



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Toxocara canis* EN
PERROS DEL ALBERGUE CRIAR DE LA CIUDAD DE
RIOBAMBA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: LAURA KATHERYNE HERNÁNDEZ LEÓN

DIRECTORA: DRA. SANDRA NOEMI ESCOBAR ARRIETA.,PhD.

Riobamba – Ecuador

2022

©2022, Laura Katheryne Hernández León

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando el Derecho de Autor.

Yo, LAURA KATHERYNE HERNANDEZ LEON, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 08 de noviembre de 2022.



Laura Katheryne Hernandez Leon

060602836-3

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular: Tipo: Proyecto de Investigación, **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Toxocara canis* EN PERROS DEL ALBERGUE CRIAR DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA**, realizado por la señorita: **LAURA KATHERYNE HERNÁNDEZ LEÓN**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
BQF. Mónica Jimena Concha Guaila, M.Sc PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022 – 11 – 08
Dra. Sandra Noemi Escobar Arrieta, PhD. DIRECTORA DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2022 – 11 – 08
Dra. Verónica Mercedes Cando Brito, PhD. MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2022 – 11 – 08

DEDICATORIA

Este trabajo de proyecto de investigación se lo dedico con mucho amor a Dios, a la Virgen María por haberme bendecido con salud, fuerza, sabiduría, amor, capacidad y perseverancia de luchar por el cumplimiento de todas las metas propuestas y alcanzadas. A mis padres, a mi abuelita, a mi hermano, a mi tío, a mi sobrina y en especial a mi madre por sus sacrificios para darme amor, educación y valor para enfrentar la vida y a la Dra. Sandra Escobar por sus consejos, motivación que en tan poco tiempo ha sido merecedora de un gran afecto de cariño la cuál llevare siempre en mi corazón.

Laura

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, a la Virgen María por todas las bendiciones y sabiduría que me ha brindado en la vida, desde mi salud, familia, amigos, profesores, demás personas que de una u otra forma intervinieron en el cumplimiento de esta meta, como también me agradezco a mí misma, por tener esa gran valentía y fuerza para luchar por un sueño propuesto que a pesar de todos los obstáculos que día a día se presentaron y hoy cumplir mi mayor proyecto de vida anhelado.

A mi querida y distinguida institución la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) por acogerme durante todos mis años de carrera, gracias por brindarme los conocimientos, valores, principios que han permitido convertirme en una gran profesional sobre todo tener amor a esta carrera, y en el futuro amar cada cosa que lo realice en el campo profesional, además un sincero agradecimiento al albergue CRIAR, y al Dr. Guillermo Davalos administrador del refugio. Agradezco a la Escuela de Bioquímica y Farmacia, a sus maestros por haberme guiado en mi formación profesional. Un agradecimiento especial a la Dra. Sandra Escobar y Dra. Verónica Cando por haber colaborado en el presente estudio a través de sus amplios conocimientos, amor a la enseñanza, paciencia y tiempo para culminar este trabajo.

A mis padres Cesareo y Mayra, a mi abuelita Laura, a mi hermano Guillermo, a mi tío Jonathan, a mi sobrina Antonella y mi cuñada Verónica, gracias por su afecto y soporte fundamental de mi vida.

Laura

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.1.	Planteamiento del Problema.....	2
1.2.	Limitaciones y delimitaciones.....	3
1.2.1.	<i>Limitaciones</i>	3
1.2.2.	<i>Delimitaciones</i>	3
1.3.	Problema General de Investigación.....	4
1.4.	Problemas Específicos.....	4
1.5.	Objetivos de la investigación.....	4
1.5.1.	<i>Objetivo general</i>	4
1.5.2.	<i>Objetivos específicos</i>	4
1.6.	Justificación.....	4
1.6.1.	<i>Justificación teórica</i>	4
1.6.2.	<i>Justificación metodológica</i>	5
1.6.3.	<i>Justificación práctica</i>	5

CAPÍTULO II

2.	MARCO TEÓRICO.....	6
2.1.	Antecedentes.....	6
2.2.	Referencias Teóricas.....	7
2.2.1.	<i>Zoonosis</i>	7
2.2.2.	<i>Zoonosis parasitarias</i>	7
2.2.3.	<i>Mecanismo de transmisión</i>	7
2.2.4.	<i>Hospedador o huésped</i>	7
2.2.5.	<i>Parasito</i>	7

2.2.6.	<i>Toxocariasis</i>	7
2.2.7.	<i>Distribución Geográfica</i>	8
2.2.8.	<i>Toxocara canis</i>	8
2.2.9.	<i>Clasificación taxonómica de Toxocara canis</i>	8
2.2.10.	<i>Descripción morfológica</i>	9
2.2.10.1.	<i>Huevos</i>	9
2.2.10.2.	<i>Larvas</i>	9
2.2.10.3.	<i>Adulta</i>	10
2.2.11.	<i>Ciclo de Vida</i>	11
2.2.11.1.	<i>Vía oral en perros</i>	12
2.2.11.2.	<i>Vía transplacentaria en perros</i>	12
2.2.11.3.	<i>Vía oral en humanos</i>	13
2.2.12.	<i>Manifestaciones Clínicas</i>	14
2.2.12.1.	<i>Perros</i>	14
2.2.12.2.	<i>Hombre</i>	14
2.2.13.	<i>Patogenicidad</i>	15
2.2.14.	<i>Diagnóstico mediante técnicas de Laboratorio</i>	15
2.2.14.1.	<i>Técnica coprológica</i>	15
2.2.14.2.	<i>Técnica cualitativa parasitaria</i>	16
2.2.15.	<i>Diagnóstico molecular</i>	16
2.2.16.	<i>Secuenciación de Sanger</i>	16
2.2.17.	<i>Amplificación de Barcode</i>	17
2.2.18.	<i>Técnicas moleculares para tipificación</i>	17
2.2.19.	<i>Técnicas moleculares fenotípicas y genotípicas</i>	17
2.2.20.	<i>PCR</i>	18
2.2.21.	<i>Diagnóstico de Toxocara canis por la técnica de PCR</i>	18
2.2.22.	<i>Tipos de PCR</i>	18
2.2.23.	<i>La Taq polimerasa</i>	20
2.2.24.	<i>Primers para la identificación molecular de Toxocara canis</i>	20
2.2.25.	<i>Procedimiento PCR</i>	21
2.2.25.1.	<i>Desnaturalización</i>	21
2.2.25.2.	<i>Templado</i>	21
2.2.25.3.	<i>Extensión</i>	21
2.2.26.	<i>Tratamiento</i>	21
2.2.26.1.	<i>Perros</i>	21
2.2.26.2.	<i>Humanos</i>	23

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	24
3.1.	Enfoque de la investigación	24
3.1.1.	<i>Enfoque cualitativo</i>	24
3.1.2.	<i>Enfoque Cuantitativo</i>	24
3.2.	Nivel de la Investigación	24
3.2.1.	<i>Exploratorio</i>	24
3.2.2.	<i>Descriptivo</i>	25
3.2.3.	<i>Explicativo</i>	25
3.3.	Diseño de la investigación	25
3.3.1.	<i>No experimental</i>	25
3.3.2.	<i>Transversal</i>	25
3.4.	Tipo de estudio	26
3.5.	Lugar de investigación	26
3.6.	Población de estudio	26
3.7.	Métodos, técnicas e instrumentos de investigación	26
3.7.1.	<i>Examen Coproparasitarios</i>	27
3.7.2.	<i>Método de Flotación de Willis</i>	27
3.7.3.	<i>Caracterización molecular</i>	27
3.8.	Socialización del tema de trabajo en el albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba.	27
3.9.	Recolección de muestras	28
3.10.	Metodología	29
3.11.	Análisis de muestras	30
3.11.1.	<i>Examen coproparasitario</i>	30
3.11.2.	<i>Método de flotación de Willis</i>	31
3.11.3.	<i>Identificación molecular</i>	31
3.11.3.1.	<i>Síntesis de primers</i>	31
3.11.3.2.	<i>Extracción de ADN</i>	32
3.11.3.3.	<i>PCR</i>	33
3.11.4.	<i>Electroforesis</i>	34
3.11.4.1.	<i>Secuenciación de Sanger</i>	34

CAPÍTULO IV

4.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	35
-----------	---	----

4.1.	Identificación de <i>Toxocara canis</i> mediante los exámenes coproparasitarios. .	35
4.1.1.	<i>Examen directo</i>	35
4.1.2.	<i>Método de Willis</i>	36
4.2.	Prevalencia de parasitosis gastrointestinal en los perros del albergue CRIAR según sexo, edad, cantidad de parásitos, especie y raza.	36
4.3.	Caracterización molecular de <i>Toxocara canis</i>	43
4.3.1.	<i>Electroforesis y PCR</i>	43
4.3.2.	<i>Secuenciación de Sanger</i>	45
4.3.3.	<i>Alineación de las secuencias</i>	47
4.3.4.	<i>Análisis filogenético</i>	49

CAPÍTULO V

5.	MARCO PROPOSITIVO	50
5.1.	Propuesta	50
5.2.	Antecedentes	50
5.3.	Justificación	50
5.4.	Objetivos	51
5.4.1.	<i>Objetivo general</i>	51
5.4.2.	<i>Objetivos específicos</i>	51
5.5.	Desarrollo de la propuesta	51
5.5.1.	<i>Criterios de inclusión</i>	51
5.5.2.	<i>Criterios de exclusión</i>	51
5.5.3.	<i>Preparación de las semillas Cucurbita maxima “zapallo”</i>	52
5.5.4.	<i>Formulación del jarabe de zapallo en base a un jarabe simple</i>	52
5.5.4.1.	<i>Preparado del jarabe simple de sacarosa</i>	52
5.5.4.2.	<i>Preparado del jarabe de semillas de zapallo</i>	52
5.6.	Control de Calidad	52
5.7.	Etiquetado del jarabe a base de semilla de Cucurbita maxima “zapallo”	53
5.8.	Dosificación según el peso de los canes.	54
5.9.	Evaluación de la eficiencia del tratamiento	54
5.10.	Limpieza y desinfección	54
5.11.	Costo de elaboración	54
5.12.	Ejecución de la propuesta	55

CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Clasificación taxonómica de <i>Toxocara canis</i>	8
Tabla 2-2:	Sistema de cruces en parasitosis.....	16
Tabla 3-2:	Características y aplicaciones de los tipos de PCR	19
Tabla 4-2:	Tratamiento para <i>Toxocara canis</i> en perros	22
Tabla 1-3:	Materiales, Equipos y reactivos empleados en el examen coproparasitarios	27
Tabla 2-3:	Materiales, Equipos y reactivos empleados en el Método de Flotación de Willis	27
Tabla 3-3:	Materiales, Equipos y reactivos empleados en la caracterización molecular.	27
Tabla 4-3:	Primers sintetizados para diagnosticar los parásitos <i>Toxocara canis</i> , por PCR punto final y secuenciación Sanger.	32
Tabla 5-3:	Componentes de reacción de PCR convencional para cada muestra ensayada.	33
Tabla 6-3:	Condiciones de PCR convencional para barcode ITS.	33
Tabla 1-4.	Resultado de parasitosis según el sexo en perros del albergue CRIAR.....	36
Tabla 2-4.	Resultado de parasitosis de según la edad en perros del albergue CRIAR.....	37
Tabla 3-4.	Resultado de parasitosis de según la cantidad de parásitos en perros del albergue CRIAR.....	38
Tabla 4-4.	Resultado de parasitosis según la especie de parásito en perros del albergue CRIAR	39
Tabla 5-4.	Resultados de parasitosis de según la raza de los perros del albergue CRIAR	41
Tabla 6-4.	Resultados de casos positivos y negativos de parasitosis de los perros del albergue CRIAR.....	42
Tabla 7-4.	Resultados de la identificación molecular por barcoding y secuenciación Sanger de <i>Toxocara canis</i>	43
Tabla 1-5.	Pruebas de control de calidad de producto terminado en jarabes.	53
Tabla 2-5.	Dosificación del jarabe de semillas de zapallo en base a los pesos promedio de los canes adultos y cachorros del albergue CRIAR.	54
Tabla 3-5.	Coste de producción del jarabe antiparasitario de semillas de zapallo.....	55

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2:	Etapas embrionarias de huevos de <i>Toxocara canis</i>	9
Ilustración 2-2:	Morfología de larvas de <i>Toxocara canis</i>	10
Ilustración 3-2:	Morfología de la forma adulta de <i>Toxocara canis</i>	11
Ilustración 4-2:	Ciclo de Vida de <i>Toxocara canis</i>	11
Ilustración 5-2:	Ciclo de vida oral y transplacentaria en el perro	12
Ilustración 6-2:	Ciclo de vida de <i>Toxocara spp.</i> en el Ser Humano	13
Ilustración 7-2:	Manifestaciones clínicas <i>Toxocara canis</i> en perros.	14
Ilustración 8-2:	Manifestaciones clínicas en el hombre.....	14
Ilustración 1-3:	Mapa de las ubicaciones del albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba.	26
Ilustración 2-3:	Diagrama metodológico del análisis de muestras de <i>Toxocara canis</i>	29
Ilustración 3-3:	Procedimiento de análisis coproparasitario directo.....	30
Ilustración 4-3:	Procedimiento para la observación de parásitos por el método de flotación de Wills.	31
Ilustración 5-3:	Condiciones de PCR convencional para barcode ITS.....	33
Ilustración 1-4:	Presencia de parasitosis según el sexo.	37
Ilustración 2-4:	Presencia de parásitos según edad.....	38
Ilustración 3-4:	Presencia de parásitos según la cantidad de parásitos.....	39
Ilustración 4-4:	Presencia de parásitos según la especie.....	40
Ilustración 5-4:	Presencia de parásitos según la raza.....	41
Ilustración 6-4:	Casos positivos y negativos de parasitosis	42
Ilustración 7-4:	Productos de PCR punto final analizando presencia de parásitos <i>T. canis</i> a partir de muestras de heces y resuspensión de huevos.	43
Ilustración 8-4:	Productos de PCR punto final analizando control interno de extracción de ADN para evaluar su calidad.	44
Ilustración 9-4:	Electroferogramas de la secuenciación de Sanger Tcan 1/ Nc2 en la muestra de heces fecales de los huevos de <i>Toxocara canis</i>	45
Ilustración 10-4:	Electroferogramas de la secuenciación de Sanger Tcan 1/ Nc2 en la muestra de resuspensión de huevos de <i>Toxocara canis</i>	46
Ilustración 11-4:	Porcentaje de identidad entre secuencias de ITS-2 del ADNr (383 pb) de los aislados <i>Toxocara canis</i> en el BLAST.....	47
Ilustración 12-4:	Alineamiento entre secuencias de ITS-2 del ADNr (383 pb) de los aislados <i>Toxocara canis</i>	48
Ilustración 13-4:	Árbol de relaciones filogenéticas según el algoritmo Neighbor-Joining. ..	49
Ilustración 1-5:	Etiqueta del Jarabe de zapallo.	53

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** AUTORIZACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN EL ALBERGUE CRIAR DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA
- ANEXO B:** BASE DE DATOS DE PARASITOSIS DE LOS PERROS DEL ALBERGUE CRIAR.
- ANEXO C:** RECOLECCIÓN DE MUESTRAS EN EL ALBERGUE CRIAR
- ANEXO D:** PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EXAMEN COPROPARASITARIO.
- ANEXO E:** FORMAS ENCONTRADAS EN EL EXAMEN COPROPARASITARIO MEDIANTE EL EXAMEN DIRECTO Y MÉTODO DE WILLIS
- ANEXO F:** CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Toxocara canis*

RESUMEN

El presente Trabajo de Integración Curricular tuvo por objeto caracterizar molecularmente al *Toxocara canis* mediante técnicas moleculares y determinar la prevalencia de parasitosis a través de la aplicación de exámenes coproparasitarios. Las muestras de heces fecales se obtuvieron de 150 canes del albergue Criar. En las cuales se detectó el parásito por medio del examen directo y el método de Willis. En los resultados de la prevalencia un total de 75 hembras presentó una parasitosis de 52.82%; en cambio 67 machos 47.18%, en el parámetro edad un grupo de 74 cachorros obtuvo 52.11% y el grupo de 68 adultos 47.89%, mientras que en la cantidad de parásitos según el caso de monoparasitosis fue de 71.83% y poliparasitados 28.17%. Según la especie *Toxocara canis* 35.75%, seguido de *Giardia canis* 32.40%, *Chilomastix sp.* 7.82%, *Ancylostoma caninum* 6.70%, *Cystoisospora canis* 5.59%, *Entamoeba coli* 7.26% y *Iodamoeba sp.* 4.47%. En el tipo de razas los canes mestizos presentaron mayor prevalencia del 94.67%, seguido de Husky 2%, Pastor alemán y Pitbull 1.33% y por último French 0.67%. Finalmente en el análisis epidemiológico un total de 94.67% de casos positivos y 5.33% de casos negativos. Para el estudio molecular se utilizó la técnica de secuenciación de Sanger y amplificación de Barcode, en el cual se seleccionó los cebadores para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de la región del espaciador transcrito interno del ácido ribonucleico en la cual el resultado fue positivo tanto para la muestra de heces como para la de resuspensión de huevos, al presentar un alto índice de prevalencia del parasitosis, se recomienda implementar un control parasitario dentro del albergue.

Palabras clave: <*Toxocara canis*>, <PARASITOSIS>, <ZONOSIS>, <REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)>, <PERROS>, <ALBERGUE ANIMAL>.



2284-DBRA-UTP-2022

ABSTRACT

The aim of this work was the molecular characterization of *Toxocara canis* by means of molecular techniques and the determination of prevalence of parasitosis by means of the application of coproparasitic tests. Fecal samples were obtained from 150 dogs from Criar shelter. The parasite was detected by direct examination and the Willis method. In the results of the prevalence, a total of 75 females presented a parasitosis of 52.82%; on the other hand, 67 males 47.18%, in the age parameter, a group of 74 puppies obtained 52.11% and the group of 68 adults 47.89%, while in the quantity of parasites according to the case of monoparasitosis was 71.83% and polyprasaitized 28.17%. According to species, *Toxocara canis* 35.75%, followed by *Giardia canis* 32.40%, *Chilomastix sp.* 7.82%, *Ancylostoma caninum* 6.70%, *Cystoisospora canis* 5.59%, *Entamoeba coli* 7.26% and *Iodamoeba sp.* 4.47%. In the type of races, half-caste dogs had the highest prevalence of 94.67%, followed by Husky 2%, German Shepherd and Pitbull 1.33% and finally French 0.67%. Finally in the epidemiological analysis a total of 94.67% of positive cases and 5.33% of negative cases. For the molecular study, the Sanger sequencing and Barcode amplification technique was used, in which primers were selected for the amplification by polymerase chain reaction of the internal transcribed spacer region of the ribonucleic acid in which the result was positive both for the fecal sample and for the egg resuspension sample, presenting a high prevalence rate of parasitosis, it is recommended to implement a parasite control within the shelter.

Keywords: <*Toxocara canis*>, <PARASITOSIS>, <ZOOONOSIS>, <POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)>, <DOGS>, <ANIMAL SHELTER>.



Lcdo. Edison Hernán Salazar Calderón M.Sc.
C.I.0603184698

INTRODUCCIÓN

El Trabajo de Integración Curricular está enfocado en la caracterización molecular, reconocimiento morfológico del parásito *Toxocara canis* y la prevalencia de parasitosis de los perros del albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba, debido a que esta especie presenta un alto nivel zoonótico para los humanos, mediante la factibilidad y viabilidad de este estudio se logrará mejorar las condiciones de vida para estas mascotas, ya que en la actualidad la fauna urbana es un problema a nivel de Salud Pública, y aumenta su propagación cada día más, por ello es necesario proveer un ambiente saludable para los canes ya que van hacer adoptados y deben encontrarse en condiciones óptimas para que personas de grupos vulnerables no presenten enfermedades zoonóticas, por consiguiente, para lograr cumplir la meta planteada, se distribuye al proyecto de la siguiente manera:

- En CAPÍTULO I. Se detalla el planteamiento del problema, objetivos y justificación del proyecto, en el cual está enfocado en los problemas de zoonosis que produce este parásito en el Ecuador y en el mundo.
- En el capítulo II. Se describe las investigaciones previas del parásito y las referencias teóricas, mediante el cual se fundamenta la investigación en base a los distintos conceptos investigativos, por ende, se justifica todas las decisiones planteadas dentro del estudio.
- En el capítulo III. Se realiza un análisis del marco metodológico en el cual se obtiene la población a estudiar, y además se detalla de manera minuciosa como se realiza los exámenes coprológicos, la técnica de PCR y electroforesis.
- En el capítulo IV. Interpretación de datos, en el cual se obtiene la morfología del parásito, la prevalencia de parasitosis gastrointestinal según el sexo, edad, cantidad de parásitos, especie y raza, y finalmente la caracterización genética del parásito para identificar molecularmente se trate del parásito en cuestión.
- En el capítulo V. Se fundamenta la propuesta realizada para la sustentación del problema a la parasitosis del albergue mediante la elaboración de un jarabe a base de las pepas de calabaza que es un antiparasitario natural que elimina al parásito *Toxocara canis*, como también a tenías, áscaris y nematodos.

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del Problema

En la actualidad las parasitosis intestinales se definen como uno de los mayores dilemas de la salud pública en Ecuador, debido a las múltiples enfermedades que pueden producir el deterioro de la salud, afectando el bienestar y vitalidad del huésped, incluso son capaces de causar la muerte, además se encuentran vinculados a problemas económicos, sociales y ambientales, los cuales podrían disminuir notablemente si se contara con diagnósticos tempranos y acertados del tipo de parásito infectante.

Se han reportado, alrededor del mundo, diecinueve especies de parásitos entéricos de perros, de los cuales el 73% tiene un potencial zoonótico, de ellos *Ancylostoma caninum*, *Toxocara canis* y *Trichuris vulpis* son de relevancia clínica. En Europa, África, Asia y América se ha demostrado un alto grado de contaminación con huevos de las especies antes mencionadas sobre todo en áreas públicas como parques, jardines y playas (Medina et al., 2018, p. 105).

En América Latina, Argentina, se encontraron parásitos zoonóticos en el 77,4% de los análisis de heces. La prevalencia de los helmintos intestinales en perros es alta, principalmente en niños en edad preescolar y escolares (Taranto et al., 2000, p. 217). En Ecuador, la prevalencia de toxocariasis en niños de 5 a 10 años llega al 30%, debido al alto grado de contaminación con materia fecal canina esto se debe a la falta de cultura de la gente, ya que los dueños de mascotas no recogen los desechos de sus animales, y esto genera un foco de contaminación para la población (Orlando et al., 2018, p. 24).

