



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

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Ancylostoma caninum* Y
PREVALENCIA DE PARASITOSIS EN PERROS DEL REFUGIO-
SANTUARIO PAE DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: KLEBER ADRIAN TENE QUINCHI

DIRECTORA: Dra. SANDRA NOEMÍ ESCOBAR ARRIETA, PhD.

Riobamba – Ecuador

2022

© 2022, **Kleber Adrian Tene Quinchi**

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

Yo, KLEBER ADRIAN TENE QUINCHI, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor 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

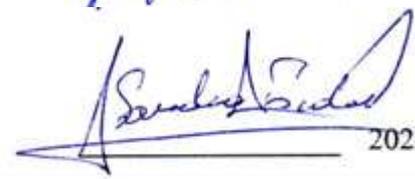


Kleber Adrian Tene Quinchi

060548073-0

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 *Ancylostoma caninum* Y PREVALENCIA DE PARASITOSIS EN PERROS DEL REFUGIO-SANTUARIO PAE DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA**, realizado por el señor: **KLEBER ADRIAN TENE QUINCHI**, 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. Aida Adriana Miranda Barros, M.Sc. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022-11-08
Dra. Sandra Noemi Escobar Arrieta, PhD. DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2022-11-08
Dra. Verónica Mercedes Cando Brito, PhD. ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2022-11-08

DEDICATORIA

Con mucho esfuerzo y sacrificio para Dios, mis padres, hermanos, amigos y maestros.

Kleber

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a Dios por permitirme culminar mi carrera profesional, a mis padres Manuel Jesús Tene Ortega y María Juana Quinchi Yupa por estar siempre presentes en cada una de las etapas de mi vida apoyándome y guiándome para alcanzar mis sueños, a mis hermanos por todo el apoyo brindado a lo largo de estos años de estudio, a mi tutora y asesora Dra. Sandra Escobar y Dra. Verónica Cando, por todo su apoyo y aporte técnico y científico para el desarrollo de este Proyecto de Investigación, a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por permitirme formar parte de su grandiosa institución educativa y en especial a la carrera de Bioquímica y Farmacia, también un agradecimiento cordial a la Licenciada Silvia Ramos por permitirme ejecutar este Trabajo de Investigación en el Refugio-Santuario PAE.

Kleber

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN.....	xvii
SUMMARY.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Limitaciones y delimitaciones.....	4
1.2.1. <i>Limitaciones</i>	4
1.2.2. <i>Delimitaciones</i>	4
1.3. Problema General de Investigación.....	4
1.4. Problemas específicos de investigación.....	5
1.5. Objetivos.....	5
1.5.1. <i>Objetivo general</i>	5
1.5.2. <i>Objetivos específicos</i>	5
1.6. Justificación.....	5
1.6.1. <i>Justificación Teórica</i>	5
1.6.2. <i>Justificación Metodológica</i>	6
1.6.3. <i>Justificación Práctica</i>	7

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. Antecedentes de investigación.....	8
2.2. Referencias teóricas.....	9
2.2.1. <i>Parasitosis canina</i>	9
2.2.2. <i>Helminetos</i>	10
2.2.3. <i>Nematodos</i>	11
2.2.4. <i>Uncinarias</i>	11

2.2.5.	Ancylostoma	11
2.2.6.	<i>Ancylostoma caninum</i>	12
2.2.6.1.	<i>Características biológicas</i>	12
2.2.6.2.	<i>Distribución</i>	12
2.2.6.3.	<i>Clasificación Taxonómica</i>	12
2.2.6.4.	<i>Morfología de Ancylostoma caninum</i>	13
2.2.6.5.	<i>Ciclo biológico de Ancylostoma caninum</i>	14
2.2.6.6.	<i>Formas de transmisión</i>	16
2.2.6.7.	<i>Patogenia en caninos causador por Ancylostoma caninum</i>	16
2.2.7.	<i>Zoonosis de Ancylostoma caninum</i>	17
2.2.7.1.	<i>Características clínicas</i>	18
2.2.8.	<i>Diagnóstico</i>	19
2.2.8.1.	<i>Diagnóstico de laboratorio</i>	19
2.2.8.2.	<i>Diagnóstico post mortem</i>	20
2.2.8.3.	<i>Diagnóstico diferencial</i>	20
2.2.9.	<i>Tratamiento de Ancylostoma caninum</i>	20
2.2.9.1.	<i>Tratamiento en canes</i>	20
2.2.9.2.	<i>Tratamiento en humanos</i>	21
2.2.10.	<i>Técnicas de biología molecular</i>	21
2.2.10.1.	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	22
2.2.11.	<i>Caracterización molecular por PCR y tipos de PCR</i>	23
2.2.12.	<i>Secuenciación Sanger</i>	24
2.2.12.1.	<i>Fundamento de la Secuenciación Sanger</i>	24

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	26
3.1.	Enfoque de investigación	26
3.1.1.	<i>Enfoque cualitativo</i>	26
3.1.2.	<i>Enfoque cuantitativo</i>	26
3.2.	Nivel de Investigación	26
3.2.1.	<i>Descriptiva</i>	26
3.2.2.	<i>Exploratoria</i>	27
3.3.	Diseño de investigación	27
3.3.1.	<i>Según la manipulación o no de la variable independiente</i>	27
3.3.2.	<i>Según las intervenciones en el trabajo de campo</i>	27
3.4.	Tipo de estudio	27

3.5.	Lugar de la investigación	28
3.6.	Población de estudio	28
3.7.	Metodología	29
3.8.	Métodos, técnicas e instrumentos de investigación	30
3.8.1.	<i>Recolección y transporte de muestras</i>	30
3.8.2.	<i>Análisis coproparasitario directo</i>	30
3.8.2.1.	<i>Procedimiento</i>	30
3.8.3.	<i>Determinación de parásitos por el método de flotación de Wills</i>	31
3.8.3.1.	<i>Procedimiento</i>	31
3.8.4.	<i>Análisis molecular</i>	32
3.8.4.1.	<i>Reacción en cadena de polimerasa (PCR)</i>	32
3.8.4.2.	<i>Extracción de ADN genómico</i>	32
3.8.4.3.	<i>Desarrollo de la Reacción En Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	33
3.8.4.4.	<i>Electroforesis</i>	37
3.8.5.	<i>Secuenciación Sanger</i>	38
3.8.5.1.	<i>Procedimiento</i>	38
3.8.5.2.	<i>Análisis de resultados de Secuenciación</i>	39
3.8.6.	<i>Instrumentos de investigación</i>	39
3.8.6.1.	<i>Materiales</i>	39
3.8.6.2.	<i>Reactivos</i>	40
3.8.6.3.	<i>Equipos</i>	41
3.9.	Análisis estadístico	42

CAPÍTULO IV

4.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	43
4.1.	Frecuencia de canes del refugio - Santuario PAE	43
4.1.1.	<i>Número de canes según el sexo</i>	43
4.1.2.	<i>Rango de edad en canes del refugio -Santuario PAE</i>	44
4.1.3.	<i>Número de canes según la raza</i>	44
4.2.	Prevalencia de parasitosis	45
4.2.1.	<i>Frecuencia de especies parasitarias</i>	45
4.2.2.	<i>Frecuencia de parásitos según el sexo</i>	47
4.2.3.	<i>Frecuencia de parasitosis según la edad</i>	47
4.2.4.	<i>Frecuencia de parasitosis según la raza</i>	48
4.2.5.	<i>Prevalencia total de parasitosis</i>	49
4.3.	Reconocimiento morfológico de <i>Ancylostoma caninum</i>	50

