



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL ADN DE *Toxocara Canis*”

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de
Médica Veterinaria y Zootecnista

Autora:

Topa Naranjo Jessica Judith

Tutora:

Blanca Mercedes Toro Molina Dra. Mg.

LATACUNGA – ECUADOR

Marzo 2021

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Topa Naranjo Jessica Judith, con cédula de ciudadanía No.0504048968, declaro ser autora del presente proyecto de investigación: “Identificación molecular del ADN de *Toxocara canis*”, siendo la Doctora Mg. Blanca Mercedes Toro Molina, Tutora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

Latacunga, 08 de marzo, 2021

Jessica Judith Topa Naranjo

Estudiante

C.C: 050404896-8

Dra. Mg. Blanca Mercedes Toro Molina

Docente tutora

C.C: 050172099-9

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DEL AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **TOPA NARANJO JESSICA JUDITH**, identificada con cédula de ciudadanía **0504048968**, de estado civil Soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, el Ph.D. Nelson Rodrigo Chiguano Umajinga, en calidad de Rector encargado y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez Barrio El Ejido Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - **LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de **Medicina Veterinaria**, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “**Identificación molecular del ADN de *Toxocara canis***”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad, según las características que a continuación se detallan:

Historial académico.- Inicio de la carrera: Abril 2016 – Agosto 2016 - Finalización: Octubre 2020 - Marzo 2021

Aprobación en Consejo Directivo: 26 de enero del 2021

Tutora: Dra. Mg. Blanca Mercedes Toro Molina

Tema: “Identificación molecular del ADN de *Toxocara Canis*”

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 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 CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los

siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

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

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA 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 CEDENTE** podrá utilizarla.

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

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en las cláusulas cuartas, constituirá causal de resolución del presente contrato. En VII 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 08 días del mes de Marzo de 2021.

Topa Naranjo Jessica Judith

LA CEDENTE

Ph.D. Nelson Rodrigo Chiguanu Umajinga

EL CESIONARIO

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“**IDENTIFICACION MOLECULAR DEL ADN DE *TOXOCARA CANIS***”, de Topa Naranjo Jessica Judith de la Carrera **Medicina Veterinaria**, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 08 de Marzo de 2021

Dra. Mg. Blanca Mercedes Toro Molina

DOCENTE TUTORA

C.C: 050172099-9

AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, la postulante: Topa Naranjo Jessica Judith, con el título de Proyecto de Investigación. “IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ADN DEL *TOXOCARA CANIS*”, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

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

Latacunga, 08 de Marzo del 2021

Lector 1 (Presidente)

Dr. PhD. Edilberto Chacón Marcheco

CC: 175698569-1

Lector 2

Dr. PhD. Rafael Garzón Jarrin

CC: 050109722-4

Lector 3

Dr. Mg. Xavier Quishpe Mendoza

CC: 050188013-2

AGRADECIMIENTO

Primero quiero agradecer a DIOS por guiarme y permitirme culminar esta meta que tanto eh anhelado.

A mi madre Guillermina Germania Naranjo Naranjo que es la persona más importante en mi vida, que me ha apoyado en todas las decisiones siendo mi guía en cualquier adversidad brindándome apoyo incondicional.

A la Dra. Karla Mena que con su profesionalismo y experiencia me ha guiado por el camino del conocimiento, brindándome apoyo y palabras de aliento para do desistir.

A mi tutora MVZ. Mg. Mercedes Toro y lectores por guiarme en la estructuración y elaboración de mi proyecto.

A mi querida UTC por brindarme la oportunidad de formar parte de tan prestigiosa institución y aprender en sus aulas, los cuales recordare por toda la eternidad.

Jessica Judith Topa Naranjo

DEDICATORIA

Dedico con todo mi corazón esta tesis a mi madre; pues sin ella ninguna de mis metas se hubiera cumplido. Tu bendición diaria a lo largo de mi vida me motivo constantemente a seguir por el camino del bien. Por eso te dedico mi trabajo madre mía en agradecimiento a tu paciencia y cariño.

Jessica Judith Topa Naranjo

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
TITULO: “IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL ADN DE *TOXOCARA CANIS*”

AUTORA: Topa Naranjo Jessica Judith

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó entre Octubre 2020 - Marzo 2021 en la Provincia de Cotopaxi, Cantón Latacunga, zonas rurales de la ciudad, el objetivo de la investigación es; la identificación molecular de ADN del *Toxocara canis*. Se recogieron muestras de materia fecal de 150 caninos domésticos, de ambos sexos, con propietario identificado, para la realización de exámenes coproparasitarios y evaluar la presencia de huevos de parásitos gastrointestinales de *Toxocara canis*. La edad de los caninos en estudio es de 2 meses hasta los 3 años dando prioridad en los exámenes coproparasitarios a la población de muestra canina de 2-9 meses de edad. Se procedió a realizar el respectivo análisis de la muestra mediante la técnica de flotación de Sheather la cual consistió en tomar 3 gramos de la muestra y homogeneizarla en 20 gramos de la solución de Sheather. Resultando mediante el examen microscópico 16 muestras positivas a la presencia de huevos del parásito de *Toxocara canis*. Se desparasitó vía oral a toda la población en estudio debido a que la localización de los caninos son en las zonas rurales de la ciudad, por ende no tienen un adecuado

cuidado profiláctico y sanitario de los animales domésticos, se obtuvo 25 ejemplares adultos de *Toxocara canis* de los cuales 16 fueron identificados mediante la técnica de examen coproparasitario, basados en diagnósticos macroscópicos, los 9 ejemplares restantes se obtuvieron sin previo examen coproparasitario debido a que la progenitora presentaba antecedentes parasitarios. El 100% de estos parásitos se identificaron como *Toxocara canis* basado en las características morfológicas, se determinó que la técnica microscópica no es efectiva ante una carga parasitaria baja. Para la tipificación morfológica se siguió los protocolos de disección para la familia *Ascaridae*. De los 20 ejemplares adultos de *Toxocara canis* evaluados 19 fueron confirmadas mediante examen de PCR, 1 muestra resultó negativa ya que existen diversos factores que influyen en el resultado de la muestra.

Palabras claves: Homogeneizar, PCR, macroscopicos, tipificación, profiláctico.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES
TITLE: "MOLECULAR IDENTIFICATION OF TOXOCARA CANIS DNA"

AUTHOR: Topa Naranjo Jessica Judith

ABSTRACT

The present research was carried out from October 2020 to March 2021 in Cotopaxi province, Latacunga City, in the rural areas of the city, the objective of this research is the molecular identification of *Toxocara canis* DNA. We collected fecal matter samples in 150 domestic canines, male and female dogs, of the registered owners, to the performance of the deworming tests and to evaluate the presence of *Toxocara canis* gastrointestinal parasite eggs. The age of the canines under research is from 2 months to 3 years, prioritizing the deworming tests in the population in the age from 2-9 months old. We performed the respective analysis of the sample using Sheather's flotation technique, which involved taking 3 grams of the sample and homogenizing it in 20 grams of Sheather's solution. According to the microscopic examination 16 samples gave positive for the presence of *Toxocara canis* parasite eggs. The entire population under study was dewormed orally due to the fact that the canines are located in rural areas of the city, therefore they do not have adequate prophylactic and sanitary care of domestic animals, 25 adult specimens of *Toxocara canis* were obtained in total and 16 were identified by deworming tests technique, based on macroscopic diagnoses; the remaining 9 specimens were obtained without deworming tests due to the fact that the progenitor of the specimens had a parasitic veterinary history. 100% of these parasites were identified as *Toxocara canis* based on morphological characteristics, it was determined that the microscopic technique is not effective when examining a low parasite load. We follow the dissection protocols for the *Ascaridae* family for the morphological typing. Of the 20 adult specimens of *Toxocara canis* evaluated, 19 were confirmed by PCR test, 1 sample was negative since there were several factors that have already influenced the result of the sample.

Keywords: Homogenize, PCR, macroscopic, typing, prophylactic

ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DEL AUTOR	iii
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	vi
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vii
AGRADECIMIENTO.....	viii
DEDICATORIA	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
ÍNDICE DE CONTENIDO	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xvi
ÍNDICE DE ANEXOS	xvii
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO.....	2
3.1. Directos.....	2
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:.....	3
5. OBJETIVOS:.....	3
6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA	4
6.1. Distribución.....	4
6.1.2. Etiología	4
6.1.3. Fisiopatología	4
6.1.4. Clasificación taxonómica de <i>Toxocara canis</i>	4
6.1.5. Toxocariasis	5
6.2.1. Características del parásito.....	5
Descripción morfológica del parásito adulto de <i>Toxocara Canis</i>	5
6.2.2. Periodo de patencia.	6
6.2.3. Descripción morfológica del huevo de <i>Toxocara Canis</i>	6
6.3.1. Larvas	8
6.3.2. Adultos.....	8
6.4.1. Ciclo de vida	9

6.5.1.	Síntomas	11
6.6.1.	Lesiones.....	11
6.8.	Métodos de diagnostico.....	12
6.8.1.	Diagnóstico clínico	12
6.8.2.	Diagnostico Físico	12
6.8.3.	Diagnóstico de laboratorio.....	13
6.8.4.	Examen microscópico	13
6.8.5.	Técnica directa.....	13
6.8.6.	Técnicas de flotación.....	13
6.8.7.	Diagnóstico de huevos de <i>Toxocara canis</i> en el suelo.....	14
6.8.8.	Tratamiento	14
6.9.	Métodos de Diagnóstico Molecular de Parásitos	15
6.9.1.	Métodos moleculares fenotípicos y genotípicos.....	15
6.9.2.	Métodos moleculares para tipificación.....	16
6.9.3.	Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)	16
6.9.4.	Parámetros que influyen en la PCR.....	17
6.9.5.	Primers (Cebadores, oligonucleótidos).....	18
6.9.6.	Los pasos para PCR.....	19
6.9.7.	La Taq polimerasa	20
6.9.8.	Características del Primers	23
7.	VALIDACIÓN DE HIPÓTESIS:.....	25
8.	METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL:	25
8.1.	Localización y Duración del proyecto.....	25
8.2.	MATERIALES Y MÉTODO DEL ENSAYO	41
8.2.1.	Material biológico	41
8.2.2.	Material de laboratorio	41
8.2.4.	Equipos.....	42
9.	DISEÑO EXPERIMENTAL	43
9.1.	Obtención de muestra biológica	43

9.2. Extracción de ADN.....	44
9.3. A partir de fenol-cloroformo.....	44
9.5. Diseño y selección de Primers.....	44
9.6. Amplificación de Fragmentos por PCR	45
9.7. Electroforesis	45
9.8. Secuenciación de ADN	46
10. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	46
10.1. Preparación de la solución azucarada (Sheather).....	46
10.2. Disección del parásito para garantizar la integridad del ADN.....	48
10.3. Extracción orgánica de ADN.....	49
10.4. Cuantificación y dilución de muestras de extractos de ADN.....	49
10.5. Amplificación de fragmentos por PCR	50
10.6. VERIFICACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN.....	51
10.7. Secuenciación	51
11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
12. IMPACTOS TÉCNICOS, (SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS).....	55
13. CONCLUSIONES.....	57
14. RECOMENDACIONES	57
15. BIBLIOGRAFIA	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica de <i>Toxocara Canis</i>	4
Tabla 2: Características y aplicaciones de PCR.....	20
Tabla 3: Cualificación y dilución de muestras de extractos de ADN.....	49
Tabla 4: Componentes PCR.....	50
Tabla 5: Parámetros PCR.....	51
Tabla 6: Códigos y peso de muestras parasitarias	53
Tabla 7: Recolección de datos de caninos en estudio	69

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico1: Parásitos adultos; Hembra (Izq), Macho (Derecha).....	6
Grafico 2: Vista microscópica de toxocara canis extremidad cefálica.	6
Grafico 3: Huevo larvado y larva eclosionando de Toxocara canis.	7
Grafico 4: Huevo de Toxocara canis.	7
Grafico 5: Ciclo biológico de Toxocara canis	10
Grafico 6: Alineamiento básico de la secuencia de nucleótidos del amplificado del ITS 2 del ADNr de T. canis	25
Grafico 7: Resultado amplificación	51
Grafico 8: Resultado de amplificación extraídas por el método fenol/cloroformo.....	53
Grafico 9: Resultado de amplificación extraídas por el método fenol/cloroformo.....	54

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Aval De Traducción	65
Anexo 2 Hoja de vida de estudiante	66
Anexo 3 Hoja De Vida Tutor.....	67
Anexo 4 Tabla 6: Recolección de datos de caninos en estudio.....	69
Anexo 5..	78
Anexo 6	79
Anexo7	80
Anexo 8	81

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

“Identificación molecular del ADN de *Toxocara canis*”

Fecha de inicio:

Noviembre 2020

Fecha de finalización:

Marzo 2021

Lugar de ejecución:

Provincia de Cotopaxi/ Cantón Latacunga/ Zonas rurales de la ciudad – Universidad de las Américas – Universidad Técnica de Cotopaxi.

Facultad que auspicia:

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia:

Medicina Veterinaria

Proyecto de investigación vinculado:

Determinación de enfermedades infecciosas y parasitarias de los animales domésticos de la región 3.

Equipo de Trabajo:

Topa Naranjo Jessica Judith (Anexo 2)

Dra.- Toro Molina Blanca Mercedes, Mg. (Anexo 3)

Área de Conocimiento:

Área: Agricultura

Sub área: Veterinaria

Línea de investigación:

Salud Animal

Sub líneas de investigación de la Carrera:

Parasitología, microbiología, inmunología y sanidad animal.

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Los varios tipos de parasitosis son una de las patologías más frecuentes, en animales como en humanos desencadenando en una alta morbilidad y mortalidad. *Toxocara Canis* es un parásito zoonótico de gran importancia socioeconómica en todo el mundo. (1) Por lo cual es importante realizar correctas identificaciones clínicas y moleculares del respectivo parásito con el propósito de la prevención y control. La identificación precisa de estas especies y la diferenciación entre sí tienen un papel importante para investigar sus ciclos de vida, epidemiología y diagnóstico específico. (2) Diversas técnicas se utilizan para detectar contaminación por parasitosis, en este caso estudiamos las formas de identificar *Toxocara canis*: análisis histológicos, PCR, y los ensayos coprológicos son los más frecuentes con los cuales se evidencia un gran número de muestras analizadas. (3) El método de diagnóstico más, seguro, rápido, sensible, alternativo, con los que podemos cuantificar que patógenos específicos afectan al animal es la identificación molecular.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza en el diagnóstico y estudio de taxonomía del parásito, análisis epidemiológicos e investigación genética de poblaciones, destaca la importancia de los avances producidos por la aplicación de esta técnica en el campo de la parasitología. La detección de ADN mediante PCR es básicamente la desnaturalización de la doble hebra de ADN por calor y luego la disminución de la temperatura para permitir que los cebadores específicos se unan a la secuencia de interés. Con el transcurso de los años se ha ido mejorando las diversas versiones adecuándola para diversas situaciones. Se describe el uso de la multiplex PCR, la loop mediated isothermal amplification LAMP, la real time PCR, y la reverse transcriptase PCR. Algunos autores han sugerido que la reverse transcriptase PCR puede colaborar con la identificación puntual del estadio en el que se encuentra el parásito. (4)

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

3.1. Directos

- Investigadores a futuro que se enfoquen en el estudio molecular.
- La investigadora principal del proyecto, requisito previo a la obtención del Título de Médico Veterinario y Zootecnista.

3.2. Indirectos:

- Investigadores y estudiantes de la carrera de Medicina Veterinaria que estén enfocados en el camino de la parasitología de pequeñas especies.
- Laboratorios clínicos que contarán con una técnica más precisa para la identificación de los diversos parásitos.