La toxocariasis es una de las enfermedades parasitarias comunes en los perros, por lo que su ámbito geográfico es muy amplio y se ha convertido en un problema constante para la salud humana. Se estima que 7 de cada 10 hogares tienen mascotas, el 80% de las cuales son perros, un animal de compañía favorito, pero contrario a lo anterior, solo el 30% de los dueños siguen correctamente el proceso de desparasitación de sus perros, lo que representa una amenaza no solo para su salud, poniendo en riesgo no solo la salud de ellos, sino también de toda la familia, poniendo en riesgo no solo la salud de ellos, sino también de toda la familia 415 patógenos humanos que se conocen, más del 60% son zoonóticos; es decir, son transmitidos por animales, siendo las enfermedades parasitarias las más preocupantes porque afectan principalmente a niños y adultos mayores, además de que están presentes tanto en poblaciones urbanas como rurales.

Por tanto, la identificación del *Toxocara canis* es de fundamental, hoy en día es analizado por medio de estudios morfológicos, inmunológicos y moleculares tanto de las formas adultas como evolutivas, tomando a la técnica molecular como método de diagnóstico más sensible para evitar la resistencia ante los fármacos antiparasitarios. La técnica molecular abarca un conjunto de métodos dentro de la rama de la biología que son utilizadas para identificar y analizar marcadores biológicos en el genoma; por lo tanto, la identificación molecular se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión, dentro de las técnicas de identificación molecular se encuentra el PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Para que se realice un diagnóstico microscópico en el can, se debe contar con la presencia de huevos de *Toxocara canis*, mediante el cual se podrá identificar sus características morfológicas para diferenciar de parásitos similares en cuanto a forma, en cambio al realizar la identificación molecular el resultado va a ser específico del género que se requiera reconocer, en este caso *Toxocara canis*.

Por tal razón, se realizará una recolección de muestras fecales para analizarlas mediante un examen coprológico y determinar si existen formas de huevos para proceder analizar la muestra molecularmente mediante la aplicación de PCR y de esta manera obtener la secuencia genética, además se va a llevar a cabo estudios metagenómicos para conocer el microbiota parasitaria existente para finalmente establecer la prevalencia de *Toxocara canis* en los perros del albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba.

1.2. Limitaciones y delimitaciones

Las principales limitaciones y delimitaciones al realiza el presente trabajo de investigación se detallan a continuación:

1.2.1. Limitaciones

- La recolección de la muestra de cada can por individual dado que se encontraban en la jaula en parejas de hembra y macho.
- La ESPOCH aún no contaba con equipos para realizar estudios a nivel molecular.

1.2.2. Delimitaciones

El presente Trabajo de Integración Curricular se realizó en los perros callejeros recogidos en el

albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba. Provincia de Chimborazo-Ecuador, durante el Periodo abril-septiembre del año 2022.

1.3. Problema General de Investigación

¿Es posible realizar la caracterización molecular del *Toxocara canis* en los perros del albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba?

1.4. Problemas Específicos

- ¿En qué lugar se llevará a cabo la caracterización molecular del *Toxocara canis*?
- ¿Qué protocolo se aplicará para extraer el ADN del *Toxocara canis*?
- ¿Cómo se diseñarán las primers para la amplificación de ADN del *Toxocara canis*?

1.5. Objetivos de la investigación

1.5.1. Objetivo general

Caracterizar molecularmente al *Toxocara canis* mediante técnicas de PCR en los perros del albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba, durante el periodo abril-agosto 2022.

1.5.2. Objetivos específicos

- Reconocer la morfología de *Toxocara canis* mediante el examen coproparasitario en muestras fecales de perros del albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba.
- Establecer la prevalencia de parasitosis por *Toxocara canis* en los perros del albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba.
- Diseñar el árbol filogenético de *Toxocara canis* mediante el algoritmo de Neighbor-Joining

1.6. Justificación

1.6.1. Justificación teórica

Conscientes de la importancia que va adquiriendo realizar un análisis parasitológico tanto a nivel molecular como microscópico el cual va a aportar que los canes del albergue puedan mejorar sus condiciones de salud, mediante estudios más avanzados como es la caracterización molecular que

es un análisis más profundo el cual abarca (extracción de ADN, síntesis de primers específicos, amplificación de barcode ITS, purificación, secuenciación Sanger y limpieza de productos de PCR), siendo así el propósito de esta investigación establecer la prevalencia de parasitosis, marcar la importancia de realizar un estudio molecular para identificar de manera precisa y eficaz el parásito desencadenante de una zoonosis.

1.6.2. Justificación metodológica

La caracterización molecular es una técnica que permite el diagnóstico rápido, sensible y específico para detectar, identificar y cuantificar a los patógenos que afectan al animal y produzcan zoonosis, es por ello, que mediante este estudio se busca el beneficio para el albergue con el fin de mejorar, brindar un conocimiento sobre esta enfermedad y su impacto en la salud de los caninos y de la sociedad. Los diferentes estudios se llevarán a cabo en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en el laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias el cual cuenta con los materiales, equipos y reactivos necesarios para la investigación, además se va a realizar los estudios moleculares conjuntamente con la Universidad de Bolonia- Italia en la cual se aprendió técnicas moleculares, con profesionales con sólidos conocimientos en el área de la genética, también es importante recalcar que la tutora será un pilar fundamental en el desarrollo de este trabajo aportando con sus conocimientos, experiencia en la rama de Parasitología, la información que servirá como sustento científico será obtenida mediante bases de datos confiables y verídicos.

1.6.3. Justificación práctica

Al caracterizar molecularmente el parásito *Toxocara canis* y establecer la prevalencia de la parasitosis en los perros del albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba, se podrá establecer los factores de riesgo para que se produzcan una zoonosis, que es una de las patologías más frecuentes tanto en animales como en humanos provocando un alto índice de morbilidad y mortalidad, debido a que el diagnóstico es poco preciso y da lugar a que los parásitos persistan durante un largo tiempo en el organismo causando una alteración fisiológica del huésped. Por lo tanto, es de vital importancia realizar la identificación clínica y molecular del parásito para prevenir y controlar la zoonosis.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En Irán, en el estudio titulado “Caracterización molecular basada en PCR de *Toxocara spp*” en este estudio, se investigó la prevalencia de *Toxocara spp.* infección en gatos y perros callejeros en la ciudad de Ahvaz, suroeste de Irán. Los huevos de *Toxocara spp.* en heces de gatos y perros callejeros se detectaron mediante el método de flotación de sacarosa, y la identificación se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de ADN, de las 140 muestras fecales que se recolectaron al azar de ambientes públicos durante los meses de enero a mayo de 2012, se encontró que el 45% albergaba *Toxocara spp.* huevos. La mayor prevalencia de *Toxocaraspp.* Los huevos se encontraron en el área central de la ciudad de Ahvaz (28,6%). Se encontraron huevos de *T. canis* en 4 (6,34%) de las 63 muestras positivas. Los perros callejeros se encuentran en parques, áreas de juego y otros lugares públicos y pueden ser un riesgo potencial de contaminación (Shahram et al., 2013).

Un estudio realizado en Ankara cuyo título es “Detection and identification of *Toxocara canis* in infected dogs using PCR ”, menciona que se recolectaron muestras fecales de 224 perros (47 aldeas) en Ankara.. Los huevos de *Toxocara spp* se diagnosticaron en las heces mediante métodos de flotación y sedimentación centrífugos. 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 secuenciación de ADN, permite la detección e identificación de huevos de *T.canis* en heces de infectados perros. Para ello, se seleccionó el gen de la subunidad 6 de la ATPasa (ADNmt) como diana para la amplificación de *T. canis*, mientras que en el corproparasitario entre 21 muestras se detectaron aislados de *Toxocara* de perros, 5 (23,8%) muestras fueron positivas por PCR para *T. canis*, y las 16 muestras restantes resultaron negativas para la PCR. Los resultados indican que la PCR puede detectar *Toxocara canis* (Öge et al., 2019, p. 123).

En Ecuador, se realizó la “Identificación molecular del *Toxocara canis* en caninos del cantón Salcedo”, el método utilizado fue la amplificación del gen ITS-2 del ADN ribosómico por PCR , mediante primers específicos y electroforesis capilar se logró secuenciar 383 pb , y los resultados obtenidos de la secuenciación fueron comparados mediante la base de datos del NCBI BLAST en los cuales resultaron positivas 20 muestras que por medio de la construcción del árbol filogenético se confirmó la identidad parasitaria, como pertenecientes al género *Toxocara*, exactamente al *Toxocara canis* (Chacón et al., 2022, pp. 66-74).

2.2. Referencias Teóricas

2.2.1. Zoonosis

Las zoonosis (del griego Zoo: animales) son enfermedades infecciosas que se transmiten de los vertebrados a los humanos en condiciones naturales (Quintero et al., 2021, pp.169-173).

2.2.2. Zoonosis parasitarias

Un grupo de enfermedades parasitarias que ocurren tanto en humanos como en animales, es decir, parásitos de vertebrados transmitidos a los humanos (Alho et al., 2021, pp.938–948).

2.2.3. Mecanismo de transmisión

El mecanismo de transmisión es un conjunto de estrategias (mecanismos) que utiliza una fuente infecciosa para establecer contacto (transmisión) con el huésped (Philip y Mideo, 2017, pp.747-755).

2.2.4. Hospedador o huésped

Hospedador se denomina al individuo que aloja un parásito, el cual puede ser lesionado por un agente infeccioso durante su estancia con el huésped del cual recibe alimento y hospedaje (Sánchez y Biron, 2019).

2.2.5. Parasito

El término parásito se refiere a un organismo que crece y predispone a otro organismo (llamado hospedador o huésped) para su protección nutricional y física sin contribuir de ninguna manera a la supervivencia del huésped; por lo tanto, solo los parásitos son beneficiados (Dabanch, 2013, pp.47-51).

2.2.6. Toxocariasis

La toxocariasis es una enfermedad causada por la infección con larvas de *Toxocara canis* y, en menor medida, la *Toxocara cati* de los gatos y otras ascariasis, y se ha manifestado en una variedad de síndromes clínicos en humanos (Marcin, 2018).

2.2.7. Distribución geográfica

Toxocara canis y *cati* se pueden encontrar en suelos de todo el mundo. Los huevos de estas especies están presentes en el 2-88% de las muestras de suelo recolectadas en diferentes países. La incidencia de las altas temperaturas y humedad en el trópico favorecen la propagación de este parásito (Person, 2005, pp. 1-7).

2.2.8. *Toxocara canis*

Toxocara canis, un gusano redondo que vive en el intestino delgado de los perros, es endémico en todo el mundo; al ingerir los huevos presentes en la tierra, vegetales crudos y alimentos contaminados con heces de perros puede infectar a los humanos. Este parásito pertenece al grupo de parásitos intestinales que pueden infectar a los humanos sin saberlo, por lo que la infección que provoca se considera zoonótica (Godoy, 2020, pp. 6-22).

2.2.9. Clasificación taxonómica de *Toxocara canis*

Toxocara canis contiene una gran cantidad de géneros, incluidos los gusanos de intestino largo, que pueden atacar a varios vertebrados.

Tabla 1-2: Clasificación taxonómica de *Toxocara canis*

Dominio	Eukaryota
Reino	Animalia
Sub reino	Bilateria
Rama	Protostomía
Infra reino	Ecdysozoa
Superphylum	Aschelminthes
Phylum	Nematelminthes
Clase	Secernentea
Sub clase	Rhabditia
Orden	Ascarida
Sub orden	Ascaridina
Superfamilia	Ascaridoidea
Familia	Eukaryota
Género	Toxocara
Especie	<i>Toxocara Cani</i>

Fuente: Timothy y Dwight, 2022, pp.147-492 (Clasificación taxonómica de *Toxocara canis*).

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

2.2.10. Descripción morfológica

Toxocara canis muestra un menor tamaño con respecto a la mayoría de las especies de la familia Ascarididae, por lo tanto, presenta la siguiente morfología:

2.2.10.1. Huevos

Son esféricos, rara vez elípticos, con una cubierta irregular gruesa con hendiduras en la superficie, irregulares, cóncavos, de color marrón oscuro a negro, granulares, de 80 a 85 μm x 75 μm de tamaño, con tres capas de quitinosa y una gruesa capa de proteína. Para que los huevos fertilizados se conviertan en larvas, necesitan condiciones de crecimiento óptimas: temperatura (22 a 25 °C) y humedad dentro de tres semanas, además son muy resistentes a diferentes condiciones climáticas y productos químicos (Kim et al., 2020, pp.403–411).

Los huevos liberados por el nuevo gusano *T. canis* de la vagina y el útero tienen forma ovoide o esférica. La superficie del huevo consta de cuatro capas, la capa más externa es una capa porosa. Los huevos están completamente llenos de materia citoplasmática. Después de varias horas de cultivo, los grumos citoplasmáticos se espesaron, creando un espacio entre el embrión y la capa interna del aspirado (Abou, 2018, pp.189-197).

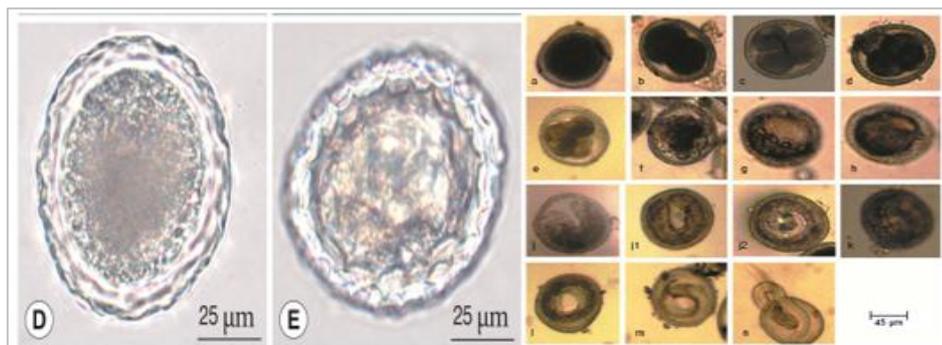


Ilustración 1-2. Etapas embrionarias de huevos de *Toxocara canis*

Fuente: Kim et al., 2020, pp.403–411

2.2.10.2. Larvas

Las primeras larvas liberadas después de la eclosión de los huevos por encapsulación son muy frágiles y no resistían el aplastamiento. Tienen un frente redondeado y no presenta ni punta ni filo. El esófago y las regiones caudales están compuestos por glóbulos grandes disecados y gránulos oscuros esparcidos por una región del intestino medio más densa. Sin embargo, la piel y los labios no se reconocen. La mayoría de las larvas del tercer individuo miden alrededor de 400

µm de largo y 15-21 µm de diámetro y pueden resistir el estrés de la incubación y permanecer intactas, por ende, se caracterizan por una boca bien desarrollada, regiones entéricas granulares y poros excretores bien definidos (Abou, 2018, pp.189-197).

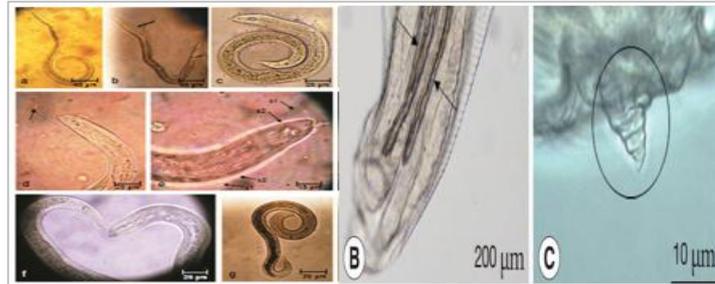


Ilustración 2-2. Morfología de larvas de *Toxocara canis*

Fuente: Kim et al., 2020, pp.403-411

Los estados larvarios se diferencian:

- **L1:** Los cachorros nacen que nace con toxocariasis en su organismo, con el tiempo comienzan a ovular y sueltan larvas a partir de los 60 días, las cuales al ser fecundadas forman óvulos sin embriones las cuales se excretan juntamente con las heces fecales.
- **L2:** El desarrollo de las larvas comienza cuando los huevos son depositados en tierras, en un lapso de 2 semanas, para que maduren, es necesario que exista un régimen de temperatura adecuado, en condiciones de clima frío, al existir un aumento de la temperatura contribuirá al desarrollo del embrión, al cabo de 4 días a una temperatura de 30°C, que estos microorganismos serán infectantes.
- **L3:** los perros de cinco semanas que ingieran los huevos embrionarios de la tierra, en el huésped hacen que las larvas maduren y viajen a órganos como los pulmones y el sistema respiratorio hasta llegar a los intestinos donde completan su desarrollo.
- **L4:** Durante la etapa de diferenciación sexual, el parásito hembra pone huevos y se excreta en las heces. El desarrollo de parásitos adultos en larvas varía según el cachorro o perro adulto. En perros mayores de 1 año, las larvas anidan en tejido muscular, corazón, pulmones e hígado en el quiste, atraviesan la placenta y llegan al feto.

2.2.10.3. Adulta

Toxocara canis es una especie con diferencias morfológicas entre machos y hembras. Los machos

miden de 4 a 6 cm de largo y son más pequeños que las hembras. La cabeza trasera del macho tiene un vientre curvo y una cola puntiaguda, con un núcleo tubular. También tiene espinas simples que transportan el esperma directamente (Dabanch, 2013, pp.47-51).

Las hembras suelen medir unos 6,5 cm de largo, pero pueden crecer hasta 15 cm. En las mujeres, la vulva mide un tercio de la longitud del cuerpo anterior. Los ovarios son muy grandes y agrandados. El útero contiene 27 millones de óvulos a la vez. Tanto hombres como mujeres tienen tres labios prominentes. Cada labio tiene una abertura posterior. La epidermis lateral es visible a simple vista. Ambos sexos tienen alas prominentes en el cuello (Harris, 2019).

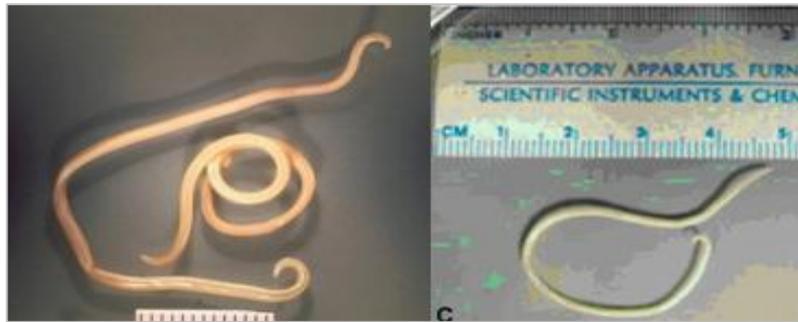


Ilustración 3-2. Morfología de la forma adulta de *Toxocara canis*

Fuente: López, 2019.

2.2.11. Ciclo de Vida

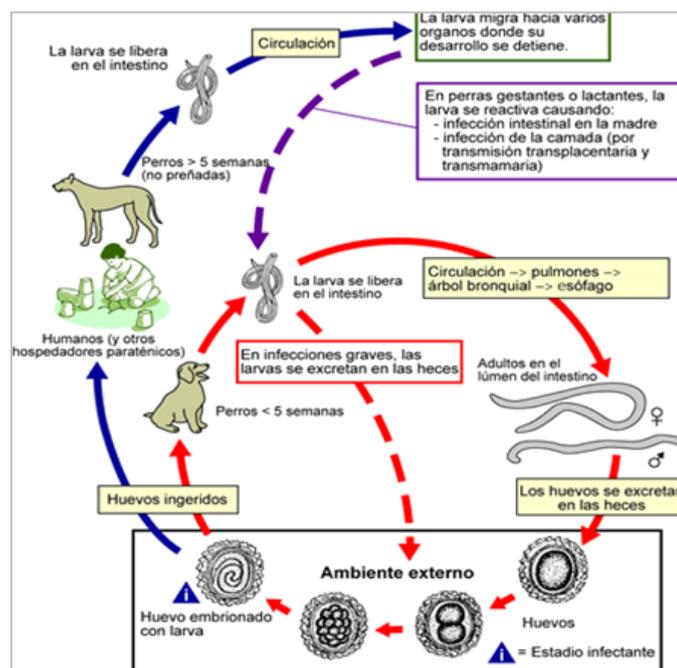


Ilustración 4-2. Ciclo de Vida de *Toxocara canis*

Fuente: Delgado y Rodríguez, 2009, pp.1-33.

2.2.11.1. Vía oral en perros

Los huevos se eliminan mediante las heces sin embrionar, tiempo durante el cual se desarrollan en el ambiente externo por un período de tiempo, generalmente de unas dos semanas, en condiciones ambientales adecuadas de temperatura y humedad (Rollinson y Stothard, 2022, pp.243-345).

La ingestión oral por parte de los perros, más comúnmente por la ingestión de huevos contaminados, también puede resultar de la ingestión de huéspedes infectados que luego eclosionan en el intestino delgado proximal; las larvas de segundo estadio pasan por la mucosa intestinal hasta llegar a la circulación portal, donde llegan al hígado y con circulación al corazón, pulmones y tráquea; de la tráquea se recogen nuevamente y se devuelven al intestino hasta alcanzar la madurez sexual, donde se forman los óvulos no embrionarios; Estos huevos se eliminan en las heces y prosperan en el suelo, brindándoles las condiciones necesarias para desarrollarse y crecer hasta el sacrificio. (Becerril, 2014, pp.279-284).

Las infecciones varían con la edad del perro y ocurren en:

- Los cachorros menores de tres meses atraviesan los alveolos pulmonares, suben por la garganta y llegan al intestino delgado, donde producen parásitos adultos.
- En perros adultos, ingresan a la circulación arterial desde los pulmones y se acumulan en los órganos internos, donde se desarrollan granulomas.
- En perros machos adultos y perras no gestantes, las larvas pueden permanecer enredadas sueltas o en varios tejidos.

2.2.11.2. Vía transplacentaria en perros

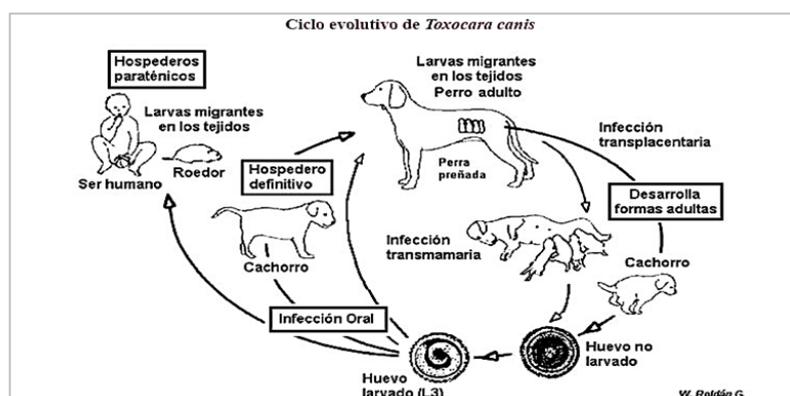


Ilustración 5-2. Ciclo de vida oral y transplacentaria en el perro

Fuente: Ambrosioni et al, 2011, pp.279-284.