4.3.1.	<i>Identificación morfológica de Ancylostoma caninum en examen microscópico directo</i>	50
4.3.2.	<i>Identificación morfológica de Ancylostoma caninum por el método de flotación de Wills</i>	51
4.4.	Caracterización molecular de Ancylostoma caninum	53
4.4.1.	<i>Resultado extracción del ADN</i>	54
4.4.2.	<i>Primers utilizados para diagnosticar Ancylostoma caninum por PCR y secuenciación Sanger</i>	55
4.4.3.	<i>Resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>	55
4.4.4.	<i>Resultados de la secuenciación Sanger y construcción de árbol filogenético del parásito Ancylostoma caninum</i>	58
4.4.4.1.	<i>Amplificación de productos de PCR punto final analizando control interno de extracción de ADN para evaluar su calidad.</i>	58
4.4.4.2.	<i>Electroferogramas obtenidos por Secuenciación de Sanger</i>	59
4.4.4.3.	<i>Alineación de las secuencias utilizando el programa MEGA 5.0</i>	61
4.4.5.	<i>Árbol filogenético de aislamientos de Ancylostoma caninum basado en las secuencias de ARNr ITS1 y 5.8S ITS2.</i>	62

CAPÍTULO V

5.	MARCO PROPOSITIVO	64
5.1.	Propuestas	64
5.1.1.	<i>Descripción de la propuesta: Elaboración de un jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya para el control de parasitosis en perros</i>	64
5.1.1.1.	<i>Plan de acción de la propuesta: elaboración de jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya</i>	65
5.1.1.2.	<i>Costo de la propuesta para la elaboración de jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya</i>	67
5.1.1.3.	<i>Responsables de la ejecución de la propuesta para la elaboración de jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya</i>	67
5.1.2.	<i>Descripción de la propuesta: Implementación de técnicas de biología molecular: PCR para la identificación de parásitos zoonóticos en la ESPOCH</i>	68
5.1.2.1.	<i>Plan de acción de la propuesta: Implementación de PCR para la identificación de parásitos zoonóticos en la ESPOCH</i>	69
5.1.2.2.	<i>Costo de la propuesta de la propuesta: Implementación de PCR para la identificación de parásitos zoonóticos en la ESPOCH</i>	71

5.1.2.3. Responsables de la ejecución: Implementación de PCR para la identificación de parásitos zoonóticos en la ESPOCH	73
CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES	76
GLOSARIO	
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Parásitos gastrointestinales comunes en caninos.....	10
Tabla 2-2:	Clasificación Taxonómica de <i>A. caninum</i>	12
Tabla 3-2:	Morfología adulta de <i>Ancylostoma caninum</i>	13
Tabla 4-2:	Formas de transmisión del <i>Ancylostoma caninum</i>	16
Tabla 5-2:	Tipos de PCR.....	23
Tabla 1-3:	Cebadores a emplearse para síntesis de ADN de <i>Ancylostoma caninum</i>	35
Tabla 2-3:	Condiciones específicas para PCR.....	35
Tabla 3-3:	Condiciones de PCR convencional para barcode ITS de <i>Ancylostoma caninum</i>	36
Tabla 4-3:	Preparación de la muestra para electroforesis.....	37
Tabla 5-3:	Materiales de laboratorio utilizados.....	39
Tabla 6-3:	Reactivos empleados.....	40
Tabla 7-3:	Equipos empleados.....	41
Tabla 1-4:	Frecuencia según las especies parasitarias.....	45
Tabla 2-4:	Frecuencia de parasitosis según la edad.....	47
Tabla 3-4:	Frecuencia de parásitos según la raza.....	48
Tabla 4-4:	Prevalencia de parasitosis en perros del refugio Santuario-PAE de la ciudad de Riobamba.....	49
Tabla 5-4:	Prevalencia de <i>Ancylostoma caninum</i> y selección de muestras para PCR.....	53
Tabla 6-4:	Datos de absorbancia obtenida de ADN por espectrofotometría.....	54
Tabla 7-4:	Primers sintetizados para diagnosticar el parásito <i>Ancylostoma caninum</i> por PCR punto final y secuenciación Sanger.....	55
Tabla 8-4:	Resultados de las determinaciones por PCR del parásito <i>Ancylostoma caninum</i> en heces y resuspensión de huevos.....	55
Tabla 1-5:	Plan de acción de la propuesta: elaboración de jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya.....	65
Tabla 2-5:	Costo de la propuesta para la elaboración de jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya.....	67
Tabla 3-5:	Responsables de la ejecución de la propuesta para la elaboración de jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya.....	68
Tabla 4-5:	Plan de acción: Implementación de PCR para la identificación de parásitos zoonóticos en la ESPOCH.....	69
Tabla 5-5:	Costo de instalación de técnicas moleculares.....	71
Tabla 6-5:	Costo de equipamientos para implementación de técnicas moleculares.....	71
Tabla 7-5:	Costo de personal para implementación de técnicas moleculares.....	73

Tabla 8-5:	Responsables de la ejecución de la propuesta: Implementación de PCR para la identificación de parásitos zoonóticos en la ESPOCH.....	73
-------------------	--	----

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2:	Clasificación de parásitos helmintos	10
Ilustración 2-2:	Morfología <i>Ancylostoma caninum</i> (A) huevo; (B) huevo larvado	14
Ilustración 3-2:	Ciclo de vida de <i>Ancylostoma caninum</i>	15
Ilustración 4-2:	Lesiones causadas por larvas migrans de <i>Ancylostoma caninum</i>	18
Ilustración 5-2:	Caso clínico: larva migrans cutánea.....	19
Ilustración 6-2:	Principio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	22
Ilustración 7-2:	Secuenciación de Sanger	25
Ilustración 1-3:	Mapa de las ubicaciones del Refugio-Santuario PAE de la ciudad de Riobamba.	28
Ilustración 2-3:	Metodología general utilizada en la caracterización molecular y prevalencia de <i>A. caninum</i>	29
Ilustración 3-3:	Análisis coproparasitario directo.....	30
Ilustración 4-3:	Procedimiento para la observación de parásitos por el método de flotación de Wills.	31
Ilustración 5-3:	Búsqueda del gen para <i>Ancylostoma caninum</i> en base de datos GenBank. .	34
Ilustración 6-3:	Diseño de cebadores y parámetros para PCR.....	34
Ilustración 7-3:	Esquema de condición de ciclo de PCR para <i>Ancylostoma caninum</i>	36
Ilustración 8-3:	Procedimiento de la Secuenciación de Sanger.	38
Ilustración 1-4:	Número de canes según el sexo.....	43
Ilustración 2-4:	Rango de edad en canes del refugio santuario-PAE.....	44
Ilustración 3-4:	Número de canes según la raza	44
Ilustración 4-4:	Diagrama de barras de la frecuencia de las especies parasitarias.....	45
Ilustración 5-4:	Diagrama de barras de frecuencia de parásitos según el sexo.....	47
Ilustración 6-4:	Diagrama de barras de la frecuencia de parásitos según la edad.....	48
Ilustración 7-4:	Diagrama de barras de la frecuencia de parásitos según la raza.....	49
Ilustración 8-4:	Fotografías de <i>Ancylostoma caninum</i> en suero fisiológico bajo el microscopio óptico con lentes objetivos de 10X (A) y 40X (B).....	50
Ilustración 9-4:	Fotografías de <i>Ancylostoma caninum</i> en solución yodurada (lugol) bajo el microscopio óptico con lentes objetivos de 10X (A) y 40X (B).	51
Ilustración 10-4:	Fotografía de <i>A. caninum</i> por el método de flotación de Wills, objetivo de 10X.....	52
Ilustración 11-4:	Fotografía de <i>Ancylostoma caninum</i> por el método de flotación de Wills con lente objetivo de 40X.	52

Ilustración 12-4: Productos de PCR punto final analizando presencia del parásito <i>Ancylostoma caninum</i> a partir de muestras de heces y resuspensión de huevos.	56
Ilustración 13-4: Productos de PCR punto final analizando control interno de extracción de ADN para evaluar su calidad	58
Ilustración 14-4: Secuencias de nucleótidos resultantes de electroferogramas (muestra 3) observados en Chromas Lite 2.01	59
Ilustración 15-4: Secuencias de nucleótidos resultantes de electroferogramas (muestra 6) observados en Chromas Lite 2.01	60
Ilustración 16-4: Alineación de secuencias de muestras con secuencias de referencia disponibles en GenBank por sus números de acceso, utilizando el programa MEGA 5.0.....	61
Ilustración 17-4: Árbol filogenético de aislamientos de <i>Ancylostoma caninum</i> basado en las secuencias de ITS1, 5.8S ITS2.....	62