4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:

Las infestaciones parasitarias comunes a nivel mundial son las de origen gastrointestinal, ya que afectan severamente la salud tanto de la mascota como de los propietarios. El canino es el animal doméstico más frecuente en los diversos hogares, por lo tanto establece un estrecho contacto con el propietario de ahí el origen de diversos tipos de contaminaciones. Afectando el bienestar y vitalidad del paciente el mismo conlleva daños económicos, ambientales, sociales, los mismos disminuirían notablemente al establecer los diagnósticos apropiados y tempranos en los diversos estadios del parásito. Los caninos son los hospedadores de diversos parásitos intestinales, que causan efectos nocivos en la salud como; Ascáridos, tenias, anquilostomidos, tricúridos. Los ascáridos género *Toxocara canis*, son los nematodos que infectan a los caninos alrededor del todo mundo produciendo las parasitosis más comunes considerándose una enfermedad de nivel zoonótico. Para lograr una adecuada identificación del mismo se han desarrollado a lo largo de diversas investigaciones estudios morfológicos, inmunológicos y moleculares aplicadas en las diferentes formas evolutivas y adultas del parásito. La técnica molecular es la técnica más sensible. Ya que engloba diferentes técnicas de la biología molecular que se utilizan para identificar y analizar los marcadores básicos del genoma. Para ello se utiliza la técnica de PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa) ya que es una técnica que ha revolucionado la investigación porque permite clonar, manipular, y detectar fragmentos de ADN. En la actualidad la identificación molecular de *Toxocara canis* no es una técnica que se utiliza de manera habitual ya que se tiene inconvenientes con los métodos que se emplea, por ello el método más utilizado en la identificación de huevos de parásitos es la microscopia la técnica no es específica en cuanto se requiera la identificación detallada del huevo del parásito en estudio.

5. OBJETIVOS:

5.1. General

- Tipificar genéticamente el *Toxocara canis* mediante la caracterización morfológica y molecular en las zonas rurales del cantón Latacunga Provincia de Cotopaxi.

5.2. Específicos

- Determinar la presencia de *Toxocara canis* en muestras fecales mediante examen coproparasitario.
- Identificar *Toxocara canis* mediante la amplificación de una región del genoma mediante el uso de primers específicos.

6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

6.1. Distribución

Toxocara canis es más habitual que *toxocara cati*. Se encuentran alrededor de todo el mundo en la tierra es necesario tener en cuenta que la mayoría de los ascàridos causan enfermedades al humano. Los huevos de *Toxocara* aparecen en el 2-88% de muestras recogidas en varios países. En América latina, las cifras varían de 1.8% a 78%. Son muy resistentes a diversas temperaturas y pueden sobrevivir, durante años a temperaturas de 10 - 30°C, en ambiente húmedo y oxigenado, al cabo de 2 - 6 semanas, se desarrollan huevos embrionados infectantes con larvas L3 en su interior. (5)

6.1.2. Etiología

El género *Toxocara canis* incluye dos especies, que afecta a hospedadores específicos:

- *Toxocara canis*, que afecta a perros: además, de zorros, lobos, lince. (6)
- *Toxocara cati*, que afecta a gatos y otros felinos silvestres. (6)

6.1.3. Fisiopatología

Los huevos y parásitos adultos de *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, representan un problema en la salud publica ya que se eliminan en el medio ambiente a través de las heces. Diversos estudios demuestran que los humanos pueden ingerir accidentalmente los huevos que estén contaminados ya que poseen una cubierta gruesa y rugosa con varias capas concéntricas que les permite adherirse a superficies como, patios traseros, areneros, parques públicos, áreas de juegos infantiles, lagos. Se destacan hábitos como la geofagia a su vez se pueden alimentar de huéspedes ya infectados como *Oryctolagus Cuniculus* (conejo). (7) El desarrollo larvario de *Toxocara Canis* no se completa en el humano, pero puede permanecer y adaptarse al ciclo biológico vivos por varios meses.

6.1.4. Clasificación taxonómica de *Toxocara canis*

Los nematodos del Orden Ascaridida han sido el tópico de varias investigaciones sobre filogenética y taxonomía. En el orden se describes más de 50 géneros distribuidos en varias especies. (8)

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *Toxocara Canis*

Dominio: Eukaryota

Reino: Animalia

Subreino: Bilateria

Rama: Protostomia
Infrareino: Ecdysozoa
Superphylum: Aschelminthes
Phylum: Nematelminthes
Clase: Secercentea
Subclase: Rhabditia
Orden: Ascaridida
Suborden: Ascaridina
Superfamilia: Ascaridoidea
Familia: Toxocaridae
Género: Toxocara
Especie: Canis

Fuente (9)

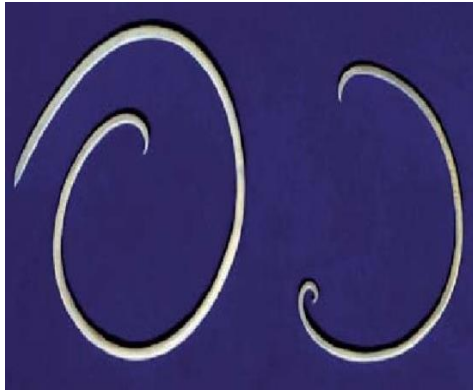
6.1.5. Toxocariasis

La toxocariosis es una zoonosis causada por la ingestión de huevos infectivos de *Toxocara* spp. El cual es un helminto propio de los perros y gatos. Este tipo de parasitosis afecta directamente a niños que están en contacto con cachorros no desparasitados o que juegan en las plazas, ya que es un medio de contagio de diversas patologías. (10) De forma accidental, el ser humano ingiere los huevos larvados de diversos parásitos, que eclosionan en el tracto intestinal y las larvas liberadas atraviesan el epitelio intestinal y los vasos sanguíneos, donde migran hacia los diferentes órganos viscerales y tejidos del cuerpo humano. (11)

6.2.1. Características del parásito

Descripción morfológica del parásito adulto de *Toxocara Canis*.

Los parásitos de *Toxocara canis* son nematodos adultos son dioicos, de tamaño grande y con color crema, extremo anterior con 3 labios grandes que envuelven una pequeña abertura bucal y alas cervicales.



Fuente: (64)

Grafico1: Parásitos adultos; Hembra (Izq), Macho (Derecha).



Fuente: (65)

Grafico 2: Vista microscópica de toxocara canis extremidad cefálica.

6.2.2. Periodo de patencia.

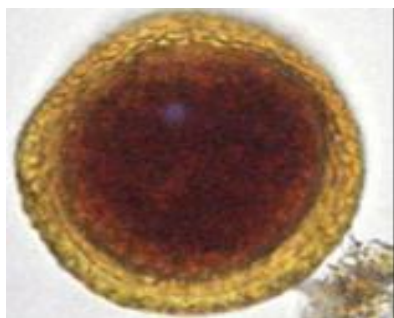
Variable: de semanas a meses. (13) Primera infestación del canino (*T. canis*), 4-5 semanas. Infestación prenatal (*T. canis*), 3-4 semanas. 27-35 días tras infección lactogénica, 32 a 39 días tras la ingestión de huevos. (12)

Fases infectantes y vías de transmisión

La vía de transmisión es variable. Las vías de infección frecuente son la ingestión de huevos embrionados, que proceden de diversos suelos o directamente del animal, larvas en leche u hospedadores parenéticos. (14)

6.2.3. Descripción morfológica del huevo de *Toxocara Canis*.

Los huevos de *Toxocara canis* son casi esféricos, miden de 75 – 90 micras de ancho y de 85 a 95 micras de largo, cascara gruesa y rugosa, subglobulosos, presentan una cubierta irregular, componente lipídico superficial que les permite adherirse a cualquier elemento. (15) No están embrionados cuando salen a través de las heces del canido poseen una cubierta gruesa ornamentada con pequeñas depresiones conteniendo en su interior la célula del huevo globular que ocupa la cavidad interna con un color oscuro uniforme. (9) Presentan un sistema reticular superficial de cresta y nervaduras. (16)



Fuente: (66)
Grafico 3: Huevo de
Toxocara canis.



Fuente: (64)
Grafico 4: Huevo larvado y larva
eclosionando de *Toxocara canis*.

La fertilización estimula inmediatamente la formación de la cubierta que tiene cuatro capas, tres la forma el propio huevo y la cuarta se añade por secreciones del útero, Mientras el huevo está en el útero, mantiene un aspecto albuminoso e incoloro; al entrar en contacto con la bilis del hospedero, se endurece y adquiere una coloración pardo amarillenta. (9)

En el desarrollo del huevo de *Toxocara canis*. Una de sus fases es en el medio exterior durante varias semanas antes de ser infeccioso, diversos estudios han demostrado que los huevos de *Toxocara canis* evolucionan a su estadio infectante en condiciones adecuadas como temperatura, humedad y aireación. (17)

Los huevos de los ascáridos se eliminan sin embrionar en las heces, en una gran cantidad; en condiciones favorables como (humedad, temperaturas entre 10°C Y 30 °C) se desarrollan en los huevos las larvas con capacidad infestante (L2), tras la ingestión vía oral, la larva sale del huevo dentro del intestino y penetra en la pared intestinal y llegan en animales jóvenes a la llamada (infestación primaria), a través de la linfa y sangre viaja al hígado al pulmón, donde empieza la muda a (L3). Continuando con la muda (L4), esta se da a través de la tráquea y esófago, pasa al intestino para convertirse en ascárido adulto tras otra muda. (18)

En los hospedadores inespecíficos (p. ej., ratones), y también en animales inmunes (p.ej., infección secundaria en perros) no se produce el desarrollo descrito de toxocara. Las larvas liberadas en el intestino atraviesan también la pared intestinal, y pasan a través del torrente circulatorio a la musculatura, donde se enquistan formando granulomas. Si tales hospedadores inespecíficos son ingeridos por el hospedador final las larvas de los ascáridos se liberan y prosiguen su desarrollo. (19)

En *Toxocara canis*, es importante conocer las vías principales de contagio como la infestación galactógena ya que las larvas pasan a través de la leche materna infestando a las crías. La

infección prenatal (el modo de infección más frecuente) o las larvas en reposo dentro de la musculatura de la madre (durante más de un año). (6) Son activadas por hormonas durante la gestación, y migran a través de la placenta al hígado de los fetos, donde alcanzan (el tercer estadio). Ahora se conoce que, el paso por los pulmones y la llegada a los intestinos tiene lugar solo después del nacimiento. (12)

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 son resistentes siempre y cuando exista humedad. (20)

6.3.1. 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. Las larvas de *Toxocara canis* pueden sobrevivir in vitro, en gran cantidad de glicoproteínas conocidas como antígenos secreción - excreción de T. canis. (21)

La cavidad bucal está rodeada de tres labios, los cuales están implicados en la recolección de alimento y el anclaje a los tejidos durante la migración. 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 peri esofágica 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)

6.3.2. Adultos

Los adultos nematodos son parásitos ascáridos capaces de infectar al hombre accidentalmente. Miden hasta 10 cm de largo; en el extremo anterior presentan aletas cervicales mucho más largas que anchas (2.4 mm x 0.2 mm) que se van estrechando hacia atrás. En el extremo cefálico se hallan los labios, que algunas veces tienen protuberancias dentiformes. (9)

6.3.2.1. Macho

Los machos constan de un extremo posterior ligeramente curvado y apéndice digitiforme, papilas caudales y dos espículas. (23) Suelen medir de 4 a 6 cm de largo por 2 a 2.5 mm de

ancho. El extremo posterior tiene una forma característica de enrollado en espiral. Parte posterior es curvada, con papilas caudales (digitiformes). (16)

6.3.2.2. Hembra

Anfidelfas, macroscópicamente de mayor tamaño, el extremo posterior tiene una figura en punta roma. (23) Las hembras miden de 6.5 a 10 cm de largo por 2.5 a 3 mm de ancho. Presenta un extremo posterior romo y en la parte posterior de la hembra es recta y terminada en punta. Tiene un alto potencial biótico ovipone 200.000 huevos por día. (9) 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. El esófago alcanza alrededor de 5 mm de largo incluyendo el ventrículo, el cual mide 0,5 mm de longitud. La vulva se encuentra situada entre la quinta y sexta partes anteriores del cuerpo del verme. (15)

Sus órganos reproductores son de color blanco, cuando se ve a través de la cutícula de los ejemplares recién evacuados el intestino tiene un color gris o negro, y los vermes tienen un color más oscuro que cuando estaban vivos. (24)

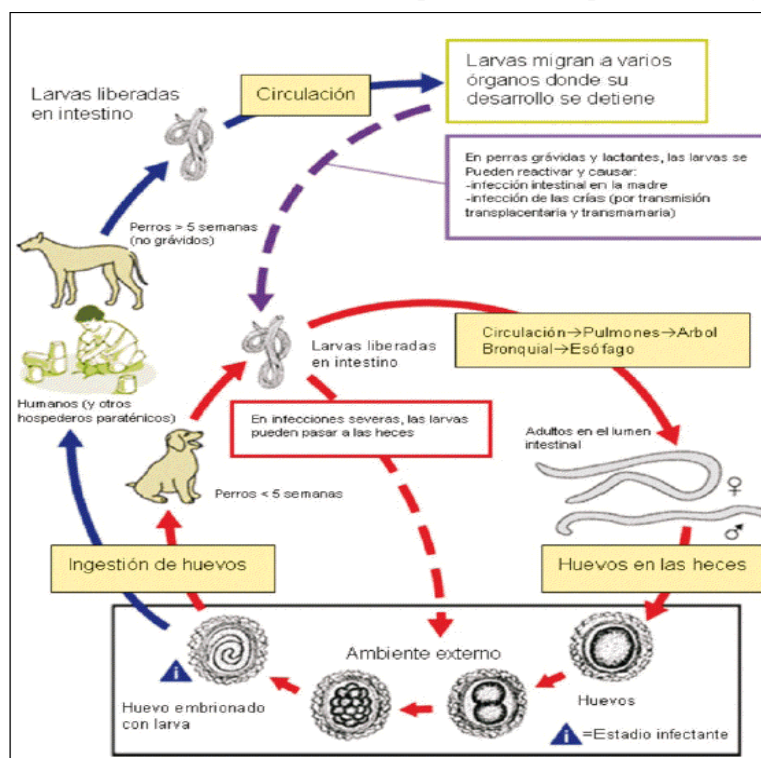
6.4.1. Ciclo de vida

En el ciclo de vida de *Toxocara canis*. Los huevos sin embrionar son expulsados con las heces de los caninos (Hospedador definitivo) al medio ambiente, donde embrionan, alcanzando el estado de LII entre 9 y 15 días, dependiendo de las condiciones ambientales. Las hembras depositan huevos sin segmentar en el intestino delgado, que salen con las heces y son extraordinariamente resistentes, pues permanecen viables desde varios meses hasta más de un año. Las condiciones medioambientales, especialmente la humedad, temperatura y tensión de oxígeno, influyen en el desarrollo de larvas infestantes que puede durar 2-5 semanas. A 26-30°C, e inmersos en agua, el desarrollo del huevo tiene lugar en 9-18 días. (19)

Para un eficaz proceso de formación del embrión los requisitos indispensables son la presencia de O₂ como la elevada humedad relativa (85%-95%). (25) Para *Toxocara canis*, el suelo es un gran reservorio, donde los huevos evolucionan hasta el estadio juvenil (LII), 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 se da 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, crecimiento y como etapa final su eliminación. (26)

El contacto entre *T. canis* y el hombre se inicia también por la ingestión de huevos que contienen la larva LII infectante. La eclosión se puede realizar tanto en el estómago como en el intestino delgado ya que los estímulos requeridos son muy diversos, lo que puede, en parte, explicar el amplio rango de hospedadores paraténicos. El lugar fundamental de penetración es el intestino delgado, particularmente el íleon, siendo los huevos que alcanzan el colon eliminados en su mayor parte. El lugar exacto de penetración es en las criptas de Lieberkühn, posiblemente por ser las zonas con menor movilidad durante la ingestión. En estas zonas se produce la degranulación de las células de Paneth en el momento de la penetración larvaria. Desde el intestino se diseminan al hígado principalmente por vía portal, aunque existen algunas evidencias de otras vías como la diseminación intraperitoneal hasta alcanzar la superficie hepática o el paso directo por vía linfática hasta el pulmón. Desde el pulmón se diseminan a través de la circulación sistémica por todas las partes del organismo. (27)



Fuente: Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, Centers for Disease Control & Prevention, National Center for Infectious Diseases, Division of Parasitic Diseases, <http://www.dpd.cdc.gov/DPDw/> (Consultado: 2007, Enero 10).