La perra en estado de gestación tiene larvas en el tejido, gracias a la fuerte capacidad de migración, las larvas se transfieren al feto debido al debilitamiento del sistema inmunológico de la madre y los cambios hormonales, lo que lleva a infecciones congénitas (Ambrosioni et al, 2011, pp.279-284).

2.2.11.3. Vía oral en humanos

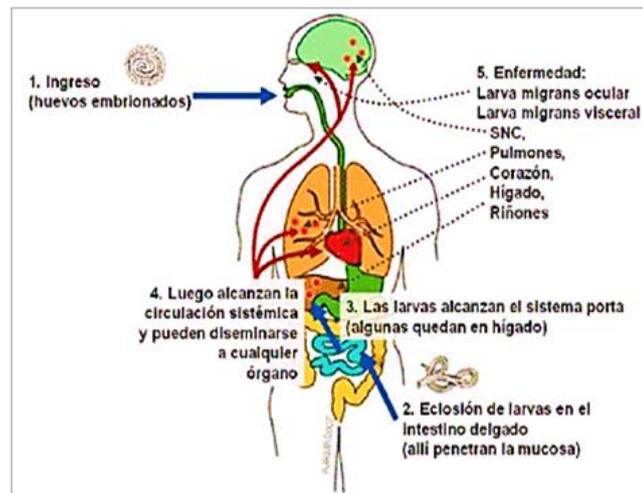


Ilustración 6-2. Ciclo de vida de *Toxocara spp.* en el Ser Humano

Fuente: Despommier, 2003, p.269.

En humanos, después del consumo de huevos embrionarios, que ingresan al duodeno, a través de los vasos sanguíneos y linfáticos, las células L2 experimentan una migración tisular. Los órganos más afectados son el hígado, los pulmones, el cerebro y los ojos. En los perros adultos, el ciclo de infección es el mismo hasta que llega a los pulmones, pero durante este proceso los huevos entran en la circulación y de ahí a los órganos y músculos, donde las larvas pueden vivir muchos años (Despommier, 2003, p.269).

2.2.12. Manifestaciones Clínicas

2.2.12.1. Perros



Ilustración 7-2. Manifestaciones clínicas *Toxocara canis* en perros.

Fuente: Meza, 2011.

Se caracteriza por una secreción nasal que puede ser fatal o desaparecer después de tres semanas. Con un gran número de infecciones en el estado prenatal, aparecen lombrices intestinales en el estómago y los intestinos, alterando la digestión, provocando vómitos y lombrices acompañantes, y en otros casos, diarrea con mucosidad acompañada de deshidratación, hinchazón y dolor abdominal. A veces, los cachorros desarrollan neumonía por inhalar vómito potencialmente mortal. A pesar de una buena alimentación, la fase crónica de cachorros y perros mayores presenta un cuadro de desnutrición progresiva. Puede haber diarrea periódica. En otras ocasiones, pueden presentarse síntomas neurológicos, incluidas convulsiones de duración limitada (Meza,2011).

2.2.12.2. Hombre



Ilustración 8-2. Manifestaciones clínicas en el hombre.

Fuente: Cejas, 2017.

Los síntomas clínicos están directamente relacionados con los órganos afectados, el número de larvas en el paciente y la edad del huésped, entre los más comunes se encuentran: la neumonía, fiebre, malestar general, linfadenopatía, hepatomegalia, esplenomegalia y más del 50% de

eosinofilia durante la migración al SNC, además incluyen deterioro neuropsiquiátrico, epilepsia, encefalitis, meningitis o toxicosis ocular que causaron cambios visuales y desarrollo de síndromes que incluyen lesiones granulomatosas, endoftalmitis difusa, papilomatitis, estas larvas no se observaron en oftalmología (Huapaya et al., 2009, pp. 283-290).

2.2.13. Patogenicidad

El parásito ataca diversos órganos como corazón, pulmones, vista, hígado, presentando síntomas clínicos de hepatomegalia y granulación, llegando incluso al cerebro, aparecen secreciones inflamatorias y granulomas en los pulmones, pues allí al examen microscópico se encuentran eosinófilos y cristales. Por lo tanto, el grado de infección depende del número de larvas que causan daño durante la migración, pero de tejido a tejido los órganos inflamados desarrollan una respuesta granulomatosa y eventualmente se calcifican en presencia de eosinófilos (Macuhova, 2012, pp. 271-276).

2.2.14. Diagnóstico mediante técnicas de Laboratorio

2.2.14.1. Técnica coprológica

- **Examen macroscópico:** las muestras de heces recolectadas deben examinarse visualmente de inmediato, para verificar su consistencia, moco, sangre, pus o parásitos adultos (Negrete, 2011).
- **Examen microscópico:** El método de Willis es el más utilizado para determinar los estadios de huevo y larva de *Toxocara canis* es la técnica de flotación con NaCl al 25%, en la cual nos permite analizar el 100% y se observa con mayor nitidez el parásito debido a que no se encuentran los restos parasitarios (Farfán, 2019, PP. 58-65). Sin embargo, el efectuar el examen microscópico mediante el uso de los reactivos de lugol y NaCl 0.9%, presenta una efectividad del 87% con respecto al de flotación.

El examen en fresco en base a la microscopia obtenidos de muestras de heces concentradas, no modificadas o teñidas con colorantes específicos sigue siendo el estándar de oro en muchos laboratorios clínicos en el mundo. Debido a su bajo costo y requisitos mínimos de equipo, este enfoque es particularmente útil en áreas de escasos recursos, donde las altas frecuencias de parásitos significan técnicas con un mejor rendimiento de diagnóstico. No obstante, la microscopía requiere técnicos altamente calificados y largos tiempos de procesamiento y análisis, lo que genera importantes preguntas sobre la sensibilidad y especificidad del diagnóstico y, en la

mayoría de los casos, no permite la discriminación morfológica de especies y genotipos (Dacal, 2020, pp.24-31).

2.2.14.2. Técnica cualitativa parasitaria

Es un sistema de cruces según el número de parásitos que existe en la muestra en análisis.

Tabla 2-2: Sistema de cruces en parasitosis.

Infección	Campos	Numero de cruces
Baja	1 a 3 formas	Una cruz (+)
Leve	4 a 7 formas	Dos cruces (+ +)
Moderada	8 a 10 formas	Tres cruces (+ + +)
Grave	> 10 formas	Cuatro cruces (+ + + +)

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

2.2.15. Diagnóstico molecular

Los ensayos moleculares se utilizan cada vez más para complementar o reemplazar los métodos tradicionales de identificación de parásitos basados en microscopía. Las posibles ventajas de los métodos moleculares, como los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, incluyen una mayor sensibilidad, capacidad para distinguir organismos morfológicamente similares e independencia de las características microscópicas subjetivas (Pritt, 2015, pp. 111-160).

Por lo tanto, los avances en las pruebas moleculares a través de la amplificación de ácidos nucleicos podrían mejorar la detección de infecciones asintomáticas con recuentos bajos de parásitos. La rápida acumulación de datos genómicos de parásitos permite el diseño de cebadores de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para objetivos genéticos multinucleares, como genes ribosómicos y mitocondrias, lo que aumenta aún más la sensibilidad y especificidad de la secuenciación del ADN de *Toxocara canis* (Wong et al,2014, p.239).

2.2.16. Secuenciación de Sanger

Es un método de secuenciación del ADN el cual incorpora un didesoxinucleótidos el cual va a dar una finalización a la cadena por medio del ADN polimerasa, en la cual en el ADN monocatenario se adiciona los nucleótidos a una cadena que se halla en constante crecimiento. El alargamiento de la cadena se produce en el extremo 3' de un cebador, mientras que los desoxinucleótidos agregados al producto de extensión se seleccionan mediante el emparejamiento de pares de bases con la plantilla (Totomoch,2017).

2.2.17. Amplificación de Barcode

La amplificación de Barcode se va a realizar la producción de amplicones por medio de PCR , especialmente de regiones particulares mediante el cual se va secuenciar la cadena, posteriormente estos datos se van a usar para identificar o "codificar" ese organismo para distinguirlo de otras especies, por ende este método es empleado ampliamente en organismos eucariotas, incluidas las algas, para la identificación de especies y se identifican diferentes loci genéticos (Thajuddin et al, 2019, pp.43-64).

2.2.18. Técnicas moleculares para tipificación

La tipificación, conocida como identificación y caracterización de patógenos, puede determinar la identidad del microorganismo que causa un brote de enfermedad infecciosa, la fuente de infección y el modo probable de transmisión, probabilidad y frecuencia de la fuente de infección en una población; las técnicas de clasificación a aplicar dependerán de los requerimientos y desempeño del sistema que se esté analizando; sin embargo, independientemente del método de tipificación utilizado, primero se debe evaluar la capacidad de generar la información epidemiológica necesaria (Merchan et al,2017, pp. 12-34).

2.2.19. Técnicas moleculares fenotípicas y genotípicas

El método fenotípico, basado en la identificación de características bioquímicas y/o fisiológicas, es la primera herramienta para comparar microorganismos, incluyendo actividad enzimática, capacidad metabólica, que determinan la expresión antigénica y sensibilidad a fungicidas, sin embargo, este método no puede ser utilizado para identificar genes, polimorfismos o mutaciones que determinan la expresión de rasgos observados en cultivos, pruebas bioquímicas y pruebas bioquímicas (Merchan et al,2017, pp. 12-34).

El genotipado examina el genoma del patógeno y permite el análisis de polimorfismos genéticos que coexisten en los patógenos. Se basan en localizar el material genético de un organismo, permitiendo cambios novedosos en los patrones de expresión génica y proporcionando alternativas más estables y reproducibles. Las técnicas utilizadas en el genotipado incluyen las siguientes: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación del genoma mediante secuenciación NGS y pirosecuenciación, hibridación con una sonda de ADN, RAPD y RFLP. (Merchan et al,2017, pp. 12-34).

2.2.20. PCR

PCR es un procedimiento simple pero muy útil en biología molecular conocido como reacción en cadena de la polimerasa. Esta es una técnica utilizada para amplificar una pieza de ADN de interés o hacer una gran cantidad de copias. En otras palabras, la PCR permite hacer millones de copias de una secuencia de ADN particular a partir de una pequeña muestra inicial (a veces incluso una sola copia). Este es un proceso importante para todos los tipos de ingeniería genética y, de hecho, ha permitido el desarrollo de varias tecnologías nuevas (Science Learning Hub, 2017).

A pesar de la diversidad y las peculiaridades epidemiológicas, la característica común de muchos parásitos intestinales es la excreción de alguna forma del parásito (quistes/ooquistes, huevos, larvas, proglótides) y heces de animales. Dado que las técnicas de diagnóstico molecular (PCR) son extremadamente sensibles a la calidad y cantidad del ADN, deben existir métodos eficientes para maximizar la degradación del material primario parásito, la extracción y la purificación, la inhibición del ADN y la eliminación de los inhibidores. Por otro lado, la eficiencia (sensibilidad, especificidad, cantidad de ADN amplificado, reproducibilidad, durabilidad) y la utilidad (diagnóstico clínico, cribado de muestras en estudios epidemiológicos, características moleculares) de cada procedimiento de PCR dependerán en gran medida (Dacal, 2020, pp.24-31).

2.2.21. Diagnóstico de *Toxocara canis* por la técnica de PCR

La PCR se usa para un diagnóstico rápido y específico porque puede amplificar específicamente el ADN de los huevos y las larvas en las etapas de larva o adulto. El diseño de cebadores es un paso importante en la identificación de parásitos por PCR. Se ha demostrado que las secuencias de ADN nuclear ITS-1 e ITS-2 proporcionan marcadores genéticos confiables para la identificación y diferenciación de *Toxocara* y especies de nematodos relacionados. Para detectar el ADN de *T. canis*, la técnica de PCR puede identificar áreas donde el parásito se está propagando; también puede distinguir el ADN de *T. canis* y *T. cati*, lo que no se puede hacer mediante técnicas parasitarias, ya que no se pueden distinguir los huevos (Öge et al., 2019, p. 123).

2.2.22. Tipos de PCR

Actualmente, se utilizan una variedad de métodos de PCR para la detección de protistas y helmintos intestinales, que incluyen PCR directa, anidada, parcialmente anidada, en tiempo real (qPCR, única o múltiple) y análisis múltiple de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), basado en amplificación de bucle isotérmico (PCR-LAMP).

La PCR anidada y semianidada proporciona un mejor rendimiento (en términos de sensibilidad y número de amplificaciones de ADN) que la PCR directa y se utiliza para la detección y el genotipado de patógenos unicelulares. Debido a su alta sensibilidad, relativa facilidad de uso y velocidad, la qPCR está destinada a fines de diagnóstico y se usa cada vez más en laboratorios clínicos, especialmente en múltiples formatos (Dacal, 2020, pp.24-31).

Tabla 3-2: Características y aplicaciones de los tipos de PCR

Tipo de PCR	Características	Aplicaciones
PCR estándar	Amplificar fragmentos de ADN utilizando dos cebadores. Se utiliza la amplificación detectada por pequeñas regiones de geles de agarosa o poliacrilamida para visualizar el número de pares de bases.	Detección cualitativa de fragmentos de ADN
PCR anidada	En esta variante, el producto de amplificación se usa como molde para la segunda amplificación usando cebadores que estarán en la primera secuencia de amplificación.	Detección cualitativa de fragmentos de ADN con alta sensibilidad y especificidad.
PCR in situ	Los productos generados a partir de muestras biológicas, como secreciones y tejidos, se pueden ver visualmente en el sitio de amplificación y permiten detectar pequeñas cantidades de material genético.	
PCR múltiple	Utiliza múltiples cebadores para amplificar dos o más fragmentos de ADN en una sola reacción de amplificación. Visualice la detección de amplificación con gel de agarosa	Detección cualitativa de múltiples fragmentos de ADN en una reacción de PCR
PCR – RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)	PCR estándar y pasos posteriores de digestión con enzimas de restricción.	Detección de polimorfismos RFLP.
PCR con transcriptasa inversa (RT - PCR)	Este tipo de PCR utiliza ARN como plantilla inicial y requiere una enzima transcriptasa inversa para convertir el ARN en un tipo de ADN llamado ADNc (ADN complementario).	La expresión génica. Detección de virus ARN
PCR - RT (Real Time) o qPCR	La PCR estándar utiliza características o sondas que contienen fluoróforos para detectar	Detección cualitativa de uno o más fragmentos de ADN. Cuantificación de ADN en la muestra (carga) o

	ampliaciones; pueden ser múltiples.	expresión génica.
--	-------------------------------------	-------------------

Fuente: Espinoza, 2017, p. 521 (Características y aplicaciones de los tipos de PCR).

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

2.2.23. La Taq polimerasa

La polimerasa Taq es una ADN polimerasa termoestable derivada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. Su función principal es la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que automatiza los pasos de amplificación repetitivos de secuencias de ADN específicas. Las reacciones en cadena de la polimerasa pueden multiplicar las moléculas de ADN hasta mil millones de veces. Esto crea una gran cantidad de genes específicos para su uso posterior en una variedad de aplicaciones (Wages, 2005, pp.243-250).

2.2.24. Primers

Los cebadores son cadenas cortas de ácidos nucleicos que son el punto de partida para la síntesis de ADN. En los organismos vivos, los cebadores son piezas cortas de ARN. Antes de que pueda tener lugar la replicación del ADN, una enzima llamada primasa, que es la ARN polimerasa, debe sintetizar los cebadores. La síntesis de cebadores es necesaria porque las enzimas sintetizadoras de ADN (llamadas ADN polimerasas) solo pueden unir nuevos nucleótidos de ADN a secuencias de nucleótidos existentes. Por lo tanto, los cebadores son la base para la síntesis de ADN. Por lo tanto, se eliminan antes de que se complete la replicación del ADN y la ADN polimerasa llena los huecos en la hebra de ADN (Wages, 2005, pp.243-250).

El cebador presenta generalmente de 18 a 24 pares de bases de longitud, que se pueden utilizar en muchos procedimientos experimentales. En una reacción de PCR para apuntar a un sitio determinado con el fin de amplificarlo para su posterior análisis. Es una forma de seleccionar secuencias de ADN muy específicas (Wages, 2005, pp.243-250).

2.2.25. Primers para la identificación molecular de *Toxocara canis*

Para la identificación de los huevos de *T.canis* se utilizan cebadores directo (*T.canis* ATP-F1: GTTTGTTGTTTTGGGGGCTA) e inverso (*T.canis* ATP-R1: CCAAAGGACGAGAAACCTCA) para amplificar una región de 217 pb del gen de la subunidad 6 de la ATP sintasa canis (Öge et al., 2019, p. 123).

2.2.26. Procedimiento PCR

2.2.26.1. Desnaturalización

La solución en el tubo se calienta a una temperatura mínima de 94 °C (201,2 °F) por medio de un circulador térmico. El calor rompe los enlaces de hidrógeno de la plantilla de ADN original y rompe el ADN en cadenas individuales (esto se denomina desnaturalización de ADN de doble cadena) (Khu et al., 2020, pp. 317-325).

2.2.26.2. Templado

La mezcla de muestra se enfría a 50-60 °C, lo que permite que los cebadores de ADN y la ADN polimerasa se unan a las hebras de ADN individuales para separarlas térmicamente (esto se denomina hibridación). En este punto, los nucleótidos (A, T, C, G) en la solución de mezcla añadida se combinarán con el ADN monocatenario formado durante el calentamiento (Khu et al., 2020, pp. 317-325).

2.2.26.3. Extensión

Cuando se combinan, forman una nueva hebra de ADN complementaria (llamada extensión de ADN). Por lo tanto, a partir de cada hebra simple de la molécula original en la muestra, se genera una molécula de ADN de doble hebra recién duplicada. La temperatura varía de 95 °C a 50-60 °C. Luego, el ciclo se repite 35-40 veces con un circulador térmico que repite automáticamente los ciclos de calentamiento y enfriamiento del proceso. La secuencia de ADN resultante se duplica cada vez que el circulador realiza un ciclo de calentamiento/enfriamiento. Entonces, lo que comienza como una pequeña porción de ADN de una muestra puede amplificarse para hacer millones de copias después de 35 ciclos de duplicación. Este ciclo se repite de 25 a 35 veces en una reacción de PCR típica, que suele durar de 2 a 4 horas, según la longitud de la región de ADN que se copia (Khu et al., 2020, pp. 317-325).

2.2.27. Tratamiento

2.2.27.1. Perros

En los perros, los compuestos aprobados para tratar las infecciones por ascarios incluyen fenbendazol, milbemicina, moxidectina, piperazina y pirantel. En Europa, la selamectina está aprobada para tratar la infección por *T. canis* con una sola dosis, mientras que, en Canadá, el

tratamiento aprobado requiere dos dosis con un mes de diferencia. Los programas de prevención del gusano del corazón con milbemicina, milbemicina/lufenuron, milbemicina/praziquantel, milbemicina/spinosad, moxidectina/imidacloprid, ivermectina/pirantel o ivermectina/pirantel/praziquantel también controlan la infestación intestinal. Además, la selamectina está aprobada para esta indicación en algunos países, pero no en los Estados Unidos (Schwartz, 2022).

Tabla 4-2: Tratamiento para *Toxocara canis* en perros

Combinación de fármaco/fármaco	Dosis (mg/kg)	Helmintos activos contra ^{una}
Aprobados solo en EEUU		
Fenbendazol	50, diario durante 3 días	<i>Toxocara canis</i> , <i>Toxascaris leonina</i> , <i>Ancylostoma caninum</i> , <i>Uncinaria stenocephala</i> , <i>Trichuris vulpis</i> , <i>Trichuris pisiformis</i>
epsiprantel	5.5	<i>D. caninum</i> , <i>T. pisiformis</i>
oxima de milbemicina	0.5	<i>T canis</i> , <i>T leonina</i> , <i>A caninum</i> , <i>T vulpis</i>
Milbemicina oxima + spinosad	0.5/30	<i>T canis</i> , <i>T leonina</i> , <i>A caninum</i> , <i>T vulpis</i>
moxidectina	0.17	<i>A caninum</i> , <i>U stenocephala</i>
Piperazina (varias sales)	48–66 ^{b, d}	<i>T. canis</i> , <i>T. leonina</i>
Praziquantel	5–12,5	<i>D caninum</i> , <i>T pisiformis</i> , <i>Echinococcus granulosus</i> ^c , <i>E multilocularis</i> ^c
Ivermectina + pamoato de pirantel	0.006/5	<i>T canis</i> , <i>T leonina</i> , <i>A caninum</i> , <i>A braziliense</i> , <i>U stenocephala</i>
Praziquantel + pamoato de pirantel	5/5	<i>T canis</i> , <i>T leonina</i> , <i>A caninum</i> , <i>A braziliense</i> , <i>Ustenocephala</i> , <i>D caninum</i> , <i>T pisiformis</i>
Praziquantel + pamoato de pirantel + febantel	5/5/25	<i>T canis</i> , <i>T leonina</i> , <i>A caninum</i> , <i>Ustenocephala</i> , <i>T vulpis</i> , <i>D caninum</i> , <i>T pisiformis</i> , <i>E granulosus</i> , <i>E multilocularis</i>
Praziquantel + pamoato de pirantel + ivermectina	5/5/0.006	<i>T canis</i> , <i>T leonina</i> , <i>A caninum</i> , <i>A braziliense</i> , <i>Ustenocephala</i> , <i>D caninum</i> , <i>T pisiformis</i>
Aprobados solo en Reino unido		
Fenbendazol	100; 50, diario durante 3 días	<i>T canis</i> , <i>T leonina</i> , <i>Ancylostoma</i> spp, <i>Uncinaria</i> spp, <i>Trichuris</i> spp, <i>Taenia</i> spp
Praziquantel	5	<i>D caninum</i> , <i>T pisiformis</i> , <i>Taenia multiceps</i> , <i>Thydatigena</i> , <i>Tovis</i> , <i>E granulosus</i> , <i>E multilocularis</i>
Febantel + embonato de pirantel	15/14.4	<i>T canis</i> , <i>T leonina</i> , <i>A caninum</i> , <i>Ustenocephala</i> , <i>T vulpis</i>
Milbemicina oxima +	0.5/5	<i>T canis</i> , <i>T leonina</i> , <i>A caninum</i> , <i>T vulpis</i> , <i>D</i>

praziquantel		<i>caninum</i> , <i>Taenia</i> spp, <i>Echinococcus</i> spp
Praziquantel + embonato de pirantel + febantel	5/14.4/15	<i>T canis</i> , <i>T leonina</i> , <i>A caninum</i> , <i>U stenocephala</i> , <i>T vulpis</i> ^c , <i>D caninum</i> ^c , <i>Taenia</i> spp (<i>Thydatigena</i> ^c , <i>T pisiformis</i> ^c), <i>Echinococcus</i> spp
Milbemicina oxima + lufenurón	0.5/10	<i>T canis</i> , <i>T leonina</i> ^d , <i>A caninum</i> , <i>T vulpis</i>
Moxidectina + imidacloprid	2.5/10	<i>T canis</i> , <i>T leonina</i> , <i>A caninum</i> , <i>Ustenocephala</i> , <i>T vulpis</i> , <i>Spirocerca lupi</i> ^e

Fuente: Peregrine, 2010 (Tratamiento para *Toxocara canis* en perros).