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** REGISTRO DE INFORMACIÓN Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS FECALES DE CANES ALOJADOS EN EL REFUGIO SANTUARIO-PAE
- ANEXO B:** PREPARACIÓN DE MUESTRAS FECALES PARA ANÁLISIS COPROPARASITARIO DIRECTO Y MEDIANTE LA TÉCNICA DE FLOTACIÓN DE WILLS
- ANEXO C:** ANÁLISIS Y OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS MUESTRAS FECALES MEDIANTE EL EXAMEN COPROPARASITARIO DIRECTO Y TÉCNICA DE FLOTACIÓN
- ANEXO D:** DESARROLLO DE TÉCNICAS MOLECULARES
- ANEXO E:** REGISTRO DE CANINOS DEL REFUGIO-SANTUARIO PAE
- ANEXO F:** RESULTADOS DEL ANÁLISIS COPROPARASITARIO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CLM	Larva Migrans Cutánea
ddNTP	Didesoxinucleótidos de terminación de cadena
dNTP	Trifosfatos de desoxinucleótidos
ITS	Espaciadores Internos Transcritos
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
PAE	Protección Animal Ecuador
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

RESUMEN

El presente Trabajo de Integración Curricular se realizó con el objetivo de caracterizar molecularmente al *Ancylostoma caninum*, a la vez que se determinó la prevalencia de parasitosis en una población comprendida por 120 caninos alojados en el Refugio-Santuario Protección Animal Ecuador (PAE) de la ciudad de Riobamba, lugar donde se realizó el registro por cada canino, identificando el sexo, raza y edad aproximada; se recolectó las muestras de heces transportándolos en un cooler al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias, donde se procedió a ejecutar el análisis coproparasitario en las soluciones de suero fisiológico y lugol; se tabuló los datos mediante la estadística descriptiva, encontrándose la prevalencia total de parasitosis del 68.33 %, siendo los parásitos más prevalentes *Giardia lamblia* (35.90%), *Toxocara canis* (19.23%) y *Ancylostoma caninum* (17.31%). A las 27 muestras positivas microscópicamente y observadas mediante la flotación de Wills para *Ancylostoma caninum*, se preparó 2 muestras (heces y resuspensión) los cuales se sometieron a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los resultados revelaron la presencia del parásito en ambas muestras con un tamaño de producto de 540 pares de bases con porcentajes de identidad del 49.1 % y 100 %. Con la Secuenciación Sanger se obtuvo los electroferogramas que permitió la extracción de la secuencia completa de nucleótidos (446 bases) para ambas muestras, posteriormente se diseñó el árbol filogenético donde se confirmó con certeza que las secuencias halladas pertenecieron al parásito *Ancylostoma caninum* dado que mostró una gran similitud con secuencias de fuentes bibliográficas. Finalmente, se recomendó promover la prevención y control de parasitosis en caninos, además aumentar la conciencia sobre las enfermedades zoonóticas y aplicar en los laboratorios la PCR dado que es un método rápido y directo para la identificación y discriminación de parásitos patógenos.

Palabras clave: <CARACTERIZACIÓN MOLECULAR>, <*Ancylostoma caninum*>, <REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)>, <ZOONOSIS>, <SECUENCIACIÓN >, <PREVALENCIA DE PARÁSITOS >.

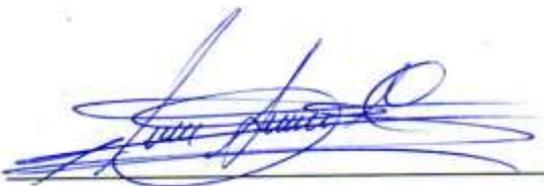


2177-DBRA-UTP-2022

SUMMARY

The aim of this work was to characterize molecularly *Ancylostoma caninum* while determining the prevalence of parasitosis in a population of 120 canines housed in the Refugio-Santuario Protección Animal Ecuador (PAE) Riobamba, where each canine was registered, identifying the sex, race and approximate age; The stool samples were collected and transported in a cooler to the Parasitology Laboratory of the Sciences College, where the coproparasitic analysis was performed in saline and Lugol's solutions; the data was tabulated using descriptive statistics, finding 68% total prevalence of parasitosis. The most prevalent parasites were *Giardia lamblia* (35.90%), *Toxocara canis* (19.23%) and *Ancylostoma caninum* (17.31%). Out of a total of 27 microscopically positive samples observed by Wills flotation for *Ancylostoma caninum*, 2 samples (faeces and resuspension) were prepared and subjected to polymerase chain reaction (PCR). The results revealed the presence of the parasite in both samples with a product size of 540 base pairs with percentages of identity 49.1 % and 100 %. With Sanger Sequencing, electropherograms were obtained which allowed the extraction of the complete nucleotide sequence (446 bases) for both samples, subsequently the phylogenetic tree was designed where it was confirmed with certainty that the sequences found belonged to the parasite *Ancylostoma caninum* since it showed a great similarity with sequences from bibliographic sources. Finally, it was recommended to promote the prevention and control of parasitosis in canines, to increase awareness of zoonotic diseases and to apply PCR in laboratories because it is a fast and direct method for the identification and discrimination of pathogenic parasites.

Keywords: <MOLECULAR CHARACTERIZATION>, <*Ancylostoma caninum*>, <POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)>, <ZONOSIS>, <SEQUENTIALIZATION>, <PREVALENCE OF PARASITES>.



Lcdo. Edison Hernán Salazar Calderón, M.Sc.
C.I. 0603184598

INTRODUCCIÓN

La parasitosis representa un problema de salud pública a nivel mundial, causando millones de muertes tanto en humanos y animales, especialmente en caninos, dado que estos son hospedadores de diversos parásitos, siendo los más comunes y ampliamente diseminados: nematodos gastroentéricos, cestodos y protozoarios, tales como el *Ancylostoma caninum*, *Trichuris vulpis*, *Strongyloides sp*, *Dipylidium caninum*, *Giardia lamblia* y *Toxocara canis* (Giraldo et al., 2005, pp. 346-352), que provocan infecciones, en muchos de los casos llegando a perjudicar la salud de los humanos gravemente cuando estas parasitosis son de carácter zoonótico (Naupay I. et al., 2019, pp. 320-329).

Según cifras de Protección Animal Ecuador (PAE), en el 2015 la población canina en Riobamba bordea los 80 000, por lo tanto en nuestro ambiente natural, existen diversos perros en su mayoría callejeros que ingresan a los refugios y portan parásitos gastrointestinales que representan un riesgo grave para otros animales, el personal y los visitantes, estos brindan un entorno que facilita la propagación de infecciones parasitarias entre animales, pero accidentalmente pueden ser transmisibles al humano como el *Ancylostoma caninum*, lo cual sucede de forma indirecta al tener contacto con tierra contaminada con heces de perros causando enfermedades de importancia especialmente en los niños quienes al ser allegados a sus mascotas son susceptibles a la infección (Mulinge et al., 2020, pp. 43-94).

Por lo tanto, con bade a lo mencionado anteriormente se presenta el Trabajo de Integración Curricular con el objetivo de caracterizar molecularmente al *Ancylostoma caninum*, a la vez que se determine la prevalencia de parasitosis en perros callejeros alojados en el refugio Santuario-PAE de la ciudad de Riobamba, debido a que por medio de este podemos determinar el nivel de prevalencia de parasitosis a la que pueden estar expuestas las personas y los canes; además mediante una identificación molecular brindar una solución a las enfermedades parasitarias en perros de la ciudad de Riobamba, ya que la mayoría de los albergues no se proporciona un tratamiento adecuado y específico para controlar las infecciones parasitarias, incluidas las causadas por el *Ancylostoma caninum*, esto al no realizarse pruebas de laboratorio para la identificación del patógeno de manera específica y tomado en cuenta que la eficacia de un tratamiento depende del diagnóstico oportuno en especial para estas infecciones (Xu et al., 2021, pp.537-545).

