



UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“TIPIFICACIÓN GENÉTICA DE *Toxocara Canis* EN LA ZONA URBANA DE
LATACUNGA”**

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

Autora:

Peñaherrera Ordóñez María Victoria

Tutor:

MVZ. Sambache Tayupanta Juan Eduardo, MSc.

Latacunga - Ecuador

Agosto 2019

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

“Yo PEÑAHERRERA ORDÓÑEZ MARÍA VICTORIA, con C.C. 0503623001 declaro ser autor (a) del presente proyecto de investigación: “TIPIFICACIÓN GENÉTICA DE *Toxocara canis* EN LA ZONA URBANA DE LATACUNGA”, siendo MVZ. Juan Eduardo Sambache Tayupanta MSc, tutor 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.

.....
María Victoria Peñaherrera Ordóñez

C.C. 0503623001

.....
MVZ. Juan Eduardo Sambache Tayupanta, MSc.

C.C. 1721796751

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 María Victoria Peñaherrera Ordóñez, identificada/o con C.C. 0503623001, de estado civil **soltera** y con domicilio en Latacunga, a quien en lo sucesivo se denominará **LA/EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Ing. MBA. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector 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.- LA/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 “**Tipificación genética de *Toxocara canis* en la zona urbana de Latacunga**” la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad según las características que a continuación se detallan:

Historial académico.- Septiembre 2014 – Agosto 2019

Aprobación HCD.- 4 de Abril del 2019

Tutor.- MVZ. Juan Eduardo Sambache Tayupanta. MSc.

Tema: “Tipificación genética de *Toxocara canis* en la zona urbana de Latacunga”

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, **LA/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 **LA/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.
- f) 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 **LA/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 **LA/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 **LA/EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA.- El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en las 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 22 días del mes de julio del 2019.

María Victoria Peñaherrera Ordóñez
EL CEDENTE

Ing. MBA. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez
EL CESIONARIO

Latacunga, 22 de julio del 2019

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

“Tipificación genética de *Toxocara canis* en la zona urbana de Latacunga”, de Peñaherrera Ordóñez María Victoria, de la carrera de 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.

MVZ. Juan Eduardo Sambache Tayupanta MSc.

AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Lectores del Proyecto de Investigación con el título:

“Tipificación genética de *Toxocara canis* en la zona urbana de Latacunga”, de Peñaherrera Ordóñez María Victoria, de la carrera de 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.

Lector 1 (Presidente/a)
Dr. Chacón Marcheco Edilberto, PhD.
CC: 1756985691

Lector 2
Dr. Garzón Jarrín Rafael Alfonso, PhD.
CC: 0501097224

Lector 3 (Secretario/a)
Dra. Toro Molina Blanca Mercedes, Mg.
CC: 0501720999

AGRADECIMIENTO

El momento de decir adiós a la Universidad ha llegado, parece que fue ayer que inquieta y preocupada pise por primera vez este edificio con incertidumbre y agitada de curiosidad; mis ojos recorren ésta casa en que en cinco años me parece que conozco ya todos sus rincones.

Pero como nada es perenne debo cambiar estos rincones y vivencias por otros sitios donde encontraré nuevas experiencias y conocimientos que afinquen los métodos ya aprendidos.

Permítanme decir Dios le pague a todos los docentes de quienes aproveché sus aptitudes, mención especial a los Doctores: Edilberto Chacón, Mercedes Toro, Eduardo Sambache, Rafael Garzón; y las Ingenieras: Margoth Martínez, Lucía Silva y Maira Martínez; de quienes he recibido desinteresadamente un trato muy especial; a mi familia y amigas por apoyarme en todo momento evitando que me dé por vencida; mi agradecimiento eterno a Dios, ya que sin su poderosa protección habría sido en vano todo mi sacrificio.

DEDICATORIA

Dedicación, esfuerzo y fortaleza fueron valores que debieron estar presentes en innumerables momentos para culminar esta etapa para convertirme en profesional.

Estos dones me inculcaron quienes estuvieron a mi lado en todo momento infundiendo en mí, valor, responsabilidad y confianza, razón por la que este trabajo dedico a ellos: mi familia, mi tía Lucy, mi madre; a mi tutor Dr. Eduardo Sambache; y Dra. Mercedes Toro quienes más que docentes se convirtieron en amigos al brindarme su apoyo incondicional en la realización de este proyecto; y en especial al Todopoderoso, cómplices desinteresados a quienes debo lo que hoy soy.

María Victoria Peñaherrera Ordóñez

RESUMEN

La presente investigación se ejecutó en la Provincia de Cotopaxi, zona urbana del Cantón Latacunga, el objetivo fue realizar la Tipificación genética de *Toxocara canis*. Se recolectaron muestras de materia fecal de 60 caninos domésticos, de ambos sexos, con propietario identificado. La población en estudio se distribuyó en un rango de edad de 2 meses hasta los 9 años. Se tomaron 3gr de heces frescas, las cuales fueron procesadas en el laboratorio de la Clínica Veterinaria Mundo Animal bajo la técnica de flotación de Sheather. Resultaron positivos 11 caninos, detectándose la presencia de huevos de *Toxocara canis*, (18.33%) de prevalencia, según el análisis microscópico mediante la aplicación de la técnica cualitativa (Cruces) de detección de huevos de parásitos. Se desparasitó vía oral a toda la población de canes en estudio, teniendo en cuenta las diferentes condiciones de vida y el inadecuado control profiláctico, se observó la expulsión de parásitos en etapa adulta en 21 caninos, lo que representa el 35% de presencia del parásito, basado en el diagnóstico macroscópico de materia fecal. En 9 caninos de 2 a 4 meses de edad se realizó una desparasitación sin previo análisis fecal y como resultado se observó la expulsión de parásitos en el total de animales. El 100% de estos parásitos fueron identificados como *Toxocara canis* basándose en las características morfológicas que presentaron. Se determinó que la técnica microscópica no es totalmente efectiva si existe una baja carga parasitaria o los parásitos se encuentran cursando una diferente etapa evolutiva. Para la tipificación molecular del parásito adulto se procedió a realizar la disección siguiendo un protocolo estandarizado para la familia *Ascarididae* que contempla *Toxocara canis*, preservando la integridad de la muestra biológica para garantizar la extracción, valoración y cuantificación del ADN al evitar la posible interferencia de los órganos reproductores durante el proceso de amplificación del ADN. De las 30 muestras en las que se identificó morfológicamente como *Toxocara canis*, solo 24 fueron confirmadas como positivas mediante PCR (80%), observándose una correcta amplificación de bandas, el 20% restante pudieran corresponder a otros tipo de *Toxocara*, posiblemente *Toxocara cati*. El estudio demuestra la alta especificidad en el diagnóstico al emplear herramientas moleculares.

Palabras clave: Parásitos gastrointestinales, identificación, PCR, marcadores moleculares

ABSTRACT

This research was carried out at Cotopaxi Province, in Latacunga urban area, the objective was to perform the *Toxocara canis* genetic classification. With identified owner, 60 domestic canines, both sexes, fecal matter samples, were collected. From 2 months to 9 years, age range, was the study population distributed of 3gr of fresh feces were taken, which were processed in the Laboratory of “Mundo Animal” Clinic Veterinary under the Sheather technique of flotation. Eleven canines were positive, detecting the presence of *Toxocara canis* eggs, which is (18.33%) of prevalence, according to the microscopic analysis by applying the qualitative technique (Crosses) to detect parasite eggs. The dogs population under study was dewormed orally, taking into account different living conditions and inadequate prophylactic control, the parasites expulsion in adult stage was observed in 21 canines, which represents 35% of the parasite's presence, based on the macroscopic diagnosis of fecal matter. In 9 canines from 2 to 4 months of age, deworming was performed without previous fecal analysis and as a result the parasite was expelled in the total number of animals, 100% of these parasites were identified as *Toxocara canis* based on the morphological characteristics they presented. It was determined that the microscopic technique is not fully effective if there is a low parasitic load or the parasites are in a different evolutionary stage. For the molecular typing of the adult parasite, the dissection was carried out following a standardized protocol for the Ascarididae family that includes *Toxocara canis*, guaranteeing the integrity of the biological sample to certify the extraction, titration and DNA quantification by avoiding the possible interference of the Reproductive organs during the DNA amplification process. From 30 samples in which *Toxocara canis* was morphologically identified, only 24 were confirmed as positive by PCR (80%), observing a correct amplification of bands, the remaining 20% could correspond to other types of *toxocara*, possibly *Toxocara cati*. The study demonstrates the high specificity in the diagnosis when using molecular tools.

Keywords: Gastrointestinal parasites, identification, PCR, molecular markers

ÍNDICE

1.	INFORMACIÓN GENERAL	1
1.1.	Título del Proyecto:	1
1.2.	Fecha de inicio:.....	1
1.3.	Fecha de finalización	1
1.4.	Lugar de ejecución:	1
1.5.	Facultad que auspicia:	1
1.6.	Carrera que auspicia:	1
1.7.	Proyecto de investigación vinculado:	1
1.8.	Equipo de Trabajo:	1
1.9.	Área de Conocimiento:.....	1
1.10.	Línea de investigación:.....	1
1.11.	Sub líneas de investigación de la Carrera:.....	1
2.	JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	2
3.	BENEFICIARIOS DEL PROYECTO	3
3.1.	Beneficiarios Directos	3
3.2.	Beneficiarios Indirectos	3
4.	EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
5.	OBJETIVOS.....	5
5.1.	Objetivo General.....	5
5.2.	Objetivos Específicos	5
6.	FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	5
6.1.	Toxocariasis.....	6
6.1.2.	Distribución	6
6.1.3.	Fisiopatología	6

6.1.4. Clasificación taxonómica de <i>Toxocara canis</i>	6
6.1.5. Características del parásito	7
Período de prepatencia.....	7
Período de patencia.....	7
Fases Infectantes y vías de transmisión.....	7
6.1.6. Descripción morfológica del parásito y huevo de <i>Toxocara canis</i>	7
6.1.6.1. Huevos	8
6.1.6.2. Larvas	9
6.1.6.3. Adultos	10
6.1.7. Ciclo de vida.....	10
6.1.8. Síntomas	11
6.1.9. Lesiones	12
6.1.10. Diagnóstico mediante técnicas de Laboratorio	12
6.1.10.1. Técnica Coprológica	12
Examen macroscópico.....	12
Examen microscópico.....	12
6.1.10.2. Técnicas cualitativas	13
6.1.11. Tratamiento.....	13
6.2. Diagnóstico Molecular de Parásitos	13
6.2.1. Métodos moleculares para tipificación	14
6.2.2. Métodos moleculares fenotípicos y genotípicos.....	14
6.2.2.1. PCR.....	15
Procedimiento de PCR	15
Diagnóstico de <i>Toxocara canis</i> por la técnica de PCR	16
Tipos de Técnicas	17

6.2.2.2.	La Taq polimerasa.....	19
6.2.2.3.	<i>Primers</i>	19
	Longitud del <i>primer</i>	19
	Temperatura y tiempo de elongación del <i>primer</i>	20
	Número de ciclos de amplificación	20
	Consejos generales para el diseño de <i>primers</i>	20
	Tipos de <i>primers</i> que existen para la identificación molecular de <i>Toxocara canis</i> .	20
7.	HIPÓTESIS	22
8.	METODOLOGÍA.....	22
8.1.	Localización y Duración del proyecto.....	22
8.2.	Unidades Experimentales	23
8.3.	Materiales, Equipos E Instalaciones.....	23
8.3.1.	Materiales	23
	Material Biológico.....	23
	Materiales de Laboratorio.....	23
	Materiales de Oficina.....	24
8.3.2.	Insumos.....	24
8.3.3.	Equipos	24
8.3.4.	Instalaciones	25
9.	DISEÑO DEL EXPERIMENTO	25
9.1.	Aislamiento de la Muestra Biológica	25
9.2.	Extracción de ADN	25
	9.2.1. A Partir de Fenol-Cloroformo	26
	9.2.2. A Partir de Resina Chelex	26
9.4.	Diseño y Selección de <i>Primers</i>	27

9.5. Amplificación de Fragmentos por PCR	28
9.6. Electroforesis	28
9.7. Secuenciación de ADN.....	29
10. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	29
10.1. Preparación de la Solución Azucarada	29
10.2. Realización de un Examen Coproparasitario mediante el Método Directo de Flotación de Sheather	29
10.3. Recolección de los ejemplares de <i>Toxocara canis</i>	30
10.4. Disección del parásito para garantizar la integridad del ADN.....	30
10.5. Extracción de ADN	31
10.5.1. A Partir de Fenol-Cloroformo	31
10.5.2. A Partir de Resina Chelex	32
10.6. Amplificación de Fragmentos por PCR	33
10.7. Secuenciación de ADN.....	34
11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	34
Determinación de la presencia de <i>Toxocara canis</i> en muestras fecales de caninos mediante un examen coproparasitario.....	34
Protocolo de disección ideal de la muestra biológica para conservar la integridad del ADN del parásito requerida para la identificación molecular.....	34
Identificación de <i>Toxocara canis</i> mediante la amplificación de una región conservada del genoma mediante el uso de <i>primers</i> específicos para reconocer el género parasitario	35
12. IMPACTOS.....	41
13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	42
13.1. CONCLUSIONES.....	42
13.2. RECOMENDACIONES	42
14. BIBLIOGRAFÍA	43