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

2.2.27.2. *Humanos*

El albendazol es el fármaco de elección en la toxocariosis, por lo que, los pacientes que recibieron albendazol durante 5 días (10 mg/kg p.v./día en dos dosis) mejoraron en comparación con los pacientes que habían recibido previamente el antiparasitario tiabendazol. La terapia recomendada es una dosis única de albendazol 400 mg dos veces al día durante 5 días. Debido a que otro fármaco de benzimidazol de uso común, el mebendazol, se absorbe poco en el tracto gastrointestinal, es una terapia de segunda línea, aunque se ha informado cierto éxito en pacientes que toman 1 g o más en un ciclo de 21 días. El tratamiento sintomático, incluidos los corticosteroides, ayuda a prevenir los síntomas alérgicos graves de la infección. La ALM se trata con cirugía (vitrectomía), quimioterapia antiparasitaria y/o corticosteroides (Schwartz, 2022).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Enfoque de la investigación

En la investigación se utilizó un enfoque mixto dado que se empleó tanto un enfoque cualitativo como cuantitativo, por ende, se va a realizar una recopilación de datos conjuntamente con un análisis estadístico para la interpretación de resultados.

3.1.1. *Enfoque cualitativo*

De acuerdo con la investigación, Otero, A., el enfoque cualitativo es un proceso de recolección de datos el cual no presenta una medición numérica y estudia la realidad de manera natural y en la forma que se presenta (Otero, 2018, pp. 23-39). Para la presente investigación se utilizó un enfoque cualitativo, dado que, se recolectará los datos de los canes del albergue acorde a su sexo, edad y raza, para su posterior interpretación, en la cual se establecerá la correlación entre las variables antes mencionadas con la parasitosis.

3.1.2. *Enfoque Cuantitativo*

Según Otero, A., el enfoque cuantitativo representa un proceso en el cual consta de mediciones numéricas en el cual se utiliza análisis estadísticos para dar respuesta a las preguntas planteadas a la investigación (Otero, 2018, pp. 23-39). Para la presente investigación se utilizó un enfoque cuantitativo, dado que se realizará un análisis estadístico para establecer la prevalencia de parasitosis según el sexo, edad, cantidad de parásitos, especie y raza de los canes del albergue, de igual manera se utilizará softwares estadísticos para realizar la interpretación de los resultados de la secuenciación de Sanger en los análisis moleculares.

3.2. Nivel de la Investigación

3.2.1. *Exploratorio*

Según Tomalá, O., la investigación exploratoria es palpar el problema por primera vez, el cual se emplea cuando no hay datos o cuando no ha sido lo suficientemente estudio y no existe una adecuada determinación. En esta investigación se realizó una investigación exploratoria dado que por primera vez en el cantón Riobamba se realiza un análisis parasitológico en los perros de un

albergue y un estudio molecular del parásito *Toxocara canis*.

3.2.2. *Descriptivo*

Según Tomalá, O., la investigación descriptiva es detallar en todas sus características principales la realidad de la situación. Esta investigación describe cada uno de los factores que se encuentran vinculados a la parasitosis en el albergue, acorde a su situación actual de salud en las que se encuentran los canes mediante el análisis coproparasitarios y moleculares.

3.2.3. *Explicativo*

Según Tomalá, O., la investigación explicativa va a presentar una relación causal, dado que intenta encontrar las causas del problema, el cual busca entender los fenómenos mediante la aplicación de diseños experimentales y no experimentales. Esta investigación explica las causas de la parasitosis en los canes del albergue mediante los resultados obtenidos en los exámenes coproparasitarios, análisis de prevalencia y estudios moleculares conjuntamente con los factores socio sanitarios del lugar.

3.3. Diseño de la investigación

3.3.1. *No experimental*

La presente investigación posee un enfoque no experimental, dado que no se va a realizar la manipulación de variables, si no se va a realizar la investigación tal y como se presenta en el contexto natural para después analizarlo, es decir que se van a recolectar los datos del albergue necesarios para realizar los análisis y presentar los resultados obtenidos sin alterar el curso normal de las variables.

3.3.2. *Transversal*

La presente investigación fue de tipo transversal debido a que los datos de los canes del albergue al igual que las muestras de heces fecales se recolectan en ese momento, por ende no se involucra un seguimiento a través del tiempo en la cual no se va a realizar inferencias respecto a los cambios determinantes y sus consecuencias.

3.4. Tipo de estudio

El tipo de estudio de la investigación fue de campo debido a que se realizó en un lugar específico, en este caso directamente en el albergue en el entorno natural de los canes, en el cual se recolectó datos y heces caninas para su respectivo análisis.

3.5. Lugar de investigación

La investigación se realizó en el el albergue CRIAR ubicado en las calles Av. 9 de octubre y Av. Juan Felix Proaño en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo.

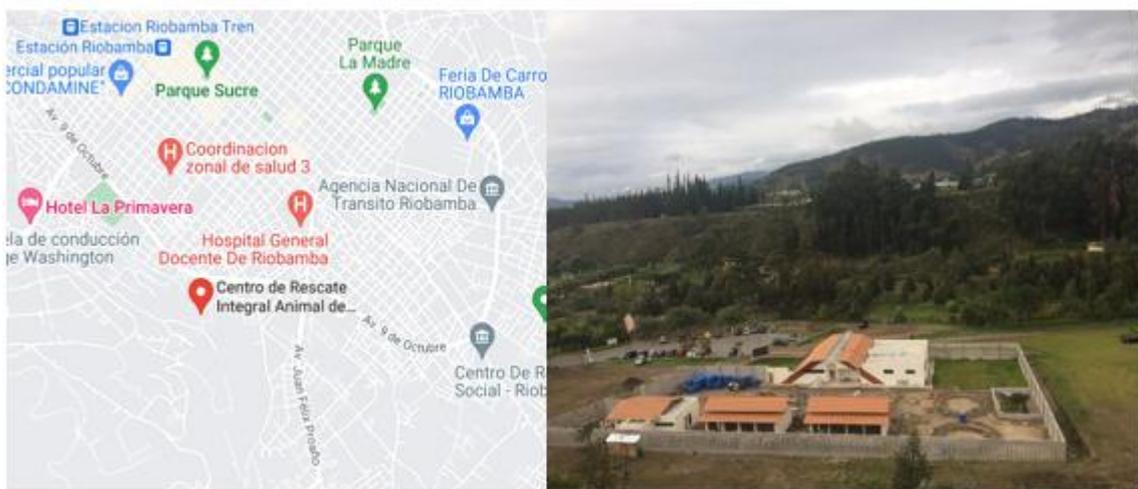


Ilustración 1-3. Mapa de las ubicaciones del albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba.

Realizado por: Google maps, 2022

3.6. Población de estudio

La población estuvo conformada por 150 canes del albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba durante el período abril- agosto 2022.

3.7. Métodos, técnicas e instrumentos de investigación.

Para la realización de la parte práctica para la detección de los parásitos se empleó el método flotación de Wills y el examen directo, mientras que para su identificación molecular se realizó la secuenciación de Sanger y barcode a continuación se detallaran los materiales, equipos, reactivo y técnicas usadas para cada análisis.

3.7.1. Examen Coproparasitarios

Tabla 1-3: Materiales, Equipos y reactivos empleados en el examen coproparasitarios

Materiales	Equipos	Reactivos
Cajas recolectoras	Microscopio	Cloruro de Sodio 0.9%
Laminillas porta y cubre objetos		Lugol

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

3.7.2. Método de Flotación de Willis

Tabla 2-3: Materiales, Equipos y reactivos empleados en el Método de Flotación de Willis

Materiales	Equipos	Reactivos
Tubos de ensayo	Microscopio	Solución Saturada de Sal
Vasos de precipitación de 500ml		
Varilla de agitación		
Cedazo		
Papel filtro		
Gradilla para tubos de ensayo		
Láminas porta objetos		
Laminillas cubre objetos		

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

3.7.3. Caracterización molecular

Tabla 3-3: Materiales, Equipos y reactivos empleados en la caracterización molecular.

Materiales	Equipos	Reactivos
Kit QIAamp DNA Stool Mini Kit	Vórtex	Buffer ASL
Eppendorf	Centrifugadora	Proteinasa K
Pipetas automáticas	Incubadora	Etanol
Puntas azules	Secuenciador	Buffer AW1
Puntas amarillas	Termociclador	Buffer AW2
Puntas lilas		Buffer de resuspensión
Tubos		Polimerasa Dream Taq Green PCR Master Mix

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

3.8. Socialización del tema de trabajo en el albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba

Para llevar a cabo el trabajo de titulación se requirió de la autorización al Dr. Carlos Jara director

de la Dirección de Gestión Ambiental, Salubridad e Higiene del GADM Riobamba, obteniendo la respectiva aceptación, se procedió a dialogar con el Dr. Guillermo Dávalos administrador del albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba, para que como ente dirigente intervenga y se otorgue el tiempo necesario para llevar a cabo dicho estudio.

3.9. Recolección de muestras

La recolección de muestras se realizó durante los meses de abril a junio en horarios de 07:00 a 10:00 en las instalaciones del albergue, posteriormente se colocaron en recipientes y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento, que se realizó dentro de las 24 horas. Para el análisis microscópico de *Toxocara canis* se realizó en el Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH con el apoyo profesional de la Dra. Sandra Escobar y para la caracterización molecular en laboratorio IDgen de la ciudad de Quito.

3.10. Metodología

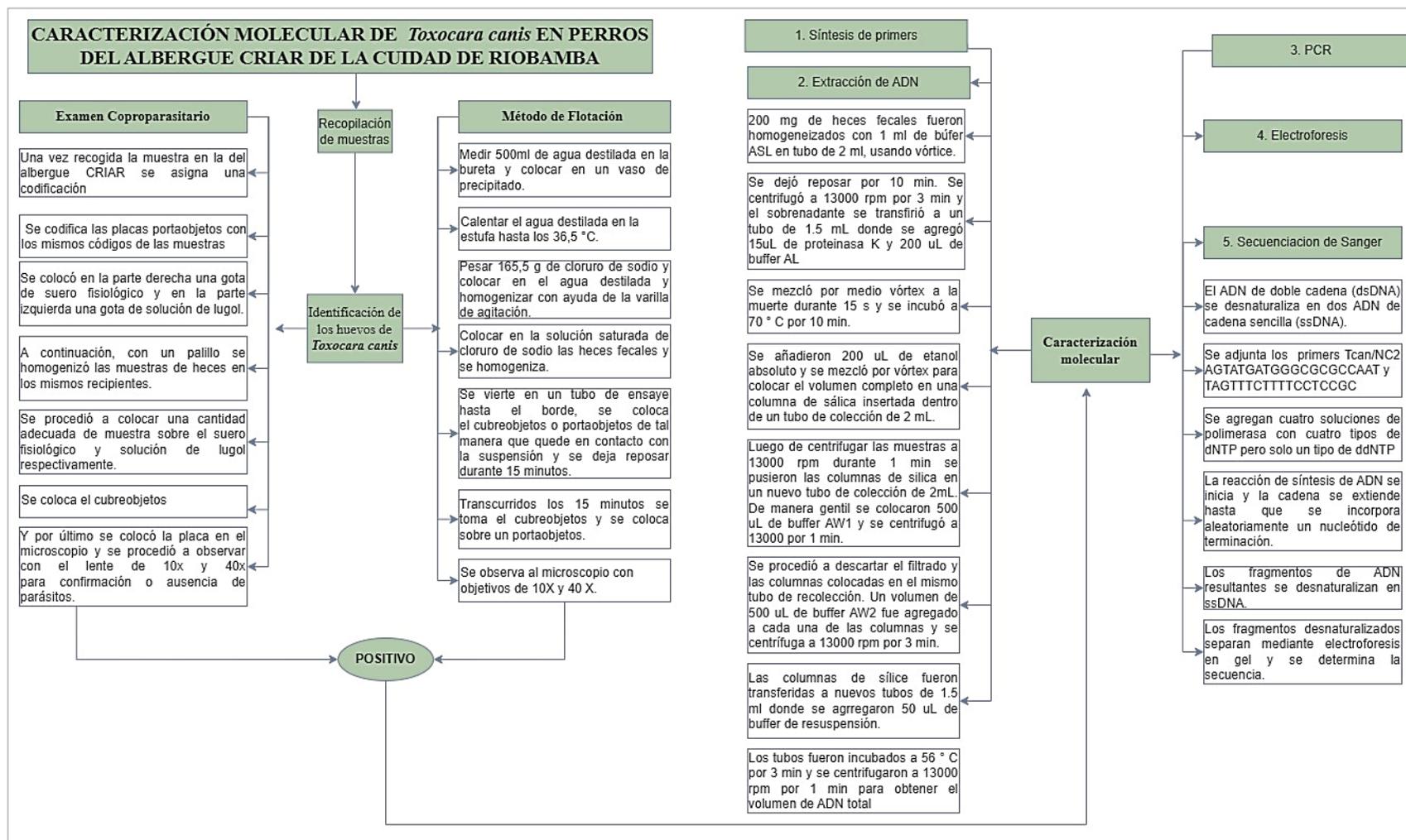


Ilustración 2-3. Diagrama metodológico del análisis de muestras de *Toxocara canis*.

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

3.11. Análisis de muestras

3.11.1. Examen coproparasitario

Procedimiento:

1. Una vez recogida la muestra en la del albergue CRIAR se asigna una codificación
2. El transporte de las heces fecales es mediante un (cooler), para procesar las muestras en el laboratorio de parasitología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Carrera Bioquímica y Farmacia.
3. Se codifica las placas porta objetos con los mismos códigos de las muestras.
4. Se colocó en la parte derecha una gota de suero fisiológico y en la parte izquierda una gota de solución de lugol.
5. A continuación, con un palillo se homogenizó las muestras de heces en los mismos recipientes.
6. Se procedió a colocar una cantidad adecuada de muestra sobre el suero fisiológico y solución de lugol respectivamente.
7. Se coloca el cubreobjetos
8. Y por último se colocó la placa en el microscopio y se procedió a observar con el lente de 10x y 40x para confirmación o ausencia de parásitos.

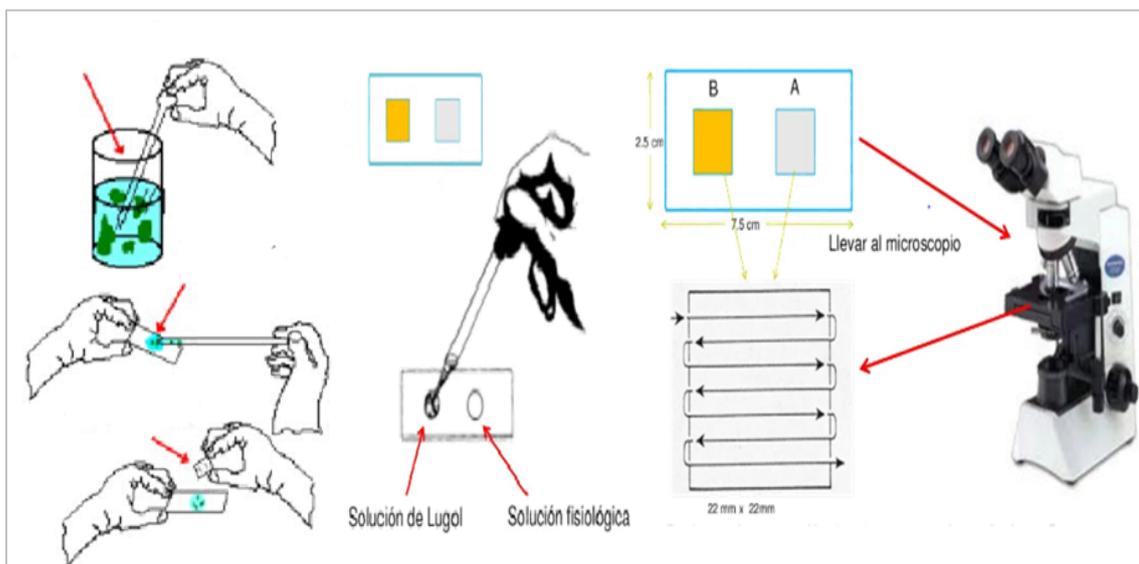


Ilustración 3-3. Procedimiento de análisis coproparasitario directo

Fuente: Rodríguez, 2020, p. 7.

3.11.2. Método de flotación de Willis

Procedimiento:

1. Medir 500ml de agua destilada en la bureta y colocar en un vaso de precipitado.
2. Calentar el agua destilada en la estufa hasta los 36,5 °C.
3. Pesar 165,5 g de cloruro de sodio y colocar en el agua destilada y homogeneizar con ayuda de la varilla de agitación.
4. Colocar en la solución saturada de cloruro de sodio las heces fecales y se homogeniza.
5. Se vierte en un tubo de ensaye hasta el borde, se coloca el cubreobjetos o portaobjetos de tal manera que quede en contacto con la suspensión y se deja reposar durante 15 minutos.
6. Transcurridos los 15 minutos se toma el cubreobjetos y se coloca sobre un portaobjetos.
7. Se observa al microscopio con objetivos de 10X y 40 X.

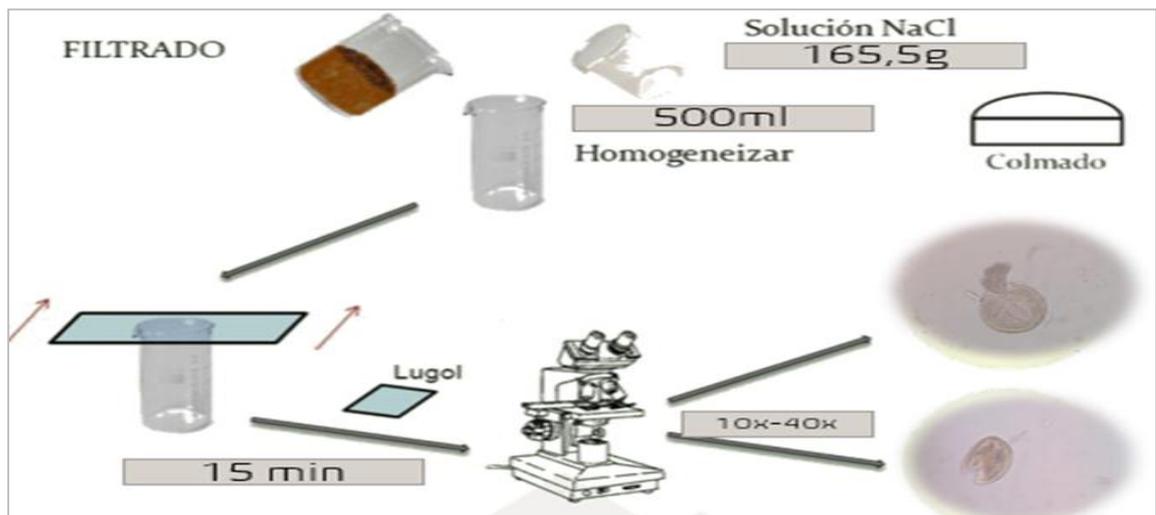


Ilustración 4-3. Procedimiento para la observación de parásitos por el método de flotación de Willis.

Fuente: Universidad Continental, 2018, pp. 24-25.

3.11.3. Identificación molecular

3.11.3.1. Síntesis de primers

Un primer específico para los parásitos canino *Toxocara canis*, *T* (Tabla 2), con target en la región ITS fueron sintetizados químicamente y su calidad evaluada por espectrometría de masas MALDI-TOF (MacroGen, Korea) como se evidencia en la Tabla 5-3.

Tabla 4-3: Primers sintetizados para diagnosticar los parásitos *Toxocara canis*, por PCR punto final y secuenciación Sanger.

Primer	Secuencia (5'-3')
Tcan1	AGTATGATGGGCGCGCCAAT
NC2	TAGTTTCCTTTCCCTCCGCT

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

3.11.3.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN total se realizó utilizando el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El mencionado kit es diseñado para obtener ADN genómico, bacteriano, viral, y de parásitos a partir de heces fecales frescas, congeladas, conteniendo posibles inhibidores de PCR, así como resuspensiones de huevos de parásitos.

Procedimiento:

1. Doscientos miligramos de heces fecales fueron homogenizados con 1mL de buffer ASL en un tubo de 2mL, usando vortex.
2. Se dejó reposar por 10 min. Se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5 mL donde se agregó 15uL de proteinasa K y 200 uL de buffer AL.
3. Se mezcló por medio vórtex a la muestra por un período de 15 s e inmediatamente se incubó a 70°C por 10 min.
4. A continuación se añadieron 200 uL de etanol absoluto y se mezcló por vórtex para colocar el volumen completo en una columna de silica insertada dentro de un tubo de colección de 2 mL.
5. Luego de centrifugar las muestras a 13000 rpm durante 1 min se pusieron las columnas de silica en un nuevo tubo de colección de 2mL. De manera gentil se colocaron 500 uL de buffer AW1 y se centrifugó a 13000 por 1 min.
6. Se procedió a descartar el filtrado y las columnas colocadas en el mismo tubo de recolección. Un volumen de 500 uL de buffer AW2 fue agregado a cada una de las columnas y se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min.
7. Las columnas de silica fueron transferidas a nuevos tubos de 1.5 mL donde se agregaron 50 uL de buffer de resuspensión.
8. Los tubos fueron incubados a 56°C por 3 min y finalmente se centrifugaron a 13000 rpm por 1 min para obtener el volumen de ADN total

3.11.3.3. PCR

La polimerasa DreamTaq Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, USA) fue la enzima utilizada para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los componentes de reacción y las condiciones de PCR punto final para las muestras con su respectivo set de primers son resumidas en la Tabla 5-3 y Tabla 6-3, respectivamente.

Tabla 5-3: Componentes de reacción de PCR convencional para cada muestra ensayada.