Los capítulos que se abordan a lo largo del estudio se describen a continuación:

- **Capítulo I:** Se describe el problema de investigación que motivó la realización del presente estudio que incluye el planteamiento del problema, las limitaciones y delimitaciones, problema general y específicos y objetivos.

- **Capítulo II:** Comprende el marco teórico donde se explica los antecedentes de los estudios de investigación sobre caracterización molecular, prevalencia de parasitosis y referencias teóricas que sustentan el trabajo desarrollado.
- **Capítulo III:** Se enfoca en el marco metodológico que se empleó para la ejecución del estudio donde se explica el enfoque, diseño de la investigación, además la población, los métodos, técnicas e instrumentos utilizados.
- **Capítulo IV:** Se describen los resultados obtenidos en el Trabajo de Integración Curricular realizando la interpretación y análisis correspondiente.
- **Capítulo V:** Finalmente se describe el marco propositivo enfocado en brindar solución a las problemáticas obtenidas en el estudio y además se describen las conclusiones y recomendaciones.

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

La parasitosis representa un problema de salud pública a nivel mundial especialmente en los países en vías de desarrollo, causando millones de muertes tanto en humanos y animales, siendo factores determinantes la sobrepoblación canina, falta de gestión y tratamientos de desparasitación. Los perros albergan parásitos potencialmente zoonóticos, siendo los más comunes y ampliamente diseminados: nematodos gastroentéricos, cestodos y protozoarios, tales como el *Ancylostoma caninum*, *Trichuris vulpis*, *Strongyloides sp*, *Dipylidium caninum*, *Giardia lamblia* y *Toxocara canis*, que provocan enfermedades como: anquilostomiasis, toxocarosis, equinococosis y giardiasis, en muchos de los casos llegando a perjudicar la salud de los humanos y canes (Naupay I. et al., 2019, pp. 320-329).

Uno de los parásitos ampliamente diseminado a nivel mundial es el *Ancylostoma caninum*, responsable de la anquilostomiasis canina con una prevalencia que oscila entre el 70 % y el 100 %, y la transmisión zoonótica representa un problema de salud pública potencialmente significativo (Thompson & Conlan, 2011, pp.69-73).

A nivel de Latinoamérica la falta de gestión de la población canina en los países en desarrollo como el Ecuador ha llevado a la superpoblación de los canes abandonados, la irregular desparasitación, el aumento de la densidad de población humana, surgen como problemas de salud grave, ya que los perros pueden albergar infecciones por patógenos potencialmente transmisibles a los seres humanos donde se incluyen diversos parásitos zoonóticos tales como los helmintos gastrointestinales zoonóticos comunes y las infecciones por protozoos: toxocarosis, la anquilostomiasis, Equinococosis y Giardiasis. Siendo el *Ancylostoma caninum*, uno de los parásitos gastrointestinales más prevalentes y patogénicos al tener contacto cutáneo con este parasito en las etapas infecciosas pueden conducir al desarrollo de larva migrans cutánea (CLM) en humanos además provocar enteritis eosinofílica (EE) (Thompson & Conlan, 2011, pp.69-73).

Según (Bowman et al., 2010, pp. 162-167) en canes el *Ancylostoma caninum* actúa causando una anemia hemorrágica aguda o crónica en canes, particularmente grave en crías jóvenes. Desde una perspectiva de salud pública, la situación más común relacionada con los anquilostomas de perros es la larva migrans cutánea (CLM), una enfermedad parasitaria de la piel que se encuentra provocando lesiones cutáneas, también llamadas erupciones crepantes o enfermedad del gusano de arena, se deben a la penetración y migración de larvas infecciosas del anquilostoma canino, produciendo una vía eritematosa, lineal o serpigínea que es intensamente prurítica y autolimitadora (Bowman et al., 2010, pp. 162-167).

En Ecuador, según las investigaciones realizadas manejan porcentajes de parasitismo entre un 20 y 40%, entre ellas destacándose las infecciones causadas por parásitos caninos transmitidos al ser humano, dado que las personas frecuentan a parques donde los canes hacen sus deposiciones, contribuyendo a una rápida infección especialmente en niños.

Los caninos de los albergues de la ciudad de Riobamba no son ajenos a la infección por *Ancylostoma caninum* debido a varios factores tales como, su facilidad de transmisión encontrándose en los alimentos y agua, ingresan al hospedero causando alta patogenicidad especialmente en aquellos animales que encuentran en hacinamiento además por su condición deplorable de dieta, higiene y pelaje permiten aún más la proliferación de este parásito. Sumado todos estos factores muchos animales de todas las edades están expuestos a sufrir *Ancylostoma caninum* que si no proporciona soluciones viables puede seguir incrementando la tasa de mortalidad.

1.2. Limitaciones y delimitaciones

Las principales limitaciones y delimitaciones del presente Trabajo de Integración Curricular fueron:

1.2.1. Limitaciones

- Recolección de muestras de heces clasificando de manera individual por cada can.
- Disponibilidad de equipos y materiales para la realización de las técnicas moleculares en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

1.2.2. Delimitaciones

El presente Trabajo de Integración Curricular se llevará a cabo en caninos callejeros alojados en el Refugio-Santuario PAE de la ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo- Ecuador, durante los meses de abril-septiembre del año 2022.

1.3. Problema General de Investigación

¿Es posible caracterizar molecularmente al *Ancylostoma caninum* en perros del Refugio – Santuario PAE de la ciudad de Riobamba, durante el período abril – septiembre 2022?

1.4. Problemas específicos de investigación

- ¿Cuál es el nivel de prevalencia de parasitosis en perros del Refugio- Santuario PAE de la ciudad de Riobamba?
- ¿Es posible reconocer la morfología de *Ancylostoma caninum* a través de un examen coproparasitario en muestras fecales de perros del Refugio- Santuario PAE de la ciudad de Riobamba?
- ¿Es de utilidad la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la caracterización del parásito *Ancylostoma caninum*?
- ¿Es posible construir un árbol filogenético mediante la Secuenciación de Sanger y utilizando programas bioinformáticos actualizados?

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Caracterizar molecularmente al *Ancylostoma caninum* en perros del Refugio- Santuario PAE de la ciudad de Riobamba, durante el período abril – septiembre 2022.

1.5.2. Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia de parasitosis en perros del Refugio- Santuario PAE de la ciudad de Riobamba.
- Reconocer la morfología de *Ancylostoma caninum* a través de un examen coproparasitario en muestras fecales de perros del Refugio- Santuario PAE de la ciudad de Riobamba.
- Caracterizar molecularmente al *Ancylostoma caninum* mediante la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Construir un árbol filogenético mediante la Secuenciación de Sanger y utilización de programas bioinformáticos actualizados.

1.6. Justificación

1.6.1. Justificación Teórica

Según cifras de Protección Animal Ecuador (PAE), en el 2015 la población canina en Riobamba bordea los 80 000, por lo que en nuestro ambiente natural se desarrollan muchos parásitos que

son propios de animales; los perros que ingresan a los refugios portan parásitos gastrointestinales que representan un riesgo grave para otros animales, el personal del refugio y los visitantes, estos brindan un entorno que facilita la propagación de infecciones parasitarias entre animales, pero accidentalmente pueden ser transmisibles al humano debido a que desconocen los parásitos zoonóticos que albergan los canes y su vía de transmisión, lo cual sucede de forma indirecta debido al tener contacto con tierra contaminada con heces de perros, a través del contacto con el pelo de los animales, alimentos y agua contaminada con excrementos o secreciones de perros, causando enfermedades de importancia especialmente en los niños quienes al ser allegados de manera física y emocional a las mascotas son susceptibles a la infección, al igual que las personas inmunocomprometidas, que han padecido patologías como el síndrome de la larva migrans visceral (VLM) (Mulinge et al., 2020, pp. 43-94).