15. ANEXOS	49
Anexo 1	49
Anexo 2	50
Anexo 3	51
Anexo 4	54
Anexo 5	55
Anexo 6	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación Taxonómica de <i>Toxocara canis</i>	6
Tabla 2 Características y aplicaciones de las diferentes clases de PCR	18
Tabla 3 Condiciones de los componentes para una PCR	33
Tabla 4 Parámetros del procedimiento de PCR.....	33
Tabla 5 Códigos y peso de la muestra parasitaria	35
Tabla 6 Datos recolectados sobre los caninos en estudio.....	51

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Parásito adulto de <i>Toxocara canis</i>	8
Gráfico 2 Extremidad cefálica de <i>T.oxocara canis</i>	8
Gráfico 3 Huevos de <i>Toxocara canis</i>	9
Gráfico 4 Ciclo Biológico de <i>Toxocara canis</i>	11
Gráfico 5 Alineamiento básico de la secuencia de nucleótidos del amplificado del ITS 2 del ADNr de <i>Toxocara. canis</i>	22
Gráfico 6 Resultados de amplificación de las muestras TXC 1, TXC 3 y TXC 4, extraídas por el método de fenol-cloroformo.	36
Gráfico 7 Resultados de amplificación de las muestras TXC 5 a TXC 15, extraídas por el método de fenol-cloroformo.	36
Gráfico 8 Resultados de amplificación de las muestras TXC 16 a TXC 30, extraídas por el método de fenol-cloroformo.	37
Gráfico 9 Resultados de amplificación de las muestras TXC 22, TXC 24, TXC 26, TXC 27, extraídas por el método de fenol-cloroformo.	37
Gráfico 10 Resultados de amplificación de las muestras TXC 2, TXC 14, TXkC 15, TXC 22, TXC 27 extraídas por el método de resina Chelex	38

1. INFORMACIÓN GENERAL

1.1. Título del Proyecto:

“Identificación molecular del género de *Toxocara canis* a partir de muestra biológica en la Zona Urbana de Latacunga”

1.2. Fecha de inicio:

Marzo 2019

1.3. Fecha de finalización

Julio 2019

1.4. Lugar de ejecución:

Zona Urbana de Latacunga – Universidad de las Américas - Universidad Técnica de Cotopaxi

1.5. Facultad que auspicia:

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

1.6. Carrera que auspicia:

Medicina Veterinaria

1.7. Proyecto de investigación vinculado:

Determinación de enfermedades infecciosas y parasitarias de animales domésticos de la zona 3

1.8. Equipo de Trabajo:

Peñaherrera Ordóñez María Victoria (Anexo 1)

MVZ. Juan Eduardo Sambache Tayupanta MSc. (Anexo 2)

1.9. Área de Conocimiento:

64 Veterinaria

1.10. Línea de investigación:

Salud Animal

1.11. Sub líneas de investigación de la Carrera:

Microbiología, parasitología, inmunología y sanidad animal

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La parasitosis es una de las patologías más comunes tanto en animales como en humanos ocasionando alta morbilidad y mortalidad ya que los parásitos logran permanecer durante un tiempo largo en el organismo causando una alteración fisiológica del huésped ¹. Por tal razón es de suma importancia realizar la identificación clínica y molecular del parásito con el fin de prevenir y controlar la enfermedad.

El diagnóstico molecular es una técnica que se encuentra desarrollándose continuamente revolucionando el diagnóstico clínico mostrando gran impacto en las áreas de la salud ².

Los métodos para el estudio de parásitos son muy básicos por lo que existen marcadores genéticos en los espaciadores transcritos del ADN ribosomal haciendo posible identificar específicamente a nematodos de *Toxocara canis*, de igual forma el avance de técnicas moleculares ha dado paso a la aplicación de marcadores como ITS 1 para una PCR multiplex y microsatélites para el reconocimiento de especies de *Ascaris* ³.

La identificación molecular es una técnica que permite la generación de métodos de diagnóstico más alternativos, rápidos, sensibles y específicos para detectar, identificar y cuantificar a los patógenos que afectan al animal.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, es una técnica que consiste en la amplificación de los ácidos nucleicos, para así identificar secuencias de ADN de microorganismos con una aproximación diferente. Está caracterizada por ser altamente específica y poseer gran sensibilidad en comparación con otros métodos obteniendo los resultados en pocas horas; por consiguiente tiene un alto potencial de aplicación para el diagnóstico de agentes infecciosos ⁴.

La PCR consiste en la amplificación in vitro de un fragmento de ADN específico. Para llevar a cabo el experimento de amplificación es necesario conocer, al menos parcialmente, la secuencia del fragmento a amplificar (un gen, una parte de un gen, una región no codificadora, etc). Básicamente, se trata de replicar una y otra vez un mismo fragmento de ADN y, para ello, debemos realizar in vitro lo que hacen las células in vivo para replicar su ADN ³.

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

3.1. Beneficiarios Directos

- ✓ Investigadores que se enfocan en el diagnóstico molecular.
- ✓ El investigador principal del proyecto, requisito previo a la obtención del Título de Médico Veterinario y Zootecnista.

3.2. Beneficiarios Indirectos

- ✓ Estudiantes e investigadores de la carrera de Medicina Veterinaria que desarrollarán actividades de investigación en las cátedras de Parasitología, elementos incluidos en la malla curricular.
- ✓ Laboratorios clínicos que tendrán una técnica más específica para la identificación de parásitos.

4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Las parasitosis intestinales representan un problema de salud pública debido a las múltiples enfermedades que pueden producir ocasionando deterioro de la salud animal afectando el bienestar y vitalidad del huésped siendo capaz de causar la muerte, inclusive trae consigo daños económicos, sociales y ambientales, los cuales podrían disminuir notablemente si se contara con diagnósticos tempranos y acertados del tipo de parásito infectante.

Dentro de los parásitos intestinales encontramos *áscaris*, *anquilostomas*, *tenias*, *tricúridos*, siendo el grupo de *Ascaris* aquel que engloba el género de *Toxocara canis*, esta es una especie de nematodo que infecta a perros en todo el mundo siendo una de las parasitosis más comunes con la que se enfrenta el animal.

La identificación de parásitos se realiza por estudios morfológicos, inmunológicos y moleculares tanto de las formas adultas como evolutivas, tomando a la técnica molecular como técnica de diagnóstico más sensible para evitar la resistencia ante los fármacos antiparasitarios.

El diagnóstico molecular engloba un conjunto de técnicas de biología molecular que son utilizadas para identificar y analizar marcadores biológicos en el genoma ⁴; por lo tanto la identificación molecular se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que

en los productos de su expresión. Dentro de las técnicas de identificación molecular se encuentra el PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa, esta técnica ha revolucionado el modo de manipular, clonar y detectar fragmentos de ADN ⁵.

A nivel mundial la identificación molecular de *Toxocariasis canina* no se encuentra totalmente estudiada y existen inconvenientes en cuanto a los métodos de diagnóstico empelados, como el método estándar que es la microscopía, la cual presenta problemas de sensibilidad en zonas de baja intensidad de infección parasitaria, no son específicos en cuanto a la identificación de género del parásito y especie a la que pertenecen.

La prevalencia de *Toxocara canis* en perros es muy alta debido, sobre todo, a la transmisión prenatal. Las tasas de distribución mundial reportadas para la infección por *Toxocara canis* en perros varían de 0 a 99,4% ⁷.

La prevalencia general en Latinoamérica de helmintos gastrointestinales en caninos es del 22.2% al 76.5%, la amplia variación se debe a que las condiciones de vida y medioambientales de los animales son muy diversas en cada país. La prevalencia general registrada para *Toxocara canis* es de 19.75% ⁸.

En el país no se encuentra desarrollado estudios moleculares de alcance nacional, y para algunos parásitos, ni siquiera se han llevado a cabo estudios de prevalencia local. Consecuentemente, existen infecciones que pudieran ser subestimadas en nuestra población resultando en problemas de salud que incrementan la morbimortalidad y que para tratarlas se requiere mayor financiamiento ⁹.

En la provincia de Cotopaxi, existe un estudio de prevalencia de parásitos intestinales identificada por medio de la técnica microscópica en algunas parroquias como Pastocalle en la cual existe un porcentaje de 90,67% ¹² y en la parroquia de Mulaló existe un porcentaje de 93,33% de parásitos intestinales y de estos el 4.28% tiene *Toxocara canis* ¹³.

Para que exista un diagnóstico microscópico debe existir la presencia de huevos de *Toxocara canis* en las heces del animal, por lo que es necesario que el parásito se encuentre en esta etapa. En caso de no poder visualizarlos se debe a que existe una carga parasitaria baja. Por otro lado cuando la carga parasitaria es moderada a alta va a existir la expulsión del parásito adulto ya sea por heces o vómito; el reconocimiento del tipo de parásito se lo realiza por sus características morfológicas pudiendo existir parásitos similares en cuanto a forma, en cambio

al realizar la identificación molecular el resultado va a ser específico del género que se requiera reconocer, en este caso *Toxocara canis*.

Se realizará una recolección de muestras fecales para analizarlas mediante un examen coproparasitario y determinar si existen formas evolutivas del parásito y proceder a la obtención del parásito adulto mediante desparasitación; para así analizar la muestra biológica mediante la aplicación de PCR en tiempo real para amplificar el ADN y obtener así una secuenciación específica.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Tipificación genética de *Toxocara canis* mediante la caracterización morfológica y molecular en la zona urbana de Latacunga.

5.2. Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de *Toxocara canis* en muestras fecales de caninos mediante un examen coproparasitario.
- Establecer el protocolo de disección ideal de la muestra biológica que permita conservar la integridad del ADN del parásito para garantizar la identificación molecular.
- Identificar *Toxocara canis* mediante la amplificación de una región conservada del genoma mediante el uso de *primers* específicos que permitan el reconocimiento del género parasitario.

6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

6.1. Toxocariasis

La toxocariasis es una infección provocada por las larvas de unas lombrices parasitarias (*Toxocara canis* y *Toxocara cati*) que suelen vivir en los intestinos de perros y gatos ¹³.

6.1.2. Distribución

Toxocara canis y *Toxocara cati* pueden encontrarse en la tierra en todo el mundo. Los huevos de estas especies aparecen en el 2-88% de muestras de tierra recogidas en varios países y regiones. Las altas temperaturas y la humedad ambiente de los trópicos favorecen la transmisión de la especie *Toxocara* ¹⁴.

6.1.3. Fisiopatología

Los huevos de *Toxocara canis*, *Toxocara cati* y de otros helmintos áscaris de animales maduran en el suelo e infectan a los perros, los gatos y otros animales. Los seres humanos pueden ingerir accidentalmente huevos presentes en tierra contaminada con heces de animales infectados o pueden alimentarse de huéspedes de transferencia infectados cocidos en forma insuficiente (p. ej., conejos). Los huevos se incuban en el intestino humano y las larvas penetran en la pared intestinal, para luego migrar a través del hígado, los pulmones, el SNC, los ojos u otros tejidos. La lesión tisular es secundaria al desarrollo de reacciones granulomatosas eosinófilas desencadenadas por las larvas migratorias ¹⁵.

Las larvas no completan su desarrollo totalmente en el cuerpo humano, pero pueden permanecer vivas durante varios meses.

6.1.4. Clasificación taxonómica de *Toxocara canis*

Los nemátodos del Orden Ascaridida han sido el tópico de muchas investigaciones sobre filogenética y taxonomía. En el orden se han descrito más de 50 géneros distribuidos en varias especies ¹⁶.

Tabla 1 Clasificación Taxonómica de *Toxocara canis*

Dominio: *Eukaryota*

Reino: Animalia
Subreino: *Bilateria*
Rama: Protostomia
Infrareino: *Ecdysozoa*
Superphylum: *Aschelminthes*
Phylum: Nematelminthes
Clase: Secernentea
Subclase: *Rhabditia*
Orden: Ascaridida
Suborden: *Ascaridina*
Superfamilia: *Ascaridoidea*
Familia: Toxocaridae
Género: *Toxocara*
Especie: *canis*

Fuente: ¹⁶

6.1.5. Características del parásito

Período de prepatencia

Variable, típicamente 21 días tras la infección prenatal; 27-35 días tras la infección lactogénica; 32-39 días tras la ingestión de huevos ¹⁷.

Período de patencia

4-6 meses dependiendo del estado inmunitario, ej. Cachorros ¹⁷.

Fases Infectantes y vías de transmisión

Ingestión de huevos embrionados procedentes del suelo o pelo del animal, larvas en la leche u hospedador paraténico. ¹⁷.

6.1.6. Descripción morfológica del parásito y huevo de *Toxocara canis*

Son nematodos grandes de color blanquecino el cual posee una cutícula con finas estriaciones transversales. El extremo posterior es romo en las hembras y digitiforme en los machos con dos espículas desarrolladas ¹⁸.