COMPONENTE DreamTaq	VOLUMEN
PCR Master Mix (2X) Primer	12,5 uL
forward (10 µM)	1,25uL
Primer reverse (10 µM)	1,25 uL
ADN template	100-150 ng
Agua libre de nucleasas	A 25 uL

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

Tabla 6-3: Condiciones de PCR convencional para barcode ITS.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	0,75 min	40
Alineamiento	93	0,75 min	
Extensión	72	0,50 min	
Extensión final	72	7 min	1

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

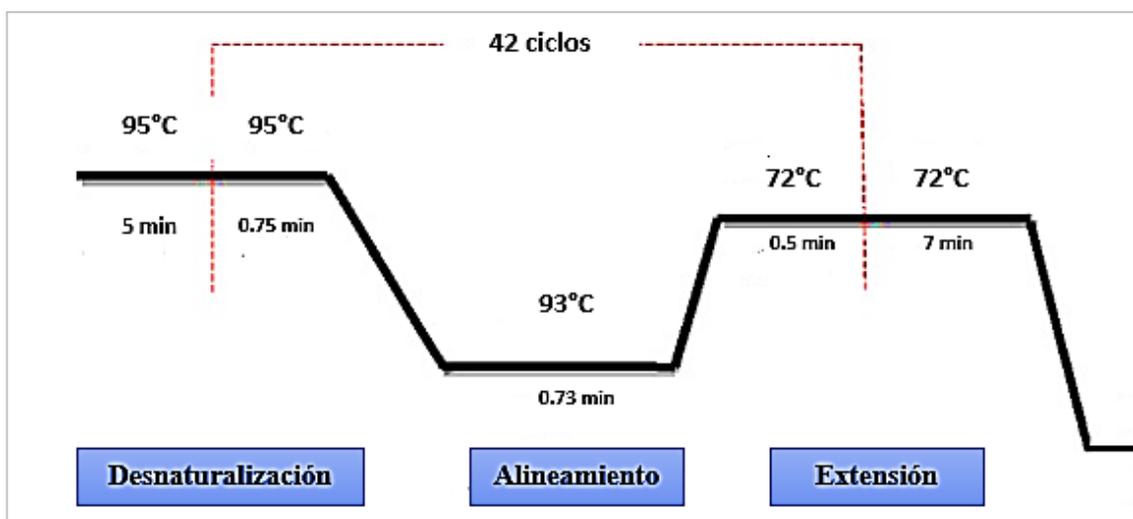


Ilustración 5-3. Condiciones de PCR convencional para barcode ITS.

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

3.11.4. Electroforesis

La electroforesis permite la separación del ADN del parásito, de esta manera se permite el aislamiento de la zona de estudio mediante la fragmentación en el gel gracias a la coloración del bromuro de etidio que hace que el ADN sea fluorescente mediante al ser sometida a la luz ultravioleta, por medio de la corriente eléctrica que se emplea sobre el gel de agarosa la carga negativa migró hacia el polo positivo; cabe mencionar que el gel se encuentra disuelto en un buffer el mismo que se encuentra a una temperatura estable mediante el uso de un microondas para obtener una solución homogénea y transparente.

La disolución es colocada en un molde y con un peine se forma los pozos donde se depositan las muestras analizar; posteriormente se enfría la mezcla para polimerizar y de esta manera se obtiene la matriz porosa. La migración del colorante contenido en el buffer de carga en un gel con 0.5–1.4% de agarosa van a partir del mismo punto que el ADN, lo que indica la posición de corrimiento del ADN; por ende se observa la banda de elevado peso molecular para la identificación de *Toxocara canis*.

3.11.4.1. Secuenciación de Sanger

1. El ADN de doble cadena (dsDNA) se desnaturaliza en dos ADN de cadena sencilla (ssDNA).
2. Se adjunta los primers Tcan/NC2 AGTATGATGGGCGCGCCAAT y TAGTTTCTTTTCCTCCGC
3. Se agregan cuatro soluciones de polimerasa con cuatro tipos de dNTP pero solo un tipo de ddNTP.
4. La reacción de síntesis de ADN se inicia y la cadena se extiende hasta que se incorpora aleatoriamente un nucleótido de terminación.
5. Los fragmentos de ADN resultantes se desnaturalizan en ssDNA.
6. Los fragmentos desnaturalizados se separan mediante electroforesis en gel y se determina la secuencia.

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Mediante el análisis a 150 muestras de heces fecales de los perros del albergue CRIAR, en las cuales se efectuó el examen coproparasitario directo y método de flotación en los laboratorios de la ESPOCH, de la Facultad de Ciencias, para identificar la morfología del parásito y establecer la prevalencia de parasitosis gastrointestinal, mientras tanto que la caracterización molecular se llevó a cabo en la ciudad de Quito en los laboratorios de IDgen en el cual se realizó la tipificación genética del parásito mediante el empleo de la técnica de PCR.

4.1. Identificación de *Toxocara canis* mediante los exámenes coproparasitarios

4.1.1. Examen directo

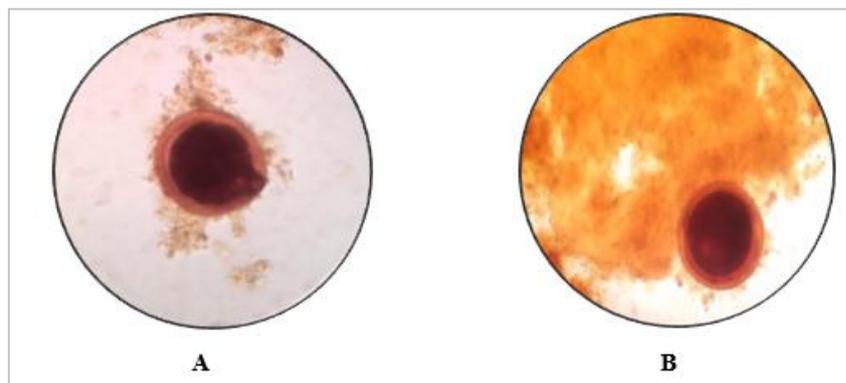


Ilustración 1-4. Identificación de huevos de *Toxocara canis* mediante el examen microscópico directo con el objetivo de 40x: **A:** Solución salina 0.9% **B:** Lugol.

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

Como se evidencia en la Ilustración 1-4, se realizó la identificación de huevos de *Toxocara canis* en solución salina al 0.9% y lugol con el objetivo de 40x, mediante el cual se observa una morfología ovalada, con una cobertura gruesa la cual presenta pequeñas depresiones, y en su interior se encuentra la célula de huevo que ocupa el 90% de la estructura total, en la solución salina se observa de un color marrón mientras que en la solución de lugol es de color caoba, todo lo antes mencionado concuerda con los estudios realizados por Delgado, O et al., el cual indica que el tamaño de huevo va a variar según el estado morfológico en el que se encuentre el cual va estar entre 85 x 75 μm (Delgado et al, 2009, pp.1-33).

4.1.2. Método de Willis

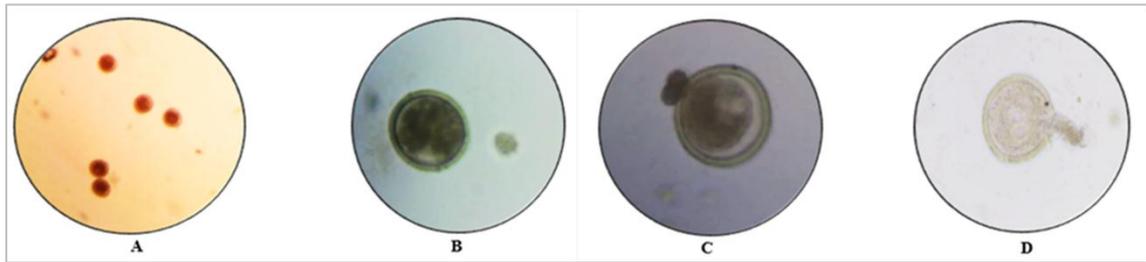


Ilustración 2-4. Identificación de huevos de *Toxocara canis* por el método de Willis: A: Objetivo 10 x B: Objetivo 40x C-D: Eclosión 40x

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

En la Ilustración 2-4, mediante el método de Willis se puede diferenciar con mayor claridad la morfología, debido a que los parásitos de mayor densidad flotan hacia la superficie y los de menor peso sumergen en la parte inferior, esta propiedad se registra gracias a la solución saturada de cloruro de sodio, al observar con el objetivo de 10x no se distingue con precisión la morfología del huevo, mientras que con el objetivo de 40x se estudia con mayor precisión cada uno de los rasgos propios, además se logró observar una eclosión en el cual se evidencia la salida del estado larvario, ocasionando de esta manera una ruptura de la estructura externa del huevo. Estos datos se asemejan a los obtenidos por Cárdenas, J et al., en el cual aporta mencionando que la técnica de Willis de concentración estándar aumenta las posibilidades de detectar estructuras parasitarias, incluidos parásitos helmintos como *Toxocara sp* (Cárdenas et al, 2021, pp.4-15).

4.2. Prevalencia de parasitosis gastrointestinal en los perros del albergue CRIAR según sexo, edad, cantidad de parásitos, especie y raza

Tabla 1-4. Resultado de parasitosis según el sexo en perros del albergue CRIAR

SEXO	FRECUENCIAS	POSITIVOS	PORCENTAJE %
Hembra	80	75	52.82
Macho	70	67	47.18
TOTAL	150	142	100.00

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

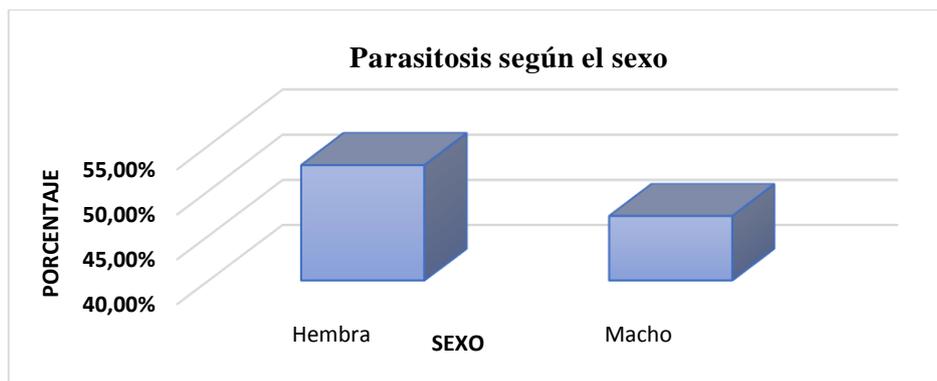


Ilustración 1-4. Presencia de parasitosis según el sexo.

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

Como se evidencia en la Tabla 5-4, al comparar la presencia de parásitos en muestras fecales de los caninos frente al sexo de estos, se presenta una positividad en los machos de 47.18% y de las hembras 52.82%, lo que indica que existe una mayor cantidad de hembras en el albergue lo que representan una tendencia a ser más propensas a portar parásitos y transmitirlos a sus cachorros por vía intrauterina. En la investigación realizada por Zurita, D. hace referencia que en un grupo heterogéneo de canes presentan una prevalencia de parasitosis del 66,7% en hembras y un 33,3% en machos (Zurita, D. 2010, pp.56-69).

Las causas más probables de dicho porcentaje son debido a que las hembras, por lo general casi siempre son rechazadas por sus propietarios por su capacidad de reproducirse y parir grandes camadas especialmente las de raza mestiza las mismas que son recogidas por los albergues en condiciones deplorables de salud, por consiguiente se deduce que ambos estudios concuerdan con los resultados.

Tabla 2-4. Resultado de parasitosis de según la edad en perros del albergue CRIAR

EDAD	FRECUENCIA	POSITIVOS	PORCENTAJE %
Cachorro	81	74	52.11
Adulto	69	68	47.89
TOTAL	150	142	100.00

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

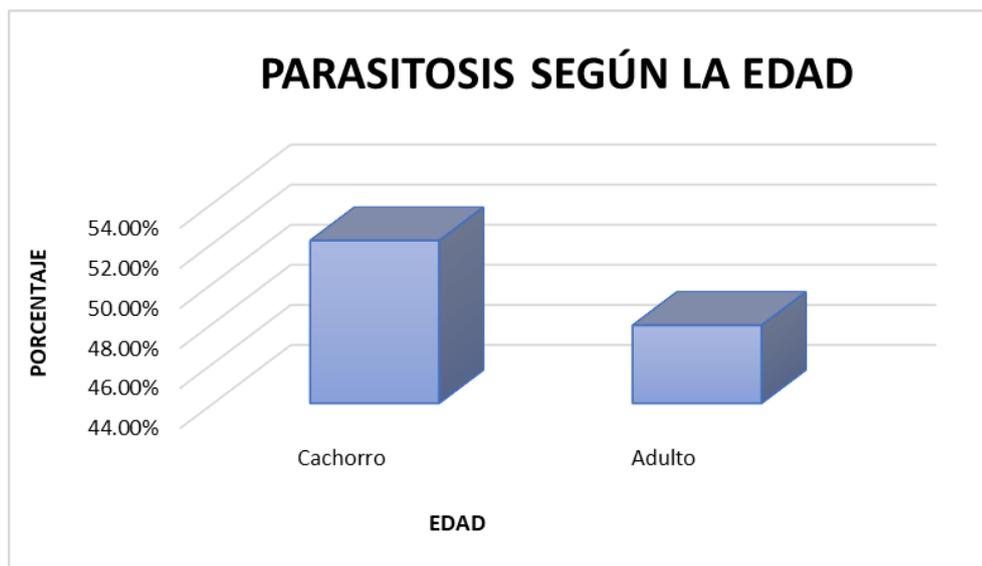


Ilustración 2-4. Presencia de parásitos según edad.

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

Como se muestra en la tabla 6-4, los portadores de una mayor cantidad de parásitos gastrointestinales son los cachorros, los mismos que presentan una prevalencia del 52,11%, mientras que los adultos poseen un 47,89%, al comparar estas dos cifras no existe una gran diferencia parasitarias entre las dos edades debido a que se desarrolla una parasitosis gestacional y en los machos se produce un contagio directo por contacto de alimento o zonas contaminadas.

Según Basantes, J. en su investigación presenta una prevalencia en cachorros del 84,22% y adultos con el 7,22%, al igual concuerda con nuestro estudio ya que los cachorros son más susceptibles a ser infectados por su madre ya que presenta un sistema inmunitario poco desarrollado, por tal razón se encuentra con mayor frecuencia una parasitosis provocada por *Toxocara canis* que es el más común entre las crías, otra causa más habitual también son los antiparasitarios utilizados dado que para disminuir costes en la compra de fármacos se adquiere un mismo medicamento para toda la jauría siendo así que no todos los casos son semejantes, empeorando de esta manera la salud de los canes (Basantes, J. 2021, pp. 56-64).

Tabla 3-4. Resultado de parasitosis de según la cantidad de parásitos en perros del albergue CRIAR

CANTIDAD DE PARASITOS	FRECUENCIA	PORCENTAJE%
Monoparasitado	102	71.83
Poliparasitado	40	28.17
TOTAL	142	100.00

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

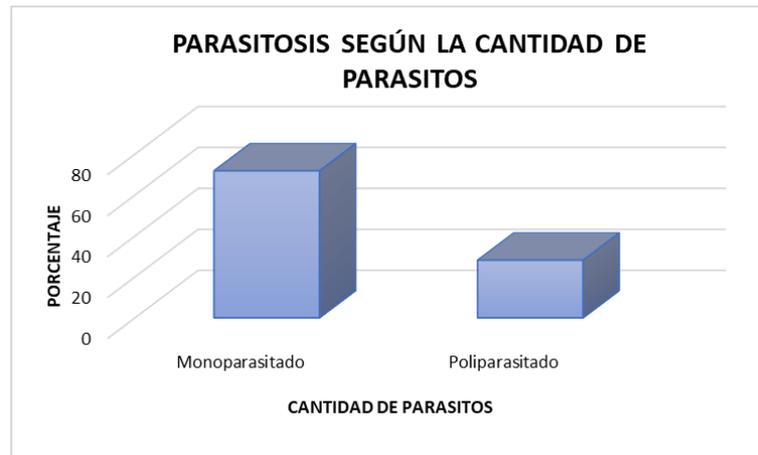


Ilustración 3-4. Presencia de parásitos según la cantidad de parásitos.

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

Como se evidencia en la tabla 7-4, los canes que presentan un solo tipo de parásito presentan una prevalencia del 71.83 y los poli parasitados 28.7%, los canes monoparasitados en su mayoría son cachorros debido a que son separados por distintas camadas, mientras que los adultos se encuentran mezclados entre sí lo que facilita su infección por las heces de otros ejemplares o por alimentos ya contaminados, estos resultados son similares a los realizados por Scaramozzino, P., en su artículo endoparásitos en perros domésticos y de refugio de Italia central en el cual menciona que un mayor porcentaje de canes presentan solo un tipo de parásito dado que los albergues presentan una condición sanitario muy favorable para los canes ya que son desparasitados cada tres meses, sin embargo por raras ocasiones presenta parasitosis la cual es solucionada con rapidez para evitar las propagaciones y desencadenar una zoonosis.

Tabla 4-4. Resultado de parasitosis según la especie de parásito en perros del albergue CRIAR

Parasito	FRECUENCIA	PREVALENCIA %
<i>Toxocara canis</i>	64	35.75
<i>Giardia canis</i>	58	32.40
<i>Chilomastix sp.</i>	14	7.82
<i>Ancylostoma caninum</i>	12	6.70
<i>Cystoisospora canis</i>	10	5.59
<i>Entamoeba coli</i>	13	7.26
<i>Iodamoeba sp.</i>	8	4.47
	179	100.00

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

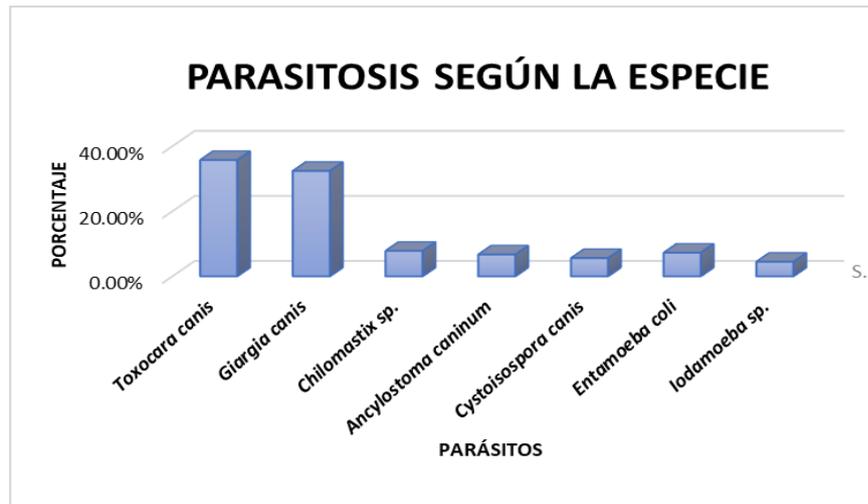


Ilustración 4-4. Presencia de parásitos según la especie

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

En la tabla 8-4, se detalla los parásitos hallados en el estudio en el cual observó la presencia de siete parásitos gastrointestinales los cuales son: *Toxocara canis* (37.75%), *Giargia canis* (32.40%), *Chilomastix sp* (7.82), *Ancylostoma caninum* (6.70%), *Cystoisospora canis* (5.59%), *Entamoeba coli* (7.26%) y *Iodamoeba sp.* (4.47%). Comparando con el estudio Tinoco, G. la cual determino la prevalencia de parásitos gastrointestinales zoonóticos en caninos del albergue mediante coprología en la ciudad de Cuenca, del cual se obtuvo que los nematodos del género *Ancylostoma caninum* (18,13%), *Toxocara canis* (16.25%) y protozoarios *Cytoisospora sp.* (4,49%) (Tinoco, G. 2022, pp.66-71). Como se evidencia existe mayor prevalencia de anquilostomiasis a diferencia de este estudio donde existe mayor prevalencia de toxocarisis, esto se debe a las distintas condiciones de vida que están sometidos los canes en cada uno de los refugios, al igual que las condiciones ambientales de cada ciudad son distintas por lo que puede influir directamente en el desarrollo de las especies parasitarias antes mencionadas, por lo tanto, por ende, la ciudad de Riobamba existe una mayor prevalencia de parasitosis por ello la relación de factores de riesgo zoonótico para la salud humana es elevada.

En otro estudio realizado de la prevalencia de parásitos en muestras fecales de perros y gatos de albergues en las provincias canadienses por Villeneuve, A. se menciona que el *Toxocara canis* fue el parásito con mayor prevalencia con un 14,6 %, seguido de *Cystoisospora spp.* 10,4%, los huevos de estas especies pueden persistir en el medio ambiente durante muchos años y servir como una importante fuente de infección constante entre los canes (Villeneuve A. et al, 2015). Al comparar con nuestro estudio los resultados se asemejan, ya que, presentan un elevado índice de toxocarisis dentro de los albergues, dado que, los perros recogidos provienen de las calles y son encontrados en condiciones deplorables de salud, por lo tanto, son portadores innatos de parásitos

gastrointestinales y al encontrarse en condiciones de hacinamiento la propagación de estos parásitos se da con gran facilidad.

Tabla 5-4. Resultados de parasitosis de según la raza de los perros del albergue CRIAR

RAZA	FRECUENCIA	PORCENTAJE %
MESTIZO	142	94.67
HUSKY	3	2.00
PASTOR ALEMAN	2	1.33
PITBULL	2	1.33
FRENCH	1	0.67
TOTAL	150	100.00

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

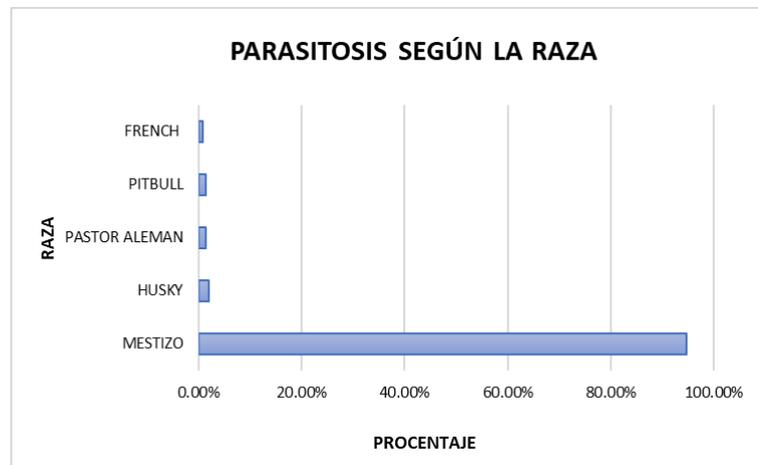


Ilustración 5-4: Presencia de parásitos según la raza

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

Según la tabla 9-4, se evidencia que la prevalencia de parasitosis según el tipo de raza es de 94.67% para canes mestizos, Husky 2%, Pastor alemán y el Pitbull 1.33% y finalmente French 0.67%, el porcentaje de la raza mestiza es muy elevada, lo que puede deberse a que las personas prefieren adoptar canes de razas puras y a que la mayor cantidad de perros abandonados son de razas mestizas por sus características físicas y reproductivas son menos deseados para ser parte de un hogar. Todo lo antes descrito es similar a lo mencionado por Salas, M en su investigación el cual obtuvo una prevalencia de raza mestizas de 94.67% y otras razas solo 5.33% el cual menciona que se debe a factores socioeconómicos de los albergues por dar protección a las razas más necesitadas de protección animal.