1.6.2. Justificación Metodológica

Debido a las dificultades con los métodos convencionales para el diagnóstico de enfermedades, actualmente se utilizan técnicas enfocadas en el diagnóstico a nivel genético debido a su rapidez y confiabilidad. Tal es el caso de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificación y confirmación de los parásitos que fueron utilizados por varios investigadores de todo el mundo que se enfocan en genes específicos. Además, otras herramientas moleculares como la Secuenciación de Sanger pueden proporcionar el nivel de discriminación que a menudo no se logra solo con la microscopía y que se necesita para diferenciar entre especies o variantes intraespecíficas de los parásitos relevantes. La caracterización puede proporcionar información importante sobre el potencial zoonótico del parásito y la dinámica de transmisión dentro de una comunidad (Suganya & Porteen 2019, pp. 96-102).

Con desarrollo de la biología molecular, los métodos basados en la PCR y Secuenciación han permitido diferenciar especies caninas de *Ancylostoma* en muestras de heces microscópicamente positivas, lo que resulta en una mejora de la precisión del diagnóstico, así como en la elucidación de aspectos epidemiológicos (Oliveira & Katagiri, 2017, pp.14-19).

En caso de los caninos el tratamiento debe incluir a todos aquellos animales susceptibles, para ello existen diversos medios que permiten identificar al parásito desde técnicas más simples como un examen coproparasitario hasta métodos y técnicas moleculares más modernas los cuales son más sensibles, específicas y requieren menos tiempo, en comparación a los métodos convencionales (ESCCAP 2013, p.1).

Por lo tanto, una identificación y caracterización exacta del *Ancylostoma caninum* permitiría dar un tratamiento preciso. Sin embargo, si el patógeno se caracteriza únicamente con pruebas convencionales, no existe la certeza de que corresponda a la especie reportada, debido a que en el intestino del perro existen diversos parásitos que comparten características muy similares, por lo

que se puede emplear técnicas moleculares tales como la metagenómica y también aquellas que se basan en la PCR.

1.6.3. Justificación Práctica

La caracterización molecular del *Ancylostoma caninum* y la prevalencia de parasitosis en las heces de los perros, es de mucha importancia, debido a que por medio de este podemos determinar el nivel de prevalencia de parasitosis a la que pueden estar expuestas las personas y los canes; además mediante una identificación molecular brindar una solución a las enfermedades parasitarias en perros, ya que la mayoría de los albergues no se proporciona un tratamiento adecuado y específico para controlar las infecciones parasitarias, incluidas las causadas por el *Ancylostoma caninum*, al no realizarse pruebas de laboratorio para la identificación del patógeno e manera específica y tomado en cuenta que la eficacia de un tratamiento depende del diagnóstico oportuno en especial para esta infección, que en cualquier estadio del parásito es crítico dada la rápida multiplicación (Xu et al., 2021, pp.537-545).

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de investigación

Desde el siglo XIX, varias investigaciones describieron la anquilostomiasis en perros, causado por el *Ancylostoma caninum*, nematodo intestinal de distribución mundial. Se sabe que todos los anquilostomas caninos son zoonóticos y causan infecciones que van desde irritaciones cutáneas transitorias hasta "erupciones progresivas" prolongadas, enteritis eosinofílica e incluso infecciones intestinales patentes (Mulinge et al., 2020, pp. 43-94). En el Ecuador no se han realizado estudios extensos, por lo que hay poca información sobre las especies de anquilostomiasis caninas y su importancia para la salud pública en el Ecuador y Chimborazo, y mucho menos investigaciones centradas en la caracterización molecular específicamente para el parásito *Ancylostoma caninum*. Por lo tanto, los datos disponibles son a nivel general destacándose los siguientes:

Un estudio titulado "*Identificación molecular de especies de Ancylostoma de perros y evaluación del riesgo zoonótico en hogares de bajos ingresos, estado de São Paulo, Brasil*" con base en exámenes copromicroscópicos y la amplificación de la PCR de la región ITS1-5.8S-ITS2, determinaron la prevalencia de parásitos intestinales y la identificación de especies de anquilostomiasis canina en las heces recuperadas de 278 perros obteniendo parásitos intestinales en el 67,3 % de los perros y la anquilostomiasis se encontró con la tasa de prevalencia más alta (56,6 %), de 158 muestras positivas para huevos de anquilostomiasis, 106 (67. 1%) fueron amplificadas por PCR y, de ellos, 88 (55,7%) fueron secuenciados con éxito para la identificación de especies. Se registraron infecciones únicas por *Ancylostoma caninum* y *Ancylostoma braziliense* en 61,4% y 12,5%, respectivamente, y mixtas en 26,1%. Las secuencias de nucleótidos de ambas especies mostraron altas tasas de identidad (98-100%) en comparación con las secuencias de referencia (Oliveira & Katagiri, 2017, pp.14-19).

Otro estudio titulado "*Primer reporte de la detección molecular de Ancylostoma caninum en Lahore, Pakistán: la amenaza de las mascotas*" Se determinó la prevalencia molecular de *Ancylostoma caninum* en perros callejeros y mascotas en Lahore, Pakistán desde julio de 2014 hasta agosto de 2015. Primero se evaluó un total de 500 muestras fecales de perros mediante una técnica de sedimentación y luego mediante un ensayo de PCR dirigido a la región ITS-2 del genoma de *Ancylostoma caninum*. En total, 130 (26%) las muestras dieron positivo para infestación de anquilostomiasis mediante examen microscópico. Las muestras microscópicamente positivas fueron procesadas para PCR y 89 (17,6%) resultaron positivas para *Ancylostoma caninum* (Rehman et al., 2017, pp. 559-564).

A nivel regional no se han realizado investigaciones de caracterización molecular del *Ancylostoma caninum*, sin embargo, existen estudios indican la prevalencia del parásito, tales como la investigación titulada “*Prevalencia de Ancylostoma caninum en perros domésticos de las parroquias San Luis y Velasco del cantón Riobamba*”, tuvieron como objetivo determinar la prevalencia de este parásito en 85 perros domésticos, su presencia relacionada con la edad, sexo, hábitat y lugar de procedencia. La técnica utilizada partió de un coprológico a partir de concentración parasitaria por flotación, usando como reactivo solución saturada de cloruro de sodio, para establecer la presencia de huevo de *Ancylostoma caninum* en las muestras de heces fecales. De acuerdo con los resultados se estableció que la prevalencia de periodo es de 3,5%, valor inferior si se compara con la prevalencia a nivel nacional del 30%, por lo tanto, se determina que es bajo el índice de prevalencia de *Ancylostoma caninum* en perros domésticos (Almeida & Bonilla, 2016, pp.36-40).

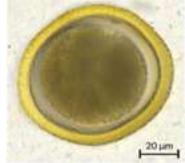
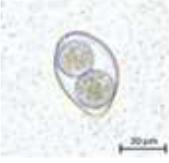
2.2. Referencias teóricas

2.2.1. Parasitosis canina

La parasitosis canina sigue siendo un problema de salud pública, a pesar de los excelentes tratamientos antiparasitarios actuales, un gran número de perros continúan infectados con diversos parásitos como anquilostomas comunes, protozoarios, lombrices intestinales, tricocéfalos y tenias, que ocurren local o esporádicamente; muchos de ellos no pueden ser controlados por los diferentes fármacos disponibles, lo que destaca la importancia de un examen fecal moderno (Gerardi et al., 2018, pp. 269-272).

Particularmente los perros que ingresan a los refugios portan parásitos gastrointestinales que representan un riesgo grave para otros animales, el personal del refugio y los visitantes, estos brindan un entorno que facilita la propagación de infecciones parasitarias entre animales. Los nematodos y protozoos que se transmiten a través de la ingestión o la penetración de la piel son los principales parásitos entéricos de preocupación en los refugios. *Ancylostoma* spp., *Uncinaria stenocephala*, *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Trichuris vulpis* y *Dipylidium caninum* son los principales helmintos, mientras que *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Isospora* spp. y *Sarcocistis* spp. son los parásitos protozoarios más prevalentes en los perros de refugio (Raza et al., 2018, p.108).

Tabla 1-2: Parásitos gastrointestinales comunes en caninos.