Fuente: ¹⁸

Gráfico 1 Parásito adulto de
Toxocara canis



Fuente: ¹⁸

Gráfico 2 Extremidad cefálica de
Toxocara canis

6.1.6.1. Huevos

Son similares a los de *Ascaris suum* pero un poco mayores de tamaño, miden 85 micras de diámetro, son subglobulosos, presentan una cubierta irregular ¹⁶, gruesa y ornamentada por numerosos hoyuelos ¹⁹, el protoplasma se aprecia con un aspecto granuloso y no están embrionados cuando salen a través de las heces de los cánidos infectados. Presentan un sistema reticular superficial de cresta y nervaduras ¹⁶ y cada uno contienen una sola célula ²⁰.

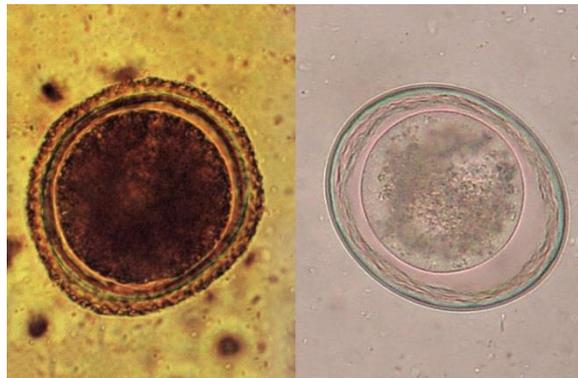
Los huevos necesitan madurar en el medio exterior durante varias semanas antes de ser infecciosos. Se ha observado que los huevos de *Toxocara canis* evolucionan a su estadio infectante según las condiciones de temperatura, humedad y aireación ²¹.

Los huevos fértiles larvados de *Toxocara canis* pueden mantenerse viables por varios meses e incluso por años; son resistentes a los factores ambientales, pueden permanecer infectantes en suelo húmedo y temperatura templada; también, soportan la desecación por su cubierta resistente ²².

Los huevos son casi esféricos, tienen una cubierta gruesa, rugosa y con un componente lipídico superficial, que les permite adherirse a cualquier elemento ²³. La fertilización estimula

inmediatamente la formación de esta cubierta, que tiene cuatro capas, tres las forma el propio huevo y la cuarta es añadida por las secreciones del útero. En primer lugar aparece la capa vitelina y, por debajo, una capa quitinosa que va seguida de una tercera de naturaleza lipídica formada bajo la segunda por coalescencia de gránulos refringentes. El material secretado por la pared del útero se adhiere a la superficie externa del huevo para formar la cuarta capa. Mientras el huevo está en el útero, mantiene un aspecto albuminoso e incoloro; sin embargo al entrar en contacto con la bilis intestinal del hospedero, se endurece y adquiere una coloración pardo-amarillenta ²².

Los huevos (óvulos) infértiles presentan una forma más irregular y, generalmente, no tienen bien definidas sus capas, ya que su formación está estimulada por la penetración de los espermatozoides en los oocitos ²². Los huevos de *Toxocara canis* se caracterizan por su gran capacidad de resistencia ante elementos químicos, mecánicos y térmicos, debido a la estructura de su cubierta. Los huevos producidos por las hembras se eliminan en las heces y son resistentes a las condiciones del medio ambiente, siempre y cuando exista humedad ²⁴.



Fuente: ²²

Gráfico 3 Huevos de *Toxocara canis*

6.1.6.2. Larvas

Las larvas de *Toxocara canis* miden aproximadamente 0,4 micras de longitud por 0,015-0,021 de diámetro y son fácilmente distinguibles de las larvas de otras especies. En el medio externo siempre se encuentran en el interior de los huevos ¹⁶.

En la región cefálica se encuentran las papilas cefálicas. El aparato bucal se continúa en un esófago largo, que ocupa un tercio de la longitud total de la larva. La porción periesofágica está ocupada por abundantes núcleos ganglionares. El esófago se prolonga en un intestino cilíndrico

que desemboca en un ano situado en posición subterminal, el primordio genital se encuentra en el último tercio y adosado a la pared intestinal. A nivel del primer tercio del esófago se sitúa un anillo nervioso, mientras que en la posición subterminal se encuentra la célula excretora que desemboca en un poro excretor ²².

6.1.6.3. Adultos

Son nematodos que presentan tres labios y lateralmente dos alas cervicales ²⁵. El macho mide de 4 a 6 cm. y la hembra es mayor llegando a alcanzar de 6 a 10 cm ²⁶. La boca se cierra con tres labios²⁵ y en la región cervical de ambos sexos existen aletas que son mucho más largas que anchas, miden de 2 a 4 mm por 0,2 mm ¹⁶. El esófago alcanza alrededor de 5 mm de largo incluyendo el ventrículo, el cual mide 0,5 mm de longitud. En el macho el extremo posterior tiene una forma característica de enrollado en espiral. A diferencia del macho, la hembra presenta un extremo posterior romo ²², la vulva se encuentra situada entre la quinta y sexta partes anteriores del cuerpo del verme ¹⁶.

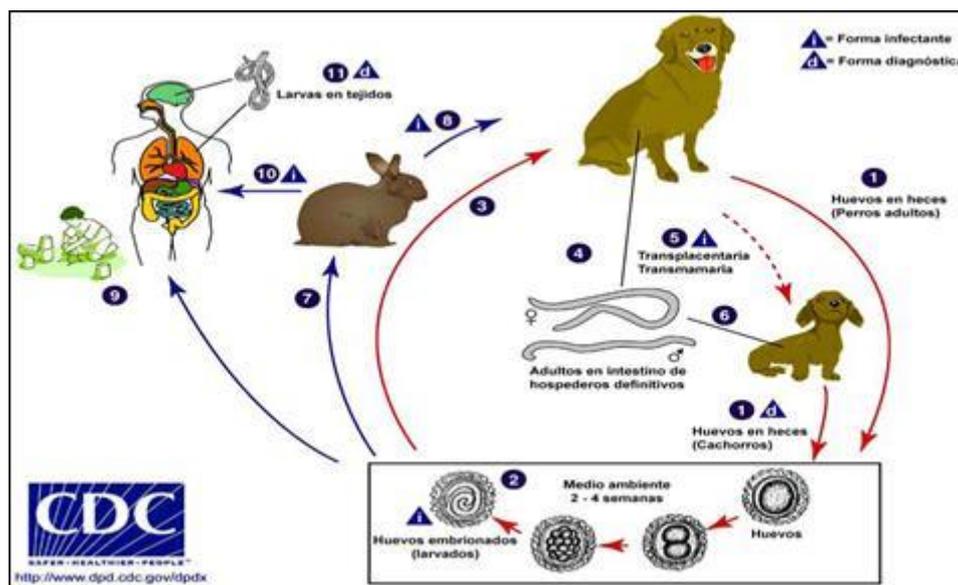
6.1.7. Ciclo de vida

En el caso de *Toxocara canis* existen diferentes hospedadores definitivos a parte del perro como por ejemplo los cánidos salvajes, Los huevos se expulsan mediante las heces sin embrionar, precisando un periodo de desarrollo en el medio externo, que, en condiciones adecuadas de humedad y temperatura ambiente, suele ser de unas dos semanas ²². Los perros pueden adquirir la infestación mediante la ingestión de huevos embrionados, la mayoría de los cuales eclosionan en el duodeno entre las dos y las cuatro horas después de su ingestión.

Para *Toxocara canis*, el suelo es un gran reservorio, donde los huevos evolucionan hasta el estadio juvenil (L2), lo que les permite permanecer estables durante uno a tres años; esto eleva la posibilidad de que el ser humano se infecte. La ingestión en caninos es por vía oral, el consumo de huevos infectados es la causa más común, pero se puede deber también por la ingesta de hospedadores infectados con el parásito. Los huevos eclosionan en el intestino delgado proximal; las larvas en estadio dos atraviesan la mucosa intestinal, hasta llegar a la circulación portal, donde llegan al hígado, y siguiendo la circulación llegan al corazón, pulmón y tráquea; de la tráquea son nuevamente ingeridos, y en el intestino mudan hasta alcanzar la madurez sexual, donde se producen los huevos no embrionados; estos huevos son eliminados a través de las heces y se desarrollan en el suelo, el cual les brinda las condiciones necesarias para su desarrollo y crecimiento; hasta la eliminación ²⁷.

En el hombre después de la ingestión de huevos embrionados, estos pasan al duodeno y por vía sanguínea y linfática las L2 emprenden la migración hística, los órganos más afectados son el hígado, los pulmones, el cerebro y los ojos ²⁸.

En los perros adultos el ciclo de infección es igual hasta la migración al pulmón, pero en estos los huevos llegan a la circulación y de allí pasan a los órganos y los músculos, donde las larvas pueden sobrevivir durante varios años ²⁷.



Fuente: ²⁷

Gráfico 4 Ciclo Biológico de *Toxocara canis*

6.1.8. Síntomas

La Sintomatología se caracteriza por descargas nasales que pueden llegar a ser mortales o simplemente desaparecen después de tres semanas. Cuando hay infección masiva prenatal existen gusanos en el intestino y estómago, alterando la digestión y causando trastornos como vómitos acompañados de gusanos, en otros casos hay diarreas de tipo mucoide con deshidratación, el abdomen está distendido y presenta dolor a la palpación. Los cachorros algunas veces presentan neumonía por aspiración de vómito que puede llegar a ser mortal.

La fase crónica en cachorros y perros de más edad está dada por un progresivo cuadro de desnutrición a pesar de tener buena alimentación. Puede presentarse diarrea intermitente. Otras

veces pueden presentarse manifestaciones nerviosas consistentes en convulsiones de duración limitada ²⁸.

6.1.9. Lesiones

El paso de las larvas sobre todo en pulmones, hígado y riñón causa inflamaciones focales que tienen un inicio hemorrágico y luego son granulomatoso-eosinófilico.

En el hígado, las lesiones miden 0,5-1,5 mm y están irregularmente distribuidas.

En una infección experimental se observa ligera hepatomegalia y microscópicamente infiltración de eosinófilos en la cápsula de Glisson y focos granulomatosos en el parénquima con pequeñas hemorragias y necrosis celular local. Los ganglios linfáticos están infartados moderadamente. En los pulmones aparecen focos múltiples amarillentos o rojizos de 0,5 – 3 mm dispersos en todos los lóbulos. Hay también neumonitis intersticial multifocal, con infiltrados inflamatorios y eosinofilia que persiste hasta siete semanas después del paso de las larvas y que pueden superar el 80% a los 11 días de la infección ²⁵.

Los riñones se decapsulan con dificultad, poseen zonas decoloradas irregulares en la superficie y focos blanquecinos de 0,5 -1 mm en la corteza. También hay lesiones similares en el bazo, diafragma y miocardio. En el intestino se encuentran *toxocaras* enrollados inmersos en abundante mucus. Suele haber enteritis catarral más o menos intensa dependiendo de la importancia parasitaria ²⁵.

6.1.10. Diagnóstico mediante técnicas de Laboratorio

6.1.10.1. Técnica Coprológica

Examen macroscópico. Debe realizarse inmediatamente a las muestras tomadas, considerándose su consistencia, color, olor, presencia de mucosas, sangre, coágulos, cuerpos extraños y aún la posibilidad de encontrar parásitos o partes de ellos, elementos de importancia para evitar errores de procedimiento ²⁹.

Examen microscópico. Para realizar un adecuado diagnóstico de parásitos gastrointestinales caninos como el *Toxocara* es recomendable detectarlos mediante la técnica de flotación fecal con solución azucarada de Sheather o de Cloruro de Sodio (NaCl) ²⁹. Sin embargo es importante

tomar en cuenta la aparición de signos clínicos y una adecuada anamnesis antes de la fase de excreción del parásito, de esta manera se podrá determinar correctamente el tratamiento.

El diagnóstico puede parecer fallido por la ausencia de huevos y larvas o su excreción fecal intermitente, incluso en los casos sintomáticos, no obstante se puede realizar análisis de tres muestras o más, en días alternos para así aumentar la tasa de probabilidad de diagnosticar la parasitosis en estadios positivos.

6.1.10.2. Técnicas cualitativas

Correspondiéndose con el sistema de cruces según el número de formas parasitarias así:

- ✓ Infección baja: (Campos con 1 a 3 formas) = Una cruz. (+)
- ✓ Infección leve: (Campos con 4 a 7 formas) = Dos cruces. (+ +)
- ✓ Infección moderada (Campos con 8 a 10 formas) = Tres cruces (+ + +)
- ✓ Infección grave: (Campos con más de 10 formas) = Cuatro cruces (+ + + +).

6.1.11. Tratamiento

En el tratamiento antiparasitario se requiere emplear antihelmínticos de eficacia comprobada. Es además de suma importancia definir el momento adecuado para la desparasitación, ya que un mismo tratamiento puede ser correcto y estar bien justificado en un momento dado, mientras que en otro puede ser inadecuado e inútil. En la práctica, el valor de un antihelmíntico depende de factores tales como el nivel del espectro, efecto residual, actividad frente a estadios adultos, juveniles y larvarios de los vermes, vía de aplicación, seguridad y costo ³⁰.