Fuente (28)

Grafico 5: Ciclo biológico de *Toxocara canis*

6.5.1. Síntomas

Los cachorros de perros pueden morir (no tanto por las migraciones larvarias como por la deglución desviada de los vómitos); esto se produce en caso de fuerte infestación del intestino en la segunda o tercera semana de vida. Síntomas típicos son tos, flujo nasal, vómitos después de las comidas, abdomen agudo (sensible a la compresión), heces con moco, sin forma y obstrucción intestinal por acumulo de ascáridos. Los animales pueden presentar anemia, adelgazan y algunas veces están raquíticos como consecuencia de una carencia de vitamina D; pelaje Hirsuto. (29)

El curso crónico ofrece una progresiva desnutrición con o sin diarreas intermitentes y, en ocasiones, manifestaciones nerviosas convulsivas periódicas. Se evidencia un retraso significativo de crecimiento, en algunos casos se produce obstrucción intestinal y perforación. El paso de los nematodos y el contenido intestinal hacia la cavidad abdominal causa peritonitis, generalmente mortal.

Los perros adultos muestran estos síntomas solo en casos de una infestación primaria o en casos de re infestación con una infestación primaria anterior débil y, por consiguiente, con insuficiente inmunidad; también es posible la aparición de la enfermedad en situaciones de estrés y a consecuencia de otras infecciones. En caso de existir una inmunización, mueren las larvas al atravesar la pared intestinal. (28)

6.6.1. 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 una 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. (30)

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. (30)

6.7.1. Factores de riesgos

Los factores primordiales es la gran cantidad de huevos de diversos parásitos en heces de los caninos; considerándose, así como la principal fuente de contaminación para los humanos ya sea por el contacto directo con los caninos; onicofagia, geofagia. La presencia de parásitos se asocia con las condiciones de vida de la población, evidenciando que las parasitosis aumentan a medida que disminuye la calidad higiénica-sanitaria de la misma. (31)

La contaminación de suelos, parques públicos, patios de escuela, jardines de casa, cajas de arena, es un factor epidemiológico importante para la transmisión de *Toxocara*. En países en vías de desarrollo, existen mayores zonas rurales que no cuentan con los servicios básicos (drenaje, pisos de cemento, agua potable) lo que conlleva un ambiente viable para la proliferación y propagación de la enfermedad, puesto que un aparato del ciclo del parásito se lleva en el suelo, lugar donde se vuelven infectantes y bajo las condiciones adecuadas sirve de reservorio. (32)

6.8. Métodos de diagnóstico

6.8.1. Diagnóstico clínico

Edad de los caninos, el brillo del pelaje, el grado de dilatación del abdomen y la ocurrencia de vómitos tras la ingestión de alimentos. (15) Diagnóstico de inoculación prenatal: basándose en datos que aporta las historias clínicas.

6.8.2. Diagnóstico Físico

Se observa la presencia de vermes adultos en las heces o mediante la identificación microscópica de huevos por examen directo o facilitado por medio de diversas técnicas de concentración en soluciones. La ausencia de soluciones no excluye la presencia de parásitos. (33) La infestación prenatal se hace patente al día 28. Los cachorros se mantienen lustrosos, apetentes y atentos, su abdomen puede presentarse ligeramente distendido, las heces son blandas, con mucosas, en ocasiones con indicios de sangre, frecuentemente por las heces se eliminan estadios adultos de *Toxocara canis*. La mucosa oral y conjuntival suelen estar más

pálidas de lo normal y pueden ser vomitadas o eliminadas por el ano auténticas masas de *Toxocara canis*. (34)

6.8.3. Diagnóstico de laboratorio

El examen coproparasitoscópico consiste en la visualización macroscópica que debe realizarse inmediatamente tomada las muestras considerándose su consistencia, color, olor, presencia de mucosas, sangre, coágulos, cuerpos extraños y microscópica de las materias fecales en busca de parásitos. Las técnicas que revelan la presencia de parásitos, son las técnicas cualitativas y cuantitativas, en ellas se busca la polivalencia, fácil ejecución y resultados confiables. En ocasiones el diagnóstico puede parecer fallido por la ausencia de huevos para ello es necesario verificar los análisis con muestras en días alternos y así diagnosticar parasitosis.

6.8.4. Examen microscópico

Con este examen se cubre mayor diversidad de formas parasitarias es recomendable realizarlo en etapas complementarias: examen microscópico directo y examen microscópico con alguna técnica de concertación. (35)

6.8.5. Técnica directa

El frotis directo obtenido por disolución de una partícula muy pequeña de heces en una gota de solución salina o sacarosa, constituye una técnica sencilla y rápida de examen. El uso de la solución salina fisiológica en vez del agua evita la lisis de trofozoitos de protozoos muy lábiles a los cambios osmóticos. (35)

6.8.6. Técnicas de flotación

Establecen que los huevos y ooquistes de una gran diversidad de parásitos flotan en una solución más densa que el agua, mientras que el detritus sedimenta. También se conoce como técnicas de concentración o enriquecimiento y permiten desenmascarar infecciones leves. Las soluciones saturadas más usadas son; sal común, sulfato de Zinc al 33%, sulfato de magnesio al 35%, solución saturada de azúcar (sheather), nitrato sódico. El rango de densidad depende de la cantidad de soluto y la temperatura. (35)

6.8.6.1. Técnica flotación de Sheather

Es útil para la concentración de quistes y ooquistes de protozoos y huevos de helmintos ya que posee mayor densidad que los mismos, este método utiliza un medio de suspensión líquido más denso que lo ooquistes, tiene una gravedad específica. (13) Esta técnica en la

actualidad es la más fácil y práctica y por ende la más utilizada para la eficaz y rápida determinación de huevos de parásitos en heces.

6.8.7. Diagnóstico de huevos de *Toxocara canis* en el suelo

Se han ensayado una gran cantidad de técnicas para la identificación o cuantificación de huevos de *Toxocara canis* y de otros parásitos en muestras de suelo que se basan de forma general en la filtración y la combinación de la sedimentación y la flotación en soluciones sobresaturadas. La recuperación de huevos de *Toxocara canis* precedentes de muestras de suelo depende de las condiciones ambientales, su textura, elección del sitio de muestreo, tipo de solución, tipo de lavado o colado, tamaño de la muestra, número de muestras. Una densidad de 2,1 huevos viables de *Toxocara canis* por cada 5 gramos de suelo representa un alto riesgo para la infección. (15)

6.8.8. Tratamiento

El tratamiento contra los ascáridos adultos en caninos y felinos se dispone en diversas series de preparados. A diferencia de los estadios migrantes y los de tejidos ya que solo se puede usar pocos productos antieméticos. Los estadios larvarios tisulares son muchos menos sensibles, y si un fármaco es activo contra fases larvarias, debe administrarse con frecuencia en altas dosis.

Diversas sales de (PIPERAZINA 110-200 mg/kg/pv) expulsan las formas localizadas en el intestino. Mayor eficacia en parásitos adultos y menor eficacia en estadios inmaduros. En cachorros fuertemente infestados conviene repartir las dosis en 2 o tres días, con el objetivo de evitar una obstrucción por los ascáridos expulsados. (30)

Los antihelmínticos de amplio espectro como él (NITROSCANATO 25-50 mg/kg/pv), es activo contra otros nematodos intestinales y cestodos del perro, tolerado por cachorros y perras gestantes. El (PAMOATO DE PIRANTEL 5 mg/kg/pv) ejerce también acciones parciales sobre ascáridos inmaduros y otros nematodos intestinales.

Los bencimidazoles de amplio espectro no solo actúan frente a los nematodos intestinales, sino también frente a los cestodos (FEBENDAZOL 3 días x 50mg/kg/pv) gran eficacia contra ascáridos mediante una dosis o divididas en tres o cinco días, o (MEBENDAZOL 22 mg/kg/pv durante 2 o 3 días) muy eficaz contra ascáridos se administras dos veces al día por dos días.

En métodos experimentales se ha aplicado (FEBENDAZOL 25-50 mg/kg/pv) en caninas a partir del 40º día de gestación hasta el parto. Los cachorros nacidos estaban libres de ascáridos y de ancilostomas. Demostrando así que el preparado fue tolerado de forma excelente por los cachorros y la madre. También la inoculación simultánea a la madre de (IVEMECTINA 50/mg/kg/pv) en los días 42, 47 y 53, redujo un 99% la carga parasitaria de la camada. (6)

La (SELAMECTINA 6 mg/ kg/pv) administrada tópicamente a las perras en dosis mínima en los días 10 y 40 antes y después del parto. Previene la transmisión transuterina y galactógena. (15)

Se debe realizar los respectivos examen coprológicos en madres con cachorros para lograr determinar la carga parasitaria y así proceder a desparasitar a los cachorros de semanas de vida, ya que son predisponentes a la infección por vía lactogénica y por consiguiente de contaminación ambiental. De igual manera las madres deberán someterse a pautas de tratamientos simultáneas a las de la camada.

6.9. Métodos de Diagnóstico Molecular de Parásitos

El diagnóstico molecular es un área dinámica en constante desarrollo que revoluciona los diagnósticos clínicos demostrando un impacto positivo en las diversas áreas de salud. El principio de la epidemiología radica en estudio de los genomas, virus, viroides, hongos y parásitos el resultado se enfoca en análisis estadístico mediante métodos geográficos que permite evaluar el desarrollo de la afección. (36)

Los métodos de biología molecular se caracterizan por ser específicos y poseer elevada sensibilidad, ya que detectan el ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito. En un principio se usaron técnicas de hibridación y actualmente el diagnóstico molecular se basa específicamente en la detección de fragmentos de ADN del genoma del parásito mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa, que tiene como finalidad amplificar varias veces un pequeño fragmento de ADN para obtener múltiples copias resultando muy sensible. (37)

6.9.1. Métodos moleculares fenotípicos y genotípicos

Los métodos fenotípicos se basan en la determinación de características bioquímicas y/o fisiológicas, que constituye la primera herramienta de comparación de microorganismos incluyendo 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. (39)

Los métodos genotípicos están basados en la detección del material genético del organismo, por lo tanto son independientes de los cambios en el patrón de expresión genética y de las influencias ambientales, ofreciendo una alternativa con mayor estabilidad y reproducibilidad. No requieren necesariamente el aislamiento y cultivo de los microorganismos, siendo posible obtener los resultados en tiempos más cortos y, usualmente con mayor poder de resolución, sensibilidad y especificidad que los métodos fenotípicos. (40)

6.9.2. Métodos moleculares para tipificación

La tipificación permite establecer la identidad de los microorganismos causantes de brotes infecciosos, determinando la caracterización de microorganismos patógenos que permite establecer la identidad de los microorganismos causantes de brotes infecciosos, estableciendo la fuente de infección y sus posibles patrones de diseminación, asimismo insta la prevalencia del agente infeccioso en una población. (41)

La tipificación puede ser evaluada teniendo en cuenta los siguientes criterios: (42)

- Detección, identificación y tipificación de la totalidad de los aislados analizados.
- Respetabilidad y reproductibilidad del método.
- Estabilidad genética del marcador, neutral por las fuerzas evolutivas.
- Exclusión de los diferentes grupos de individuos con probabilidades elevadas.
- Capacidad del método para arrojar resultados similares a los obtenidos a través de otras técnicas.
- Efectividad entre los costos económicos generados por la aplicación del método y las ganancias obtenidas al lograr la prevención y control de la enfermedad.
- Relación entre los logros obtenidos a nivel económico, recursos y tiempo empleado.

6.9.3. Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

La PCR surgió en 1971 cuando Gobind Khorana describía la técnica a explicar de la replicación de un fragmento de ADN usando dos iniciadores. Pero en 1983 Kary Mullis y sus compañeros que usaron dos iniciadores que se alineaban con cada una de las hebras de ADN replicando exponencialmente un fragmento del ADN flanqueado por iniciadores. En un

principio, para llevar a cabo el ciclo de PCR, se calentaba la mezcla en baño María, pero cuando llegaba a más de 90°C para desnaturalizar la doble hélice, la ADN de polimerasa se inactivaba por ellos años posteriores se descubrió la enzima Taq polimerasa que resiste diversas temperaturas. (43)

La reacción en cadena de polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que actúa amplificando millones de veces las secuencias específicas de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello se aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si se usa ADN complementario proveniente de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como *Reverse transcription-PCR*. Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa, capaz de convertir el ARNM en una molécula de ADNc. Este método fue copiado de los retrovirus que se usan una transcriptasa reversa para convertir su genoma de ARN en ADN. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNtps: adenina, timina, citosina y guanina), el ion de magnesio (Mg^{2+}), una solución amortiguadora o buffer y H_2O . Todos estos complementos interactúan en tres diversas etapas que componen el PCR que son la desnaturalización, hibridación y extensión. (44)

6.9.4. Parámetros que influyen en la PCR

Desoxirribonucleósidos (Trifosfato dNTPS)

Los cuatro dNTPS son las bases para construir nuevas cadenas de ADN. Variaciones en sus concentraciones afectan la especificidad y fidelidad. Las concentraciones muy altas causan la disminución de la actividad de la enzima incluso puede llegar a inhibirla. Las concentraciones más utilizadas es de 0,2 a 1Mm. Los dNTPS pueden captar iones de magnesio (Mg^{2+}) por lo tanto las concentraciones de ambos deben guardar la misma relación. (45)

Iones divalentes y monovalentes

Los iones divalentes actúan como cofactores de la enzima por lo tanto tienen una función crítica en la reacción. Se suele usar Mg^{2+} , agregado comúnmente cloruro de magnesio ($MgCl_2$, siendo usado en una concentración de 0,5 y 2,5mM). (46)

Solución tampón buffer

Mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa. Generalmente incluye Tris-HCl (pH=8,4 a temperatura ambiente), KCl, gelatina y MgCl₂. Diversos autores de investigación recomiendan el uso de adyuvantes para aumentar la especificidad y fidelidad como el dimetilsulfóxido (DMSO), añadido para disminuir las estructuras secundarias del ADN. (47)

6.9.5. Primers (Cebadores, oligonucleótidos)

Delimitan la zona de ADN a amplificar. Al ser conocidos por la enzima permite iniciar la reacción. Son secuencias cortas, normalmente de 18 a 22 nucleótidos (aunque pueden llegar a 40 según el caso) y contenido en GC entre 40 a 75%. Los cebadores deben tener una temperatura de fusión similar. Normalmente se diseñan para ser exactamente complementarios al molde de ADN y la concentración la que suelen emplearse está en el intervalo de 0,1-0,5 μM. Los Primers ideales deben carecer de estructuras secundarias así como de complementariedad en el extremo 3' se induce a que ambos iniciadores se traslapen en dicho extremo y sirvan de templados y a su vez de iniciadores para que la polimerasa los extienda generando pequeñas ampliaciones referidos. (45) La Taq polimerasa solo puede hacer DN si hay un cebador, una corta secuencia de nucleótidos que proporcionan un punto de partida para la síntesis de ADN. En una reacción de PCR, la región de ADN que será copiada, o amplificada, se determina por los cebadores que el investigador elija. Los cebadores para PCR son pedazos cortos de ADN de cadena sencilla, generalmente de unos 20 nucleótidos de longitud. En cada reacción de PCR se utilizan dos cebadores que están diseñados para flanquear la región blanco (la región que debe ser copiada). Es decir, les agregan secuencias que harán que se unan cadenas opuestas del molde de ADN solo en los extremos de la región a copiar. (48)

ADN Molde

Contiene la región de ADN que se va a amplificar la cantidad de este molde varía entre 1ng-20ng cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas. El molde puede ser también ARN previamente transformado en ADNc mediante transcripción reversa, existen diversas formas de preparar los moldes para PCR. En la actualidad existen variados protocolos de extracción en función de tipo de muestra clínica. (49)

Agua

Usada como solvente. Se requiere al menos que sea desionizada (18mchms) o milli-Q grado molecular. Si se busca un mejor rendimiento se aconseja además, que sea libre de DNasa y RNasas, purificada por luz ultravioleta, ozono o 0,1% de dietilpirocarbonato. (46)

6.9.6. Los pasos para PCR

Los factores primordiales son clave para la realización entre ellos la Taq polimerasa, cebadores, ADN molde y nucleótidos. Los ingredientes se colocan en un tubo junto con los cofactores y se somete a ciclos repetitivos de calentamiento y enfriamiento que permitirán la síntesis de ADN. Los pasos básicos se detallan a continuación:

Desnaturalización por calor

Regularmente se agrega una etapa previa de desnaturalización (94°C-96°C) para relajar estructuras secundarias, es importante que el ADN del molde se desnaturalice para iniciar la síntesis de la nueva cadena complementaria. El proceso que se consigue con temperatura de 94°C por un minuto. (50) Los enlaces del hidrógeno que unen las bases de uno a otro son débiles, se rompen a altas temperaturas, mientras que los enlaces entre fosfatos y desoxirribosa, son enlaces covalentes más fuertes por lo tanto permanecen intactos. (51)

Alineamiento – unión de la sonda a la secuencia diana

La enzima utilizada en la reacción necesita del grupo OH- libre en el extremo 3' punto que constituye el sitio de crecimiento de la cadena complementaria. El alineamiento de ambos Primers se produce en una temperatura determinada para que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN por composición de bases que oscila entre 40 y 70°C. (52)

El objetivo no es replicar la hebra entera de ADN sino replicar la secuencia diana aproximadamente 100-600 pares de bases que es única en el organismo. Los iniciadores marcan el final de la secuencia diana: estos son sintéticos y cortos, creados a partir de una hebra única de ADN y que normalmente consta de 20-30 bases. (51)

Extensión

Esta etapa se realiza a temperaturas altas. El tiempo de depende del tamaño de la amplificación, debiendo estimar 1 minuto para alargar 1000 nucleótidos. Es común que al finalizar se realice un alargamiento de 5 minutos a 72°C para asegurarse que todos los complementos estén

terminados y tengan la misma longitud. La temperatura de la reacción se eleva para que la Taq polimerasa extienda los cebadores y sintetice así nuevas cadenas de ADN. (50)

La extensión comienza siempre en el extremo 3' del iniciador creando una doble tira a partir de cada una de las hebras individuales. La Taq ADN polimerasa sintetiza exclusivamente en la dirección 5' a 3'. No obstante los nucleótidos libres en la solución solo se añaden al extremo 3' del iniciador, construyendo la tira complementaria de la secuencia de ADN. (51)

6.9.7. 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 usa proviene de una bacteria (*Thermus Aquaticus*) tolerante totalmente al calor. Su ADN polimerasa es muy termoestable y su mayor actividad se presenta cerca de los 70°C. (48)

Técnica de PCR para la detección de *Toxocara canis*.