<i>Ancylostoma</i>	<i>Toxocara</i>	<i>Cystoisospora</i>	<i>Trichuris</i>	<i>Giardia</i>
				

Fuente: (Nagamori et al., 2020, pp. 346-354)

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

2.2.2. Helminthos

Helmintho es un término derivado del griego helmins que significa "gusano parásito", son muy comunes, dependiendo de la especie, habitan de manera libre o como parásitos de una planta o animal. La gran mayoría de helmintosis se limita a hospedadores no humanos. Sin embargo, existen aquellos que parasitan al ser humano y pertenecen a dosfyla: nematelmintos, que comprenden a los nematodos (gusanos redondos) y platelmintos, que incluyen a los cestodos (gusanos planos) y trematodos (Weller, 2019, pp.255-320).

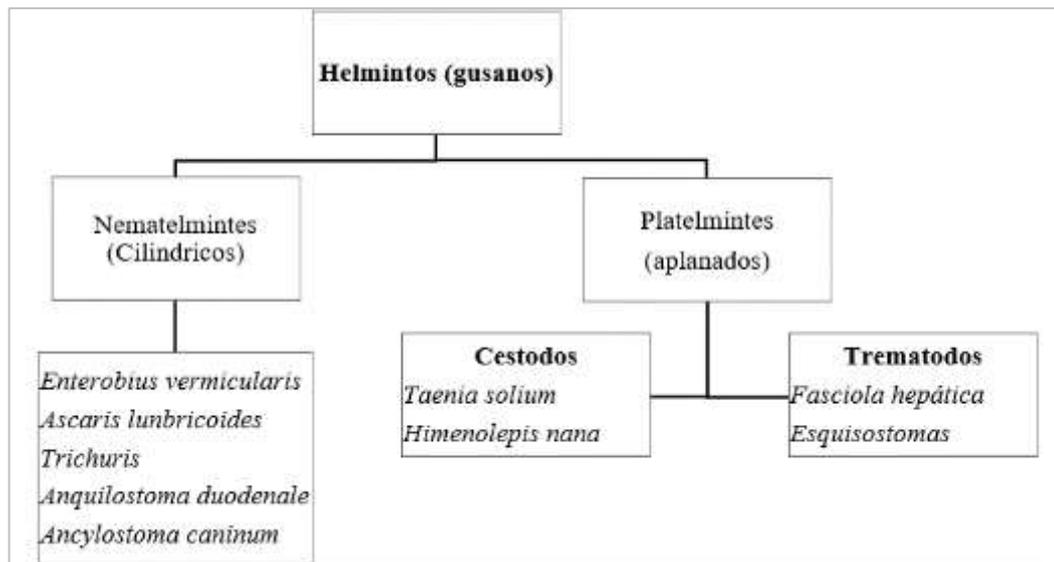


Ilustración 1-2: Clasificación de parásitos helmintos

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

Cabe recalcar que los helmintos difieren de los protozoarios en varios aspectos, siendo los protozoarios microorganismos unicelulares, mientras que los helmintos son gusanos multicelulares que poseen órganos y sistemas diferenciados, poseen ciclos vitales complejos que requieren de estadios secuenciales de desarrollo fuera del hospedador (Weller, 2019, pp.255-320).

Existen diversos helmintos que afectan a los caninos, tales como: *Ancylostoma caninum*,

Trichuris vulpis, *Strongyloides stercoralis*, *Dipylidium caninum* y *Toxocara canis*, entre otras; éstos ocasionan deterioro de la salud animal afectando el bienestar y la vitalidad del hospedero e incluso ocasionan la muerte.

2.2.3. Nematodos

Los nematodos son gusanos redondos no segmentados. Las especies de nematodos son muy distintas y abundantes en la naturaleza. La mayor parte de los nematodos son de vida libre y estas especies han evolucionado en forma variable para sobrevivir en distintos hábitats, incluidos el agua salada, agua dulce o tierra. Los perros son portadores de este tipo de parásitos y pueden transmitir cerca de 40 enfermedades infecciosas capaces de afectar a los seres humanos. A nivel mundial, se han reportado 19 géneros de parásitos entéricos de perros, de los cuales el 73 % tiene potencial zoonótico destacándose el *Ancylostoma caninum*, *Toxocara canis* y *Trichuris vulpis*, son los más importantes, por su distribución geográfica y su relevancia clínica (Medina et al., 2018, pp. 105).

2.2.4. Uncinarias

Son parásitos nematodos que pueden infectar tanto a personas como animales vertebrados causando dos tipos de parasitosis en humanos: Uncinariasis humanas y Larva Migrans Cutánea (LMC). El término “uncinaria” se deriva del término “uncus” cuyo significado es gancho, que hace referencia a la morfología de la cápsula bucal de los helmintos (D’Amelio & Cavallero, 2022, pp. 560-569).

2.2.5. Ancylostoma

Ancylostoma deriva del griego anchylos: gancho y stoma: boca, (boca con ganchos). Son parásitos nematodos del orden Strongylida cuyas especies producen enfermedades conocidas como anquilostomiasis, son relativamente frecuentes en los carnívoros domésticos, silvestres y accidentalmente en el humano, pertenecen a la familia Ancylostomatidae, que se localizan en el intestino delgado y se caracteriza por hematofagia (Quiroz, 1999, pp. 202-245). *Ancylostoma* spp. son responsables de las infecciones por Larvas migrans cutáneas (LMC), principalmente debidas a especies parásitas de perros y gatos que penetran accidentalmente en la piel humana. La infección es típica de regiones de clima cálido y puede ser determinada por *A. braziliense*, *A. ceylanicum*, *Ancylostoma caninum* por miembros del género *Uncinaria* (D’Amelio & Cavallero, 2022, pp. 560-569).

2.2.6. *Ancylostoma caninum*

Es un nematodo intestinal hematófago que infecta a perros, gatos y otros mamíferos en las zonas templadas y tropicales del mundo. Además de la importancia veterinaria, *Ancylostoma caninum* también puede causar enfermedades zoonóticas en humanos (Liu et al., 2013, pp. 1-6).

2.2.6.1. *Características biológicas*

Ancylostoma caninum pertenece al reino Eukarya, por lo que sus células cuentan con un núcleo, donde se encuentran los cromosomas, que están conformados por ADN. Es clasificado como un parásito lo que implica que no puede vivir de manera libre, sino necesariamente asociado a un huésped; es un organismo heterótrofo por lo que se alimenta otros seres vivos o de sustancias elaboradas por otros. Siendo una característica importante el ser hematófago es decir se alimenta de la sangre del huésped (Weller, 2019, pp.255-320).

2.2.6.2. *Distribución*

Ancylostoma caninum es un parasito cosmopolita, con mayor distribución en zonas tropicales y en las regiones templadas. En climas más fríos, se detecta en perros importados y situaciones vulnerables. Otros animales como los zorros pueden también actuar como huéspedes definitivos del parásito. Los humanos pueden ser infectado accidentalmente con larva migrans cutánea, aunque no pueden ser huéspedes definitivos (Saari et al., 2019, pp. 83-149).

2.2.6.3. *Clasificación Taxonómica*

Tabla 2-2: Clasificación Taxonómica de *A. caninum*

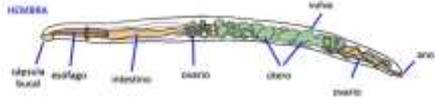
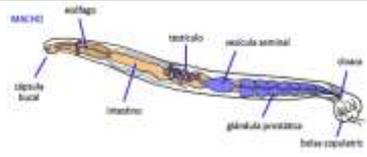
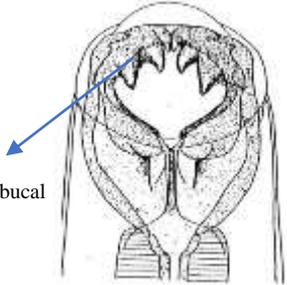
Taxonomía:	<i>Ancylostoma caninum</i>
Reino:	Animalia
Filo:	Nematoda
Clase:	Secernentea
Orden:	Strongylida
Familia:	Anclomuiosida
Género:	<i>Ancylostoma</i>
Especie:	<i>A. caninum</i>

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

2.2.6.4. Morfología de *Ancylostoma caninum*

- Adultos

Tabla 3-2: Morfología adulta de *Ancylostoma caninum*.