Los vermes adultos localizados en el intestino se tratan fácilmente y los principios activos con actividad adulticida que se emplean con mayor frecuencia son: levamisol (7,5 mg/ kg VS), fenbendazol (50 mg/kg en perros), mebendazol (20-40 mg/kg) ³¹ y el albendazol como fármaco de elección en una sola dosis de 100mg/kg ³².

6.2. Diagnóstico Molecular de Parásitos

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* ³³.

6.2.1. 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 ³⁴.

6.2.2. 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 ³⁴.

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 ³⁵.

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 ⁴⁶.

6.2.2.1. 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 ³⁷.

Las pruebas de PCR utilizan iniciadores, cebadores o "*primers*" para delimitar la amplificación de un segmento determinado del ADN utilizando una ADN polimerasa termoresistente. 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 ³³.

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 ³⁶.

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 ⁵.

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 “Platteau”. 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*)⁵.

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 siguientes⁵.

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 subsiguientes⁵.

Diagnóstico de *Toxocara canis* por la técnica de PCR

La reacción en cadena de la es una técnica de amplificación de secuencias de DNA in vitro³⁸.

El diagnóstico molecular utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction), permite determinar ADN del parásito en muestras de heces de perros y en suelos³⁹, y podría ser una ventaja sobre las técnicas coprológicas ya que la detección de huevos en tierra no es muy sensible, debido a huevos rotos o deteriorados y no fácilmente identificables.

En otros países se ha utilizado la técnica de PCR para detección de ADN de *Toxocara canis* en muestras de tierra, permitiendo identificar las zonas donde está circulando el parásito; además de permitir la diferenciación del ADN de *T. canis*, del de *T. cati*, lo cual no puede hacerse por técnicas parasitológicas, ya que los huevos son indistinguibles⁴⁰.

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 ⁴¹.

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 ⁴¹.

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 ⁴¹.

Tabla 2 Características y aplicaciones de las diferentes clases de PCR

TIPO DE PCR	Características	Aplicaciones
PCR estándar	Amplificación de un segmento de ADN utilizando dos cebadores. La detección de la amplificación es mediante geles de agarosa o poliacrilamida empleados para las observaciones de regiones pequeñas en número de pares de bases	Detección cualitativa de un segmento de ADN
PCR anidada	En esta variante el producto de amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con iniciadores que se van a ubicar dentro de la primera secuencia amplificada.	Detección cualitativa de un segmento de ADN, altamente sensible y específico.
PCR in situ	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.	
PCR Múltiple	Amplificación de dos o más segmentos de ADN utilizando varios partidores 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
PCR - RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)	PCR estándar con paso posterior de digestión con enzimas de restricción.	Detección de polimorfismos tipo RFLPs.
PCR con transcriptasa inversa (RT - PCR)	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
PCR - RT (Real Time) o qPCR	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: ⁴¹.

Para cada aplicación de la PCR es necesario ajustar las condiciones y el diseño de la reacción, por ejemplo ⁴²:

- 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.
- Las cantidad de los reactivos y de ADN molde.
- La longitud del amplicón o producto de PCR obtenido.

 T_m

6.2.2.2. 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*)⁴³.

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 cadenas⁴³.

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 oligonucleótidos⁴⁴.

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 ADN⁴⁴.

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 longitud⁴⁵.

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 ⁴⁶.

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) ⁴⁵.

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°).

Tipos de *primers* que existen para la identificación molecular de *Toxocara canis*

En un estudio realizado ⁴⁷ sobre la “Optimización de una metodología para el aislamiento y detección molecular de huevos de *Toxocara canis* en muestras de suelo” determinó que para el estudio del ADN de las muestras fecales del parásito se lo realizó en el ADN total de todo el fluido de flotación que se extrajo al utilizar el kit de extracción de ADN Takapozist de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Primero, los huevos se sometieron 5 veces en 20s. Las muestras homogeneizadas fueron dispuestos a través de la técnica de congelación y descongelación (10 ciclos de congelación [10 min en nitrógeno líquido] y descongelación [10 min a 95 ° C]) y la digestión con proteinasa K se realizó durante la noche. Para esto se identificó *Toxocara* spp. los cebadores específicos de la especie se eligieron entre el gen espaciador transcrito interno 2 (ITS2) que se describió previamente como *Tcan1* (5'-AGTATGATGGGCGCGCCAAT-3') y *NC2* (5'-TAGTTTCTTTTCTCCGCT-3')⁴⁷.

La amplificación por PCR se llevó a cabo en 25 µl de volúmenes de reacción que contenían 0,3 µl (5 u / µl) de ADN Taq polimerasa, 2,5 µl de x10 tampón de PCR, 0,9 µl (50 mM) de MgCl₂, 0.5 µl (10 mM) de desoxinucleótido trifosfato (dNTP). Se mezcla, 10-13 µl de agua destilada desionizada, 1 µl de cada cebador directo e inverso (15 pmol), 3-4 µl de albúmina sérica bovina al 0,1% como potenciador, y 3-4 µl de plantilla de ADN. Las amplificaciones se realizaron bajo las siguientes condiciones: Ciclo inicial a 94 ° C durante 30 s, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 60 s, luego a 55 ° C durante 30 s y extensión por polimerasa a 72 ° C durante 30s y un ciclo final a 72 ° C durante 5 min. Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% (p / v) teñido con tinción segura para ADN⁴⁷.

Una investigación realizada⁴⁸ con el tema “Producción y evaluación del antígeno recombinante TES-30 de *Toxocara canis* para el inmunodiagnóstico de toxocariasis” se realizó la construcción del gen sintético siendo procesado de la siguiente forma: el fragmento N se sintetizó por elongación con Taq ADN polimerasa a partir de los oligonucleótidos alineados Tc30Nfw en sentido 5’

ACCCCAACAACCACACGGCGCATGATCGCCGCAATCGTCGTTTTGTTATGTCTCC
 ACCTCTCCGCCACCAATGCTTGCGCCACCAACAATGACTGTGGTATTTTCCAAGT
 GTGCGTTAACAACGTCTGCGTTGCCAATAACCAAGGATGCAATCCGCCTTGTGTG
 CCTCCGCAGGTTTGC GTTGCACCA-3’y Tc30Nrv en anti sentido 5’-
 GTGCACCAGTCGCTAGCCTGGTTGAAAAGGAAGCGTCCAGGTAGAGAGG
 CGATATAGCAATTGTTGTTGAACGGCGTCCAATTGGGTGGGCAGGCACGTGGTCT
 TGTAGTTGTAACGCCTGGAGCTGCAGTTGTAGTGGCTGCCGGTGGAGGGGCGACA
 CACATTGGTGCAACGCAAACCTG-3’ de 189 y 182 bases respectivamente⁴⁸.

Finalmente en el artículo de investigación realizado con el tema “*Toxocara canis* genes for internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: TNJ presenta una tabla de referencias de las diferentes secuencias de ADN para identificación de *Toxocara canis* 49.

Toxocara canis genes for internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: Tnj
Sequence ID: [dbj|AB110032.1](#) Length: 400 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 400		GenBank	Graphics			▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand			
706 bits(382)	0.0	394/400(99%)	2/400(0%)	Plus/Plus			
Query	35	CATTGAGC-CTAGAATTTTCGCACACTACATTGCNCCATCGGGTTCATTCCC GTTGGCAGC	93				
Sbjct	2	CATTGAGCACTAAAATTTTCGAACGC-ACATTGCGCCATCGGGTTCATTCCC GTTGGCAGC	60				
Query	94	TCTGGCTGAGGGTCAGTATATTAAGGAGTATGATGGGCGCGCCAATTTATGGAATGTGAT	153				
Sbjct	61	TCTGGCTGAGGGTCAGTATATTAAGGAGTATGATGGGCGCGCCAATTTATGGAATGTGAT	120				
Query	154	TAAACGCGCAAGGTTGTGGTGCATTTCGGTGAGCTATGCTGGTGTGGTAATGGATATTGTGC	213				
Sbjct	121	TAAACGCGCAAGGTTGTGGTGCATTTCGGTGAGCTATGCTGGTGTGGTAATGGATATTGTGC	180				
Query	214	AATTGTACAGCGTACCTTGCCAAGGAAATATTCGCACAAGAAATGGCTGTCGTTTGCTCG	273				
Sbjct	181	AATTGTACAGCGTACCTTGCCAAGGAAATATTCGCACAAGAAATGGCTGTCGTTTGCTCG	240				
Query	274	TAAAGAGGCAAAATTTGGCCATGAGTGTATGTTGCGTTGCTTCACGATACGGCCTCCAGCA	333				
Sbjct	241	TAAAGAGGCAAAATTTGGCCATGAGTGTATGTTGCGTTGCTTCACGATACGGCCTCCAGCA	300				
Query	334	AACGTTGTTTATTGTTTGGTTGTGGCAGCATCCAGGTTGGAGGTGGCGTTATCGGTCGCT	393				
Sbjct	301	AACGTTGTTTATTGTTTGGTTGTGGCAGCATCCAGGTTGGAGGTGGCGTTATCGGTCGCT	360				
Query	394	TGAATGAGGAATGCATGGCGAATGGTTGAAATGAGAtttt	433				
Sbjct	361	TGAATGAGGAATGCATGGCGAATGGTTGAAATGAGATTTT	400				

Fuente: ⁴⁹

Gráfico 5 Alineamiento básico de la secuencia de nucleótidos del amplificado del ITS 2 del ADNr de *Toxocara. canis*

7. HIPÓTESIS

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

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

8. METODOLOGÍA

8.1. Localización y Duración del proyecto

La investigación se llevó a cabo en la provincia de Cotopaxi, cantón Latacunga (**0°56'6.8" S 78°36'55.9"**), en la zona urbana de la ciudad, con una duración de 120 días.

8.2. Unidades Experimentales

Para el desarrollo de la presente investigación, se utilizó el parásito adulto de género *Toxocara canis* de 69 caninos de diferentes edades encontrados en la ciudad de Latacunga, obteniendo alrededor de 5 parásitos aproximadamente de cada uno a través de la identificación morfológica del parásito.

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

- ✓ 69 perros
- ✓ 30 ejemplares de *Toxocara canis*
- ✓ Muestras fecales

Materiales de Laboratorio

- ✓ Tubos de Ensayo
- ✓ Gradilla
- ✓ Agua
- ✓ Solución azucarada
- ✓ Cernidor
- ✓ Vasos
- ✓ Gradillas de laboratorio
- ✓ Pinzas anatómicas
- ✓ Pipeta
- ✓ Tubos Eppendorf 1.5 mL

- ✓ Couler para transporte
- ✓ Guantes
- ✓ Mandíl
- ✓ Placas Petri
- ✓ Mango de bisturí
- ✓ Hojas de bisturí
- ✓ Jeringuilla
- ✓ Agua libre de nucleasas

Materiales de Oficina

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

8.3.2. Insumos

- ✓ 1 L de Etanol al 70%
- ✓ *Primers* forward ATCGATGAAGAACGCWGC (200 nmol)
- ✓ *Primers* reverse TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT (200 nmol)
- ✓ Proteinasa K
- ✓ Buffer de Extracción
- ✓ Fenol/Cloroformo/Isoamílico
- ✓ Agua Milli Q o TE
- ✓ Resina Chelex al 10%
- ✓ BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit
- ✓ Qiagen Multiplex MasterMix
- ✓ Agarosa en TBE teñido con SYBR

8.3.3. Equipos

- ✓ Microscopio
- ✓ Centrífuga
- ✓ Balanza
- ✓ Estereomicroscopio

- ✓ Balanza analítica
- ✓ Incubadora
- ✓ Vortex de ADN
- ✓ Termociclador
- ✓ Espectrofotómetro
- ✓ Secuenciador

8.3.4. Instalaciones

- ✓ Laboratorio Clínico de la Clínica Veterinaria Mundo Animal
- ✓ 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

9.1. Aislamiento de la Muestra Biológica

Los caninos en estudios se desparasitaron con Albendazol al 10% a dosis única de 100mg/kg vía oral, al día siguiente se revisó las heces de los canes en las que se observaron parásitos en forma adulta (Anexo 3); se colocaron en un frasco de plástico para su clasificación por sexos. Se continuó con la disección seleccionada para *Ascaris* dentro del cual se encuentra *Toxocara canis* estableciendo un protocolo a seguir, tomando en cuenta que es necesario adquirir los conocimientos esenciales sobre la morfología el parásito para de esta manera identificar las diferentes partes que lo constituyen, recalcando que los parásitos machos presentan una pequeña curvatura en el extremo caudal a nivel de la cola que permite identificarlo, a diferencia de las hembras que exhiben una punta roma. Al realizar el protocolo de disección constató que en los parásitos machos no se seccione los túbulos seminíferos para evitar la alteración del resultado en cuanto a la extracción y amplificación de ADN. Una vez seccionado el último tercio se procedió a tomar el peso en la balanza analítica y se realizó pequeñas fracciones de aproximadamente 1mm que fueron introducidas en un tubo Eppendorf de 1,5 mL al cual se añadió 1 mL de etanol al 70% como requisito para conservar el ADN de la muestra. Finalmente se procedió a cerrar el tubo y se etiquetó con el código TXC 01 – 30 respectivamente.