El diagnóstico molecular utilizando la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). Nos permite determinar el ADN de los parásitos en muestras de heces de caninos en suelos y evidentemente es una ventaja sobre las técnicas coprológicas ya que la detección de huevos en tierra no es muy específica. Debido a que pueden existir huevos rotos o deteriorados que no se pueden identificar fácilmente. (53) Una de las mayores ventajas de la PCR radica en la facilidad de efectuar un diagnóstico a partir de pequeñas muestras, que se pueden conseguir por medio de métodos como cepillado, aspiración, biopsia e incluso a partir de material biológico conservado. Su elevada sensibilidad es la característica que permite demostrar las mutaciones causantes de enfermedades, además de funcionar como marcador biológico de diagnóstico. (54)

Tipos de PCR

Desde la creación de PCR, se han descrito diversos tipos de usos clínicos de esta técnica.

Tabla 2: Características y aplicaciones de PCR

Tipo de RCP	Características	Aplicaciones
RCP Estándar	Amplificación de un segmento de ADN utilizando dos partidores.	Detección cualitativa de un segmento de ADN.
	La detección de la	

	amplificación es mediante geles de agarosa.	
RCP anidada	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.
RCP 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.	
RCP Múltiple	Amplificación de dos o más segmentos de ADN utilizando varios partidores en una reacción de amplificación. La detección de la amplificación es mediante geles de agarosa.	Detección cualitativa de varios segmentos de ADN en una sola reacción de RCP
RCO-RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)	RCP estándar con paso posterior de digestión con enzimas de restricción.	Detección de polimorfismos genéticos (SNP)
RT (transcriptasa inversa)-RCP	Síntesis de cADN a partir de ARN mediante transcripción reversa, seguido de una RCP.	Expresión de genes. Detección de virus ARN.
RCP-TR (tiempo real) o Qrcp	RCP estándar donde se utilizan tinciones o sondas con fluoróforos para la detección de los fragmentos amplificados puede ser del tipo multiplex.	Detección cualitativa de uno o varios segmentos de ADN. Cuantificación de ADN en la muestra (cargas) o expresión de genes (asociada a una reacción de transcripción reversa).

Fuente: (55)

Tipos y características de PCR. (56)

- Para cada aplicación de PCR se debe ajustar las debidas condiciones y el diseño.
- Duración de fases de apareamiento y elongación
- Tipo de cavadores o primers empleados y sus temperaturas de fusión.

- Tipo de polimerasa utilizada.
- Cantidad de reactivos y de ADN molde.
- Longitud de ampliación o producto de PCR obtenido.

Técnicas PCR

Existen diferentes métodos y aplicaciones en función de lo que nos interesa investigar.

- 1) PCRs para la amplificación de un solo sitio conocido del genoma. Estos PCRs requieren conocer la secuencia que se trabaja por ejemplo cuando se amplifica un gen específico, en cuyo caso se utilizan oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de dicho gen y se obtiene un fragmento y tamaño ya conocido. Con este tipo de técnica es posible hacer filogenias, y para poder obtener los datos hay distintos caminos; debe hacerse geles especiales que detectan cambios hasta de una sola base entre 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 lo necesario es obtener las secuencias completas del gen que se amplifica. El gen secuenciado puede ser analizado desde varias perspectivas. (57)

- 2) PCRs en los que no es necesario conocer la región que se está amplificando (se amplifican regiones no conocidas, como zonas hiperviables del genoma), por lo cual no se sabe el tamaño fragmentado (o fragmentos) que se esperan. Estos se utilizan para determinar polimorfismos genómico y son los más comunes para *fingerprint*, ya que es sencillo obtener los datos (un gel agarosa después del PCR es suficiente), se observa varios loci simultáneamente y la zona de 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 pequeño (de 6 a 18 bases) y sobre todo que su secuencia este presente muchas veces en el ADN del organismo que estudiamos. Existen zonas repetidas hipervariables del ADN que pueden amplificarse de esta manera, los sitios que sirven para iniciar síntesis de ADN en los cromosomas, conocidas como micro satélites. El primer ciclo de reacción lo que sucederá es que el oligonucleótido utilizado hibridara en distintas zonas del ADN, y primero comenzara a sintetizarse en 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 la 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. (57)

6.9.8. Características del Primers

Como ya mencionamos antes los iniciadores actúan como punto de partida y unión para la ADN polimerasa durante la síntesis de ADN del fragmento a amplificar. (58)

Longitud del iniciador

Cada iniciador sentido y anti sentido debe contar con una longitud de 18 a 24 bases, ya que la cantidad de bases influye en la especificidad de la secuencia a amplificar, siempre y cuando la temperatura de alineamiento sea óptima. La longitud del iniciador influye en la eficiencia del alineamiento, cuando más largo sea el iniciador, menos eficaz será la alineación. (58)

Especificidad

Los iniciadores deben elegirse de forma que tengan una secuencia única dentro del ADN a amplificar. Como la ADN-polimerasa puede activarse a diferentes temperaturas, la extensión del iniciador se produce a una temperatura inferior a la de alineamiento. (58)

Temperatura

Los mejores resultados se obtienen con una temperatura de fusión de entre 55 a 72°C. Durante 0.5-3 minutos. Si la polimerasa tiene una actividad específica a 37°C. (59)

Numero de ciclos

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 recomienda de 40-45 ciclos para amplificar 5° moléculas y entre 25-30 para amplificar 3 5 moléculas, a la misma concentración. (59)

Consejos generales para diseño de primers: (60)

1. Los primers deben tener una longitud de 17-28 b.
2. El contenido de G+C debe estar alrededor del 50-60%.
3. Se deben evitar secuencias de 3 o más Cs o Gs en las regiones terminales 3`.

4. Las terminaciones 3' no deben ser complementarias, ya que esto puede llevar a la formación de dímeros.
5. Deben evitarse los *primers* que formen secuencias auto-complementarias (habilidad para formar estructuras 2⁰).

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

En un estudio realizado (61) sobre la “Optimización de una metodología para el aislamiento y detección molecular de huevos de *Toxocara canis* en muestras de suelo” se determinó que para el estudio del ADN de muestras fecales del parásito se realizó en el ADN total de la flotación se extrajo utilizando el kit de extracción de ADN Takaposit siguiendo detalladamente las instrucciones del fabricante.

Los huevos se sometieron 5 veces en 20s. Las muestra ya homogeneizadas fueron dispuestas a la técnica de congelación y descongelación consecutiva (10 ciclos de congelación/ 10 minutos en nitrógeno líquido) y descongelación (10 minutos a 95°C), digestión con Proteinasa K realizada durante el lapso de toda la noche. Se utilizaron cebadores específicos de la especie se eligió entre en gen espaciador transcrito interno 2 (ITS2) que se describió previamente como Tcan 1 (5'-AGTATGATGGGCGCGCAAT-3') y NC2 (5'-TAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3'). (61)

La composición de la mezcla de reacción de PCR fue: 12,5µL de Master Mix PCR 100 2X, compuesta por 20 mM de Tris-HCl (pH 8,5), 100mM de KCl, 3,0 mM de MgCl₂ y 400mM de cada dNTPS; 2,5 µL de cada primer (100 pmol); 5 µL ADN (10-50 ng); 2U de Taq polimerasa y 2,5 µL de ciclos de 94°C por 3 minutos; 35 Thermal Cyclera. El control positivo de la reacción de PCR fue ADN de huevos de *Toxocara canis*, obtenido previamente. El contenido negativo fue agua libre de ADNsa y ARNasa. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) teñido en tinción segura para ADN. (61)

Toxocara canis genes for internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: Tn
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-CTAGAATTTTCGCACACTACATTGCNCCATCGGGTTCATTCCCGTTGGCAGC					93
Sbjct	2	CATTGAGCACTAAAATTTCTGAACGC-ACATTGCGCCATCGGGTTCATTCCCGTTGGCAGC					60
Query	94	TCTGGCTGAGGGTCAGTATATTAAGGAGTATGATGGGCGCGCCAATTTATGGAATGTGAT					153
Sbjct	61	TCTGGCTGAGGGTCAGTATATTAAGGAGTATGATGGGCGCGCCAATTTATGGAATGTGAT					120
Query	154	TAACGCGCAAGGTTGTGGTGCATTTCGGTGAGCTATGCTGGTGTGGTAATGGATATTGTGC					213
Sbjct	121	TAACGCGCAAGGTTGTGGTGCATTTCGGTGAGCTATGCTGGTGTGGTAATGGATATTGTGC					180
Query	214	AATTGTACAGCGTACCTTGCCAAGGAAATATTCGCACAAGAAATGGCTGTCGTTTGCTCG					273
Sbjct	181	AATTGTACAGCGTACCTTGCCAAGGAAATATTCGCACAAGAAATGGCTGTCGTTTGCTCG					240
Query	274	TAAAGAGGCAAAATTGGCCATGAGTGTATGTTGCGTTGCTTCACGATACGGCCTCCAGCA					333
Sbjct	241	TAAAGAGGCAAAATTGGCCATGAGTGTATGTTGCGTTGCTTCACGATACGGCCTCCAGCA					300
Query	334	AACGTTGTTTATTGTTTGGTTGTGGCAGCATCCAGGTTGGAGGTGGCGTTATCGGTCGCT					393
Sbjct	301	AACGTTGTTTATTGTTTGGTTGTGGCAGCATCCAGGTTGGAGGTGGCGTTATCGGTCGCT					360
Query	394	TGAATGAGGAATGCATGGCGAATGGTTGAAATGAGAtttt			433		
Sbjct	361	TGAATGAGGAATGCATGGCGAATGGTTGAAATGAGATTTT			400		

Fuente: (61)

Grafico 6: Alineamiento básico de la secuencia de nucleótidos del amplificado del ITS 2 del ADNr de *T. canis*

7. VALIDACIÓN DE HIPÓTESIS:

Ha: La identificación molecular de ejemplares adultos de *Toxocara canis* mediante la utilización de primer específico permitirá las caracterizaciones genéticas específicas.

Hn: La identificación molecular de ejemplares adultos de *Toxocara canis* mediante la utilización de primer específico no permitirá las caracterizaciones genéticas específicas.

8. METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL:

8.1. Localización y Duración del proyecto

La presente investigación se llevó a cabo en la provincia de Cotopaxi, Cantón de Latacunga en zonas rurales de la ciudad. Cotopaxi es una de las 24 provincias que conforma la república del Ecuador, localizada en la región sierra del país, al centro-norte del país. Latacunga esta dividida por 7 cantones perteneciente a la región centro 3.

Limites

Norte: Pichincha

Sur: Tungurahua y Bolívar

Este: Napo

Oeste: Pichincha y Los Ríos

Ubicación Geográfica

Latitud: -0.93521

Longitud: -78.61554

Unidades experimentales

Para la realización de esta investigación, se utilizó 20 ejemplares adultos del genero *Toxocara canis*, de 150 caninos de las zonas rurales del Cantón Latacunga.

8.2. MATERIALES Y MÉTODO DEL ENSAYO

8.2.1. Material biológico

- 150 caninos
- 20 ejemplares adultos de *Toxocara canis*
- Muestras fecales

8.2.2. Material de laboratorio

- Guantes
- Mandil
- Cofia
- Mascarilla
- Agua
- Solución azucarada (Sheather)
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Cernidor
- Vasos
- Gradillas de laboratorio

- Pipetas
- Pinza anatómicas
- Envases de muestras de orina
- Tubos eppendorf 1.5ml
- Mango de bisturí
- Hojas de bisturí
- Couler de transporte
- Geles de hielo
- Placas Petri
- Jeringuilla de 3 ml
- Jeringuillas de 5ml

8.2.3. Materiales de oficina

- Libros de parasitología
- Libreta de apuntes
- Cámara fotográfica
- Escritorio
- Lámpara
- Impresora
- Esferos
- Rotuladores

8.2.4. Equipos

- Microscopio
- Esteromicroscopio
- Centrifugadora
- Termociclador
- Porta tubos
- Balanza analítica
- Refrigeradora
- Espectrofotómetro

8.2.5 Insumos

- 1 litro de etanol al 70%

- Directo 5'-ATCGATGAAGAACGCWGC-3'
- Primer Inverso 5'-AAGCATGATGCAAAAGGCAAATAAACCC-3'
- Proteínasa K
- Buffer de Extracción
- Fenol/cloroformo/isoamilico
- Agua Mili Q o TE

8.2.6 Instalaciones

- Laboratorio de “GUAU Clínica Veterinaria”
- Laboratorio de Parasitología de la Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Laboratorio de Investigación de Biología Molecular de la Universidad de las Américas.

9. DISEÑO EXPERIMENTAL

9.1. Obtención de muestra biológica

La recolección de las muestras biológicas se obtuvieron con exámenes previos coproparasitarios por medio de campañas de desparasitaciones en las zonas rurales del Cantón Latacunga Provincia de Cotopaxi, Las desparasitaciones se realizó con Tenibest 1ml/5kg/pv que contiene (Albendazol micronizado 150mg, Praziquantel 112, 5 mg, excipientes 1ml). Diariamente se inspeccionó las heces de los canes obteniendo los ejemplares adultos de *Toxocara canis*; Los cuales se procedieron a extraer de las heces para poder lavarlos con agua y retirar el excedente de heces detalladamente se clasificó por sexos para conservarlos en frascos de muestra de orina estéril con etanol al 70% con información detallada. Posterior a ello se realizó la disección que es específica para *Áscaris- Toxocara canis*, es de importante conocer la estructura, morfología de los ejemplares adultos de *Toxocara canis* para así poder identificar cada una de las partes que lo compone y cumplir con los protocolos establecidos, es importante recalcar que los parásitos adultos machos presentan una curvatura en forma de (gancho) a nivel de la cola que permite identificarlo. Las hembras tienen una prominente punta roma (en forma de lanza). Al momento que se realiza el corte importante no diseccionar los túbulos seminíferos en los machos. En el presente estudio se tomó como base la medida de 2 milímetros para la disección y conservar la información molecular, Ya diseccionados los ejemplares se procedió a secar en un tiempo mínimo los excedentes de etanol para poder obtener un peso real en la balanza analítica, obteniendo el peso se procede a colocarlos en tubos eppendorf de 1.5ml con 1 ml de etanol requisito

indispensable para conservar el ADN se selló los tubos y se colocó las etiquetas con información específica de cada ejemplar adulto. Finalmente se conservó en Couler con gel de hielo para poder trasladar las muestras al laboratorio respectivo.