Hembra	Macho
14 - 16 mm	10 - 12 mm
	
Extremo anterior de Ancylostoma	Hembra adulta de <i>Ancylostoma caninum</i>
	

Fuente: (Saeed, 2003, párr. 1; Wheeler, 2018, párr. 1)

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

Las hembras de *Ancylostoma caninum* miden aproximadamente de 14 a 16 mm de largo y 0,5 mm de ancho, mientras que los machos son más pequeños, de 10 a 12 mm de largo y 0,36 mm de ancho y posee una cola puntiaguda. El extremo anterior se dobla dorsalmente para que la disposición de los lados ventral y dorsal del anquilostoma se invierta. En la cabeza del anquilostoma hay un área llamada cápsula bucal que contiene la boca y dientes. Ventralmente, hay un par de dientes, cada uno con tres puntas. En la profundidad de la cápsula hay un par de dientes dorsales triangulares y un par de dientes ventrolaterales. Los dientes del *Ancylostoma caninum* se encuentran en la cápsula bucal y se dividen en tres juegos. Dos conjuntos ventrales forman un equivalente de mandíbula inferior, mientras que un conjunto adicional se proyecta desde el lado dorsal y equivale vagamente a una mandíbula superior (Saeed, 2003, párr.4). Cada conjunto ventral tiene tres puntos, siendo los más alejados a los lados los más grandes. Mientras que los conjuntos ventrales son prominentes, el conjunto dorsal está oculto más profundamente en la cápsula bucal.

Si *Ancylostoma caninum* ingiere sangre recientemente presentara una coloración rojiza, si no, aparece gris. Posee un canal alimentario compuesto por un esófago, un intestino y un recto; el esófago es muy musculoso, lo que refleja su papel en la tracción de la mucosa intestinal hacia el cuerpo cuando se alimenta. Los anillos esofágicos y anales de *Ancylostoma caninum* son la fuente de las fibras nerviosas que se extienden por todo el cuerpo para inervar los órganos sensoriales, incluidos los anfidios y los fásmidos (Saeed, 2003, párr.2).

Posee dos tipos de larvas:

- **Rabditiforme:** de aproximadamente 300 μm x 17 μm . Son redondeadas en el extremo bucal con una abertura que se comunica con un esófago y un bulbo digestivo.
- **Filariforme:** del doble del largo mide unos 500 μm . Posee un esófago, el cual cubre una tercera parte de la extensión del cuerpo y termina en cola puntiaguda.

▪ *Huevo*

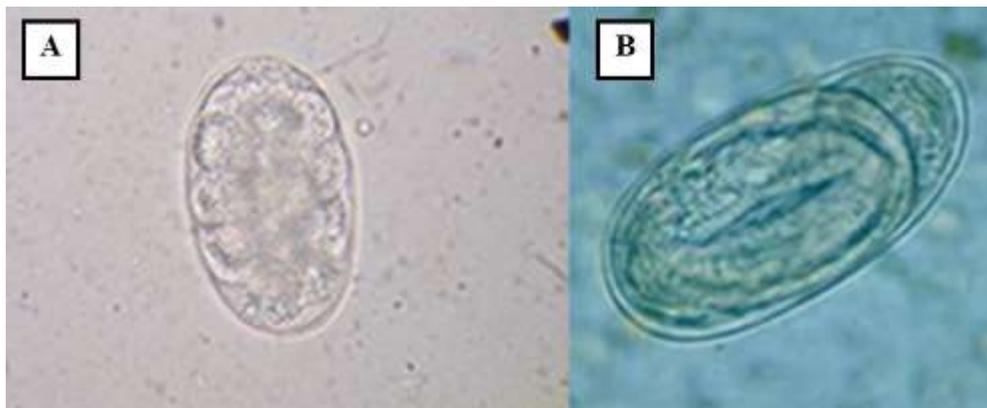


Ilustración 2-2: Morfología *Ancylostoma caninum* (A) huevo; (B) huevo larvado

Fuente: (Coello et al., 2019, pp. 1402-1406).

Los huevos son puestos por las hembras, típicamente cuando están en la etapa de ocho celdas, miden entre 38 y 43 μm de ancho, con paredes delgadas. Los huevos son ovalados, con extremos redondeados y presentan una cubierta delgada y muy transparente. Recién depositados, solo contienen un embrión en desarrollo formado por 2 a 8 células.

2.2.6.5. Ciclo biológico de *Ancylostoma caninum*

Ancylostoma caninum tiene un ciclo de vida directo. Los huevos salen en las heces al medio ambiente donde eclosionan y se desarrollan en un ambiente favorable que es ligeramente arenoso, con bastante humedad y oxígeno; la temperatura óptima es entre 20- 30°C donde mudan a larvas; la primera larva se desarrolla en un día, al alimentarse por bacterias para llegar al segundo estado larvario (ambas poseen esófago rabditiforme). Continúa alimentándose y muda para dar lugar al

tercer estado larvario, esta conserva la muda de la segunda larva, que le sirve de protección y ya no sea alimentada; esto sucede en 22 días a temperatura de 15°C o en dos a cinco días a 20 ° a 30° C (Saari et al., 2019, pp. 83-149).

La larva 3 logra infestar al huésped por vía cutánea o por vía oral, al tragar la larva, o a su vez la larva penetra en la piel, generalmente entre los dedos de los pies. Un huésped paraténico también puede servir como fuente de infección, o los cachorros pueden infectarse leche de perra, una vez que las etapas de larvas hipobióticas latentes han volverse activo. Posteriormente sigue la ruta linfática para llegar al corazón y pulmones, en donde a través de los capilares pasa a los alvéolos, sigue su migración por bronquiolos, bronquios, tráquea y faringe en donde es deglutida al intestino, y se produce la última muda y la maduración que tiene lugar después de un breve período de permanecer en la pared intestinal que tarda desde dos días hasta una semana (Saari et al., 2019, pp. 83-149).

Los anquilostomas son chupadores de sangre. Agarran la mucosa del intestino con sus partes orales, cuando las estructuras dentales ya está crecido, cambian de sitio de succión con un intervalo de unas pocas horas; el período de prepatente es de 2 a 3 semanas dependiendo de la edad de los perros, después de lo cual millones de óvulos se secretan en las heces diariamente durante varias semanas y el período patente comprende de 6 a 12 meses (Saari et al., 2019, pp. 83-149). El ciclo de vida ilustrado de *Ancylostoma caninum* se presenta a continuación:

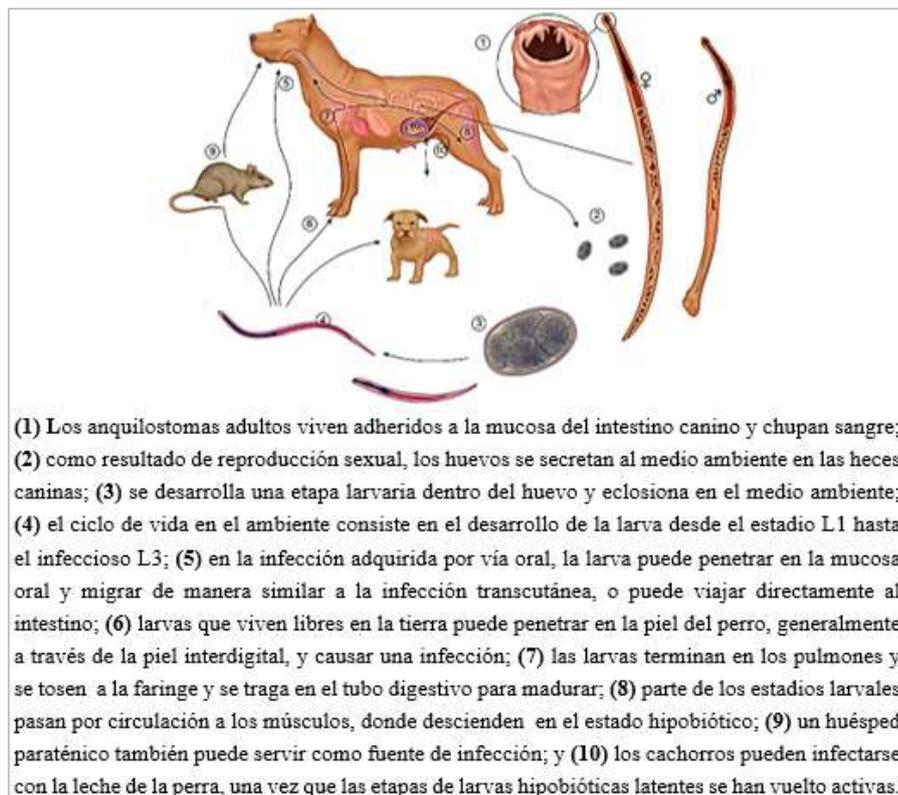


Ilustración 3-2: Ciclo de vida de *Ancylostoma caninum*

Fuente: (Saari et al., 2019, pp. 83-149; Furtado & Dias, 2020, pp. 1-7).