9.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se implementaron dos protocolos; el primero a partir de fenol cloroformo que permitió obtener un alto rendimiento de la calidad de ADN sin embargo es frecuente que restos de solventes orgánicos contaminen la muestra; mientras que el segundo método consistió en el uso de resina chelex que es una técnica más específica para la detección de pequeños fragmentos de ADN; por tal razón las muestras que fueron procesadas y resultaron negativas con la extracción a partir del primer protocolo se confirmó aplicando el procedimiento esencial a partir de resina chelex.

9.2.1. A Partir de Fenol-Cloroformo

En el protocolo el lisado celular se mezcló con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico para la separación de los ácidos nucleicos y las proteínas; para esto se transfirió la muestra de tejido del parásito re suspendido en alcohol previamente, a un tubo de 1,5 µL donde se lavó 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 tuvo una fase acuosa superior que contiene los ácidos nucleicos; se realizó vortex por 1 minuto y se colocó proteinasa K incubando las muestras toda la noche a una temperatura de 56° C en el thermomixer. Al día siguiente se añadió fenol/cloroformo/isoamílico en una proporción de (25:24:1) realizando vortex hasta formar una emulsión lechosa que luego se centrifugó durante 10 minutos a una temperatura de 4°C a máxima velocidad que dio paso a una fase orgánica que contenía las proteínas disueltas en el fenol y los lípidos en el cloroformo. Se agitó bien y se colocó 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 añadió etanol 70% helado y se centrifugó por 15 minutos a 12000 rpm, descartando el sobrenadante y dejando secar. Posterior a esto se re suspendió en 40 µL de Agua Milli Q o TE y se incubó la muestra a 37°C por dos horas para proceder a la cuantificación de la concentración de ADN.

Para verificar la integridad de las muestras se lo realizó al observar una banda definida en la parte superior del gel de agarosa tras la migración electroforética.

9.2.2. A Partir de Resina Chelex

Para la realización de este procedimiento se transfirió la muestra de tejido del parásito re suspendido en alcohol a un tubo de 1.5 µL lavando con agua libre de nucleasas; se procedió a cortar la muestra en pedazos de menor tamaño y se transfirió a un nuevo micro tubo colocando

200 µL de Chelex al 10% en agitación constante ya que actuó como quelante de iones metálicos polivalentes los mismos que fueron catalizadores en la ruptura de ADN a altas temperaturas; se maceró con una punta de pipeta durante 5 minutos en un bloque frío para luego incubar la muestra macerada a -80°C, aproximadamente por 1 minuto, una vez que se haya congelado por completo, se proporcionó un shock térmico introduciendo el tubo con la muestra en agua hirviendo, hasta que ésta se descongeló. Se repitió este paso de 3 a 5 veces consecutivas, posteriormente se realizó vortex y se incubó a 56°C durante 1 hora; luego se centrifugó la muestra durante 1 minuto a 10000 rpm colocando el micro tubo en el termobloque a 95° C por 8 minutos volviendo a centrifugar por 2 minutos a 10000 rpm para finalmente proceder a cuantificar la concentración de ADN.

En la cuantificación y valoración de ADN se determinaron las impurezas proteicas del ADN presentes en cada muestra utilizando un espectrofotómetro V – 630.

9.4. Diseño y Selección de *Primers*

La selección de oligonucleótidos iniciadores fue 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 realizó según la cadena de secuencia que se quiere codificar para un elemento específico como en este caso el ADN de *Toxocara canis*.

Para la selección de *primers* se realizó 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 ⁵⁰.

La selección de *primers* se realizó mediante el diseño específico de primer asociado al estudio de especie que se desarrolló y la otra opción fue 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 se diluyeron las muestras de ADN hasta alcanzar una concentración de 10 ng/ μ 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 se colocaron en el termociclador con el fin de realizar la desnaturalización inicial que consiste en separar las cadenas de ADN y se llevó a cabo elevando la temperatura a 95.0°C durante un ciclo de 15 minutos para posteriormente disminuir la desnaturalización un grado de temperatura durante 30 segundos por 38 ciclos. Una vez separadas las cadenas de ADN se procedió a la alineación aplicando un descenso de la temperatura a 57.0°C durante 1 minuto a través de 38 ciclos respectivos permitiendo que los cebadores se unan por complementariedad al molde de ADN; a partir de la fase de elongación se estableció una temperatura de 72.0°C durante 1 minuto y 38 ciclos aplicando la enzima Taq polimerasa que incorporó nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. Por último la elongación final se realizó a 72.0°C durante 10 minutos que dio paso a la fase final de reposo a una temperatura de 4.0°C por 10 minutos.

9.6. Electroforesis

La electroforesis consistió en la separación de biomoléculas como el ADN o ARN de acuerdo a su tamaño permitiendo el aislamiento de la zona de interés ya que cada fragmento se separó 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 migró hacia el polo positivo; dicho gel disuelto en un buffer se fundió usando un microondas hasta obtener una solución homogénea y transparente. Esta disolución se vació en un molde y se colocó 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 observó como una única banda de elevado peso molecular.

9.7. Secuenciación de ADN

La secuenciación del ADN consistió en que las cuatro bases nitrogenadas se unieron con la misma pareja para formar “pares de bases” que fueron copiadas de manera idéntica cuando las células se dividieron. La realización de este procedimiento es reservado por el Laboratorio de Investigación de Biología Molecular de la Universidad de las Américas siguiendo las recomendaciones del fabricante.

10. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

10.1. Preparación de la Solución Azucarada

1. Se colocó una olla el agua con el azúcar y calentar mezclando continuamente hasta disolver el azúcar evitando la ebullición, de esta manera se formará una solución ligeramente espesa.

10.2. Realización de un Examen Coproparasitario mediante el Método Directo de Flotación de Sheather

Descripción de la metodología:

1. Recolectar el material fecal fresco de un perro en una funda y rotularlo.
2. En una balanza colocar un frasco plástico y observar que el conteo este en cero.
3. Utilizando una lengüeta de madera tomar una pequeña cantidad de heces de la funda y colocarlo en el frasco plástico.
4. Pesar en la balanza 3 gr de heces.
5. Mezclar los 3 gr de heces en 20 mL de solución azucarada con una lengüeta hasta que quede una pasta uniforme.

6. En otro frasco colocar una gasa en la parte superior y colocarle alrededor una liga para sujetarlo y así utilizarlo como un colador.
7. Verter la mezcla de heces y solución sobre la gasa, con la ayuda de la lengüeta removerlos para que quede completamente cernido.
8. Tomar el frasco con el material ya cernido, verterlo en un tubo de ensayo y taparlo.
9. Colocar el tubo de ensayo en la centrifugadora (se colocan en forma de X).
10. Centrifugar a 1250 revoluciones (rpm) durante 10 minutos.
11. Tomar y abrir lentamente el tubo de ensayo debido a que los huevos se encuentran flotando en su superficie.
12. Utilizando una pipeta colocar una o dos gotas de la mezcla en un portaobjetos y el tubo de ensayo colocarlo en una rejilla.
13. Coger un portaobjetos y lentamente colocarlo encima del portaobjetos evitando que se forme burbujas de aire.
14. Colocar la muestra en el microscopio.
15. Observar en el microscopio para detectar los huevos de los parásitos.

10.3. Recolección de los ejemplares de *Toxocara canis*

1. Los ejemplares de *Toxocara canis*, se obtuvieron de caninos ubicados en la zona urbana de Latacunga mediante la desparasitación oral con Albendazol al 10% a dosis única de 100 mg/kg vía oral.
2. Los animales desparasitados expulsaron a través de heces los parásitos adultos de *Toxocara canis*.
3. Luego de su expulsión se lavó con agua y se introducen en un frasco plástico con etanol al 70%.
4. Se etiquetaron y rotularon los frascos con su respectivo código.

10.4. Disección del parásito para garantizar la integridad del ADN

Descripción de la metodología:

1. Los parásitos de *Toxocara canis* deben ser mantenidos a temperatura ambiente.
2. Se clasifican los parásitos por sexos hembra y macho según su morfología y se utilizan exclusivamente los machos.

3. Se toma al parásito y se coloca en la balanza analítica, digitando el peso correspondiente en la computadora.
4. Utilizando el estereomicroscopio se ubica la cola del parásito procediendo a seccionar el último tercio, observando que no queden restos de túbulos seminíferos.
5. La parte diseccionada se pesa en la balanza analítica y se continúa a fraccionar en pequeños pedazos.
6. Dichos pedazos se colocan en el tubo Eppendorf previamente esterilizado y se añade 1 mL de etanol al 70%.
7. Posterior a esto se sellan los tubos y se rotulan con el código asignado TXC y el número de muestra.
8. 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.

10.5. Extracción de ADN

La extracción de ADN se lo realizó utilizando dos métodos, a partir de fenol – cloroformo y de Resina Chelex, detallados a continuación.

10.5.1. A Partir de Fenol-Cloroformo

Descripción de la metodología:

1. Transferir la muestra de tejido del parásito adulto (5 mg aprox.), previamente re suspendido en alcohol, a un tubo de 1.5 µL.
2. Lavar la muestra de tejido con agua libre de nucleasas. Descartar el agua.
3. Colocar 500 µL de Buffer de Extracción y macerar con una punta de pipeta o pistilo por 5 minutos en un bloque frío.
4. Realizar vortex por 1 minuto y colocar 5 µL de Proteinasa K.
5. Incubar las muestras a 56°C toda la noche.

6. Sacar las muestras del thermomixer, dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Añadir 750 μL de Fenol/Cloroformo/Isoamílico (25:24:1) y realizar vortex hasta formar una emulsión lechosa.
8. Centrifugar 10 minutos a 4°C a máxima velocidad. Transferir toda la fase acuosa a un nuevo microtubo.
9. Añadir a esa fase, 500 μL de Cloroformo: Isoamílico (24:1), homogenizar en vortex.
10. Centrifugar 10 minutos a 4°C a máxima velocidad. Transferir toda la fase acuosa a un nuevo microtubo.
11. Añadir al nuevo microtubo, 400 μL Isopropanol 100% y 40 μL de NaCl 3M.
12. Agitar bien y colocar a temperatura ambiente por dos horas.
13. Centrifugar por 30 minutos a 4°C a 15000 rpm.
14. Descartar el sobrenadante con mucho cuidado de no topar el pellet.
15. Agregar 1000 μL de Etanol 70% helado y centrifugar por 15 min a 12000 rpm.
16. Descartar el sobrenadante y dejar secar.
17. Re suspender en 40 μL de Agua Milli Q o TE e incubar la muestra a 37°C por dos horas.
18. Cuantificar la concentración de ADN.

10.5.2. A Partir de Resina Chelex

Descripción de la metodología:

1. Transferir la muestra de tejido (5mg aprox.), previamente re suspendido en alcohol, a un tubo de 1.5 μL .
2. Lavar la muestra de tejido con agua libre de nucleasas. Descartar el agua.
3. Cortar la muestra en pedazos de menor tamaño, con la ayuda de un bisturí, y transferirlos a un nuevo microtubo.
4. Colocar 200 μL de Chelex al 10% en el microtubo. (La solución de Chelex debe estar en agitación).
5. Macerar con una punta de pipeta o pistilo por 5 minutos en un bloque frío.
6. Incubar la muestra macerada a -80°C , aproximadamente por 1 minuto, una vez que se haya congelado por completo, proporcionar un shock térmico introduciendo el tubo con la muestra en agua hirviendo, hasta que ésta se descongele. Repetir este paso de 3 a 5 veces consecutivas.
7. Realizar vortex e incubar a 56°C durante 1 hora.

8. Transcurrido el tiempo de incubación, centrifugar la muestra por 1 minuto a 10000 rpm.
9. Colocar el microtubo en el termobloque a 95°C por 8 minutos.
10. Centrifugar el microtubo por 2 minutos a 10000 rpm.
11. Transferir aproximadamente 150 µL del sobrenadante (ADN) a un nuevo microtubo.
12. Cuantificar la concentración de ADN.

10.6. Amplificación de Fragmentos por PCR

Descripción de la metodología:

1. Dilución de las muestras de ADN hasta alcanzar una concentración de 10 ng/µL.
2. Ensamblar los componentes para una PCR bajo las condiciones (Tabla 3)

Tabla 3 Condiciones de los componentes para una PCR

COMPONENTE	C. Inicial	C. Final	Vol. 1 RX (µL)	Vol. 30 Rx (µL)
Agua MQ			4,9	147
Primer Fw	10 µM	0,2 µM	0,3	9
Primer Rv	10 µM	0,2 µM	7,5	9
Master Mix *	2X	1X	7,5	225
ADN	10 ng/µL	0,4 ng/µL	2	60
Volumen Final			15	450

*: QIAGEN Multiplex PCR Master Mix 2X

Fuente: Laboratorio UDLA.

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

Tabla 4 Parámetros del procedimiento de PCR

Paso	T (°C)	Tiempo	N° Ciclos
Desnaturalización Inicial	95.0	00:15:00	
Desnaturalización	94.0	00:00:30	
Alineación	57.0	00:01:00	38
Elongación	72.0	00:01:00	
Elongación Final	72.0	00:10:00	

Reposo	4.0	00:10:00
---------------	-----	----------

Fuente: Laboratorio UDLA.