9.2. Extracción de ADN

El protocolo a partir de fenol cloroformo permite una excelente calidad de rendimiento de ADN no obstante los restos de diversos solventes que se colocan contaminan la muestra..

9.3. A partir de fenol-cloroformo

En este protocolo es necesario seguir cuidadosamente cada uno de los pasos detallados a continuación:

Disecionar 2mm de la muestra de tejido y transferirla a un nuevo tubo de 1.5 mL se debe añadir 500 µL de Buffer de Extracción y macerar con una punta de pipeta o pistilo por 5 minutos al interior de un bloque frío. Realizar vortex por 1 minuto y colocar 5 µL de Proteinasa K (20 mg/mL). Incubar las muestras a 56°C toda la noche en agitación, a 300 rpm. Sacar las muestras del termobloque, dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Añadir 750 µL de Fenol/Cloroformo/Isoamílico y realizar vortex hasta formar una emulsión lechosa. Se continúa a centrifugar 10 minutos a 4°C a máxima velocidad se transfiere toda la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1.5 mL se añade a esa fase, 500 µL de Cloroformo: Isoamílico, homogenizar en vortex. Centrifugar 10 minutos a 4°C a máxima velocidad. Transferir toda la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1.5 mL. Añadir al nuevo microtubo, 400 µL Isopropanol 100% y 40 µL de NaCl 3M. Agitar bien y dejar reposar a temperatura ambiente por dos horas. Centrifugar por 30 minutos a 4°C a 15000 rpm. Descartar el sobrenadante con mucho cuidado de no alterar el pellet. Agregar 1000 uL de Etanol 70% helado y centrifugar por 15 min a 15000 rpm. Descartar el sobrenadante y dejar secar. Re suspender en 40 µL de Agua Milli Q o TE e incubar la muestra a 37°C por dos horas. Cuantificar la concentración de ADN. Para confirmar la integridad de las muestras se realizó observando una banda definida en la parte superior del gel agarosa tras la migración electroforética.

9.5. Diseño y selección de Primers

La selección de oligonucleótidos determinados para iniciadores o cebadores es fundamental para la realización de PCR ya que la hibridación con sondas y secuenciación de ADN depende de ello para ser exitosa e cuanto al diseño de *Primers* se debe realizar según la cadena de secuencias que el investigador desea codificar para determinado elemento como en esta

investigación el ADN de *Toxocara canis*. El propósito de los PCR es amplificar un locus por lo que la posición de los *primers* debe ser relativa a los codones de inicio y terminación, el primer “Reverse” debe localizarse 35 pb después de la región que codifica y si el *primer* es para secuenciación se obtiene la secuencia de ADN es recomendable que los *primers* se localicen a 50 pb antes de la región que se desea secuenciar, La estandarización se realizó mediante el análisis y diseño específico de *primers* asociado al estudio correspondiente a la especie en investigación.

9.6. Amplificación de Fragmentos por PCR

Para continuar con la amplificación de fragmentos de ADN se diluye las muestras para alcanzar la concentración de 10 ng/μL y ensamblar los componentes de la PCR utilizando factores como Agua MQ, *Primer Directo y reverse*, master mix y las muestras de ADN del ejemplar adulto de *T. canis*. Cada una de las muestras se coloca en el termociclador para realizar la desnaturalización inicial este procedimiento consiste en separar las cadenas de ADN, este paso se lleva a cabo elevando la temperatura a 94.0°C durante un ciclo de 2 minutos para subsiguientemente continuar la desnaturalización a 94.0°C 30 segundos por 35 ciclos. Ya separadas las cadenas de ADN se continua con la alineación aplicando un descenso de temperatura a 58.0°C durante 30 segundo por 35 ciclos permitiendo que los cebadores se unan por complementariedad al molde de ADN; en la fase de elongación se instituyó una temperatura de 72.0°C por 1 minuto por 35 ciclos implementando la enzima Taq polimerasa que incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. En la enlongacion final se mantiene la temperatura de 72.0°C con 5 minutos y 1 ciclo. Como el último paso fundamental es el reposo que se estableció a una temperatura de 4.0°C por 10 minutos por 1 ciclo.

9.7. Electroforesis

Este protocolo consiste en la separación de las biomoléculas como el ADN o ARN de acuerdo al respectivo tamaño permitiendo el aislamiento de la zona de interés ya que cada fragmento se separa en el gel por su tinción con bromuro de etidio que hace que el ADN se haga fluorescente a través de la emisión de la luz ultravioleta ya que cuando la corriente eléctrica se aplica sobre el gel de agarosa la carga negativa migro hacia el polo positivo; este gel disuelto en buffer se funde usando microondas hasta obtener la solución que homogénea y transparente, la disolución se vacía en un molde y se coloca un peine que forma pozos donde se procederán a depositar las muestras; se deja enfriar para la polimerizar y formar la matriz porosa variándose así el tamaño del poro según la respectiva concentración de agarosa

contenida en la disolución. La migración de colorante que contiene el buffer de carga en un gel parte del mismo punto que el ADN ayudando a indicar la posición del ADN.

9.8. Secuenciación de ADN

Este paso consiste en que las bases nitrogenadas se unen con la misma pareja para formar las mismas que son copiadas de manera idéntica al momento de dividirse. La secuenciación de este procedimiento se realizó por el laboratorio de Investigación de Biología Molecular de la Universidad de las Américas siguiendo recomendaciones de fabricante.

10. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

10.1. Preparación de la solución azucarada (Sheather)

Se consiguieron los elementos necesarios para la preparación como, agua, olla, cuchara, azúcar y un recipiente para colocar la mezcla que repose. En primer lugar se agregó agua en la olla posteriormente se colocó la azúcar a continuación calentamos a fuego lento mezclando continuamente hasta disolver el azúcar es importante evitar que se forme grumos, se mezcla hasta obtener una solución ligeramente espesa obteniendo esta consistencia procedemos a cambiar a un recipiente para que la solución repose. Como medio de conservación de la solución se mantiene en la nevera.

Ejecución de exámenes Coproparasitarios con la solución Sheather

Enumeración de la metodología utilizada

1. Identificar los caninos a evaluar con la técnica.
2. Adquirir frascos de muestras de heces estériles de acuerdo con el número de animales a evaluar.
3. Recolectar una pequeña porción de heces frescas de canino y rotularlo apropiadamente.
4. Trasladar el material biológico a las instalaciones de GUAU Clínica Veterinaria para los respectivos análisis coprológicos.
5. Inspeccionar que estén a disposición todos los materiales necesarios en el laboratorio.
6. Utilizando una lengüeta obtener una pequeña cantidad de la muestra de heces y colocarlo en un frasco plástico debidamente rotulado.
7. Pesar en la balanza gramera 3 gramos de heces
8. En el frasco 1 colocar 20ml de solución azucarada
9. Mezclar los 3 gramos de heces en el frasco con los 20 ml de la solución y mezclar hasta que se forme una pasta uniforme.

10. En el frasco 2 colocar una gasa en la parte superior sujeta por una liga ya que su función será de actuar como colador.
11. Derramar el contenido de la mezcla de heces y la solución sobre la gasa del frasco 2, con la ayuda de una paleta remover, presionar para que se cierna en su totalidad.
12. Rotular los tubos de ensayo donde se colocara la mezcla
13. Revisar el frasco con la mezcla cernida, y verterlos en los tubos de ensayos previamente rotulados y tapar.
14. Ubicar los tubos de ensayos en la centrifugadora en forma de X es importante verificar que los tubos contengan la misma cantidad de muestra para obtener un adecuado balance en la centrifugadora.
15. Encender la centrifugadora y establecer las configuraciones adecuadas, 10 minutos a 1250 revoluciones por minuto,
16. Tomar el tubo de ensayo de la centrifugadora y retirar la tapa cuidadosamente sin moverlo excesivamente ya que los huevos se encuentran flotando en la superficie del mismo.
17. Utilizando una varilla de laboratorio o una pipeta se procede a colocar dos gotas en el portaobjetos y se rotula respectivamente, el restante de la muestra se tapa el tubo de ensayo y se deja reposar en una rejilla.
18. Con un cubreobjetos cuidadosamente colocar encima de las dos gotas en el portaobjetos con precaución de no formar burbujas de aire al colocarlos.
19. Fijar el número de aumento para observar la muestra en microscopio.
20. Colocar la muestra en el microscopio
21. Observar detalladamente la presencia de huevos de parásitos en las muestras de heces caninas.
22. En una base de datos preliminar se procede a anotar debidamente el número de la muestra y paciente, detallando si existe presencia de huevos de parásitos en el canino usando la técnica de diagnóstico cualitativo de cruces.
23. Finalmente, ya revisada todas las muestras necesarias se procede a desechar el material utilizado.

10.2. Disección del parásito para garantizar la integridad del ADN

Enumeración de la metodología utilizada

1. Identificación de caninos con expulsión de ejemplares adultos de *Toxocara canis*.
2. Adecuada extracción de los parásitos de las haces de los caninos con el objetivo de precautelar la integridad del ejemplar.
3. Clasificación de los parásitos de acuerdo a su sexo, macho y hembra teniendo en cuenta su morfología, cada uno de los ejemplares adultos se lava con agua.
4. Posteriormente se los coloca tubos con etanol al 70% cubriéndolos en su totalidad.
5. Se extrae el ejemplar adulto del tubo se quita los excedentes de etanol para poder pesarlo, posteriormente se coloca en la balanza analítica, digitando detalladamente el número de muestra y el peso correspondiente a la misma.
6. Utilizando el esteromicroscopio manipulamos el parásito con el objetivo de verificar la ubicación de la cola de ejemplar adulto de *Toxocara canis* para continuar a seccionar el último tercio, en esta investigación tomamos como referencia que el corte sea aproximadamente de 2mm se verifico que sea una disección adecuada.
7. La parte diseccionada del ejemplar adulto se procedió a pesarlo en la balanza analítica es importante anotar los respectivos pesos de los 20 ejemplares adultos de la investigación.
8. Se procede a rotular los microtubos eppendorf de 1.5ml con los datos respectivos y se colocó con una pipeta 1ml de etanol al 70%.
9. Se coloca las muestras diseccionadas de 2mm en los tubos eppendorf previamente con etanol al 70%.
10. Se verifica la rotulación de los microtubos con el código asignado TX 001-TX 020.
11. Las muestras deben ser conservadas un Couler con gel de hielo. Para subsiguientemente ser enviadas al Laboratorio de Investigación de Biología Molecular de la Universidad de las Américas en el campus QUERI con la dirección José Queri y Av. De los granados en el distrito metropolitano de Quito.
12. El restante de los ejemplares adultos se desecha en material bilógico.

10.3. Extracción orgánica de ADN

A PARTIR DE FENOL-CLOROFORMO

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

10.4. Cuantificación y dilución de muestras de extractos de ADN

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

Tabla 3: Cualificación y dilución de muestras de extractos de ADN

DILUCIONES TOXOCARA	
VOLÚMEN FINAL (μ L)	20
CONCENTRACIÓN FINAL (ng/ μ L)	5

ID MUESTRA	C. INIAL	V. ADN	V. AGUA
T001	21	4,76	15,24
T002	128,5	0,78	19,22
T003	189,7	0,53	19,47
T004	42,8	2,34	17,66
T005	55,4	1,81	18,19
T006	86,8	1,15	18,85
T007	201,1	0,5	19,5
T008	99	1,01	18,99
T009	18,6	5,38	14,62
T010	130,6	0,77	19,23
T011	159,7	0,63	19,37
T012	61,6	1,62	18,38
T013	55,1	1,81	18,19
T014	89,1	1,12	18,88
T015	224,8	0,44	19,56
T016	222,3	0,45	19,55
T017	80,6	1,24	18,76
T018	54,8	1,82	18,18
T019	237,5	0,42	19,58
T020	143,8	0,7	19,3

Fuente: Laboratorio UDLA

10.5. Amplificación de fragmentos por PCR

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

Tabla 4: Componentes PCR

COMPONENTE	C. Inicial	C. Final	Vol. 1 Rx (μL)	Vol. 60 Rx (μL)
Agua MQ			8,8	528
Buffer	10X	1X	1,5	90
MgCl₂	50 mM	1,5 mM	0,45	27
dNTP Mix	10 mM	0,2	0,3	18
Primer Fw	20 μM	0,5 μM	0,375	22,5
Primer Rv	20 μM	0,5 μM	0,375	22,5

Taq Polimerasa*	10 U/uL	2 U/uL	0,2	12
ADN	5 ng/μL	1 ng/μL	3	
Volumen Final			15	

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

Fuente: Laboratorio UDLA

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

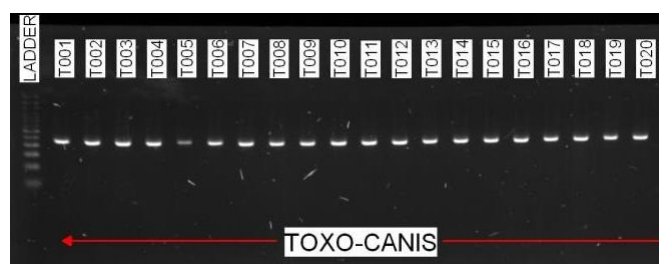
Tabla 5: Parámetros PCR

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

Fuente: Laboratorio UDLA

10.6. VERIFICACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN

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



Fuente: Laboratorio UDLA

Grafico 7: Resultado amplificación

10.7. Secuenciación

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

11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Determinar la presencia de *Toxocara canis* en muestras fecales mediante examen coproparasitario.

Los caninos utilizados para la investigación se identificó en lugares rurales del Cantón Latacunga, los datos que se recolectaron incluye edad, habitat, y condiciones de vida que influye en el grado de parasitismo que se encontró. Se recolecto 150 muestras de caninos de diversas edades, para proceder a realizar un examen coproparasitario dando prioridad a las muestras de caninos entre 1 a 9 meses de edad. De los cuales se observó la presencia de huevos, del parásito en estudio *Toxocara canis* en 16 casos de prevalencia basándonos en la técnica de microscopía. Igualmente se desparasito a todos los caninos que estaban registrados ya que los caninos con lo que se realizó esta investigación viven en zonas lejanas a la ciudad por tal motivo no tienen un control adecuado de calendario de desparasitaciones de las mascotas, Las desparasitaciones se realizaron con Tenibest 1ml/5kg/pv, cuya composición (Albendazol micronizado 150mg, Praziquante 112, 5 mg, expientes 1ml). Aunque no se encontró la presencia de huevos en el examen de microscopia de todas las muestras en los caninos se evidencia diversos síntomas que apuntan a ser parasitosis, obteniendo 25 ejemplares adultos de *Toxocara canis* que representan 16. 66% de casos positivos a parasitosis. Mientras que en el 83.33% no se observó la presencia de parásitos a pesar de las condiciones de vida de cada paciente de las 25 muestras recolectadas el 64% (16 muestras) dio positivo en el examen coproparasitario mediante la técnicas cualitativa y en el 36% (9 muestras) de los casos no se observó la presencia de huevos ya que en la materia fecal se recolecto el estadio adulto del parásito de *Toxocara canis* según las características morfológicas; Los 9 cachorros tenían antecedentes de una bajo control profiláctico de su progenitora y presentaron algunos signos de parasitismo determinando una alta carga parasitaria.

Identificar *Toxocara canis* mediante la amplificación de una región del genoma mediante el uso de primer específicos.

La identificación y peso de cada muestra varia como se redacta en la tabla, obteniendo un promedio de peso de muestra de gramos, ya que se disecciono en 2mm de longitud preservando la integridad añadiendo etanol al 70%; teniendo en cuenta el protocolo adecuado para *Toxocara canis* ideal para conservar el ADN de las muestras.