Tabla 6-4. Resultados de casos positivos y negativos de parasitosis de los perros del albergue CRIAR

CASOS	FRECUENCIA	PORCENTAJE%
Positivos	142	94.67
Negativos	8	5.33
Total	150	100

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

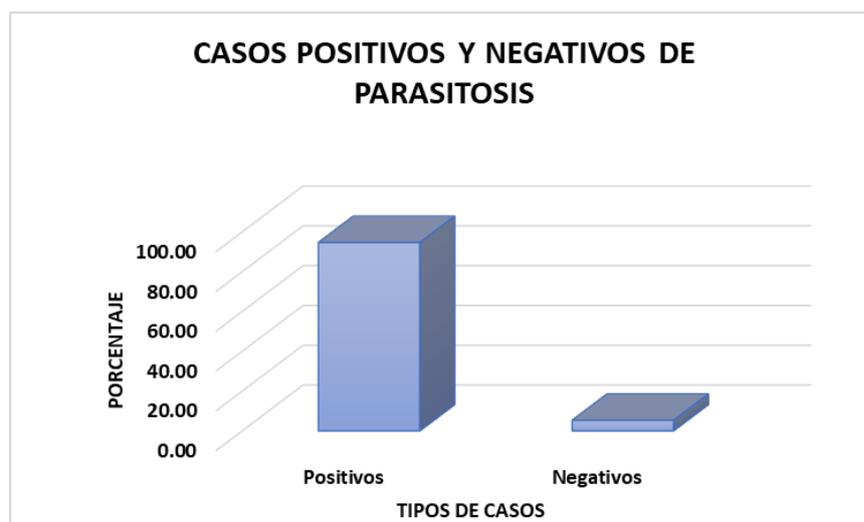


Ilustración 6-4: Casos positivos y negativos de parasitosis

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

Como se muestra en la tabla 10-4, de las 150 muestras de heces procesadas en el laboratorio, procedentes del albergue CRIAR, se encontró una prevalencia 94.67%, siendo 142 muestras positivas para parásitos gastrointestinales zoonóticos, en cambio el 5.33% (8 muestras) resultó negativo. Al presentar una prevalencia de parasitosis del 94.67%, se considera un riesgo para la salud humana. No obstante, las causas principales para que se desarrolle dicha parasitosis es directamente la sobrepoblación de canes en un espacio reducido, el cual es un factor fundamental para que se produzca un contagio directo, relacionado además con el aspecto sanitario y el control de la desparasitación, estos datos se asemejan a los resultados obtenidos por Iza, M. en su estudio de evaluación de la frecuencia de enteroparásitos de caninos en tres refugios del distrito metropolitano de Quito, que en base a 125 muestras analizadas el 56.8% de los perros tienen algún tipo de parásito, lo que nos indica que los canes de los albergues presentan un elevado índice de parasitismo vinculado igualmente a las condiciones de hacinamiento y condiciones de vida que presentan en dicho lugar durante su estadía (Iza, M. 2015, p.37).

4.3. Caracterización molecular de *Toxocara canis*

Para llevar a cabo el análisis molecular de *Toxocara canis* se analizaron las 64 muestras positivas las cuales fueron colocadas en un recipiente etiquetadas como muestra N°1 y por medio del método de Willis de flotación se obtuvo la muestras N°2 de los huevos en resuspension, en las cuales se realizó la identificación molecular por barcoding y secuenciación Sanger en donde se utilizó los primers Tcan/NC2 AGTATGATGGGCGCGCCAAT y TAGTTTCTTTTCCTCCGCT correponsientemente, las secuencias obtenidas se analizaron mediante bibliografía y constatados en la Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), por medio del GenBank exactamente del BLAST, se encontraron las secuencias publicadas similares al parasito en investigación, los cuales se detallan en la Tabla 14-4.

Tabla 7-4. Resultados de la identificación molecular por barcoding y secuenciación Sanger de *Toxocara canis*.

Muestra	Código BioSin	Hospedero	Fuente	Determinación	Barcode	Resultado	Identidad (%)	Calidad	N° Acc GenBank
1	TPH	Canis lupus familiaris	Heces	<i>Toxocara canis</i>	ITS2	Detectado	100	70.3	MK728992 .1
4	TPE	Canis lupus familiaris	Resuspensión huevos	<i>Toxocara canis</i>	ITS2	Detectado	99.84	82.5	MK728992 .1

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

4.3.1. Electroforesis y PCR

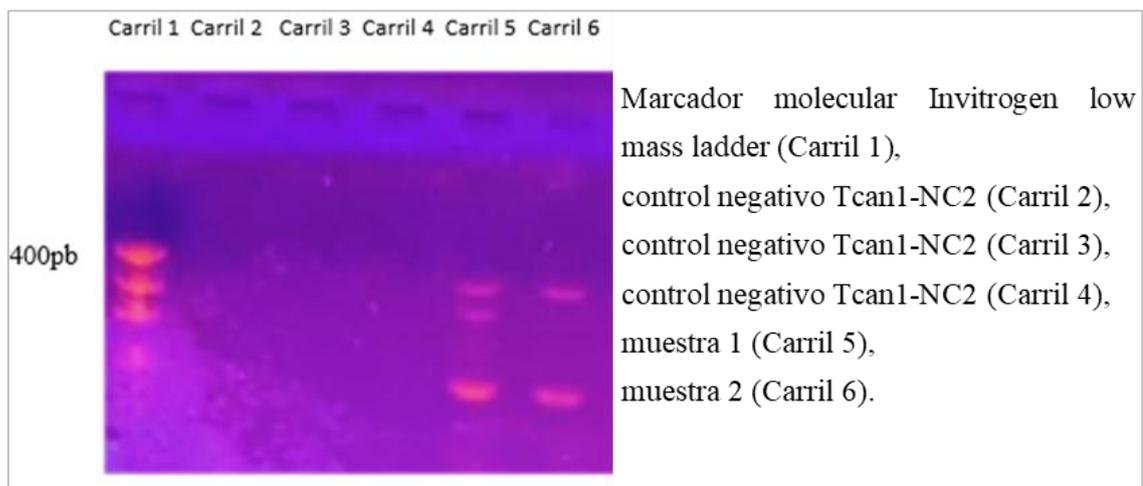


Ilustración 7-4: Productos de PCR punto final analizando presencia de parásitos *T. canis* a partir de muestras de heces y resuspensión de huevos.

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

Mediante la electroforesis y el PCR punto final a 400 pb para la detección de los genes Tcan1 y Nc2, se evidencia que en gel de agarosa se determinó la presencia o ausencia de amplicon determinando así existencia o la carencia del parásito analizado en cada una de las muestras, en el cual se comprobó la presencia de *Toxocara canis* tanto en la muestra de heces fecales con un 100% de identidad y un 70.3% de calidad como en la de resuspensión de huevos con un 99.84 de identidad y una calidad de 82.5%. Del mismo modo en el estudio realizado por Suganya, G et al, a treinta canes de que se encontraban en la Clínica de Pequeños Animales a los cuales se les tomo las muestras de heces fecales que fueron analizadas por PCR a 380 pb para la detección de los genes Tox Can1 y Nc2, resulto que solo las 25 muestras fueron positivas con un 83,33% de positividad (Suganya et el, 2018, pp.96-102). En otra investigación realizada por Chacón, E et al. En el cual se realiza un el estudio a 106 canes del cantón Salcedo, en Ecuador en el cual se realizó un diagnóstico PCR en el cual fueron secuenciados un total de 383 pb de la región del gen ITS-2 del ADN ribosómico (ADNr), en el cual se obtuvo que 16 muestras resultaron ser positivas a la presencia de huevos de *Toxocara canis* (Chacón et al., 2022, pp. 66-74). En base a lo antes mencionado, se hace énfasis en la importancia del análisis de los parásitos a nivel molecular dado que por medio del uso de cebadores específicos es mucho más rápido y eficaz realizar un diagnostico de Toxocaraparásitos, siendo así el más útil para comprender mejor la distribución de las especies del parásito en los estudios epidemiológicos.

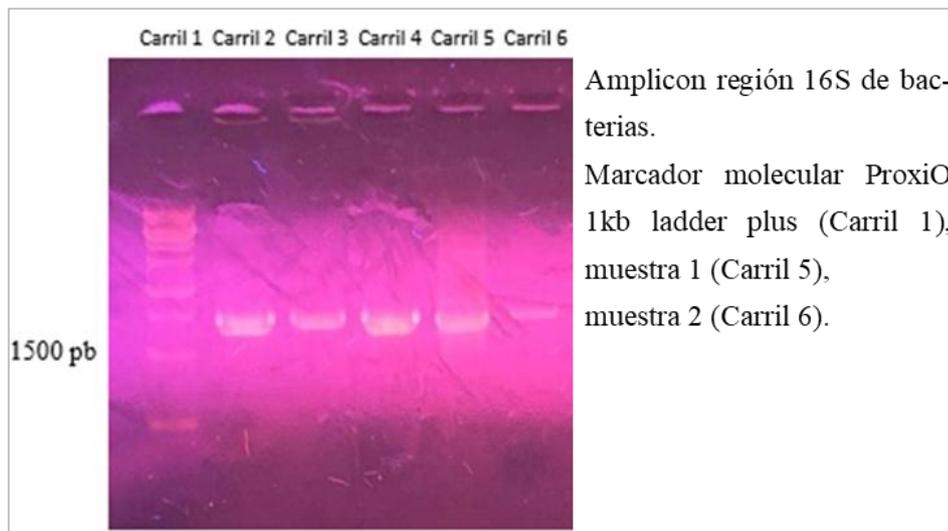


Ilustración 8-4: Productos de PCR punto final analizando control interno de extracción de ADN para evaluar su calidad.

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

Es importante resaltar que en las dos muestras analizadas se realizó un control de PCR amplificando la región 16S de bacterias. Mediante la amplificación exitosa en todas las muestras (Ilustración 23-4), se prueba que el ADN total extraído fue de calidad y no contuvo inhibidores

de PCR que pudieran haber generado falsos negativos en la determinación de parásito canino.

4.3.2. *Secuenciación de Sanger*

La secuenciación Sanger se realizó para las 2 muestras que amplificaron los productos esperados. Los electroferogramas fueron analizados y las secuencias limpias y ensambladas usando los programas bioinformáticos FinchTV y Geneious v11.1.5.

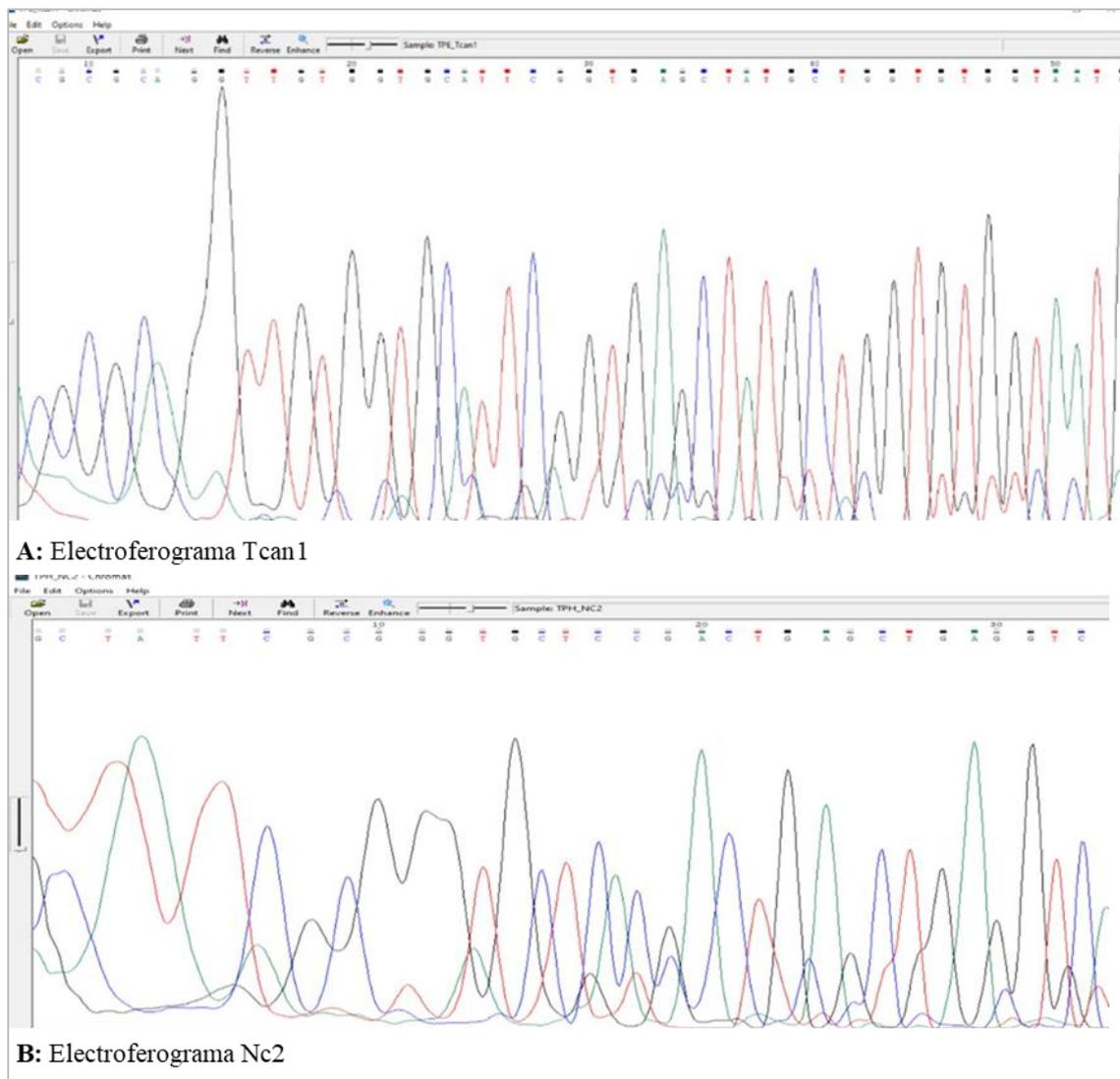


Ilustración 9-4: Electroferogramas de la secuenciación de Sanger Tcan 1/ Nc2 en la muestra de heces fecales de los huevos de *Toxocara canis*.

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

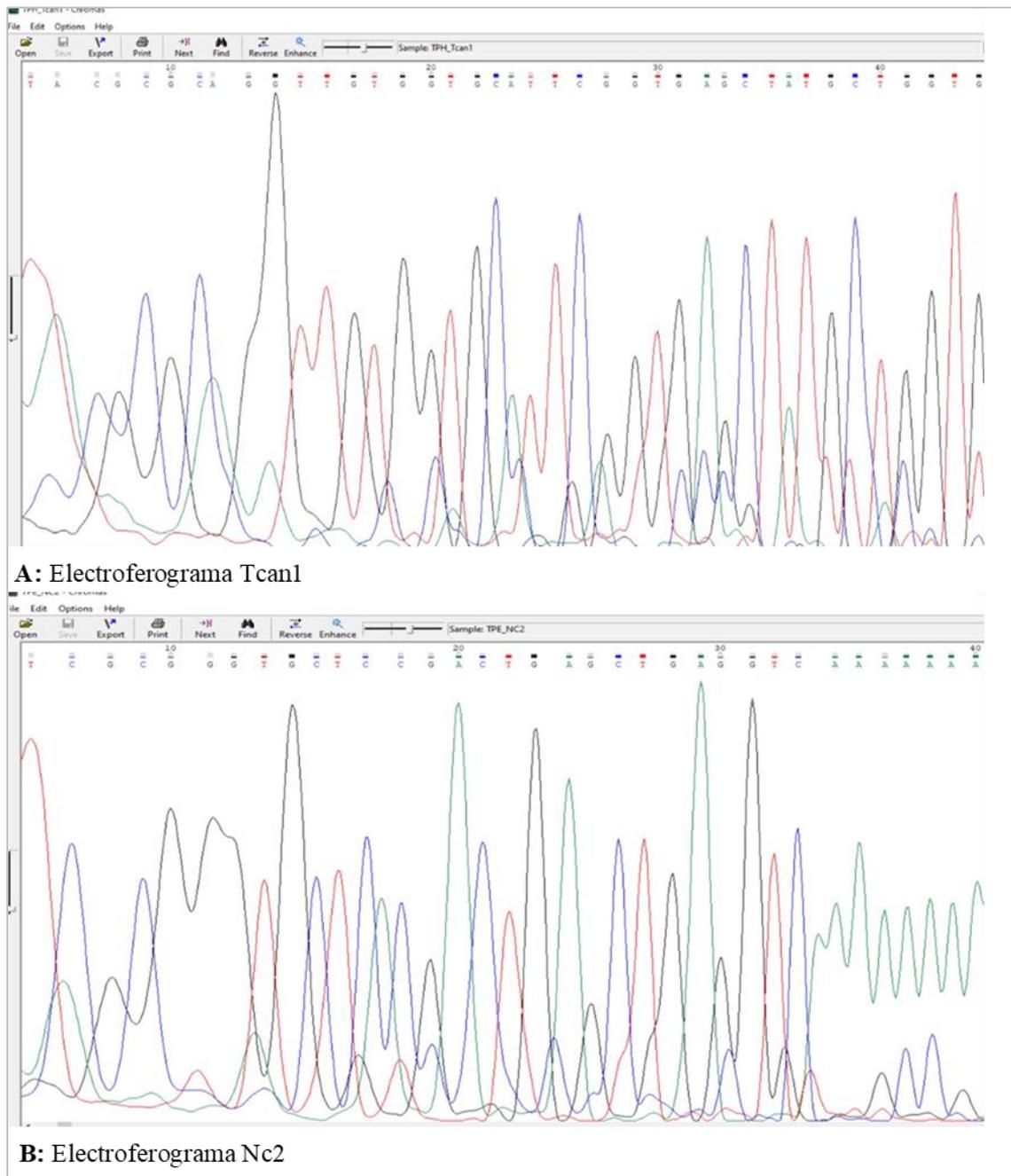


Ilustración 10-4: Electroferogramas de la secuenciación de Sanger Tcan 1/ Nc2 en la muestra de resuspensión de huevos de *Toxocara canis*

Realizado por: Hernández., Laura, 2022.

La secuenciación de Sanger nos permite conocer el orden de los nucleótidos de los fragmentos de ADN que son de alta calidad, como se evidencia en la Ilustración 23-4, en la muestra N°1 de heces fecales, mediante el análisis e interpretación del electrofenograma se identifica la siguiente secuenciación:

>Muestra1

GTTGTGGTGCATTCGGTGAGCTATGCTGGTGTGGTAATGGATATTGTGCA

Mientras que en la Ilustración 24-4, se observa el electrofenograma de la muestra N°2 de la resuspension de los huevos en el cual mediante la obtención de los fragmentos de ADN se obtiene la siguiente secuenciación:

>Muestra2

**GTTGTGGTGCATTCGGTGAGCTATGCTGGTGTGGTAATGGATATTGTGCAATT
GTACAGCGTACCTTGCCAGGAAATATTCGCACAAGAAATGGCTGTCGTTTGCT
CGTAAAGAGGCCAAAATTGGCCATGAGTGTATGTTGCGTTGCTTC**

Lo antes mencionado es similar a los estudios realizados por Sambache, T en su estudio TIPIFICACIÓN GENÉTICA DE *Toxocara canis* EN LA ZONA URBANA DE LATACUNGA, en el cual obtuvo las mismas secuenciaciones de Sanger al realizar su análisis mediante la matriz de secuenciación (BigDye - 3.1), desarrollando la secuenciación en electroforesis capilar.

4.3.3. Alineación de las secuencias

Las secuencias del gen ITS-2 (ADN) de *Toxocara canis* fueron obtenidas a partir de la secuencia de referencia MK728992.1 disponible en el logaritmo del BLAST del GenBank.

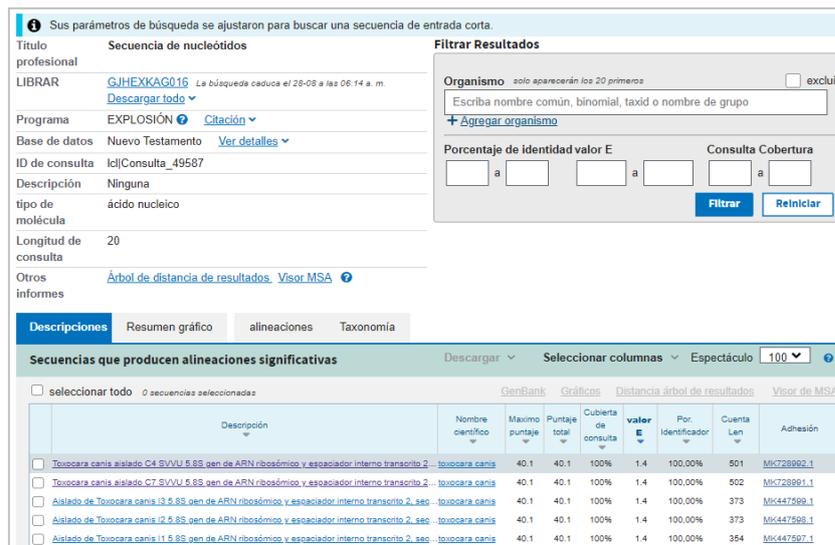


Ilustración 11-4: Porcentaje de identidad entre secuencias de ITS-2 del ADNr (383 pb) de los aislados *Toxocara canis* en el BLAST.

Fuente: NBCI, 2001.

En la presente investigación se ratifica que secuencia de la región del espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADNr (380 pb) de *Toxocara canis*, presenta una región altamente conservada como se evidencia en la Ilustración 22-4, esto es semejante al estudio realizado por Fernández et al., en el cual menciona que la región ITS posee dos regiones que no son codificables, por lo que las variables que se hallan dentro de las repeticiones son altamente conservadas del ADN ribosómico (Fernández et al, 2018, pp 1-13).

