fw/Rv. En cada caso se corrió un control negativo para verificación de contaminación.

## V. SECUENCIACIÓN

Purificar los productos de PCR mediante purificación enzimática; y realizar la secuenciación Sanger, matriz BigDye 3.1 según recomendaciones del fabricante.

## Anexo 6.

applied biosystems

QUICK REFERENCE

## BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

Catalog Numbers 4337454, 4337455, 4337456, 4337457, 4337458

Pub. No. MAN0015666 Rev. A.0

**Note:** For safety and biohazard guidelines, see the "Safety" appendix in the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit User Guide (Pub. no. 4337035). Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

This document is intended as a benchtop reference for experienced users of the BigDye™ Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit (Cat. Nos. 4337454, 4337455, 4337456, 4337457, and 4337458). See the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit User Guide (Pub. No. 4337035) for detailed instructions and troubleshooting.

### Product description

The BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit provides pre-mixed reagents for Sanger sequencing reactions.

The kit includes BigDye™ Terminator v3.1 & v3.1 SX Sequencing Buffer, which is specifically optimized for use with the BigDye™ Ready Reaction mixes.

The kit has been formulated to deliver robust performance across a wide variety of DNA sequences while maximizing readlengths. When used in combination with Minor Variant Finder Software, the kit can also be used to detect variants as low as 5% in a sample (see Minor Variant Finder Software User Guide (Pub. No. MAN0014835)).

### Workflow



### Prepare templates

#### Template quantity

Table 1. Recommended DNA quantities

DNA sample	Quantity
PCR product:	
• 100-200 bp	1-3 ng
• 200-500 bp	3-10 ng
• 500-1000 bp	5-20 ng
• 1000-2000 bp	10-40 ng
• >2000 bp	20-50 ng
Single-stranded DNA	25-50 ng
Double-stranded DNA	150-300 ng
Coated, BAC	0.5-1.0 µg
Bacterial genomic DNA	2-3 µg

Sequencing templates should be purified before use in sequencing reactions. See <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/dna-extraction.html> for a range of suitable kits.

### Perform cycle sequencing

#### Set up the sequencing reactions

**IMPORTANT!** Protect dye terminators from light. Cover the reaction mix and sequencing plates with aluminum foil before use.

1. Completely thaw the contents of the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and your primers and store on ice.
2. Vortex the tubes for 2 to 3 seconds, then centrifuge briefly (2 to 3 seconds) with a benchtop microcentrifuge to collect contents at the bottom of the tubes.
3. Label microcentrifuge tubes "forward" and "reverse" and add components as indicated:

**IMPORTANT!** Change pipette tips after each transfer.

**IMPORTANT!** For control reactions use 4 µL of the control primers (0.8 pmol/µL) in both 10 µL and 20 µL reactions.

Component	Standard reaction (20 µL) <sup>(1)</sup>		
	Quantity per reaction	Example Forward	Example Reverse
BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 µL	8 µL	8 µL
Forward primer (3.2 µM)	3.2 pmol	1 µL	—
Reverse primer (3.2 µM)	—	—	1 µL
Deionized water (RNase/DNase-free)	Varies based on template and primer volumes	9 µL	9 µL
Template	See "Template quantity" on page 1	2 µL <sup>(2)</sup> /3 µL <sup>(3)</sup>	2 µL <sup>(2)</sup> /3 µL <sup>(3)</sup>
<b>Total volume</b>	<b>20 µL</b>	<b>20 µL</b>	<b>20 µL</b>

<sup>(1)</sup> Reactions can be scaled to 10 µL for 384-well plates. Keep the primer concentration and volume the same as in 20 µL reactions.

<sup>(2)</sup> e.g., 100-200 bp of dsDNA.

<sup>(3)</sup> Concentration of template may affect volume. If template volume differs, please adjust the volume of water in the reaction mix.

**NOTE:** Store on ice and protected from light.

4. Seal the plate with MicroAmp™ Clear Adhesive Film.
5. Vortex the plate for 2 to 3 seconds, then centrifuge briefly in a swinging bucket centrifuge to collect contents to the bottom of the wells (5 to 10 seconds) at 1,000 × g.

**NOTE:** Bubbles may be present within the wells, but do not adversely affect the reaction.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ThermoFisher  
SCIENTIFIC

Anexo 7.


**Invitrogen Custom Primers**

*Certificate of Analysis*

GUSTAVO VENTURAS  
#228110  
Order Number:  
FO: GV-PRIMERS-13-140  
Order Date: 16/05/2020

<b>Line 97 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 12/16/2020</b>		Primer Number:	425686A01
Primer Name:	Nad-Cox1-F	Primer Length:	26
Researcher:	B.TORO	Scale of Synthesis:	200 N
Sequence (5' to 3'):	(DNA) - CAR TTT CGT AAG GC		
Molecular Weight ( $\mu\text{g}/\mu\text{mole}$ ):	1,090.5		
Millimolar Extinction Coeff.: (OD/ $\mu\text{mol}$ ):	301.7		
<b>Purity</b>	<b>Desalt</b>		
% GC Content:	43		4.07
$T_m$ (1M Na <sup>+</sup> ):	68		1,225.46
$T_m$ (50 mM Na <sup>+</sup> ):	67		132.5
Notes:			
<b>Line 98 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 12/16/2020</b>		Primer Number:	425686A02
Primer Name:	Nad-Cox1-REV	Primer Length:	26
Researcher:	B.TORO	Scale of Synthesis:	200 N
Sequence (5' to 3'):	(DNA) - CCA ATT TGY TGA AGT T		
Molecular Weight ( $\mu\text{g}/\mu\text{mole}$ ):	1,096.7		
Millimolar Extinction Coeff.: (OD/ $\mu\text{mol}$ ):	291.1		
<b>Purity</b>	<b>Desalt</b>	<b>OD's</b>	<b>2.79</b>
% GC Content:	35	<b><math>\mu\text{g}'s</math></b>	<b>1,334.84</b>
$T_m$ (1M Na <sup>+</sup> ):	86	<b>nmoles</b>	<b>181.6</b>
$T_m$ (50 mM Na <sup>+</sup> ):	64		
Notes:			
<b>Line 99 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 12/16/2020</b>		Primer Number:	425686A03
Primer Name:	Nad-Cox1.2-FWD	Primer Length:	27
Researcher:	B.TORO	Scale of Synthesis:	200 N
Sequence (5' to 3'):	(DNA) - AGT CCT GAT GCT TTT GGG TTC TAT GGA		
Molecular Weight ( $\mu\text{g}/\mu\text{mole}$ ):	1,128.4	$\mu\text{g}$ per OD:	38.97
Millimolar Extinction Coeff.: (OD/ $\mu\text{mol}$ ):	287.5	nmoles per OD:	3.48
<b>Purity</b>	<b>Desalt</b>	<b>OD's</b>	<b>51.28</b>
% GC Content:	44	<b><math>\mu\text{g}'s</math></b>	<b>1,485.55</b>
$T_m$ (1M Na <sup>+</sup> ):	89	<b>nmoles</b>	<b>178.5</b>
$T_m$ (50 mM Na <sup>+</sup> ):	68		
Notes:			

Page 1 of 2 (printed 12/20/2020 at 19:55:56)  
 For Research Use Only. Not for use in Diagnostic procedures.



### Anexo 8.



Foto 1. Preparación de la muestra en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad Técnica de Cotopaxi



Foto 2. Entrega de muestras al Laboratorio d investigación ULDA