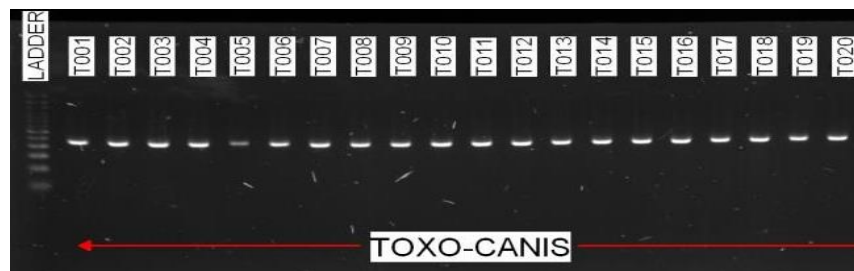
Tabla 6: Códigos y peso de muestras parasitarias

Código del tubo	Sexo del parásito	Peso del producto diseccionado
T001	Hembra	1.6µg
T002	Hembra	1.7µg
T003	Hembra	3.4µg
T004	Hembra	1.0µg
T005	Hembra	1.2µg
T006	Hembra	3.7µg
T007	Hembra	3.0µg
T008	Hembra	3.0µg
T009	Hembra	1.1µg
T010	Hembra	1.9µg
T011	Hembra	3.0µg
T012	Hembra	1.3µg
T013	Macho	2.6µg
T014	Macho	2.0µg
T015	Macho	4.1µg
T016	Macho	4.9µg
T017	Macho	1.2µg
T018	Macho	0.8µg
T019	Hembra	5.4µg
T020	Hembra	3.8µg
Promedio		2.53 µg

La identificación molecular de *Toxocara canis* se realizó por medio de la amplificación de una región conservada del genoma mediante el uso de primers específicos.

- Directo 5'-ATCGATGAAGAACGCWGC-3'
- Primer Inverso 5'-AAGCATGATGCAAAAGGCAAATAAACC-3'

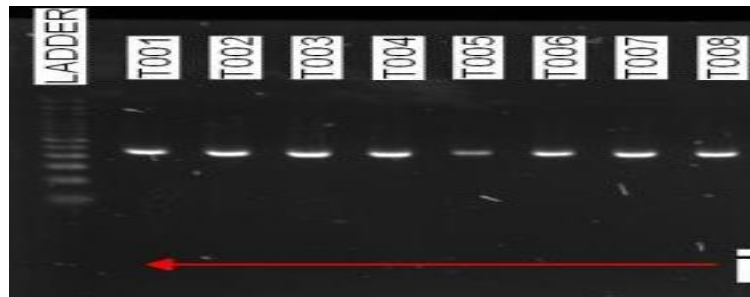
Los resultados de la amplificación de las muestras de T001, T002, T003, T004, T006, T007, T008, T008, T009, T010, T011, T011, T012, T013, T014, T015, 016, T017, T018, T019, T020. Demuestran que pertenecen a *Toxocara canis* debido a que en la lectura las bandas de electroforesis se encuentran visiblemente teñidas con el gel de agarosa en su totalidad, es decir que los *primers forward* y *reverse* son específicos para detectar el ADN del parásito en cuestión.



Fuente: UDLA

Grafico 8: Resultado de amplificación extraídas por el método fenol/cloroformo

En cuanto a las muestra T005, se puede observar que la banda de electroforesis no se encuentra teñida en su totalidad con el gel de garosa ya que los primers no fueron específicos para *Toxocara canis* y posiblemente no pertenece a otra familia de *Toxocara*.



Fuente: UDLA

Grafico 9: Resultado de amplificación extraídas por el método fenol/cloroformo

Los resultados de la amplificación de muestras T001, T002, T003, T004, T006, T007, T008, T008, T009, T010, T011, T011, T012, T013, T014, T015, 016, T017, T018, T019, T020. Se extrajeron por el método fenol/cloroformo, sin embargo el T005 no dio resultados positivo a *Toxocara canis* e pertenece a otra familia de *Toxocara*. De tal forma que para el T005 el *Primer* no fue específico para esa clase de parásito. De las 20 muestras que se realizó los respectivos exámenes e identificando morfológicamente los parásitos adulto como *Toxocara canis*. Solo 19 fueron confirmadas mediante el examen de PCR, observándose una correcta amplificación de cada una de las bandas, el 1 restante no corresponde a *Toxocara canis* por ello no dio positivo en esta investigación. La aplicación de PCR en el estudio demostró una especificidad en el diagnóstico molecular.

Discusión

Estudios realizados de Ensayo de. PCR cuantitativa en tiempo real dúplex para la detección y discriminación de los huevos de *Toxocara canis* y *Toxocara cati* (Nematoda, Ascaridoidea) en muestras de suelo y heces. (62) Demuestran que el desarrollo de una PCR dúplex cuantitativa en tiempo real (2qPCR) dirigida al espaciador transcrito interno del gen del ARN ribosómico (ITS2) y se ha utilizado para la identificación rápida y específica de huevos de *T. canis* y *T. cati* en muestras fecales y de suelo. Es sensible y específica ya que permite la identificación rápida y confiable de huevos de *T. canis* y *T. cati* en muestras clínicas y ambientales. El aumento de las poblaciones de perros, gatos y zorros en las zonas urbanas genera de hecho la

necesidad de métodos analíticos estandarizados y de alto rendimiento para estudiar la prevalencia de huevos de *Toxocara* spp, principalmente *T. canis* y *T. cati*.

La investigación sobre; Detección e identificación de *Toxocara canis* en perros infectados mediante PCR (2). Indica que se recolectaron muestras fecales de 224 perros (47 aldeas) en Ankara. *Toxocara* spp. Los huevos se diagnosticaron en las heces mediante métodos de sedimentación y flotación centrífuga. Un total de 21 perros (9,38%) fueron positivos para *Toxocara* spp. huevos. En este estudio utilizamos la técnica de PCR que, en combinación con la secuenciación de ADN, permite la detección e identificación de huevos de *T. canis* en heces de perros infectados. Para ello, se seleccionó el gen de la subunidad 6 de la ATPasa (mtDNA) como diana para la amplificación de *T. canis*. Los cebadores se utilizaron para amplificar la región de 217 pb. De los 21 aislados de *Toxocara* detectados coproscópicamente de perros, 5 (23,8%) muestras dieron positivo en la PCR para *T. canis* y las 16 muestras restantes resultaron negativas para la PCR. Los resultados indican que la PCR puede detectar el ADN de *Toxocara canis* en las heces de perros infectados, pero la eficacia fue baja en comparación con la sedimentación / flotación.

La ejecución de protocolos adecuados para la extracción de ADN es importante para la amplificación de ADN. En esta investigación se utilizó la extracción de solventes a través de la técnica fenol/cloroformo demostrando así que fue el método adecuado porque en la evaluación de los 20 ejemplares adultos 19 obtuvieron un óptimo rendimiento en cuanto al diseño de Primers específico el 1 ejemplar no dio positivo al examen determinando que la información de los Primers no fue la adecuado o alguna alteración de la muestra. La utilización del PCR como en anteriores investigación es importante ya que nos ayuda a identificar de mejor manera la estructura molecular del parásito.

12. IMPACTOS TECNICOS, (SOCIALES, AMBIENTALES O ECONOMICOS)

El alcance del impacto social del proyecto incurre en diversos aspectos, como la salud humana y animal, ya que el daño que ocasiona estos parásitos gastrointestinales afecta la vitalidad y bienestar de los portadores con el paso del tiempo se ha ido reconociendo que las parasitosis gastrointestinales de animales son factores zoonóticas altamente importantes en la Salud Mundial.

El impacto ambiental en la actualidad aun no es un tema de gran importancia mundial pero las recientes investigaciones demuestran que unos de los medios de diseminación de enfermedades zoonóticas en este caso parásitos gastrointestinales se produce cuando los

huevos de parásitos son expulsados en el medio ambiente y diseminado en el suelo. Producen infestación o re infestaciones en hospedadores definitivos o parenéticos dando continuidad al ciclo larvario, de los diversos tipos de parásitos expandidos en los numerosos tipos de suelo.

El impacto económico que ocasiona, depende de la carga parasitaria ya que al ser una enfermedad que ocasiona graves daños en la salud del animal afecta en la economía del propietario por debe ser diagnosticado, evaluado y tratado específicamente para la enfermedad. Existe registro de propietarios que no cuenta con la economía y no son tratados llevándolos a la muerte.

En último lugar es necesario dar a conocer a la población en especial a propietarios de mascotas sobre las investigaciones realizadas alrededor del mundo exponiendo los diagnósticos de laboratorio y las identificación moleculares consecuentemente se debe informar sobre los signos, lesiones y síntomas de esta enfermedad para que consigan identificar el deterioro de sus respectivas mascotas y así poder evitar en ciertos porcentajes la propagación de zoonosis y de igual manera precautelar la salud integral de los propietarios. El impacto técnico que se evidencia en la investigación es la aplicación y realización de análisis coprológicos, datos estadísticos de porcentajes de contaminación de parasitosis gastrointestinales y aplicación de diagnóstico molecular en la provincia de Cotopaxi, Cantón Latacunga, zonas rurales de la ciudad obteniendo datos precisos.

13. CONCLUSIONES

- En los análisis coprológicos se observó un porcentaje moderado de huevos de *Toxocara canis* en las muestras procesadas, en específico en las muestras de caninos entre 1 a 9 meses de edad, los que revelaron una mayor representación de huevos de *Toxocara canis*; sin embargo se evidencio parásitos expulsados en su forma adulta en caninos que dieron negativos a examen coprológico ya que posiblemente los parásitos se encontraban cursando la etapa adulta, y no la etapa larvaria, de esta manera se logró identificar morfológicamente a los 25 ejemplares adultos.
- La identificación morfológica de *Toxocara canis* fue corroborada mediante la identificación molecular en un 90 % de los 20 ejemplares que se evaluó. Es trascendental conocer el protocolo adecuado de disección de la muestra biológica de la familia de *Ascàridos* que nos permita conservar el ADN para permitir la tipificación. Demostrando que el diseño del *primer* seleccionado fue específico para la identificación molecular del parásito en la investigación. Sin embargo los análisis moleculares detectaron una posible infestación de otro tipo de parásitos de la familia *Toxocara*.

14. RECOMENDACIONES

- Realizar charlas y campañas de concientización a la población sobre la importancia de la implementación de calendarios de desparasitación en los animales de compañía como cuidado profiláctico y sanitario para así evitar una zoonosis.
- Establecer la realización de exámenes adecuados coproparasitarios según la necesidad del investigador como antes descrito, de igual manera se recomienda la realización de más estudios de identificación molecular ya que el diagnóstico molecular nos revela datos clínicos exactos del parásito a investigar.
- Alcanzar los conocimientos fundamentales parasitología y las técnicas adecuadas de disección del parásito *Toxocara canis* para poder conservar la integridad el ADN del ejemplar y el acoplamiento adecuados a los Primers específicos y así obtener resultados claros de identificación molecular.

15. BIBLIOGRAFIA

1. Zhu XQ. Modelo genetico del patogeno zoonotico *Toxocara canis*. Biblioteca Nacional de Medicina de EEUU. 2015 Febrero; 6(6145).
2. H. Oge SOGOB. Deteccion e identificacion de *Toxocara canis* en perros infectados mediante PCR. Biblioteca Nacional de Medicina de EEUU. 2019 Junio ; 2(118-123).
3. Ibañez VV. Desarrollo de herramientas moleculares para la deteccion e identificacion del parasito *Toxocara canis*. [Online].; 2012 [cited 2021 Enero 12. Available from: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10213/1/uy24-18530.pdf>.
4. Amado DAP. Reaccion en Cadena of Polymerasa. Scielo. 199 Abril; 3(2).
5. Orlando N. Prevalencia de *Toxocara canis* y su incidencia zoonotica ambiental en niños de la ciudad de Jipijapa. Polo del Conocimiento. 2018 Agosto; 3(8).
6. H. Mehlhorn DDWR. Manual de Parasitologia Veterinaria. Primera ed. Parras A, editor. España: GRASS-IATROS; 1994.
7. Carmen DMd. Larva migrans ganglionar. presentacion de un caso. Scielo. 2003 Enero-Abril; 75(1).
8. Garza VAT. Evaluacion in vitro de la motilidad de huevos larvados de *Toxocara canis* luego de la exposicion a compuestos metalicos de transicion, ligandos derivados de azoles y soluvet. [Online].; 2017 [cited 2020 Noviembre 23. Available from: <http://eprints.uanl.mx/14122/1/1080225422.pdf>.
9. Abish SER. Evaluaicon del comportamietno de conejos parasitados con *Toxocara canis*. [Online].; 2015 [cited 2020 Noviembre 25. Available from: https://core.ac.uk/download/pdf/55524609.pdf?fbclid=IwAR3idoa-KBnkkSVKvnvixQ0Hl_-A9AvISkSYu_P26ew-74Td01tocK0REKs.
10. Santillan G. Evaluación de un antígeno purificado para el diagnóstico de toxocariosis. Elsevier. 2013 Enero; 45(2).
11. Roldan W. Diagnostico de Toxocariosis humana. Scielo salud publica. 2010 Abril;(613-

20).

12. The center for food security & public health. Toxocariasis. [Online].; 2005 [cited 2020 Noviembre 25. Available from: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/toxocariasis-es.pdf>.
13. Manual Practico de Parasitologia Veterinaria. Parasitologia. [Online].; 2010 [cited 2020 Noviembre 25. Available from: https://mascvuex.unex.es/ebooks/sites/mascvuex.unex.es.mascvuex.ebooks/files/files/file/Parasitologia_9788477239109.pdf.
14. Rojas M. Toxocara canis en la salud publica. [Online].; 2014 [cited 2020 Noviembre 25. Available from: https://vetcomunicaciones.com.ar/uploadsarchivos/toxocara_canis_en_la_salud_p_blica.pdf.
15. Rodriguez DMPDIF. Toxocara canis y Sindrome Larva Migrans Visceralis. Red vet. 2006 Abril; II(4).
16. canis T. Toxocara canis. [Online]. [cited 2020 Noviembre 28. Available from: https://rodas5.us.es/file/36efc930-3256-4db2-9b39-a1a9b64fc971/1/5_toxocara_canis_SCORM.zip/pagina_01.htm.
17. Quinteros M. Universidad de Chile. [Online].; 2005 [cited 2020 Noviembre 28. Available from: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/130938/Distribuci%C3%B3n-de-larvas-de-diferentes-aislados-de-Toxocara-canis-en-%C3%B3rganos-y-la-respuesta-inmune-humoral-asociada-a-un-modelo-Murino.pdf?sequence=1>.
18. Databio. Instituto Nacional e Higiene En El Trabajo. [Online].; 2018 [cited 2020 Noviembre 30. Available from: <https://www.insst.es/documents/94886/354041/Ascaris+lumbricoides.pdf/9c0631c3-62c2-4701-a73a-a73f1db65123>.
19. Ortega SPC. Toxocara canis en perros. [Online].; 2015 [cited 2020 Noviembre 30. Available from: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/14545/1/Trabajo%20de%20Titulaci%C3%B>

- 3n%20-%20Sara%20Campos%20Ortega%2C%202015.pdf.
20. Artículo de revision. Scielo. [Online].; 2019 [cited 2020 Noviembre 30. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v28n4/a10>.
 21. A.Nadler S. FILOGENIA DE LA ASCARIDOIDEA (NEMATODA: ASCARIDIDA) BASADA EN TRES GENES Y MORFOLOGÍA: HIPÓTESIS DE LA EVOLUCIÓN ESTRUCTURAL Y SECUENCIAL. BioOne COMPLETE. 2000 Abril; II(86).
 22. Barrios ANM. Universidad Autonoma del Estado de Mexico. [Online].; 2014 [cited 2020 Novienbre 12. Available from: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/32659/Tesis%20Albis.pdf?sequence=1&isAllowed=y&fbclid=IwAR0Mrl-wZbWYw2bCaTjJAnjaHQB3tBplAhBBGsrQ9B7ZGWDH8Br7ouKbdpg>.
 23. Suntaxi MCI. T-UCE-0014-038. [Online].; 2015 [cited 2020 Noviembre 24. Available from: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6786/1/T-UCE-0014-038.pdf>.
 24. Universidad de Cuenca. Prevalencia de helmintos gastrointestinales (Cestodos y Nematodos) en caninos de la ciudad de cuenca. [Online].; 2020 [cited 2020 Diciembre 08. Available from: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/383/1/TESIS.pdf>.
 25. Saavedra E. Parasitosis de interés en nuestro medio: aspectos actuales de la toxocariosis humana. Elseiver. 2000 Diciembre; 36(10).
 26. Salamanca ACR. Toxocara canis: una zoonosis frecuente a nivel mundial. Readlyc.org. 2016 Octubre; 13(1).
 27. Saavedra E. Parasitosis de interés en nuestro medio: aspectos actuales de la toxocariosis humana. Elsevier. 2000 Diciembre; 36(10).
 28. Chavez JP. Toxocariosis humana en el Perú: aspectos epidemiológicos, clínicos y de. Scielo. 2011; 4(28).
 29. Bustamante MCL. Toxocara canis: Una zoonosis frecuente a nivel mundial. Dialnet. 2016 Junio; 13(1).