Toxocara canis isolate C4 SVVU 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence
 Sequence ID: [MK728992.1](#) Length: 501 Number of Matches: 1

Range 1: 34 to 416

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
708 bits(383)	0.0	383/383(100%)	0/383(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  AAATTCGAACGCACATTGCGCCATCGGGTTCATCCCGTTGGCACGCTGGCTGAGGGT 60
Sbjct 34  AAATTCGAACGCACATTGCGCCATCGGGTTCATCCCGTTGGCACGCTGGCTGAGGGT 93
Query 61  CAGTATATAAGGAGATGATGGGCGCCAAATTTATGGAAATGTGATTAACGCCCAAGGT 120
Sbjct 94  CAGTATATAAGGAGATGATGGGCGCCAAATTTATGGAAATGTGATTAACGCCCAAGGT 153
Query 121  TGTGGTGCATTCGGTGAGCTATGCTGGTGTGGTAATGGATATTGTGCAATTGTACAGCGT 180
Sbjct 154  TGTGGTGCATTCGGTGAGCTATGCTGGTGTGGTAATGGATATTGTGCAATTGTACAGCGT 213
Query 181  ACCTTGCCAAGGAAATATTCGCACAAGAAATGGCTGTCGTTGCTCGTAAAGAGGCAAAA 240
Sbjct 214  ACCTTGCCAAGGAAATATTCGCACAAGAAATGGCTGTCGTTGCTCGTAAAGAGGCAAAA 273
Query 241  TTGGCCATGAGTGTATGTTGCGTTGCTTCACGATACGGCTCCAGCAAACTGTTTATT 300
Sbjct 274  TTGGCCATGAGTGTATGTTGCGTTGCTTCACGATACGGCTCCAGCAAACTGTTTATT 333
Query 301  GTTTGGTTGTGGCAGCATCCAGGTTGGAGGTGGCGTTATCGGTCCGTTGAATGAGGAATG 360
Sbjct 334  GTTTGGTTGTGGCAGCATCCAGGTTGGAGGTGGCGTTATCGGTCCGTTGAATGAGGAATG 393
Query 361  CATGGCGAATGTTGAAATGAGA 383
Sbjct 394  CATGGCGAATGTTGAAATGAGA 416
  
```

Ilustración 12-4: Alineamiento entre secuencias de ITS-2 del ADNr (383 pb) de los aislados *Toxocara canis*

Fuente: NBCI, 2019.

Por lo tanto, en las regiones que son regularmente estudiadas del ADNr de los genes codificantes se encuentran (18S, 5.8S, y 28S) a la par con los dos espaciadores internos (ITS1 e ITS2). Aspecto también descrito por Gnani, C et al., a partir de la detección y caracterización molecular de suelos transmitidos helmintos de importancia zoonótica en Andhra Prades, basado en genes mitocondriales y ribosomales, entre ellos el ITS-2 y 5.8S (Gnani,2019). Por ende, las secuencias muy conservadas del gen 5.8S, son empleadas como punto de unión de cebadores universales para realizar la amplificación de las regiones espaciadoras flanqueantes, mientras que el ITS1 e ITS2 son de importancia para establecer varias relaciones filogenéticas entre los parásitos. Es por ello que, mediante este estudio se demuestra la gran utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa, ya sea empleado para marcadores genéticos tanto a nivel del ADN ribosómico y/o del ADN mitocondrial, dado que son de gran efectividad para la identificación y diferenciación de ascaridoides a nivel de especie.

4.3.4. Análisis filogenético

El árbol filogenético se generó en base a las secuencias del espaciador transcrito interno (ITS-2), por medio del ARN ribosómico del *Toxocara canis* y utilizando como método de comparación otras secuencias encontradas en el GenBank mediante los números de acceso MK447598; MK447599, MK309928, MK728991; MK728992.1. Al realizar este análisis que incluyen otras fuentes de información en el cual se hallan caracteres morfológicos y secuencias de ADN nuclear, se ve reflejado con mayor exactitud la prueba de corroboración de caracteres para determinar la especie parasitaria, recalcando así la importancia del región ITS-2 para establecer las relaciones filogenéticas de los parásitos.



Ilustración 13-4: Árbol de relaciones filogenéticas según el algoritmo Neighbor-Joining.

Fuente: Mahdy, 2020.

Lo antes mencionado concuerda con los estudios realizados por Mahdy et al., en el cual realizó la Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of *Toxocara* Species in Dogs, Cattle and Buffalo in Egypt mediante su análisis filogenético de la relación entre especies relacionadas de *Toxocara* entre ellas se escogió tres huéspedes diferentes en Egipto (perros, ganado y búfalos), mediante la caracterización de la región ITS-2 puede proporcionar una base para la identificación del gen ITS-2 el cual es una herramienta sensible para el 78,38 % de similitud de nucleótidos entre *T. canis* y *T. vitulorum*, por el cual se logra establecer las relaciones filogenéticas de estas tres especies (Mahdy, 2020, pp. 83-90).

En otro estudio realizado por Khademvatan, S et al., también hace énfasis en la importancia de la región ITS-2 ya que por medio de su comparación y por métodos de distancia de caracteres como la parsimonia máxima mostraron que la topología es semejante entre los árboles con un 75% de precisión filogenética indican una agrupación fiable entre los diferentes miembros de la especie de *Toxocara sp* (Shahram et al., 2013).

CAPÍTULO V

5. MARCO PROPOSITIVO

5.1. Propuesta

FORMULACIÓN DE UN JARABE DE LA SEMILLA *Cucurbita máxima* “ZAPALLO” CON EFECTO ANTIPARASITARIO.

5.2. Antecedentes

En una investigación realizada por Díaz, D et al. en el cual realizó estudios preclínicos de *Cucurbita máxima* (semilla de zapallo) un antiparasitario intestinal tradicional en zonas urbano-rurales, el cual se utilizó a canes como animales de experimentación en los cuales se determinó la concentración mínima inhibitoria como antiparasitario, en el cual al realizar un preparado con 23 g. de la semilla de zapallo en 100 ml de agua destilada, presenta un efecto antihelmíntico, concentración equivalente a ± 73 , en el cual se ha demostrado que causa alteraciones en la movilidad de los helmintos y su muerte, en un tiempo de 38.4 minutos estos estudios fueron realizados de manera macroscópica; mientras de forma microscópica las proglótides maduros se evidencia una destrucción de la membrana basal al igual que los huevos de los anillos grávidos (Díaz et al, 2004, pp.323-327).

5.3. Justificación

Los elevados casos de parasitosis encontrados en el albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba, el cual cuenta con una prevalencia de 94.67%, se convierte ya en un problema de la Salud Pública, por lo que se plantea realizar un jarabe natural de semillas de zapallo el cual contine en un 2% aminoácidos alcaloides como la cucurbitina y el principio activo de la fitosterolina que son las responsables de las propiedades vermífugas, además en su composición química también se halla el ácido salicílico, grasas y cantidades significantes de calcio, hierro y potasio, cristales globoides de proteínas, isoenzimas, hormonas vegetales, saponinas y triterpenoides pentacíclicos (Díaz et al, 2004, pp.323-327). Lo mas importante dentro de sus propiedades antiparasitarias, se debe a que por su efecto proteo- lítico presenta un promedio de vida de los parásitos de aproximadamente 38 min posterior de su dosificación, también es importante recalcar que no solo ayuda a la eliminación y muerte de la forma adulta sino también de los huevos y quistes de los parásitos. Por lo tanto por medio del jarabe se va a mejorar las condiciones de salud de los canes del albergue y de la misma forma evitar que se desarrollen casos de zoonosis parasitarias.

5.4. Objetivos

5.4.1. *Objetivo general*

Formular un jarabe a base de la semilla de *Cucurbita maxima* “zapallo”, para ser administrado a los perros del albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba.

5.4.2. *Objetivos específicos*

- Realizar el etiquetado del jarabe a base de semilla de *Cucurbita maxima* “zapallo”.
- Efectuar una tabla de dosificación de acuerdo con el peso de los canes en edad adulta y cachorros del albergue CRIAR de la ciudad de Riobamba.
- Determinar los costos que se generan la elaboración del jarabe antiparasitario de las semillas de zapallo.

5.5. Desarrollo de la propuesta

Se realiza la propuesta de la formulación de jarabe antiparasitario de las semillas de zapallo en base a los resultados obtenidos del grado de parasitosis hallado en los 150 canes del albergue CRIAR, dado que esta especie presenta cualidades antihelmínticas y es portadora de una gran cantidad de vitaminas y proteínas.

5.5.1. *Criterios de inclusión*

- Las semillas de zapallo que se encuentre fuera de una contaminación microbiológica y en buen estado.
- Las semillas que no se encuentren en periodo de germinación.

5.5.2. *Criterios de exclusión*

- Semillas que se encuentren con indicios de una contaminación microbiológica y en mal estado.
- Semillas que se encuentren con gritas o en estado de germinación.

5.5.3. *Preparación de las semillas Cucurbita maxima “zapallo”*

- Seleccionar de las semillas de zapallo que se encuentren en mejor estado y posteriormente se procede a limpiarlas.
- Secar las pepas por un lapso de 15 a 20 días.
- Se procede a la descascaración de las semillas para obtener el endospermo.
- Finalmente se tritura el endospermo mediante el uso de un mortero y un pistilo hasta obtener un polvo fino.

5.5.4. *Formulación del jarabe de zapallo en base a un jarabe simple*

Para la formulación del jarabe se lo realizó a lo establecido en el Formulario Nacional. En este caso se realizó 300 ml de jarabe de zapallo de tal manera que se obtuvo 5 frascos de 60 ml con un contenido de 50g de semilla de zapallo por cada frasco.

5.5.4.1. *Preparado del jarabe simple de sacarosa*

- En un recipiente se pesa 360 g de sacarosa.
- Posteriormente en balón de aforo con capacidad de 500 mL se coloca la sacarosa y posteriormente el agua purificada 250 mL para disolver la mezcla y finalmente se procede aforar hasta los 500 ml se retira del calor y se obtiene los 300ml de jarabe simple.

5.5.4.2. *Preparado del jarabe de semillas de zapallo*

- En los 300 mL se agregó los 250 g de polvo de semillas de zapallo.
- Con una varilla de agitación se homogeniza la mezcla hasta que este homogénea.

250 g polvo de semilla de zapallo →300 ml de jarabe simple

50 g polvo de semillas de zapallo →x= **60 ml de jarabe de semillas de zapallo**

5.6. Control de Calidad

Una vez que el jarabe se encuentre elaborado se procederá a realizar los controles de calidad del producto terminado los resultados deben encontrarse dentro de los límites determinados por la Farmacopea, para que pueda ser utilizado y de esta manera garantizar la salud del animal.

Tabla 1-5. Pruebas de control de calidad de producto terminado en jarabes.

Físicos	Microbiológicos
pH	Recuento de aerobios totales (método recuento en placa).
Transparencia	
Sabor	
Olor	Recuento de hongos y levaduras.
Color	Determinación de <i>Escherichia coli</i> .
Viscosidad	
Densidad	Determinación de <i>Salmonella sp.</i>
Cuerpos extraños	
Volumen deseable	Determinación de <i>Pseudomona aeruginosa</i> .

Fuente: Farmacopea, 2001

Realizado por: Hernández, Laura, 2022

5.7. Etiquetado del jarabe a base de semilla de *Cucurbita maxima* “zapallo”

La etiqueta consta en su lado izquierdo de la composición y la tabla de dosificación acorde a los pesos de los canes en estudio, en el centro se encuentra el logo y la cantidad que contiene el frasco de jarabe, mientras que en el lado derecho se describe las condiciones de precaución y de almacenamiento.



Ilustración 1-5. Etiqueta del Jarabe de zapallo.

Realizado por: Hernández, Laura, 2022.

5.8. Dosificación según el peso de los canes.

La dosificación se realizó en base a un promedio de los pesos de los canes adultos y cachorros del albergue en los cuales se calculó de la dosis que deberían recibir para su desparasitación en una única dosis que se detalla en la Tabla 2-5:

Tabla 2-5. Dosificación del jarabe de semillas de zapallo en base a los pesos promedio de los canes adultos y cachorros del albergue CRIAR.

Edad	Peso Kg	Dosis Mínima (ml/Kg)	Dosis (ml)
Adultos	8.4	2	16.8
	12.2	2	24.4
	15.6	2	31.2
Cachorros	2.8	2	5.6
	3.7	2	7.4
	5.2	2	10.4

Realizado por: Hernández, Laura, 2022.

5.9. Evaluación de la eficiencia del tratamiento

Después de recibir la monodosis al término de 8 días posteriores se les debe realizar un examen coproparasitario, de esta forma se observará la carga parasitaria, y se determinará la eficacia del tratamiento alternativo de parasitosis.

5.10. Limpieza y desinfección

La limpieza y desinsectación de los lugares donde se encuentran los canes debe ser de manera diaria y las heces desechadas para evitar un nuevo contagio dentro de la jauría.

5.11. Costo de elaboración

Al realizar la tabla de costos se demuestra que la propuesta es viable y factible dado que económicamente representa una cantidad menor al coste de un tratamiento de desparasitación en el cual se obtienen el mismo resultado de una forma natural, más convencional y fácil de llevarla a cabo.

Tabla 3-5. Coste de producción del jarabe antiparasitario de semillas de zapallo

Descripción	Cantidad	Costo unitario (\$)	Total (\$)
Costos de Equipos			
Balanza analítica	1	207	207
Mortero con pistilo	1	12	12
Vasos de precipitación	5	15	75
Estufa Eléctrica Portátil	1	10	10
Agitadores	1	45	45
Total			349
Costos de Materia Prima			
Semillas de zapallo	1	10	10
Total			10
Costo de otros compuestos			
Agua destilada	1	3	3
Sacarosa	1	12	12
Total			15
Costos de Envasado			
Frascos Ambar	5	6	30
Etiquetas	5	1.8	9
Total			39
COSTO TOTAL DE PRODUCCIÓN			413

Realizado por: Hernández, Laura, 2022.

5.12. Ejecución de la propuesta

La propuesta puede ejecutarla un docente y estudiante a quien le interese llevar a cabo la elaboración de un jarabe antiparasitario natural el cual presente una forma convencional y alternativa de aportar a la salud de los canes de una manera menos invasiva que un fármaco tradicional y de una manera más económica.

CONCLUSIONES

En los exámenes coproparasitarios por el método directo y el de flotación de Willis se logró identificar la presencia de los huevos de *Toxocara canis*, mediante el reconocimiento morfológico, por consiguiente, en el examen directo con el reactivo de lugol y la solución de cloruro de sodio al 0.9%, se observó con el objetivo de 40x la forma ovalada, la cobertura gruesa la cual presenta pequeñas depresiones, y en su interior se encuentra la célula de huevo que ocupa el 90% de la estructura total, mientras que el método de Willis se observa con mayor nitidez las características antes mencionadas, esta propiedad la proporciona la solución saturada de cloruro de sodio dado que los parásitos con mayor densidad van a flotar a la superficie por lo cual no existe restos parasitarios que imposibiliten la visión del parásito. Se evaluó la prevalencia según el sexo, en el cual se concluye que las hembras alcanzaron una prevalencia de 52.82% (75/150); en cambio los machos 47.18% (67/150). Otro parámetro que se consideró en el estudio fue la edad, en donde el grupo de los cachorros obtuvo 52.11% (74/150) y en el grupo de adultos 47.89% (68/150).

Al analizar según la cantidad de parásitos se obtuvo una prevalencia de monoparasitosis del 71.83% (102/150); mientras que los canes poliparasitados presentan 28.17% (40/150). Mientras de lo que hace referencia a la prevalencia según la especie se concluye que el parásito *Toxocara canis* (37.75%) es el más prevalente, seguido de *Giardia canis* (32.40%), *Chilomastix* sp (7.82%), *Ancylostoma caninum* (6.70%), *Cystoisospora canis* (5.59%), *Entamoeba coli* (7.26%) y *Iodamoeba* sp. (4.47%). En cuanto al estudio de la prevalencia según el tipo de razas se obtuvo que la raza de canes mestizos alcanzó la mayor prevalencia del 94.67% (142/150), seguido de Husky 2% (3/150), Pastor alemán y el Pitbull 1.33% (4/150) y finalmente French 0.67% (1/150). Finalmente en el análisis epidemiológico del albergue CRIAR, se encontró una prevalencia total de 94.67%, en las cuales (142/150) son positivas para parásitos gastrointestinales y 5.33% (8/150) resultado negativo, convirtiéndose de esta manera en un problema ya de salud pública debido a que se debe mantener precaución al momento de tener contacto directo con los canes ya que presentan un alto potencial zoonótico, en especial a los grupos vulnerables como son los niños, ancianos y gestantes.

Las 64 muestras positivas aisladas de los caninos fueron identificadas molecularmente por medio de la secuenciación de Sanger y la amplificación de barcode para la identificación de la región ITS-2 del ADNr, en la cual tanto en la muestra N°1 de las heces y la muestra N° 2 de la resuspensión de huevos por el método de Willis dieron positivas para *Toxocara canis*, la primera con una identidad del 100% y calidad 70.3% mientras que la segunda la identidad de 99.84% y la calidad del 82.5 %.

RECOMENDACIONES

Implementar dentro del albergue un programa de desparasitación continua para los canes, con un tratamiento individualizado según sea el caso que se vaya a tratar.

Capacitar al personal del albergue sobre el cuidado de los animales para evitar el contagio entre ejemplares.

Empezar un tratamiento de desparasitación a los canes que dieron positivo a los exámenes coproparasitarios.

Incentivar a las personas que adopten a los canes les proporcione un seguimiento médico y una higiene adecuada para evitar problemas de parasitosis y zoonosis.

BIBLIOGRAFÍA

ABOU, IMAN. Etapas de desarrollo y viabilidad de los huevos de *Toxocara canis* fuera del huésped. *Biomédica* [en línea]. 2018, vol.38, n.2 [citado el 23-04-2022], pp.189-197. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572018000200189&lng=en&nrm=iso. ISSN 0120-4157. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3684>.

ALHO, A., FERREIRA, I., AFONSO, M y BELO, S. Human Toxocariasis in Portugal—An Overview of a Neglected Zoonosis over the Last Decade (2010–2020). *Infectious Disease Reports* [en línea]. 2021, 13(4), pp.938–948. ISSN 2036-7449 [consultado el 23 de abril de 2022]. Disponible en: [doi:10.3390/idr13040086](https://doi.org/10.3390/idr13040086)

AMBROSIONI, J., CECCHINI, D., CASTELLARO, P., BISCIONE, F., LLOVERAS, S y ORDUNA, T. Toxocariosis humana en el Perú: aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. *Acta méd. peruana* [online]. 2011, vol.28, n.4 [citado 2022-04-23], pp.228-236. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172011000400010&lng=es&nrm=iso. ISSN 1728-5917.

BASANTES, J., Prevalencia de parásitos gastrointestinales en caninos (*Canis lupus familiaris*) en una clínica veterinaria. Trabajo experimental. Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana, 2021.

BECERRIL, M. *Parasitología Médica*. 4a ed. México: McGRAW-HILL, 2014. ISB:13:978-607-15-1150-8, pp.279-284. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1483§ionid=102298848>

CARDENAS, J., et al. Evaluación de técnicas coprodiagnósticas para *Toxocara canis*. *Rev. investig. vet. Perú* [online]. 2021, vol.32, n.3 [citado 2022-09-24], pp. 4-15. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172021000300019&lng=es&nrm=iso. ISSN 1609-9117. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i3.18861>.

CEJAS, B., RODRÍGUEZ, L y BATISTA, D. Toxocariasis ocular infantil. En línea. 2017. Disponible en: <https://sociedadcanariadeoftalmologia.com/wp-content/revista/revista-27/27sco16.htm>. [consultado el 23/04/2022].

CHACÓN, E., et al. Identificación molecular del *Toxocara canis* en caninos del cantón Salcedo, Ecuador. Revista Científica y Tecnológica UPSE [en línea]. 2022, 9(1), pp.66–74 [consultado el 25 de septiembre de 2022]. ISSN 1390-7697. Disponible en: doi:10.26423/rctu.v9i1.679

DABANCH, J. Zoonosis. Rev. chil. infectol. [online]. 2003, vol.20, suppl.1 [citado 2022-04-23], pp.47-51. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182003020100008&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0716-1018. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182003020100008>.

DACAL, E., KÖSTER, P y CARMENA, D. Diagnóstico molecular de parasitosis intestinales. En línea. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, vol. 38. 2020, pp. 24–31. ISSN 0213-005X. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.02.005>. [consultado el 23/04/2022].

DELGADO, O y RODRIGUEZ, A. Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariasis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina. Bol Mal Salud Amb [online]. 2009, vol.49, n.1 [citado 2022-04-23], pp.1-33. Disponible en: <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482009000100001&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1690-4648.

DELGADO, O y RODRIGUEZ, A. Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariasis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina. Bol Mal Salud Amb [online]. 2009, vol.49, n.1 [citado 2022-09-24], pp.1-33. Disponible en: <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482009000100001&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1690-4648.