10.7. Secuenciación de ADN

Purificar los productos de PCR con perlas magnéticas (inmovilización reversible en fase sólida); y realizar la secuenciación Sanger, matriz BigDye 3.1 según recomendaciones del fabricante.

11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Determinación de la presencia de *Toxocara canis* en muestras fecales de caninos mediante un examen coproparasitario

Los caninos evaluados eran de diferentes edades y vivían en diferentes condiciones, lo que pudo influir en el grado de parasitismo, debido a diversos factores asociados. De las 60 muestras recolectadas se logró observar la presencia de huevos de parásitos de *Toxocara canis* en 11 casos, representando el 18,33% de prevalencia según la técnica microscópica y cualitativa mediante cruces. Sin embargo todos los perros fueron desparasitados ya que no se encontraban con un control profiláctico adecuado utilizando Albendazol al 10% en una dosis única de 100mg/kg, y a pesar de no haber encontrado huevos en el análisis microscópico presentaban algunos síntomas de parasitosis llegando a obtener parásitos de 21 perros, representando el 35% de prevalencia según la técnica macroscópica de materia fecal lo que significa que 10 animales no resultaron positivos al diagnóstico microscópico. Dichos parásitos fueron clasificados como *Toxocara canis* basándose en las características morfológicas del parásito. Las 9 muestras biológicas restantes se obtuvieron de cachorros de 2 a 3 meses de edad que fueron desparasitados desconociendo la realización del examen coproparasitario; de los 9 caninos el 100% expulsó el parásito en su forma adulta.

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 0,1167 gramos, la cual fue seccionada en aproximadamente 2 mm de longitud y para preservar su integridad se añadió etanol al 70%; determinando así que el protocolo de disección de *Toxocara canis* fue el ideal para la conservación del ADN de la muestra. (Anexo 4)

Tabla 5 Códigos y peso de la muestra parasitaria

Código del tubo	Peso del Parásito	Peso del producto diseccionado
TXC01	0,065	0,0080
TXC02	0,060	0,0072
TXC03	0,054	0,0071
TXC04	0,057	0,0069
TXC05	0,052	0,0065
TXC06	0,049	0,0065
TXC07	0,071	0,0091
TXC08	0,273	0,0257
TXC09	0,148	0,0209
TXC10	0,330	0,0598
TXC11	0,084	0,0130
TXC12	0,057	0,0114
TXC13	0,045	0,0157
TXC14	0,047	0,0085
TXC15	0,102	0,0113
TXC16	0,098	0,0145
TXC17	0,047	0,0109
TXC18	0,234	0,0224
TXC19	0,242	0,0114
TXC20	0,111	0,0119
TXC21	0,083	0,0245
TXC22	0,062	0,0082
TXC23	0,180	0,0302
TXC24	0,112	0,0065
TXC25	0,039	0,0064
TXC26	0,127	0,0045
TXC27	0,312	0,0052
TXC28	0,150	0,0129
TXC29	0,098	0,0067
TXC30	0,113	0,0210
PROMEDIO	0,1167	0,1167

Identificación de *Toxocara canis* mediante la amplificación de una región conservada del genoma mediante el uso de *primers* específicos para reconocer el género parasitario

La identificación molecular de *Toxocara canis* a través de la amplificación de una región conservada del genoma mediante el uso de los *primers* forward (ATCGATGAAGAACGCWGC) y reverse (TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT) que son específicos para la detección y especificidad del parásito de interés (Anexos 5-7)

Los resultados de la amplificación de las muestras de TXC 1, TXC 3 y TXC4 pertenecen a *Toxocara canis* 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.

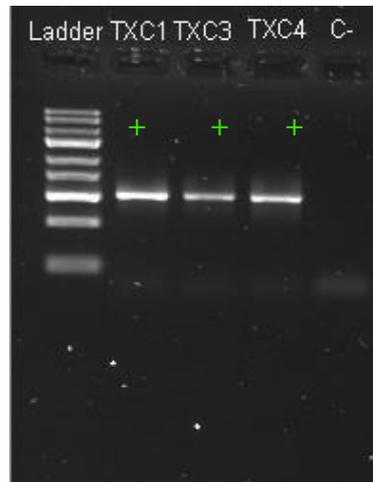


Gráfico 6 Resultados de amplificación de las muestras TXC 1, TXC 3 y TXC 4, extraídas por el método de fenol-cloroformo.

En cuanto a las muestras a partir de TXC 5 a TXC 15, se visualiza que todas pertenecen a *Toxocara canis*; sin embargo las muestras TXC 11, TXC 14 Y TXC 15 no corresponden al parásito en cuestión; pudiendo determinar que son otro tipo de *Toxocara*.



Gráfico 7 Resultados de amplificación de las muestras TXC 5 a TXC 15, extraídas por el método de fenol-cloroformo.

Las muestras del parásito desde la TXC16 a TXC 30 corresponden a *Toxocara canis*; no obstante la muestra TXC 22 no pertenece al género parasitario según su identificación molecular a pesar de su reconocimiento morfológico

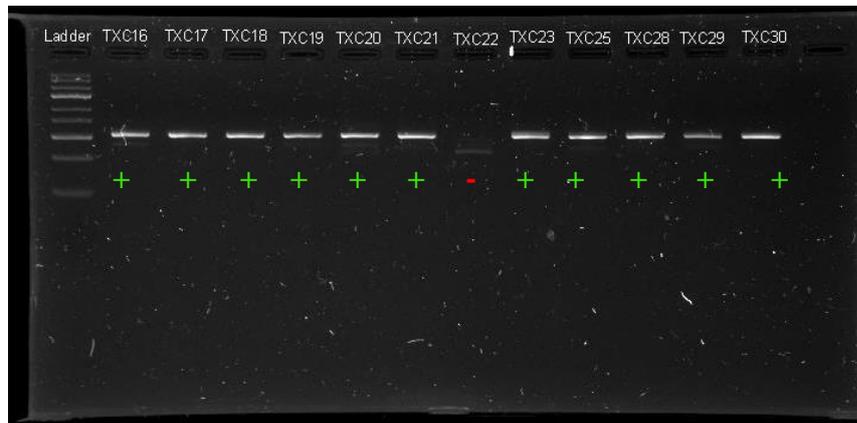


Gráfico 8 Resultados de amplificación de las muestras TXC 16 a TXC 30, extraídas por el método de fenol-cloroformo.

La amplificación de las muestras pertenecientes a los códigos TXC 22, TXC 24, TXC 26 y TXC 27 denotó que los *primers* seleccionados no son específicos del parásito salvo el caso de TXC 26 en el cual dio positivo a *Toxocara canis*.

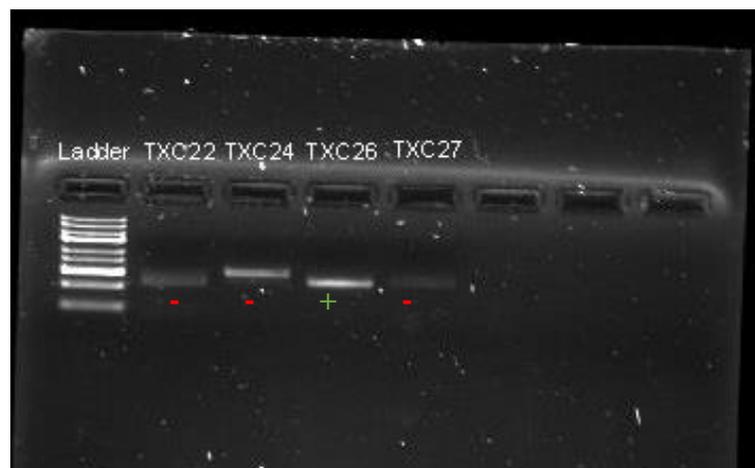


Gráfico 9 Resultados de amplificación de las muestras TXC 22, TXC 24, TXC 26, TXC 27, extraídas por el método de fenol-cloroformo.

Los resultados de amplificación de las muestras TXC 2, TXC 14, TXC15, TXC 22 y TXC 27 fueron extraídas tanto por el método fenol/cloroforno como de resina Chelex debido a que es una técnica más concreta para reconocer pequeños fragmentos de ADN, sin embargo, no dieron resultados favorables ya que ninguno resultó positivo a *Toxocara canis*. La lectura de bandas no fue definida en su totalidad, ya que los *primers* no eran los específicos para este tipo de parásito.



Gráfico 10 Resultados de amplificación de las muestras TXC 2, TXC 14, TXC 15, TXC 22, TXC 27 extraídas por el método de resina Chelex

De las 30 muestras en las que se identificó morfológicamente al *Toxocara canis*, solo 24 fueron confirmadas como positivas mediante PCR (80%), observándose una correcta amplificación de bandas, el 20% restante pudieran corresponder a otros tipo de *toxocara*, posiblemente *Toxocara cati*. El estudio demuestra la alta especificidad en el diagnóstico al emplear herramientas moleculares.

Discusión

Estudios realizados en cestodos ⁵² determinan que la caracterización molecular de *Cysticercus fasciolaris* ha permitido obtener conclusiones fiables sobre la relación filogenética entre los miembros de la familia *Taeniidae*, en muchos casos difícil de obtener mediante el estudio morfológico únicamente; de igual manera en el caso de *Toxocara canis* y su relación con la familia *Ascarididae*; sin embargo se determina que es más sensible el diagnóstico molecular para un diagnóstico acertado en comparación con el reconocimiento morfológico.

La investigación realizada sobre la “Optimización de una metodología para el aislamiento y detección molecular de huevos de *Toxocara canis* en muestras de suelo” ⁴² indica que siete (53,84%) de las 13 muestras de suelo recolectadas se identificaron como *Toxocara canis*

estableciendo un mayor porcentaje de especificidad del análisis molecular a comparación del microscópico o morfológico; de la misma forma en el caso de parásitos adultos de *Toxocara canis* ya que tuvo un alcance de 24 muestras (80%) a comparación del reconocimiento morfológico.

La elección de un buen protocolo para la extracción de ADN es crucial 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 viable en su totalidad ya que los protocolos de extracción deben ser sencillos, rápidos y reproducibles manteniendo la seguridad e integridad de la muestra. Por tal motivo, se utilizaron dos protocolos de extracción DE ADN a partir del parásito; uno se encuentra basado en la extracción con solventes orgánicos fenol/cloroformo y otro, utilizando resina chelex que es quelante de iones metálicos polivalentes.

Las 30 muestras fueron analizadas mediante el protocolo fenol/cloroformo obteniendo un alto rendimiento del 80% es decir 24 muestras se identificaron con los *primers* específicos de *Toxocara canis*; sin embargo en un estudio realizado ⁵¹ 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 *Toxocara canis*.

Por otro lado al realizar la extracción de ADN con la resina Chelex se obtuvo un bajo rendimiento en las 6 muestras procesadas de *Toxocara canis* a diferencia del análisis realizado por otros investigadores ⁵¹, donde se extrajo mayor cantidad de ADN que en el protocolo con solventes orgánicos. En cuanto a la integridad del ADN de las muestras de *Trypanosoma cruzi* fue deficiente donde se observó en el gel de agarosa un extendido a lo largo de todo el carril, evidenciando degradación de igual manera que en el caso de *Toxocara canis* en el cual se puede observar una ligera banda en la electroforesis; no excluyendo la posibilidad que estos valores estén sobrestimados por contaminación que pudiese estar en la muestra. Otro estudio ⁵² definió que el uso de resina chelex redujo la manipulación de las muestras, minimizando las posibles contaminaciones accidentales durante la extracción de ADN; presentando la ventaja de ser una técnica económica, sencilla y rápida y mostró la mayor eficiencia de recuperación de ADN en

muestras de *Giardia*. Por lo anterior expuesto y para verificar si el protocolo de extracción de ADN mediante cloroformo afectó a la muestra, se decidió utilizar el protocolo de resina chelex con el fin de establecer si la no lectura de bandas se debía a la baja calidad del ADN, sin embargo luego de utilizar los dos protocolos, se llegó a la conclusión de que los resultados de las muestras que fueron negativas para *Toxocara canis* se mantuvieron luego de la lectura de bandas; determinando que la información de los *primers* seleccionados no corresponden al parásito estudiado.

12. IMPACTOS

El impacto que genera el presente proyecto incurre en la salud animal, ya que al contraer parásitos gastrointestinales la vitalidad y bienestar del canino disminuye además de convertirse en un factor zoonótico relacionado con los problemas de Salud Pública.

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 como 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 de los análisis coprológicos y la obtención de datos estadísticos en cuanto al porcentaje de casos diagnosticados mediante la técnica microscópica. Incluyendo también el diagnóstico molecular del parásito para generar datos específicos de la identificación del género *Toxocara canis* en la zona urbana de Latacunga.

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; de ser el caso puede traer consigo complicaciones graves como ceguera en humanos.