30. Mesta ACS. Universidad autonoma agraria antonio narro. [Online].; 2013 [cited 2020 Diciembre 20. Available from:
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7573/ANA%20CECILIA%20SEGOVIA%20MESTA.pdf?sequence=1&isAllowed=y&fbclid=IwAR17abbaeVjQobsl7qksQTnLVNYq5eG1ircFKMaGsJpwCXEfCjtf5x4g1vM>.
31. Aranzamendi C. Helminfos: inmunorregulación y enfermedades inflamatorias, de qué lado son *Trichinella* spp. y *Toxocara* spp. ResearchGate. 2013 Diciembre; 4.
32. Barrios ANM. Universidad Autonoma del Estado de Mexico. [Online].; 2014 [cited 2020 Diciembre 26. Available from:
http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/32659/Tesis%20Albis.pdf?sequence=1&isAllowed=y&fbclid=IwAR05ka7OwNsv_2HFOUG4TTJegJBKXbL9BBe4GFJI9J_AoqsQ7wrAOJysJYQ.
33. Shetty A. Síndrome Nefrótico asociado con la infección por *Toxocara canis*. Biblioteca Nacional de Medicina. 1999 Setiembre; 3(19).
34. Departamento de parasitología, Facultad de medicina, Alexandria Universidad, Egypto. Vista de desarrollo y viabilidad de huevos de *Toxocara canis*. [Online].; 2018 [cited 2020 Diciembre 28. Available from:
<https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3684/3951>.
35. Rodríguez RI. ResearchGate. [Online].; 2015 [cited 2020 Diciembre 29. Available from:
https://www.researchgate.net/publication/279530633_Figueroa-Castillo_JA_Jasso-Villazul_C_Liebano-Hernandez_E_Martinez-Labat_P_Rodriguez-Vivas_RI_Zarate-Ramos_JJ_2015_Capitulo_3_Examen_coproparasitoscopico_En_Tecnicas_para_el_diagnostico_de_parasitos_c.
36. Merchan MA. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. Scielo. 2017 Setiembre; 16(5).
37. Ferrer E. Scielo. 2015 Setiembre; 27(3).
38. Ibañez VV. Universidad de la República de Uruguay. [Online].; 2012 [cited 2020 Diciembre 29. Available from:
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10213/1/uy24->

18530.pdf?fbclid=IwAR3tvkSUQILnkl87M3oId82SWPu-zNTbhLY2J7bWE5-M9QE8oC-KxwibyeQ.

39. Barrera JCH. Agentes etiológicos de mastitis bovina en municipios con importante producción lechera del departamento de Boyacá. ResearchGate. 2015 Junio; 2(2).
40. Pfaller M. Archivos de patología y laboratorio de medicina. [Online].; 1999 [cited 2020 Diciembre 30. Available from:
<https://meridian.allenpress.com/aplm/article/123/11/1007/61415/Molecular-Epidemiology-in-the-Care-of-Patients>.
41. Glenda Vilches GA. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. Scielo. 2009 Junio; 29(1).
42. Merchan MA. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. Scielo. 2017 Octubre; 16(5).
43. Alejandra Serrato Diaz LFR. PCR: reacción en cadena. [Online].; 2017 [cited 2020 Diciembre 31. Available from:
http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf?fbclid=IwAR2I6U93zL_ELUKuF3B7HgeBqJCtUVUowuhh6xgSVhS67PpnfiuQ-Zu5RpY.
44. Tamay de DiosL IVC. Fundamentos de la reaccion en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Medigraphic. 2013 Agosto; 2(2).
45. Sanches IPR. La reaccion en cadena de la polimerasa a dos decadas de su invencion. Ciencia UANL. 2004 Septiembre; 2(2).
46. Sint D. Avances en la PCR multiplex: equilibrar la eficacia de los cebadores y mejorar el éxito de la detección. Biblioteca Nacional de Medicina. 2012 Octubre; 3(5).
47. RS Cha WT. Especificidad, eficiencia y fidelidad de la PCR. Biblioteca Nacional de Medicina. 1993 Diciembre; 3(3).
48. Khan Academy. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). [Online].; 2008 [cited 2021 Enero 03. Available from: https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr?fbclid=IwAR3kQiBCLcntptfFW4pzCgMATDZL0ILMkFMvs143i8FcB_REaErNkgi

hYJM.

49. F. Lamothe KJ,GP,LS,JB,TC,OM. Sociedad Americana de Microbiologia. [Online].; 1999 [cited 2020 Diciembre 31. Available from:
<https://jcm.asm.org/content/48/10/3510.short?fbclid=IwAR0odEseuyPIVWak1E8F3vlQYVKtYD0bAnSF-pJO8TkqmvCPWb2sVQK0I3A>.
50. Luis Eguarte VSXA. Ecologia Molecular. Primera ed. Semarnat , editor. España: Instituto Nacional de Ecologia; 2007.
51. Laboratorio de diagnostico molecular. Roche. [Online].; 2019 [cited 2021 Enero 02. Available from:
https://www.roche.com.ar/es/productos/diagnostica/diagnostico_de_laboratorio/laboratorio_de_diagnostico_molecular.html?fbclid=IwAR2Kbxtw8uu57bNq6uOA_oQblJrm3ncX-FYP_61xiG73dYHwTs3Kz9wX-BI.
52. Bolivar AM, Rojas A, Garcia Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. Readly. 2014 Abril; 3(1).
53. Andrés Romero ORCML. Estandarizacion de la tecnica de PCR para la deteccion de ADN de Toxocara canis en muestras de tierra. ResaerchGate. 2018 Junio; 12(1).
54. VICTORIA EUGENIA VILLEGAS MSC MCSMLCP. Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. Readly.org. 2009 Julio-Septiembre; 40(3).
55. Farfan M. Biologia molecular aplicada al diagnostico clinico. SciencieDirect. 2015 Noviembre; 26(6).
56. Moreira C. Diseño de primerspara PCR. [Online].; 2018 [cited 2021 Enero 06. Available from: https://eead-csic-compbio.github.io/bioinformatica_estructural/node28.html.
57. Asuar LE. Inecc. [Online].; 2017 [cited 2021 Enero 10. Available from:
http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/530/cap17.pdf?fbclid=IwAR1hAGNwAfcgE9XBHTlgYAt5BkjswkEqAyR9Y4EPbtLORwtFWHlsKEC_YB4.
58. Hernandez Flores VM. Analisis de iniciadores con herramientas bioinformaticas libres en linea. Temas de ciencia y tecnologia. 2018 Enero; 22(64).

59. Cortazar Martinez Adriana SRP. Instituto de Biotecnologia. [Online].; 2004 [cited 2021 Enero 21. Available from: <http://oldwww.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>.
60. Giorgio M. Introduccion al diseño de primers. [Online]. [cited 2021 Enero 22. Available from: <http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/claroline/backends/download.php?url=L0Z1bmRhbWVudG9zX3Rl83JpY29zX2RlX2xhX3JlYWwNjafNuLnBkZg%3D%3D&cidReset=true&cidReq=BIOINF O>.
61. Meza DLM. Optimizacion de una metodologia para el aislamiento y deteccion molecular de huevos de Toxocara canis en muestras de suelo. Scielo. 2015 Junio; 19(1).
62. Durant JF. Ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real dúplex para la detección y discriminación de los huevos de Toxocara canis y Toxocara cati (Nematoda, Ascaridoidea) en muestras de suelo y heces. Springer Link. 2012 Diciembre; 5(288).
63. Ort SPg. [Online].
64. Zerpa R. Imágenes de parásitos causantes de fasciolosis, cisticercosis, hidatidosis y toxocarosis. ReserachGate. 2010 Septiembre; 27(4).
65. Centro de diseminacion control y prevencion. Identificacion de laboratorio de parasitos de interes para la salud publica. [Online].; 2000 [cited 2020 Noviembre 27. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/toxocariasis/index.html>.
66. Muñoz LGG. dspace.ucuenca.edu.ec. [Online].; 2013 [cited 2020 Diciembre 22. Available from: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4328/1/TESIS.pdf>.

ANEXOS**Anexo 1 Aval De Traducción**

Anexo 2**Hoja de vida de la estudiante****CURRICULUM VITAE****DATOS PERSONALES:**

Apellidos: Topa Naranjo

Nombre: Jessica Judith

Fecha de Nacimiento: 13/12/1996

Edad: 24 Años

Estado Civil: Soltera

Nacionalidad: Ecuatoriana

Domicilio Actual: Latacunga

Teléfono celular: 0987206992

Cédula: 0504048968

ESTUDIOS REALIZADOS:

Primaria: Escuela Club Femenino Cotopaxi

Secundaria: Unidad Educativa Cesar Viera

Superior: Universidad Técnica de Cotopaxi

TITULOS OBTENIDOS

Bachiller en música



Anexo 2
Hoja De Vida Tutor
DATOS PERSONALES

Apellidos: Toro Molina

Nombres: Blanca Mercedes

Estado civil: Soltera

Cedula de ciudadanía: 0501720999

Numero de cargas familiares: 0

Lugar y fecha de nacimiento: Latacunga, 20 de noviembre de 1970

Dirección domiciliaria: Cotopaxi/Latacunga/ La matriz/La estación, Gral. Julio Andrade y
Marco A.

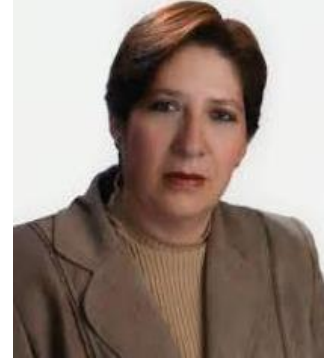
Teléfono convencional: 032234418

Celular: 0995272516

E-mail institucional: blanca.toro@utc.edu.ec

Tipo de sangre: A+

De carnet de conadis: No posee



ESTUDIOS REALIZADOS Y TITULOS OBTENIDOS

Nivel	Titulo	Institución de Educación Superior	Tipo	Número de registro	Fecha de registro
Tercer	Doctora en Medicina Veterinaria y Zootecnia.	Universidad de Guayaquil	Nacional	1006-02-283706	2002-10-04
	Diplomado Superior en Anestesiología y Cirugía de Pequeñas Especies	Universidad Central del Ecuador	Nacional	1005-04-498652	2004-04-28
	Diplomado Superior en Medicina y Manejo de Urgencias en Perros y Gatos	Universidad Central del Ecuador	Nacional	1005-05-610370	2005-09-22
	Magister en Clínica y Cirugía Canina	Universidad Agraria del Ecuador	Nacional	1018-14-86050818	2014-08-28
	Diploma Superior en Didáctica de la Educación Superior	Universidad Técnica de Cotopaxi	Nacional	1020-12-86029975	2012-12-06
	Magister en Gestión de la Producción	Universidad Técnica de Cotopaxi	Nacional	1020-07-667220	2007-10-01

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

Dra. Mg. Blanca Mercedes Toro Molina.

Firma del Tutor

Anexo 3

Tabla 7: Recolección de datos de caninos en estudio

Nº	Sector (Zonas rurales de Latacunga)	Habitad	Nombre del canino	Sexo	Edad	Examen Coprológ ico	Despar asitado	Frecuen cia	Vacuna	Fecha de la desparasitació n	Fecha de Recolección
1	Patután	Casa	Maggi	Hembra	3 meses	+	No	-	Si	06-nov-20	-
2	Patután	Tierra	Negro	Macho	11 meses	+	No	-	No	06-nov-20	10-nov-20
3	Patután	Casa	Dori	Hembra	2 meses	+	Si		Si	06-nov-20	-
4	Patután	Casa	Gordo	Macho	2 meses	+	si		Si	06-nov-20	10-nov-20
5	Patután	Terraza	Kira	Hembra	1 año	-	Si		No	06-nov-20	-
6	Patután	Tierra	Marlon	Macho	1 año	-	No	-	No	06-nov-20	-
7	Patután	Tierra	Nena	Hembra	1 año	-	No	-	No	06-nov-20	-
8	Patután	Tierra	Guiro	Macho	1 año	-	No	-	No	06-nov-20	-
9	Patután	Tierra	Lola	Hembra	2 años	-	No	-	No	06-nov-20	-
10	Patután	Casa	Margarita	Hembra	1 año	-	No	-	Si	06-nov-20	-
11	La Calera	Terraza	Tormenta	Hembra	2 años	-	No	-	Si	13-nov-20	-
12	La Calera	Casa	Ema	Hembra	1 año	-	No	-	Si	13-nov-20	-
13	La Calera	Casa	Bella	Hembra	1 año	-	Si		Si	13-nov-20	-
14	La Calera	Terraza	Peiton	Hembra	11 meses	-	Si		No	13-nov-20	-

15	La Calera	Tierra	Mayita	Hembra	8 meses	-	No	-	No	13-nov-20	-
16	La Calera	Tierra	Barbara	Hembra	1 año	+	No	-	No	13-nov-20	16-nov-20
17	La Calera	Casa	Tito	Macho	5 meses	+	Si		Si	13-nov-20	16-nov-20
18	La Calera	Tierra	Vito	Macho	1 año	-	No	-	No	13-nov-20	-
19	La Calera	Casa	Beto	Macho	2 años	-	No	-	Si	13-nov-20	19-nov-20
20	La Calera	Tierra	Lula	Hembra	8 meses	-	No	-	No	20-nov-20	-
21	La Calera	Terraza	Lilo	Macho	8 meses	-	No	-	No	20-nov-20	-
22	La Calera	Casa	Mayita	Hembra	1 año	-	No	-	Si	20-nov-20	-
23	La Calera	Casa	Vero	Hembra	1 año	-	No	-	Si	20-nov-20	-
24	La Calera	Tierra	Dira	Hembra	2 año	+	No	-	No	20-nov-20	26-nov-20
25	La Calera	Tierra	Alber	Macho	1 año	-	No	-	No	20-nov-20	-
26	La Calera	Terraza	Mimi	Hembra	1 año	-	No	-	Si	20-nov-20	-
27	La Calera	Casa	Neco	Macho	1 año	-	No	-	Si	20-nov-20	-
28	La Calera	Tierra	Laura	Hembra	8 meses	-	No	-	No	20-nov-20	-
29	La Calera	Casa	Lulú	Hembra	7 meses	-	No	-	Si	20-nov-20	26-nov-20
30	La Calera	Tierra	Lila	Hembra	9 meses	-	No	-	No	20-nov-20	-
31	Zumbalica Norte	Casa	Eli	Hembra	1 año	-	No	-	Si	27-nov-20	-
32	Zumbalica	Terraza	Tiburón	Macho	10 meses	-	No	-	Si	27-nov-20	-

	Norte										
33	Zumbalica Norte	Tierra	Centavo	Macho	11 meses	-	No	-	No	27-nov-20	-
34	Zumbalica Norte	Terraza	Nena	Hembra	9 meses	-	No	-	Si	27-nov-20	-
35	Zumbalica Norte	Casa	Coco	Macho	10 meses	+	Si		Si	27-nov-20	26-nov-20
36	Zumbalica Norte	Casa	Molly	Macho	8 meses	-	Si		Si	27-nov-20	-
37	Zumbalica Norte	Tierra	Copo	Macho	7 meses	-	No	-	No	27-nov-20	-
38	Zumbalica Norte	Casa	Mimi	Hembra	1 año	-	No	-	Si	27-nov-20	-
39	Zumbalica Norte	Terraza	Pepe	Macho	11 meses	-	Si		Si	27-nov-20	-
40	Zumbalica Norte	Casa	Beyli	Hembra	10 meses	-	Si		Si	27-nov-20	-
41	Zumbalica Sur	Tierra	Bingo	Macho	2 años	-	Si		No	28-nov-20	-
42	Zumbalica Sur	Tierra	Robert	Macho	7 meses	-	Si		No	28-nov-20	-
43	Zumbalica Sur	Tierra	Oso	Macho	11 meses	-	No	-	No	28-nov-20	-
44	Zumbalica Sur	Casa	Cofi	Macho	2 años	-	Si		Si	28-nov-20	-