DESPOMMIER, D. "Toxocariasis: Clinical Aspects , Epidemiology , Medical Ecology , and en:<https://cmr.asm.org/content/16/2/265.short>

DIAZ, O., et al. Estudios preclínicos de cucurbita máxima (semilla de zapallo) un antiparasitario intestinal tradicional en zonas urbano rurales. Rev. gastroenterol. Perú [online]. 2004, vol.24, n.4 [citado 2022-10-04], pp.323-327. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292004000400004&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1022-5129.

ESPINOSA, L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Espinosa L. Las Herramientas Moleculares. En línea. 2017. p. 521 [consultado el 23/04/2022]. Disponible en:

<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/530/cap17.pdf>

FARFÁN, D., QUISPE, R., RIVERA, A., y LLOJA, L. Prevalencia de huevos de *Toxocara* spp. en áreas recreacionales del distrito Gregorio Albarracín Lanchipa y el nivel de contaminación (ligero, moderado, alto). En línea. *Ciencia & Desarrollo*. 2019, n.º 24, pp. 58–65. ISSN 2617-6033. Disponible en: <https://doi.org/10.33326/26176033.2019.24.786>. [consultado el 23/04/2022].

FERNÁNDEZ, J., et al. Sequence characterization of the 5S ribosomal DNA and the internal transcribed spacer (ITS) region in four European *Donax* species (Bivalvia: Donacidae). *BMC genetics*. 2018, vol. 19, n.o 1, págs. 1-13. Disponible en: <https://bmcgenomdata.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12863-018-0684-x>

GNANI, C. Detection and molecular characterization of soil transmitted helminths of zoonotic significance in Andhra Pradesh. (Doctoral Dissertation, Sri Venkateswara Veterinary University). Tirupati-517502. India,2019.

GODOY, P., MAUVEZIN, J., BASMADJIAN, Y., SAYAGUÉS, B Y GIACHETTO, G. Toxocariasis: manifestaciones clínicas y de laboratorio en niños asistidos en un prestador integral de salud privado de Montevideo, Uruguay (2014-2018). *Rev. Méd. Urug.* [online]. 2020, vol.36, n.1 [citado 2022-04-23], pp.6-22. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902020000100006&lng=es&nrm=iso. Epub 01-Mar-2020. ISSN 0303-3295. <http://dx.doi.org/10.29193/rmu.36.1.1>.

GÓMEZ, F., ATEHORTUA, G., y OROZCO, SONIA C. La influencia de las mascotas en la vida humana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2007, vol. 20, no 3, p. 386.

HOJEDA, R. Diagnóstico de las parasitosis 2020. En línea. Share and Discover Knowledge on SlideShare. [s. f.]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/CariHojedaRemberto/diagnostico-de-las-parasitosis-2020-3>. [consultado el 07/06/2022].

HUAPAYA, P., ESPINOZA, Y., ROLDAN, W y JIMENEZ, S. Toxocariosis humana: ¿problema de salud pública? *An. Fac. med.* [online]. 2009, vol.70, n.4 [citado 2022-04-23], pp.283-290. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832009000400010&lng=es&nrm=iso. ISSN 1025-5583.

KIM, H., EUI, S., JINHO, P., et al. Morphological and Molecular Characterization of *Toxocara apodemi* (Nematoda: Ascarididae) from Striped Field Mice, *Apodemus agrarius*, in Korea. En línea. 2020. The Korean Journal of Parasitology, vol. 58. n.º 4, pp. 403–411. ISSN 1738-0006. Disponible en: <https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.4.403>. [consultado el 23/04/2022].

KIRSTAHLERA, P., AARESTRUP, F Y PAMP, S. Detection of Parasites in Microbiomes using Metagenomics. En línea. 2022, pp. 112–245. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.03.27.485979v1.full.pdf>. [consultado el 23/04/2022].

LÓPEZ, B. *Toxocara canis*: características, morfología, síntomas de infección. Liferder [en línea]. 2019 [consultado el 23 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.liferder.com/toxocara-canis/>

MACUHOVA, A., FUJINAMI, K y OHTA, O. Contamination, distribution and pathogenicity of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs from sandpits in Tokyo, Japan. En línea. 2012 Journal of Helminthology, vol. 87, n.º 3, pp. 271–276. ISSN 1475-2697. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/s0022149x12000314>. [consultado el 23/04/2022].

MAHDY, O., et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Toxocara* species in dogs, cattle and buffalo in Egypt. Helminthologia [en línea]. 2020, 57(2), pp. 83–90 [consultado el 4 de octubre de 2022]. ISSN 1336-9083. Disponible en: doi:10.2478/helm-2020-0013

MARCIN, J. What are parasites and how do they make us sick?. En línea. 2018. The Conversation. Disponible en: <https://theconversation.com/what-are-parasites-and-how-do-they-make-us-sick-121489>. [consultado el 23/04/2022].

MEDINA, R., RODRÍGUEZ, R., y BOLIO, M. Nematodos intestinales zoonóticos en perros de parques públicos de Yucatán, México. Biomédica [en línea] 2018. vol. 38, núm. 1, p. 105 [consultado. 20 abril de 2022]. Recuperado de: doi:10.7705/biomedica.v38i0.3595

MEGAN, H. *Toxocara canis*. Animal Diversity Web [en línea]. 2019 [consultado el 23 de abril de 2022]. Disponible en: https://animaldiversity.org/accounts/Toxocara_canis/

MERCHÁN, A., TORRES, M. Y DÍAZ, A. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. Rev haban cienc méd. En línea. 2017. pp 12-34. [citado

23 Abr 2022]. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/1651>

MEZA, O. Larva Migrans Visceral. Revista del Colegio de Médicos del Estado de Lara [Internet]. 2011 [citado 2022-04-23]; (1): 4. Disponible en: <https://revistacmvl.jimdo.com/suscripci%C3%B3n/volumen-2/toxocariosis/>

NEGRETE K. Parasitología Veterinaria, Técnicas de diagnóstico coprológico En línea. 2011 [consultado el 23/04/2022]. Disponible en: <http://karenpaterninanegrete.blogspot.com/2011/12/parasitologia-veterinaria-tecnicasde.html>

ÖGE, H., S. ÖGE y G. ÖZBAKIŞ-BECERIKLISOY. Detection and identification of *Toxocara canis* in infected dogs using PCR. Helminthologia [en línea]. 2019, 56(2), p. 118–123. ISSN 1336-9083 [consultado el 20 de abril de 2022]. Disponible en: doi:10.2478/helm-2019-0008

ORLANDO, N., OSEJOS, M., VÉLIZ, J., SALTOS, M., y ALCÍVAR, J. Prevalencia de *Toxocara canis* y su incidencia zoonótica ambiental en niños de la ciudad de Jipijapa. En línea. 2018. Polo del Conocimiento, vol. 3, n.º 8, p. 29. ISSN 2550-682X. Disponible en: <https://doi.org/10.23857/pc.v3i8.591>. [consultado el 20/04/2022].

OTERO, A., Enfoques de Investigación [en línea]. Colombia, 2018, pp. 23-39 [consultado el 24 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/326905435_ENFOQUES_DE_INVESTIGACION

PEARSON R. Toxocariasis. México. [En línea]. 2005, pp. 1-7. [consultado el 23/04/2022]. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/toxocariasis-es.pdf>

PEREGRINE, A. Roundworms in Small Animals - Digestive System - MSD Veterinary Manual. MSD Veterinary Manual [en línea]. 2018 [consultado el 30 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.msdevetmanual.com/digestive-system/gastrointestinal-parasites-of-small-animals/roundworms-in-small-animals>

PHILIP, G. y MIDEO, N. Parasite transmission among relatives halts Red Queen dynamics. En línea. 2017. Evolution, vol. 71, pp. 747–755. ISSN 0014-3820. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/evo.13157>. [consultado el 23/04/2022].

PRITT, B. Molecular Diagnostics in the Diagnosis of Parasitic Infection. En línea. Methods in Microbiology, vol. 42 (2015), pp. 111–160. Disponible en:

<https://doi.org/10.1016/bs.mim.2015.05.001>. [consultado el 23/04/2022]

QUINTERO, P., GUTIERREZ, A y PATINO, D. Toxocariosis. Acta Neurol Colomb. [en línea]. 2021, vol.37, n.1, supl.1 [citado el 22-04-2022], pp.169-173. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012087482021000200169&lng=en&nrm=iso>. Epub 27 de mayo de 2021. ISSN 0120-8748. <https://doi.org/10.22379/24224022350>.

RODRIGUEZ, G. Curso Parasitología. UNSL. - ppt video online descargar. En línea. SlidePlayer - descarguen y compartan sus presentaciones PowerPoint, 2020. Disponible en: <https://slideplayer.es/slide/2840067/>. [consultado el 05/06/2022].

ROLLINSON, D Y STOTHARD, R. Avances en Parasitología [en línea]. 2022. [consultado el 23 de abril de 2022]. pp.243-345. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/bookseries/advances-in-parasitology/vol/115/suppl/C>

SÁNCHEZ, M Y BIRON, D. Editorial: Host Manipulation by Parasites. En línea. 2019. Frontiers in Ecology and Evolution, vol. 7. ISSN 2296-701X. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00369>. [consultado el 23/04/2022].

SCHWARTZ, R., SATESH, P., FIELDS, M y CALUM N. The epidemiology and control of *Toxocara canis* in puppies. Parasite Epidemiology and Control [en línea]. 2022, 16, e00232. ISSN 2405-6731 [consultado el 30 de abril de 2022]. Disponible en: [doi:10.1016/j.parepi.2021.e00232](https://doi.org/10.1016/j.parepi.2021.e00232)
SCIENCE LEARNING HUB. What is PCR? En línea. 2017. Disponible en: <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/2347-what-is-pcr>. [consultado el 23/04/2022].

SHAHRAM, K., FAKHER, R., MAHDI, TAVALLA., RAHMAN, ABDIZADEH., y MAHMOUD, HASHEMITABAR. PCR-Based Molecular Characterization of *Toxocara* spp. Using Feces of Stray Cats: A Study from Southwest Iran. PLoS ONE [en línea]. 2013, 8(6), e65293. ISSN 1932-6203 [consultado el 20 de abril de 2022]. Disponible en: [doi:10.1371/journal.pone.0065293](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065293)

SUGANYA, G., et al. Prevalence and molecular characterization of zoonotic helminths in dogs. Journal of Parasitic Diseases [en línea]. 2018, 43(1), pp. 96–102 [consultado el 25 de septiembre de 2022]. ISSN 0975-0703. Disponible en: [doi:10.1007/s12639-018-1066-z](https://doi.org/10.1007/s12639-018-1066-z)

TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., KUMAR S. MEGA6: Análisis

genético evolutivo molecular versión 6.0. *mol. Biol. Evol.* 2013; 30 :2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197. [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

TARANTO, N., PASSAMONTE, L., y MARINCONZ, M. Parasitosis zoonóticas transmitidas por perros en el Chaco Salteño. *Medicina (Buenos Aires)*, 2000, vol. 60, no 2, p. 217.

THAJUDDIN, A., et al. *Cyanobacterial Taxonomy: Morphometry to Molecular Studies*. India: Academic Press, 2019. pp 43-64. ISBN 9780128146675.

TIMOTHY, K., y DWIGHT, B. *Toxocara canis*. En línea. 2022. *Trends in Parasitology*. ISSN pp. 147-492. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.01.002>. [consultado el 23/04/2022].

TINOCO, G., Prevalencia de parásitos gastrointestinales zoonóticos en caninos del albergue mediante coprología. En: Repositorio [base de datos en línea]. Trabajo de grado, Universidad Politécnica Salesiana, 2022.

TOMALA, O., Tipos de investigación. Google Sites: Sign-in [en línea]. 3 de septiembre de 2020 [consultado el 25 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/misitioweboswaldotomala2016/tipos-de-investigacion>

TOTOMOCH, A., et al. Sanger sequencing as a first-line approach for molecular diagnosis of Andersen-Tawil syndrome. *F1000Research* [en línea]. 2017, 6, 1016 [consultado el 4 de octubre de 2022]. ISSN 2046-1402. Disponible en: doi:10.12688/f1000research.11610.1

VILLENEUVE, A., et al. Prevalencia de parásitos en muestras fecales de perros y gatos de albergues en las provincias canadienses. *Parásitos y vectores*, 2015, vol. 8, n° 1, pág. 1-10.

WAGES, JK. Reacción en cadena de la polimerasa. En línea. *Enciclopedia de ciencia analítica*, vol. 2 (2005), pp. 243–250. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123693977004751>.

WONG, S., FUNG, K., CHAU, S., POON, R., WONG, C., y YUEN, K. Molecular diagnosis in clinical parasitology: when and why? *Exp Biol Med (Maywood)*. 2014. p.239. doi: 10.1177/1535370214523880. Epub 2014 Mar 25. PMID: 24668556.

ZHU, H., ZHANG, H., XU, Y., LAŠŠÁKOVÁ, S., KORABEČNÁ, M. y NEUŽIL, P. PCR

past, present and future. En línea. BioTechniques, vol. 69 (octubre de 2020), n.º 4, pp. 317–325. ISSN 1940-9818. Disponible en: <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>. [consultado el 30/04/2022].

ZURITA, D., Determinación De Parásitos Gastrointestinales A Través De Análisis Coproparasitario En Perros Del Albergue Canino 2 “O” Del Recinto Joyocoto, Parroquia Veintimilla, Cantón Guaranda, Provincia De Bolívar. En: Repositorio [base de datos en línea]. Trabajo de grado, Universidad Estatal de Bolívar, 2012.

ANEXOS

ANEXO A: AUTORIZACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN EL ALBERGUE CRIAR DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA.



ESPOCH
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Of. No. 116. CBQF-FC.2022
Riobamba, marzo 08 del 2022

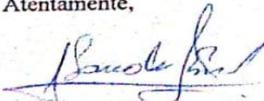
Doctor
Guillermo Dávalos
ADMINISTRADOR DEL ALBERGUE CRIAR
Presente

De mi consideración:

Reciba un atento y cordial saludo de quienes hacemos la Facultad de Ciencias, Carrera de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH, al tiempo que, conociendo su alto espíritu de colaboración con los Centros de Educación Superior, le solicito muy comedidamente autorice a la señorita Laura Katheryne Hernández León con CI. 060602836-3 para el desarrollo de su Proyecto **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Toxocara canis* EN PERROS DEL ALBERGUE CRIAR DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA**, con la finalidad de recolectar las muestras fecales de los canes para análisis microscópicos y molecular, a la vez solicito se le preste a la estudiante todas las facilidades necesarias para que pueda realizar su trabajo de Titulación que es requisito para poder graduarse. Dicho trabajo está aprobado por la unidad de titulación y su tutora es la Dra. Sandra Escobar Docente de la Facultad.

Particular que comunico para fines pertinentes.

Atentamente,



Dra. Sandra Escobar A,
**COORDINADORA CARRERA
BIOQUÍMICA Y FARMACIA**



**ANEXO B: BASE DE DATOS DE PARASITOSIS DE LOS PERROS DEL ALBERGUE
CRIAR.**

N° m	Sexo	Edad	RAZA	Parásitos gastrointestinales						
				<i>Toxocara canis</i>	<i>Giardia canis</i>	<i>Chilomastix sp.</i>	<i>Ancylostoma caninum</i>	<i>Cystoisospora canis</i>	<i>Entamoeba coli</i>	<i>Iodamoeba sp.</i>
1	Hembra	Cachorro	Mestizo	+++	++	++				
2	Hembra	Cachorro	Mestizo	+	+					
3	Hembra	Cachorro	Mestizo		+					
4	Hembra	Cachorro	Mestizo	+	+					
5	Hembra	Cachorro	Mestizo		+					
6	Hembra	Cachorro	Mestizo	++						
7	Hembra	Cachorro	Mestizo				+			
8	Hembra	Cachorro	Mestizo	+	++	++	+			
9	Hembra	Cachorro	Mestizo		++	++				
10	Hembra	Cachorro	Mestizo	+						
11	Hembra	Cachorro	Mestizo	N/P						
12	Hembra	Cachorro	Mestizo		+					
13	Hembra	Cachorro	Mestizo	N/P						
14	Hembra	Cachorro	Mestizo	+						
15	Hembra	Cachorro	Mestizo	++						
16	Hembra	Cachorro	Mestizo	+	+					
17	Hembra	Cachorro	Mestizo	+		+				
18	Hembra	Cachorro	Mestizo				++			
19	Hembra	Cachorro	Mestizo	++	+					
20	Hembra	Cachorro	Mestizo				+			
21	Hembra	Cachorro	Mestizo	++						
22	Hembra	Cachorro	Mestizo		+					
23	Hembra	Cachorro	Mestizo	+				+		
24	Hembra	Cachorro	Mestizo			+				
25	Hembra	Cachorro	Mestizo	+	+					
26	Hembra	Cachorro	Mestizo			+				
27	Hembra	Cachorro	Mestizo	+						
28	Hembra	Cachorro	Mestizo	+						
29	Hembra	Cachorro	Mestizo	+						
30	Hembra	Cachorro	Mestizo	+	++			+++		
31	Hembra	Cachorro	Mestizo	+						
32	Hembra	Cachorro	Mestizo	+						
33	Hembra	Cachorro	Mestizo		+					
34	Hembra	Cachorro	Mestizo		+			+		

35	Hembra	Cachorro	Mestizo	N/P						
36	Hembra	Cachorro	Mestizo	+				+		
37	Hembra	Cachorro	Mestizo	++	+					
38	Hembra	Cachorro	Mestizo	N/P						
39	Hembra	Cachorro	Mestizo		+					
40	Hembra	Cachorro	Mestizo		+			+		
41	Hembra	Cachorro	Mestizo	++						+
42	Hembra	Cachorro	Mestizo			+				
43	Hembra	Adulto	Husky	+++	+					
44	Hembra	Adulto	Husky		+					
45	Hembra	Adulto	Husky	+						
46	Hembra	Adulto	Pitbull		++					
47	Hembra	Adulto	Pitbull	+++						
48	Hembra	Adulto	Pastor aleman		+					+
49	Hembra	Adulto	Pastor aleman	+	+					
50	Hembra	Adulto	French					+		
51	Hembra	Adulto	Mestizo	++						
52	Hembra	Adulto	Mestizo							+
53	Hembra	Adulto	Mestizo		+					
54	Hembra	Adulto	Mestizo		+					
55	Hembra	Adulto	Mestizo			+				
56	Hembra	Adulto	Mestizo		+					
57	Hembra	Adulto	Mestizo		+					
58	Hembra	Adulto	Mestizo			+				
59	Hembra	Adulto	Mestizo					+		
60	Hembra	Adulto	Mestizo	+	+					
61	Hembra	Adulto	Mestizo		+					
62	Hembra	Adulto	Mestizo							
63	Hembra	Adulto	Mestizo	++					+	
64	Hembra	Adulto	Mestizo	+	+				+	
65	Hembra	Adulto	Mestizo	++					+	
66	Hembra	Adulto	Mestizo				+			
67	Hembra	Adulto	Mestizo		+					
68	Hembra	Adulto	Mestizo							
69	Hembra	Adulto	Mestizo		++					
70	Hembra	Adulto	Mestizo				++			
71	Hembra	Adulto	Mestizo					+		
72	Hembra	Adulto	Mestizo		+					
73	Hembra	Adulto	Mestizo		+					

74	Hembra	Adulto	Mestizo	++						
75	Hembra	Adulto	Mestizo	N/P						
76	Hembra	Adulto	Mestizo		++					
77	Hembra	Adulto	Mestizo		+					
78	Hembra	Adulto	Mestizo	++						
79	Hembra	Adulto	Mestizo	++					+	
80	Hembra	Adulto	Mestizo		+					
81	Machos	Cachorro	Mestizo	+						
82	Machos	Cachorro	Mestizo		+					
83	Machos	Cachorro	Mestizo	+++						
84	Machos	Cachorro	Mestizo	+	++					
85	Machos	Cachorro	Mestizo							
86	Machos	Cachorro	Mestizo		++					+
87	Machos	Cachorro	Mestizo	N/P						
88	Machos	Cachorro	Mestizo	+			+			
89	Machos	Cachorro	Mestizo		+				+	
90	Machos	Cachorro	Mestizo	++						
91	Machos	Cachorro	Mestizo	+	+					
92	Machos	Cachorro	Mestizo	N/P						
93	Machos	Cachorro	Mestizo				++			
94	Machos	Cachorro	Mestizo		+					
95	Machos	Cachorro	Mestizo		+					
96	Machos	Cachorro	Mestizo	+						
97	Machos	Cachorro	Mestizo	+						
98	Machos	Cachorro	Mestizo	++						
99	Machos	Cachorro	Mestizo	N/P						
100	Machos	Cachorro	Mestizo		+					
101	Machos	Cachorro	Mestizo	++						
102	Machos	Cachorro	Mestizo	++						
103	Machos	Cachorro	Mestizo		+					
104	Machos	Cachorro	Mestizo	+						
105	Machos	Cachorro	Mestizo		+					
106	Machos	Cachorro	Mestizo	+			+			
107	Machos	Cachorro	Mestizo	+++						
108	Machos	Cachorro	Mestizo	+++						
109	Machos	Cachorro	Mestizo		+					
110	Machos	Cachorro	Mestizo	+++						
111	Machos	Cachorro	Mestizo		+					
112	Machos	Cachorro	Mestizo			+	+			
113	Machos	Cachorro	Mestizo	+						+
114	Machos	Cachorro	Mestizo		++					

115	Machos	Cachorro	Mestizo	+++						
116	Machos	Cachorro	Mestizo		++					
117	Machos	Cachorro	Mestizo							
118	Machos	Cachorro	Mestizo		+					
119	Machos	Cachorro	Mestizo		++					
120	Machos	Adulto	Mestizo					+		
121	Machos	Adulto	Mestizo			+				
122	Machos	Adulto	Mestizo						++	
123	Machos	Adulto	Mestizo			+				
124	Machos	Adulto	Mestizo							+
125	Machos	Adulto	Mestizo	+	++			+		
126	Machos	Adulto	Mestizo	+						
127	Machos	Adulto	Mestizo						+	
128	Machos	Adulto	Mestizo		+++					
129	Machos	Adulto	Mestizo	+++		+				
130	Machos	Adulto	Mestizo							+
131	Machos	Adulto	Mestizo	++		++				
132	Machos	Adulto	Mestizo						+	
133	Machos	Adulto	Mestizo			+				
134	Machos	Adulto	Mestizo	+	+					
135	Machos	Adulto	Mestizo	++		+				
136	Machos	Adulto	Mestizo		+					+
137	Machos	Adulto	Mestizo	+						
138	Machos	Adulto	Mestizo		+					
139	Machos	Adulto	Mestizo				+			
140	Machos	Adulto	Mestizo						+	
141	Machos	Adulto	Mestizo	++			+			
142	Machos	Adulto	Mestizo						+	
143	Machos	Adulto	Mestizo						+	
144	Machos	Adulto	Mestizo	+++						
145	Machos	Adulto	Mestizo				+			
146	Machos	Adulto	Mestizo		++					
147	Machos	Adulto	Mestizo	++					++	
148	Machos	Adulto	Mestizo				+			
149	Machos	Adulto	Mestizo					++		
150	Machos	Adulto	Mestizo	+++						

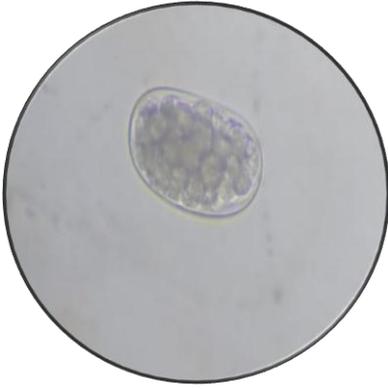
ANEXO C: RECOLECCION DE MUESTRAS EN EL ALBERGUE CRIAR



ANEXO D: PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EXAMEN COPROPARASITARIO

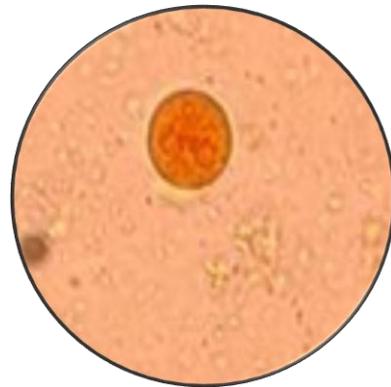


**ANEXO E: FORMAS ENCONTRADAS EN EL EXAMEN COPROPARASITARIO
MEDIANTE EL EXAMEN DIRECTO Y METODO DE WILLIS.**

	
<i>Giargia canis</i>	
	
<i>Chilomastix sp.</i>	
	
<i>Ancylostoma caninum</i>	



Cystoisospora canis

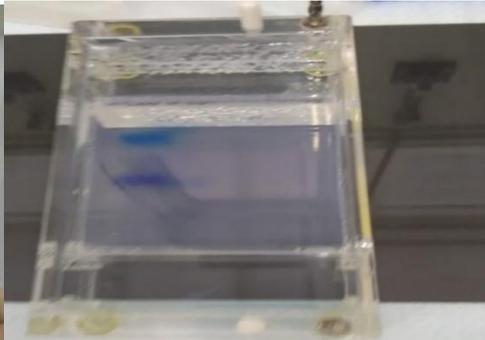


Entamoeba coli



Iodamoeba sp.

ANEXO F: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Toxocara canis*.





epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 15 / 12 / 2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Laura Katheryne Hernández León
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímica Farmacéutica
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.



2284-DBRA-UTP-2022