13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

13.1. CONCLUSIONES

- ✓ El análisis coprológico evidenció un bajo porcentaje de huevos de *Toxocara canis* en las muestras procesadas; sin embargo luego la desparasitación fueron expulsados parásitos que posiblemente se encontraban cursando la etapa adulta y no la etapa de huevo o larvaria, permitiendo la identificación morfológicamente del *Toxocara canis* en 30 muestras.
- ✓ El protocolo de disección de la muestra biológica fue completamente adecuado preservando la integridad del ADN y la no contaminación, permitiendo una mejor tipificación molecular.
- ✓ La técnica de PCR confirmó la identificación de *Toxocara canis* en el (80%) de las muestras evaluadas; lo que indica que los *primers* seleccionados fueron los específicos para la identificación molecular del parásito en cuestión; sin embargo el diagnóstico molecular también detectó la posible infestación de algunos caninos con *Toxocara cati*.

13.2. RECOMENDACIONES

- ✓ Adquirir los conocimientos fundamentales sobre los diferentes temas de parasitología e identificación molecular.
- ✓ Realizar un adecuado examen coproparasitario utilizando las técnicas descritas según sea el caso.
- ✓ Estudiar la posible infestación cruzada con *Toxocara cati* en caninos de la comunidad.
- ✓ Implementar campañas de desparasitación como cuidado profiláctico en animales de compañía para evitar el desencadenamiento de una zoonosis.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Caraballo A, Jaramillo A, Loaiza J. Prevalencia de Parásitos Intestinales en caninos atendidos en el Centro de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad CES. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia [Internet]. 2007 [9 Mayo 2019]; Vol. 2: 25. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/3214/321428098003.pdf>
2. Posada A. Descripción de los parásitos intestinales más comunes en caninos llevados a consulta a la Clínica Veterinaria Lasallista Hermano Octavio Martínez López [Internet]. Caldas; 2013 [15 Enero 2013; 9 Mayo 2019]. Disponible en: http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/853/1/DESCRIPCION_PARASITOS_INTESTINALES_COMUNES_CANINOS.pdf
3. Cotrina A. Prevalencia de Parásitos en caninos por el método de flotación con solución saturada de azúcar Distrito de Olmos Período Septiembre - Diciembre 2014 [Internet]; México; 2015 [Enero 2015; 10 Mayo 2019]. Disponible en: <http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/3496/BC-TES-TMP-2361.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
4. Conca N. Diagnóstico Molecular [Internet]. México; 2016 [Noviembre 2016; 10 Mayo 2019]. Disponible en: https://smlc.cl/sitio/jornada2016/post/presentaciones/dgnstc_bmen_clnc.pdf
5. Giorgio E. Introducción al diseño de *primers* [Internet]. 2015 [Agosto 2015; 10 Mayo 2019]. Disponible en: <http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/claroline/backends/download.php?url=L0Z1bmRhbWVudG9zX3Rl83JpY29zX2RlX2xhX3JlYWNjafNuLnBkZg%3D%3D&cidReset=true&cidReq=BOINFO>
6. Palomino C, González Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Rev. Scielo [Internet]. 2014 [11 Mayo 2019]. 15-16 Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020
7. Benavides C, Vallejo D, Astaiza J, Bastidas Y, Portilla J. Identificación de huevos de *Toxocara spp.* en zonas verdes de conjuntos cerrados del municipio de Pasto - Colombia. Rev. Biosalud [Internet]. 2017 [18 Mayo 2019]; (2):45. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v16n2/1657-9550-biosa-16-02-00044.pdf>

8. Ramón G. Prevalencia de *Helmintos* Gastrointestinales (Céstodos y Nemátodos) en Caninos en la Ciudad de Cuenca [Internet]. Cuenca: Saúl Landivar; 2012 [Junio 2012; 17 Mayo 2019]. Disponible en:
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/383/1/TESIS.pdf>
9. Izquieta L. Investigacionsalud.gob.ec. [Internet]. Ecuador: 2018 [Enero 2018; 16 Mayo 2019]. Disponible en:
<https://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/propad/proyecto3/>
10. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en perros atendidos en el consultorio veterinario “Mi Finquita” mediante examen coprológico [Internet]. Guayaquil; 2015 [Julio 2015; 19 Mayo 2019]. Disponible en:
<http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/4499/1/T-UCSG-PRE-TEC-CMV-8.pdf>
11. Latorre E, Nápoles M. Estudio Para Determinar la Contaminación con Parásitos Zoonóticos Caninos en Parques de la Zona Urbana del Distrito Metropolitano de Quito [Internet]. Ecuador: 2014 [Mayo 2014; 21 Mayo 2019]. Disponible en:
<http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3119/1/000110197.pdf>
12. Unapucha G. Prevalencia de Helmintos Enteroparásitos Zoonoticos y Factores Asociados en Caninos Domésticos (*canis familiaris*) en el Barrio El Progreso de la Parroquia San Juan de Pastocalle. Latacunga; 2018.
13. Amaguaña M. Prevalencia de Helmintos Enteroparásitos Zoonóticos y Factores Asociados en (*Canis familiaris*) en el Barrio Chinchil Robayos, Chinchil Villamarín, Trompucho. Latacunga; 2019.
14. Pearson R. *Toxocariasis*. [Internet]. México; 2005 [Mayo 2005; 23 Mayo 2019]. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/toxocariasis-es.pdf>
15. Manual MSD versión para profesionales [Internet]. Colombia: 2017 [Abril 2017; 22 Mayo 2019]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/enfermedades-infecciosas/nematodos-gusanos-redondos/toxocariasis>
16. De la Fé Rodríguez P, Duménigo B, Brito E, Aguiar J. *Toxocara canis* y Síndrome Larva Migrans Visceralis (*Toxocara canis* and Syndrome Larva Migrans Visceralis). Rev. REDVET [Internet]. 2006 [25 Mayo 2019]; Vol. VII: 4. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/pdf/636/63617138002.pdf>
17. Bardón M. Contribución a la Biología e Inmunología de *Toxocara Canis* [Internet]. Madrid; 1992 [1992; 24 Mayo 2019]. Disponible en:
<http://webs.ucm.es/BUCM/tesis//19911996/D/1/D1032001.pdf>

18. Despommier D. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. *Clin Microbiol Rev.* [Internet]. 2003 [25 Mayo 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC153144/>
19. Restrepo J. *Toxocara canis* [Internet]. 2015 [Abril 2015; 27 Mayo 2019]. Disponible en: https://rodas5.us.es/file/36efc930-3256-4db2-9b39-a1a9b64fc971/1/5_toxocara_canis_SCORM.zip/pagina_01.htm
20. Endara M. *Toxocara canis* [Internet]. Cuba: 2013 [cited 27 May 2019]. Disponible en: https://www.ecured.cu/Toxocara_canis
21. Maldonado M. Prevalencia de Anticuerpos a *Toxocara canis*. en caballos de la Policía Montada de Iztapalapa, Distrito Federal [Internet]. México; 2014 [Mayo 2014; 29 May 2019]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/55524619.pdf>
22. Martínez A. Seroprevalencia de *Toxocara spp* en niños de Chalco Estado de México [Internet]. Ri.uaemex.mx. 2014 [29 May 2019]. Disponible en: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/32659/Tesis%20Albis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
23. Sievers. Prueba de una técnica para recuperar huevos de *Toxocara canis* de muestras de tierra. *Rev. Parasitol latinoam*; 2007: 5-6.
24. Alonso J, López M, Bojanich M, Marull J. Infección por *Toxocara canis* en población adulta sana de un área subtropical de Argentina. *Rev. Parasitol Latinoam.* 2004;(59):61-64.
25. Segovia A. *Toxocara canis* [Internet]. México; 2013 [Septiembre 2013; 1 June 2019]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7573/ANA%20ECILIA%20SEGOVIA%20MESTA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
26. Tuasa C. Prevalencia de Helminos Gastrointestinales Zoonóticos de caninos en Tres Parques Turísticos de la Ciudad de Ambato [Internet]. Ambato; 2015 [Mayo 2015; 3 June 2019]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/18365/1/Tesis%2030%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20339.pdf>
27. León M, Rojas A, Bustamante O. *Toxocara canis*: una zoonosis frecuente a nivel mundial. *Revista Ciencia y Agricultura.* 2016;(1):22.
28. Meza O. Larva Migrans Visceral. *Revista del Colegio de Médicos del Estado de Lara* [Internet]. 2011 [6 June 2019]; (1): 4. Disponible en: <https://revistacmvl.jimdo.com/suscripci%C3%B3n/volumen-2/toxocariosis/>

29. Negrete K. Parasitología Veterinaria, Técnicas de diagnóstico coprológico [Internet]. 2011 [11 Diciembre 2011; 22 June 2019]. Disponible en:
<http://karenpaterninanegrete.blogspot.com/2011/12/parasitologia-veterinaria-tecnicas-de.html>
30. Cardenas M, Chávez A, Casas E. Efectividad del fenbendazol y praziquantel para el control en dosis única de nemátodos y céstodes en perros. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú [Internet]. 2006 [22 June 2019]; Vol I: 2. Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172006000100004
31. Moya J. Toxocariosis. Revista Veterinaria Argentina [Internet]. 2015 [30 Junio 2019];:1. Disponible en:
<https://www.veterinariargentina.com/revista/2015/06/toxocariosis/>
32. Arcos L. Albendazol [Internet]. México 2007 [3 agosto 2007; 31 Junio 2019]. Disponible en:
http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Albendazol.htm
33. Martínez M. et. al Identificación morfológica y molecular de *Cysticercus fasciolaris* aislado de un roedor (*Rattus norvegicus*) de la provincia de Buenos Aires (Argentina) Rev. de Microbiología. [31 Junio 2019]Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754113700166>
34. Ferrer E. Técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de chagas. SABER Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente [Internet]. 2015 [9 Junio 2019]; Vol 27: 61. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/4277/427743080002.pdf>
35. Yopez R, Caicedo N, Ríos H. Principios de Biotecnología [Internet]. 2012 [15 Junio 2019]. Disponible en: <http://grupobiotec.blogspot.com/p/marco-teorico.html>
36. Equipo y Laboratorio C. Etapas de un Proceso PCR [Internet]. 2011 [2 Julio 2019]. Disponible en:
http://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=16764
37. Cortazar A, Silva E. Métodos Físico - Químicos en Biotecnología [Internet]. México; 2004 [Junio 2004; 12 Junio 2019]. Disponible en:
<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
38. Garrido M. PCR [Internet]. España: 2015 [Abril 2015; 19 Junio 2019]. Disponible en:
<https://www.ugr.es/~mgarrido/PCR.htm>

39. Premoli G, Gonzales A, Millán B, Percoco T, Vielma A. Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Cubana de Medicina Tropical* [Internet]. 2004 [3 Julio 2019]; Vol II: 3. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602004000200001
40. Romero A, Lares M, Romero A, Catalano E, Martínez M, Ferrer E. Estandarización de la Técnica de PCR para la detección de ADN de *Toxocara canis* (Warner, 1782) en muestras de tierra [Internet]. Research Gate. 2018 [16 Junio 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/325251196_ESTANDARIZACION_DE_LA_TECNICA_DE_PCR_PARA_LA_DETECCION_DE_ADN_DE_Toxocara_canis_WARNER_1782_EN_MUESTRAS_DE_TIERRA
41. Espinosa L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Espinosa L. *Las Herramientas Moleculares*. [Internet]. México: 2017. 521 [Junio 2019]. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/530/cap17.pdf>
42. Contreras B. Diseño de *primers* para PCR [Internet]. 2017 [Febrero 2017; 3 Julio 2019]. Disponible en: https://ead-csic-compbio.github.io/bioinformatica_estructural/node28.html
43. Reece J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [Internet]. Khan Academy. 2018 [Noviembre 2018; 19 Junio 2019]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
44. Loftus S. Iniciador o cebador [Internet]. 2018 [Diciembre 2018; 4 Julio 2019]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Iniciador-o-cebador>
45. Pinzón A. Introducción al diseño “in silico” de *primers*. [Internet]. Bogotá; 2006 [6 Julio 2019]. Disponible en: <http://bioinf.ibun.unal.edu.co/cbib/estudiantes/1-07/primerDesign.pdf>
46. Partida L. Sección III. Análisis de Ácidos Nucleicos [Internet]. 2016 [Marzo 2016; 8 Julio 2019]. Disponible en: http://www.ira.cinvestav.mx/portals/0/Documentos/LabLPPM/SecIII_Analisis_Acidos_Nucleicos_LPartida.ae6df34b-976a-4238-b615-525238c592a7.pdf
47. Mendoza D, Maldonado H. Optimización de una metodología para el aislamiento y detección molecular de huevos de *Toxocara canis* en muestras de suelo. *Revista de Ciencias Scielo* [Internet]. 2015 [8 Julio 2019]; Vol 1: 3. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-19352015000100003

48. Olave A, Mesa J, Botero J, Patiño E, García G, Alzate J. Producción y evaluación del antígeno recombinante TES-30 de *Toxocara canis* para el inmunodiagnóstico de toxocariasis [Internet]. Rev. Biomédica; 2016 [11 Julio 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-41572016000100005&script=sci_abstract&tlng=es
49. Khademvatan S, Rahim F, Tavalla M, Abdizadeh R, Hashemitabar M. PCR-Based Molecular Characterization of *Toxocara spp.* Using Feces of Stray Cats: A Study from Southwest Iran [Internet]. NCBI. 2019 [12 Julio 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3670902/>
50. Balagurasamy N, Galván E. *Primers* [Internet]. 2015 [Septiembre 2015; 12 Julio 2019]. Disponible en: https://www.academia.edu/28667914/_PRIMERS_DEFINICI%C3%93N_CRITERIO_S_DE_SELECCI%C3%93N_Y_DISE%C3%91O_
51. López M, et. al. Comparación de dos protocolos de extracción de ADN de *Trypanosoma cruzi* cultivados en medio axénico. [Internet]. Rev. Med. Perú. Exp; 2014. [17 Julio 2019]. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000200005#tab01
52. Molina N, et. al. Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de *Giardia lamblia* [Internet]. Rev. Scielo. 2006. [17 Julio 2019]. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122006000200006