45	Zumbalica Sur	Casa	Sara	Hembra	1 año	-	Si		Si	28-nov-20	-
46	Zumbalica Sur	Casa	Burbuja	Hembra	2 años	-	Si		Si	28-nov-20	-
47	Zumbalica Sur	Tierra	Bobi	Macho	2 años	-	No	-	No	28-nov-20	-
48	Zumbalica Sur	Tierra	Bubin	Macho	1 año	-	No	-	No	28-nov-20	-
49	Zumbalica Sur	Tierra	Oso	Macho	10 meses	-	No	-	No	28-nov-20	-
50	Zumbalica Sur	Tierra	Negrita	Hembra	3 meses	+	Si		No	28-nov-20	-
51	Guapulo	Casa	Ayukita	Hembra	4 meses	+	Si		Si	03-dic-20	-
52	Guapulo	Casa	Firu	Macho	2 meses	+	Si		Si	03-dic-20	-
53	Guapulo	Casa	Café	Macho	5 meses	+	No	-	Si	03-dic-20	06-dic-20
54	Guapulo	Terraza	Yena	Hembra	2 meses	+	Si		Si	03-dic-20	-
55	Guapulo	Tierra	Vivi	Hembra	3 meses	+	No	-	Si	03-dic-20	-
56	Guapulo	Tierra	Nena	Hembra	6 meses	+	Si		No	03-dic-20	-
57	Guapulo	Casa	Dayco	Macho	2 meses	+	Si		Si	03-dic-20	07-dic-20
58	Guapulo	Terraza	Coqui	Macho	5 meses	+	No	-	Si	03-dic-20	-
59	Guapulo	Teraza	Lobo	Macho	3 meses	+	No	-	Si	03-dic-20	-
60	Guapulo	Casa	Kiara	Hembra	4 meses	+	No	-	Si	03-dic-20	06-dic-20
61	Tilipulo	Casa	Matias	Macho	2 años	-	No	-	Si	04-dic-20	-
62	Tilipulo	Casa	Pitufa	Hembra	3 años	-	No	-	Si	04-dic-20	-
63	Tilipulo	Casa	Lucas	Macho	11 meses	-	No	-	Si	04-dic-20	-

64	Tilipulo	Casa	Max	Macho	8 meses	-	No	-	Si	04-dic-20	-
65	Tilipulo	Casa	Pelusa	Hembra	1 año	-	No	-	Si	04-dic-20	-
66	Tilipulo	Casa	Luna	Hembra	10 meses	-	No	-	Si	04-dic-20	-
67	Tilipulo	Casa	Keyla	Hembra	11 meses	-	No	-	Si	04-dic-20	-
68	Tilipulo	Casa	Reyna	Hembra	2 años	-	No	-	Si	04-dic-20	-
69	Tilipulo	Casa	Macho	Macho	2 años	-	No	-	Si	04-dic-20	-
70	Tilipulo	Tierra	Max	Macho	11 meses	-	No	-	No	04-dic-20	-
71	Tilipulo	Terraza	Negra	Hembra	9 meses	-	No	-	No	05-dic-20	-
72	Tilipulo	Terraza	Enano	Macho	1 año	-	Si		No	05-dic-20	-
73	Tilipulo	Tierra	Negro	Macho	3 meses	+	No	-	No	05-dic-20	-
74	Tilipulo	Terraza	Blanco	Macho	6 meses	+	Si		Si	05-dic-20	08-dic-20
75	Tilipulo	Tierra	Jeko	Macho	9 meses	-	Si		No	05-dic-20	-
76	Tilipulo	Terraza	Nena	Hembra	2 años	-	Si		No	05-dic-20	-
77	Tilipulo	Tierra	Luna	Hembra	2 meses	+	No	-	No	05-dic-20	-
78	Tilipulo	Casa	Kalin	Macho	2 meses	+	No	-	Si	05-dic-20	08-dic-20
79	Tilipulo	Casa	Chispas	Macho	3 meses	+	No	-	Si	05-dic-20	-
80	Tilipulo	Casa	Toto	Macho	4 meses	+	No	-	Si	05-dic-20	08-dic-20
81	Santo Samana	Terraza	Tomate	Macho	1 año	-	Si		No	17-dic-20	-
82	Santo Samana	Terraza	Negrita	Hembra	1 año	-	Si		Si	17-dic-20	-

83	Santo Samana	Tierra	Alsur	Macho	11 meses	-	No	-	No	17-dic-20	-
84	Santo Samana	Terraza	Suco	Macho	2 años	-	No	-	Si	17-dic-20	-
85	Santo Samana	Casa	Bella	Hembra	3 meses	+	Si		Si	17-dic-20	19-dic-20
86	Santo Samana	Tierra	Aguila	Macho	1 año	-	Si		No	17-dic-20	-
87	Santo Samana	Tierra	Manchas	Macho	2 años	-	No	-	No	17-dic-20	-
88	Santo Samana	Casa	Linda	Hembra	10 meses	-	Si		Si	17-dic-20	-
89	Santo Samana	Casa	Chikitin	Macho	8 meses	-	Si		Si	17-dic-20	-
90	Santo Samana	Casa	Chocotin	Macho	7 meses	-	Si		Si	17-dic-20	-
91	Brazales	Tierra	Cuki	Hembra	2 meses	+	No	-	No	18-dic-20	-
92	Brazales	Tierra	Colorada	Hembra	3 meses	+	No	-	No	18-dic-20	-
93	Brazales	Tierra	Tiki	Hembra	4 meses	+	No	-	No	18-dic-20	-
94	Brazales	Tierra	Lulú	Hembra	5 meses	+	No	-	No	18-dic-20	-
95	Brazales	Terraza	Tomas	Macho	6 meses	+	No	-	No	18-dic-20	20-dic-20
96	Brazales	Tierra	Lobo	Macho	7 meses	-	No	-	No	18-dic-20	-
97	Brazales	Tierra	Lucas	Macho	1 año	+	No	-	No	18-dic-20	22 -dic-20
98	Brazales	Tierra	Timido	Macho	1 año	-	No	-	No	18-dic-20	-
99	Brazales	Tierra	Pocoyo	Macho	2 años	-	No	-	No	18-dic-20	-
100	Brazales	Tierra	Puka	Hembra	1 año	-	No	-	No	18-dic-20	-

101	Brazales	Casa	Ady	Hembra	3 meses	+	Si		Si	19-dic-20	-
102	Brazales	Casa	Sheila	Hembra	11 meses	-	Si		Si	19-dic-20	-
103	Brazales	Casa	Duke	Macho	8 meses	-	Si		Si	19-dic-20	-
104	Brazales	Tierra	Eiprel	Hembra	1 año	-	No	-	No	19-dic-20	-
105	Brazales	Terraza	Alú	Macho	9 meses	-	Si		Si	19-dic-20	-
106	Brazales	Casa	Akira	Hembra	2 años	-	No	-	Si	19-dic-20	-
107	Brazales	Terraza	Beki	Hembra	5 meses	+	Si		No	19-dic-20	22-dic-20
108	Brazales	Terraza	Tom	Macho	1 año	-	Si		No	19-dic-20	-
109	Brazales	Casa	Jerry	Macho	2 meses	+	No	-	Si	19-dic-20	-
110	Brazales	Tierra	Gary	Macho	7 meses	-	No	-	No	19-dic-20	-
111	El Calvario	Tierra	Pluto	Macho	8 meses	-	No	-	No	21-dic-20	-
112	El Calvario	Tierra	Balto	Macho	2 años	-	No	-	No	21-dic-20	-
113	El Calvario	Casa	Güero	Macho	10 meses	-	No	-	Si	21-dic-20	-
114	El Calvario	Casa	Beto	Macho	3 años	-	Si		Si	21-dic-20	-
115	El Calvario	Casa	Paco	Macho	4 meses	+	No	-	Si	21-dic-20	24-dic-20
116	El Calvario	Terraza	Bruno	Macho	9 meses	-	Si		No	21-dic-20	-
117	El Calvario	Tierra	Mina	Hembra	1 año	-	Si		No	21-dic-20	-
118	El Calvario	Terraza	Brisa	Hembra	5 meses	+	Si		Si	21-dic-20	24-dic-20
119	El Calvario	Tierra	Bexi	Hembra	11 meses	-	No	-	No	21-dic-20	-

120	El Calvario	Tierra	Gore	Macho	2 años	-	No	-	No	21-dic-20	-
121	El Calvario	Terraza	Betoben	Macho	2 años	-	No	-	Si	21-dic-20	-
122	El Calvario	Casa	Aldo	Macho	3 meses	+	No	-	Si	21-dic-20	24-dic-20
123	El Calvario	Terraza	Rey	Macho	6 meses	+	No	-	No	21-dic-20	-
124	Patután	Terraza	Muñeco	Macho	9 meses	-	No	-	Si	22-dic-20	-
125	Patután	Casa	Memo	Macho	1 año	-	Si		Si	22-dic-20	-
126	Patután	Tierra	Tita	Hembra	3 años	-	No	-	No	22-dic-20	-
127	Patután	Casa	Cami	Hembra	2 meses	+	Si		Si	22-dic-20	-
128	Patután	Tierra	Klar	Macho	9 meses	-	No	-	No	22-dic-20	-
129	Patután	Tierra	Mani	Macho	1 año	-	No	-	No	22-dic-20	-
130	La Calera	Tierra	Moreta	Hembra	8 meses	-	No	-	No	22-dic-20	-
131	La Calera	Terraza	Canela	Hembra	2 meses	+	Si		Si	22-dic-20	-
132	La Calera	Casa	Carnal	Macho	8 meses	-	No	-	Si	22-dic-20	-
133	Zumbalica Norte	Casa	Bety	Hembra	11 meses	-	Si		Si	23-dic-20	-
134	Zumbalica Norte	Terraza	Pipo	Macho	1 año	-	No	-	No	23-dic-20	-
135	Zumbalica Norte	Casa	Gorda	Hembra	3 meses	+	No	-	No	23-dic-20	26-dic-20
136	Zumbalica Sur	Tierra	Puerquito	Macho	10 meses	-	Si		No	23-dic-20	-

137	Zumbalica Sur	Casa	Lolita	Hembra	3 años	-	Si		Si	23-dic-20	-
138	Zumbalica Sur	Tierra	Lolo	Macho	11 meses	-	No	-	No	23-dic-20	-
139	Zumbalica Sur	Casa	Dana	Hembra	2 meses	+	Si		Si	23-dic-20	26-dic-20
140	Zumbalica Sur	Tierra	Bebe	Hembra	7 meses	-	No	-	No	23-dic-20	-
141	Guapululo	Terraza	Pato	Macho	4 meses	+	No	-	No	27-dic-20	-
142	Guapululo	Casa	Eevee	Hembra	8 meses	-	Si		Si	27-dic-20	-
143	Santo Samana	Teraza	Geco	Macho	1 año	-	Si		Si	27-dic-20	-
144	Santo Samana	Casa	Mika	Hembra	3 meses	+	Si		Si	27-dic-20	29-dic-20
145	Tilipulo	Casa	Eli	Hembra	9 meses	-	Si		Si	27-dic-20	-
146	Tilipulo	Terraza	Lulú	Hembra	1 año	-	No	-	Si	27-dic-20	-
147	Tilipulo	Casa	Patas	Macho	2 meses	+	No	-	No	27-dic-20	29-dic-20
148	Brazales	Casa	Pedro	Macho	2 años	-	No	-	Si	27-dic-20	-
149	Brazales	Tierra	Teto	Macho	9 meses	-	No	-	No	27-dic-20	-
150	Brazales	Casa	Neto	Macho	4 meses	+	No	-	No	27-dic-20	-

Anexo 5



SERVICIOS ESPECIALIZADOS DE LABORATORIO

LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN

COTIZACIÓN #: DGI-STOX-19-002

FECHA: 04 diciembre de 2019

VALIDEZ: 30 días

ATENCIÓN: Mercedes Toro

E-MAIL: blanca.toro@utc.edu.ec

TELÉFONO: -

DIRECCIÓN: -

Estimada Dra. Toro,

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

Nos es grato poner a su consideración la siguiente cotización:

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

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 50 muestras (en un solo pedido).
- Se otorga un descuento del 5% en grupos de 60 a 100 muestras, y del 10% en grupos de muestras mayores a 100 (en un solo pedido).

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

Atentamente,

Gabriel Iturralde

Coordinador de Laboratorios de Investigación UDLA

Servicio de Análisis de Metales

LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN - UDLA

Universidad de Las Américas – Quito, Ecuador. Sede Querí – Bloque 5

Teléfono +593 (2) 3981000 ext. 2384

laboratorio.investigacion@udla.edu.ec

Pág. 1 de 2

Anexo 6



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 ESTRUCTURA 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.

LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN - UDLA

Universidad de Las Américas – Quito, Ecuador. Sede Querí – Bloque 5

Teléfono +593 (2) 3981000 ext. 2384

laboratorio.investigacion@udla.edu.ec

Pág. 2 de 2

Anexo 7



INFORME DE SERVICIOS DE ENSAYO

SERVICIO TOXACARA

Laboratorios de Investigación - UDLA



Informe No. LI-STOX-0002

Fecha de emisión: Febrero 10, 2021

1. Información Cliente

Cliente:	Universidad Técnica de Cotopaxi
Contacto:	Mercedes Toro
Dirección:	Av. Simón Rodríguez s/n
Teléfono:	03 2252205
Correo electrónico:	blanca.toro@utc.edu.ec

2. Cotización

Servicio solicitado	Número de corridas	Costo por 10 muestras	Costo Total
Extracción de ADN	60	\$ 69,00	\$ 414,00
PCR de Amplificación	60	\$ 46,00	\$ 276,00
Electroforesis con agarosa	60	\$ 38,00	\$ 228,00
Purificación de productos PCR Secuenciación Sanger (Fw/Rv)	60	\$ 134,00	\$ 804,00
Total (incluido IVA)			\$ 1.928,64

3. Datos de las Muestras*

Muestras entregadas**	Extracción de ADN	PCR de Amplificación	Electroforesis con agarosa	Purificación	Secuenciación SANGER (fwd y rev)	Fecha de recepción de muestras
60	60	60	60	60	120	15.01.2021

*Adjunto Formulario Solicitud de Servicios (información de cada muestra entregada).

** Las muestras son recopiladas y entregadas directamente por el cliente para su análisis en los Laboratorios de Investigación - UDLA. 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.

Anexo 8



INFORME DE SERVICIOS DE ENSAYO

SERVICIO TOXACARA
Laboratorios de Investigación - UDLA

4. Reporte de resultados

Método de análisis						Fecha de inicio del análisis	Fecha de obtención de resultados
Extracción de ADN	PCR de Amplificación	Electroforesis	Secuenciación				
			Purificación	Matriz	Purificación para secuenciación		
Extracción orgánica a partir de fenol - cloroformo	PCR punto final / convencional	Gel de agarosa al 2%	Purificación enzimática	Secuenciación Sanger (BigDye – 3.1) analizada en electroforesis capilar.	Protocolo basado en resina de filtración en gel.	20.01.2021	09.02.2021

Observaciones:

La amplificación y lectura forward de *Toxocara canis*, se realizó con el primer provisto por el cliente en el análisis anterior (julio 2019).

5. Informe Final

Fecha de elaboración de informe técnico	Archivos adjuntos	
	Informe de lectura (PDF)	Cromatogramas (ab1)
10.02.2021	120	120

Notas:

1. El presente informe de ensayo aplica únicamente para las muestras entregadas por el cliente a la fecha y hora descritas en este documento. Las muestras fueron analizadas según fueron recibidas en los Laboratorios de Investigación – UDLA.
2. Los resultados obtenidos se tratarán como información confidencial. La UDLA ratifica la autoría intelectual del contratante sobre las muestras, los primers y resultados de los servicios obtenidos.
3. Se prohíbe la reproducción parcial o total del presente informe sin previa autorización de los Laboratorios de Investigación – UDLA.

Firma de Responsable Técnico
Dayana Aguilar
Técnico
Laboratorios de Investigación

Firma de Autorización
Angie Bultrón
Coordinador
Laboratorios de Investigación