15. ANEXOS

Anexo 1

AUTORA

CURRICULUM VITAE

DATOS PERSONALES:

Apellidos : Peñaherrera Ordóñez

Nombres : María Victoria

Fecha De Nacimiento : 04/08/1996

Edad : 22 Años

Estado Civil : Soltera

Nacionalidad : Ecuatoriana

Domicilio Actual : Latacunga

Teléfono Celular : 0987844688

Cédula : 0503623001



ESTUDIOS REALIZADOS:

Primaria : Escuela de Educación Básica “Once de Noviembre”

Secundaria : Unidad Educativa “Victoria Vásquez Cuví”

Superior : Universidad Técnica de Cotopaxi

TÍTULOS OBTENIDOS:

Bachiller en Ciencias

Proceso de Médico Veterinario

Anexo 2

TUTOR DE TITULACIÓN**DATOS PERSONALES****APELLIDOS:** Sambache Tayupanta**NOMBRES:** Juan Eduardo**ESTADO CIVIL:** Soltero**CEDULA DE CIUDADANÍA:** 1721796751**NÚMERO DE CARGAS FAMILIARES:** 0**LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO:** Quito, 22 de febrero de 1989**DIRECCIÓN DOMICILIARIA:** Simón Bolívar E-85 y calle del Hogar**TELÉFONO CONVENCIONAL:** 022315247 **TELÉFONO CELULAR:** 0998937933**EMAIL INSTITUCIONAL:** juan.sambache@.utc.edu.ec**TIPO DE DISCAPACIDAD:** Ninguna**# DE CARNET CONADIS:****ESTUDIOS REALIZADOS Y TÍTULOS OBTENIDOS**

NIVEL	TITULO OBTENIDO	FECHA DE REGISTRO	CÓDIGO DEL REGISTRO CONESUP O SENESCYT
TERCER	MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA	2013-07-08	1040-13-1225281
CUARTO	MASTER OFICIAL EN MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN	2017-05-11	7241100599
CUARTO	MASTER OF SCIENCE IN ANIMAL BREEDING AND REPRODUCTION BIOTECHNOLOGY	EN PROCESO	EN PROCESO

PUBLICACIONES RECIENTES (máximo 3)

Autor/ Coautor de artículo indexado	Nombre del Artículo	Nombre de la revista	Lugar (País-ciudad)	Fecha de la publicación
Juan Eduardo Sambache	ANÁLISIS GENÓMICO DE LA CALIDAD DE LA CARNE Y DEL METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN PORCINO	PUBLICACIONES CRAG	BARCELONA, ESPAÑA	04/07/2016
Juan Eduardo Sambache Daniel Crespo P.	SELECCIÓN Y DETECCIÓN DE INDELS EN EL GENOMA PORCINO A PARTIR DE DATOS DE SECUENCIACIÓN PARALELA MASIVA	AIDA JORNADAS	VALENCIA, ESPAÑA	15/03/2016

Anexo 3

Tabla 6 Datos recolectados sobre los caninos en estudio

N	Nombre del canino	Sexo	Edad	Hábitat	Vacunado	Desparasitado	Frecuencia	Parasitado	Técnica cualitativa	Fecha de recolección de la muestra fecal	Fecha de desparasitación	Fecha de Recolección del parásito
1	Tommy	Macho	3 meses	Tierra	No	No	-	Si	+	22/04/2019	24/04/2019	25/04/2019
2	Moncha	Hembra	10 años	Tierra	No	No	-	No	-	22/04/2019	24/04/2019	-
3	Lucero	Hembra	2 años	Casa	Sí	Sí	Cada año	No	-	22/04/2019	24/04/2019	-
4	Kelly	Hembra	2 años	Terraza	No	No	-	No	-	22/04/2019	24/04/2019	-
5	Clarita	Hembra	1 año	Potrero	No	No	-	Si	+	22/04/2019	24/04/2019	26/04/2019
6	Chocolate	Macho	4 años	Potrero	No	No	-	Si	+	22/04/2019	24/04/2019	30/04/2019
7	Yuly	Hembra	7 años	Casa	No	No	-	No	-	22/04/2019	24/04/2019	-
8	Davicho	Macho	16 meses	Tierra	Sí	Sí	Cada 6 meses	No	-	22/04/2019	24/04/2019	-
9	Coqueta	Hembra	1 año	Tierra	No	No	-	No	-	22/04/2019	24/04/2019	-
10	Bobby	Macho	3 meses	Tierra	No	No	-	Si	-	22/04/2019	24/04/2019	29/04/2019
11	Saturno	Macho	9 meses	Terraza	No	No	-	No	-	25/04/2019	26/04/2019	-
12	Lunita	Hembra	15 meses	Tierra	No	No	-	No	-	25/04/2019	26/04/2019	-
13	Goty	Macho	3 años	Tierra	No	No	-	No	-	25/04/2019	26/04/2019	-
14	Bruno	Macho	2 meses	Casa	No	No	-	Si	+	25/04/2019	26/04/2019	26/04/2019
15	Laika	Hembra	18 meses	Tierra	No	No	-	No	-	25/04/2019	26/04/2019	-
16	Sukita	Hembra	2 años	Tierra	No	No	-	No	-	25/04/2019	26/04/2019	-
17	Teddy	Macho	1 año	Casa	No	No	-	No	-	25/04/2019	26/04/2019	-
18	Solovino	Macho	2 meses	Tierra	No	No	-	Si	-	25/04/2019	26/04/2019	27/04/2019
19	Doky	Macho	4 años	Tierra	No	No	-	No	+	25/04/2019	26/04/2019	-

20	Franchesca	Hembra	1 año	Terraza	No	No	-	No	-	25/04/2019	26/04/2019	-
21	Hada	Hembra	4 años	Terraza	Sí	Sí	Cada 2 años	No	-	27/04/2019	28/04/2019	-
22	Toby	Macho	3 meses	Tierra	No	No	-	Si	-	27/04/2019	28/04/2019	29/04/2019
23	Negríto	Macho	4 meses	Tierra	No	No	-	Si	+	27/04/2019	28/04/2019	30/04/2019
24	Gally	Hembra	15 meses	Tierra	No	No	-	No	-	27/04/2019	28/04/2019	-
25	Aranza	Hembra	2 años	Tierra	No	No	-	No	+	27/04/2019	28/04/2019	-
26	Bernavé	Hembra	2 años	Tierra	No	No	-	No	-	27/04/2019	28/04/2019	-
27	Liss	Hembra	4 años	Casa	No	No	-	No	-	27/04/2019	28/04/2019	-
28	Dalila	Hembra	3 años	Casa	No	No	-	No	-	27/04/2019	28/04/2019	-
29	Sofía	Hembra	15 meses	Casa	Sí	Sí	Cada año	No	-	27/04/2019	28/04/2019	-
30	Juanita	Hembra	18 meses	Casa	No	No	-	No	-	27/04/2019	28/04/2019	-
31	Andy	Macho	3 años	Casa	Sí	Sí	Cada 2 años	No	-	31/04/2019	01/05/2019	-
32	Caracol	Macho	1 año	Casa	Sí	Sí	Cada 4 meses	No	-	31/04/2019	01/05/2019	-
33	Cumandá	Hembra	6 años	Tierra	No	No	-	Si	-	31/04/2019	01/05/2019	03/05/2019
34	Piolín	Macho	1 año	Tierra	No	No	-	No	-	31/04/2019	01/05/2019	-
35	Pedro	Macho	8 meses	Tierra	No	No	-	Si	+	31/04/2019	01/05/2019	03/05/2019
36	Ricky	Macho	1 año	Tierra	No	No	-	No	-	31/04/2019	01/05/2019	-
37	Rufo	Macho	18 meses	Tierra	No	No	-	No	-	31/04/2019	01/05/2019	-
38	Solecito	Hembra	1 año	Tierra	No	No	-	Si	++	31/04/2019	01/05/2019	03/05/2019
39	Campeón	Macho	2 años	Casa	No	No	-	No	-	31/04/2019	01/05/2019	-
40	Chapi	Hembra	2 años	Casa	Sí	Sí	Cada año	No	-	31/04/2019	01/05/2019	-
41	Raul	Macho	3 años	Casa	No	No	-	No	-	03/05/2019	04/05/2019	-
42	Jhon Patricio	Macho	3 años	Terraza	No	No	-	No	-	03/05/2019	04/05/2019	-
43	Kiara	Hembra	5 años	Casa	No	No	-	No	-	03/05/2019	04/05/2019	-
44	Kuki	Hembra	4 años	Casa	No	No	-	No	-	03/05/2019	04/05/2019	-
45	Tefy	Hembra	3 años	Tierra	No	No	-	No	-	03/05/2019	04/05/2019	-

46	Carlo	Macho	1 año	Tierra	No	No	-	No	-	03/05/2019	04/05/2019	-
47	Rubí	Hembra	4 meses	Césped	No	No	-	Si	++	03/05/2019	04/05/2019	05/05/2019
48	Lazy	Hembra	6 meses	Césped	No	No	-	Si	+	03/05/2019	04/05/2019	05/05/2019
49	Blanca	Hembra	3 meses	Césped	No	No	-	Si	+	03/05/2019	04/05/2019	05/05/2019
50	Dogo	Macho	2 meses	Césped	No	No	-	Si	-	03/05/2019	04/05/2019	05/05/2019
51	Chiquita	Hembra	2 meses	Césped	No	No	-	Si	-	06/05/2019	07/05/2019	08/05/2019
52	Pelusa	Macho	5 meses	Césped	No	No	-	Si	-	06/05/2019	07/05/2019	08/05/2019
53	Tiago	Macho	14 meses	Tierra	No	No	-	No	-	06/05/2019	07/05/2019	-
54	Yankee	Macho	2 años	Casa	No	No	-	No	-	06/05/2019	07/05/2019	-
55	Josafa	Macho	1 año	Casa	No	No	-	No	-	06/05/2019	07/05/2019	-
56	Lulú	Hembra	4 meses	Césped	No	No	-	Si	-	06/05/2019	07/05/2019	08/05/2019
57	Romeo	Macho	2,5 meses	Césped	No	No	-	Si	-	06/05/2019	07/05/2019	08/05/2019
58	Junior	Macho	2,5 meses	Césped	No	No	-	Si	-	06/05/2019	07/05/2019	08/05/2019
59	Julieta	Hembra	2,5 meses	Césped	No	No	-	Si	-	06/05/2019	07/05/2019	08/05/2019
60	Hugo	Macho	8 años	Césped	No	No	-	No	-	06/05/2019	07/05/2019	-

Anexo 4

DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN



UDLA - LAB

Formulario de Solicitud Servicio de Secuenciación Sanger de Toxocara canis

#	Código de Proyecto UDLA	Investigador / Cliente	Código del tubo	Peso del producto diseccionado
1	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC01	0.0080
2	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC02	0.0072
3	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC03	0.0071
4	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC04	0.0069
5	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC05	0.0065
6	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC06	0.0065
7	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC07	0.0091
8	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC08	0.0257
9	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC09	0.0209
10	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC10	0.0598
11	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC11	0.013
12	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC12	0.0114
13	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC13	0.0157
14	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC14	0.0085
15	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC15	0.0113
16	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC16	0.0145
17	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC17	0.0109
18	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC18	0.0224
19	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC19	0.0114
20	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC20	0.0119
21	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC21	0.0245
22	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC22	0.0082
23	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC23	0.0302
24	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC24	0.0065
25	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC25	0.0064
26	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC26	0.0045
27	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC27	0.0052
28	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC28	0.0129
29	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC29	0.0067
30	DGI-STOX-19-001	Ma. Victoria Peñaherrera	TXC30	0.0210

Anexo 5


SERVICIOS ESPECIALIZADOS DE LABORATORIO
 LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN


COTIZACIÓN #: DGI-STOX-19-001

FECHA: 04 Julio 2019

VALIDEZ: 30 días

ATENCIÓN: Victoria Peñaherrera

E-MAIL: mavicky4@gmail.com

TELÉFONO: -

DIRECCIÓN: -

Estimada Victoria,

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
Extracción de ADN	\$ 69.00
PCR de Amplificación	\$ 46.00
Electroforesis en Agarosa	\$ 38.00
Purificación y Secuenciación SANGER (fwd y rev)	\$ 134.00
TOTAL	\$ 299.00

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 30 muestras (en un solo pedido).
- Se otorga un descuento del 3% 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
4. Para el análisis molecular solicitado se requiere la entrega de muestras de la siguiente manera:
 - El cliente debe entregar el tejido diseccionando, empacado 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. ENVIO 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.

FIRMA

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.