2.2.6.6. Formas de transmisión

Tabla 4-2: Formas de transmisión del *Ancylostoma caninum*

Vía oral	Vía transcutánea	Huésped paraténico	A través de la leche
Las larvas pueden ser ingeridas pasar por la mucosa y migrar de manera similar a la infección transcutánea, o puede ir directamente al tubo digestivo, donde la maduración tiene lugar después de un breve período de permanecer en la pared intestinal.	Las larvas que viven libres en la tierra pueden penetrar en la piel del perro, generalmente a través de la piel interdigital, y causar la infección.	Un hospedador intermedio como la rata o el ratón también puede servir como fuente de infección.	Los cachorros pueden infectarse con la leche de la perra, los cuales llegaron a los pulmones y no prosiguieron su camino hacia el intestino, sino migran hacia los músculos donde permanecen aletargados y una vez activas causan la infección.

Fuente: (Saari et al., 2019, pp. 83-149).

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

2.2.6.7. Patogenia en caninos causador por *Ancylostoma caninum*

Los cachorros son los más gravemente afectados debido a enfermedades agudas o crónicas, pérdida de sangre y anemia. Dado que un gusano chupa alrededor de 0,1 ml sangre al día, una infección grave puede conducir rápidamente a la anemia. Además, *Ancylostoma caninum* secreta anticoagulantes, que exacerba la pérdida de sangre, sumado a que los gusanos cambian con frecuencia el sitio de succión. Debido a los anticoagulantes, el sangrado continúa, aunque el gusano haya abandonado el sitio. Un solo gusano puede consumir hasta 0,1 ml de sangre en 24 h, llegando a absorber en conjunto hasta 10mL de sangre solo en 1 día a la vez que producen alrededor de 600 heridas que continuaran sangrando. Las infecciones causan hemorragia y anemia debido a la pérdida de sangre eso puede ser sustancial, e incluso fatal, a menudo se observan diarrea y vómitos, así como palidez de las mucosas (membranas mucosas, por ejemplo, las encías), debilidad, apatía y pelaje seco y opaco (Saari et al., 2019, pp. 83-149).

En perros adultos, la infección es suele ser menos grave y la médula ósea es capaz de compensar la pérdida de sangre durante mucho tiempo. Al final, la deficiencia de hierro y la anemia correspondiente pueden manifestarse.

Los cachorros pequeños son propensos a la diarrea, que puede ser sangriento. Los signos pulmonares son causados por la migración larvas en el pulmón o la falta de oxígeno causada por la anemia. En la infección transcutánea, las áreas de la piel expuestas a larvas la migración puede infectarse y sufrir ulceración, especialmente si el perro ha sido previamente sensibilizado al parásito. En la infección crónica, el estado general del perro y el abrigo de piel se deteriora, el peso disminuye y el apetito es pobre. Pica (comer objetos inusuales) puede manifestarse. Las formas larvarias transcutáneas pueden causar eritema, prurito y pápulas, especialmente en la piel entre dedos de los pies. Los signos generalmente se resuelven espontáneamente alrededor de 5 días. después de que hayan aparecido.

- *Manifestaciones clínicas*

Dentro de las manifestaciones clínicas características y a menudo mortales de la infección por *Ancylostoma caninum* en perros jóvenes es la presencia de anemia normocrómica y normocítica aguda, seguida por una hipocromía y macrocitosis. Los cachorros con pueden presentar anemia con diarrea sanguinolenta o melenas. Otros signos clínicos incluyen letargo, anorexia, deshidratación, vómitos y poco aumento de peso. Estos signos son el resultado directo del consumo de sangre y fluidos corporales por parte de los gusanos. Las larvas infecciosas (L3) se ingieren del medio ambiente y se desarrollan directamente en el tracto intestinal (Nemzek & Lester, 2015, pp. 511).

La infiltración prenatal y de calostro puede causar anemia severa, seguida de coma y muerte dentro de las tres semanas posteriores al nacimiento. En animales susceptibles, la condición puede ser aguda y rápida, o incluso fatal, aunque otros pueden desarrollar cierto grado de resistencia a los efectos de la infección. El síntoma clínico más evidente es la anemia con retención de líquidos, a veces hinchazón, debilidad general y emaciación. En las últimas etapas de la enfermedad, los cambios en la sangre pueden incluir eosinofilia, la tasa de crecimiento disminuye y el cabello se vuelve seco y áspero (Nemzek & Lester, 2015, pp. 512).

2.2.7. Zoonosis de *Ancylostoma caninum*

El *Ancylostoma caninum* puede ser patógeno para los humanos. Las larvas del tercer estado larvario (L3) pasadas transcutáneamente pueden causar una condición llamada larva migrans cutánea (CLM). En las primeras etapas, una lesión pequeña, rojiza y protuberante se observa con mayor frecuencia en la piel del pie o la espinilla (áreas en contacto con el suelo), desde donde la larva comienza a migrar formando lesiones sinuosas, eritematosas y pruriginosas en la piel, las denominadas rastreras erupción.



Ilustración 4-2: Lesiones causadas por larvas migrans de *Ancylostoma caninum*

Fuente: (Saari et al., 2019, pp. 83-149).

Las lesiones normalmente se recuperan sin tratamiento en unos meses. En algunos casos raros, el canino *Ancylostoma* puede lograr migrar al intestino humano y para inducir enteritis eosinofílica. El anquilostoma canino es, sin embargo, incapaz de producir gusanos reproductores en el intestino humano.

Clásicamente, las larvas de *A. braziliense* y *Ancylostoma caninum* han sido caracterizadas como agentes etiológicos de infecciones cutáneas en humanos conocidas como larva migrans. Particularmente el *Ancylostoma caninum* tiene la capacidad de causar enteritis eosinofílica en humanos, y ha habido informes sobre el parasitismo natural de gusanos adultos de esta especie en intestinos humanos. Sin embargo, ninguno de estos estudios ha informado gusanos sexualmente maduros, por lo que nunca se ha detectado la producción de huevos. De hecho, las infecciones experimentales en humanos con *Ancylostoma caninum* provocaron dolor abdominal intermitente y eosinofilia, pero no se observaron huevos en las heces en ningún momento. Sin embargo, George y colaboradores detectaron ADN de *Ancylostoma caninum* en heces humanas, lo que sugiere que el papel de los animales como reservorios de anquilostomas en humanos puede estar subestimado y debe investigarse (Furtado y Dias, 2020, pp. 1-7).

2.2.7.1. Características clínicas

La inflamación empieza a las pocas horas de la infección cuando se presenta una dermatitis “inespecífica”. En cuestión de días a meses las larvas comienzan a migrar produciendo las características lesiones: una erupción serpiginosa eritematosa (creeping eruption) en forma de canales únicos o múltiples, ondulados y ligeramente elevados de 2 a 5 mm de ancho que avanza a una velocidad promedio de 1 a 3 cm al día. Este labrado intradérmico genera intenso prurito y edema por lo que no es raro encontrar una impetiginización secundaria a las excoriaciones (Sánchez & Salazar, 2021, pp. 2-8).

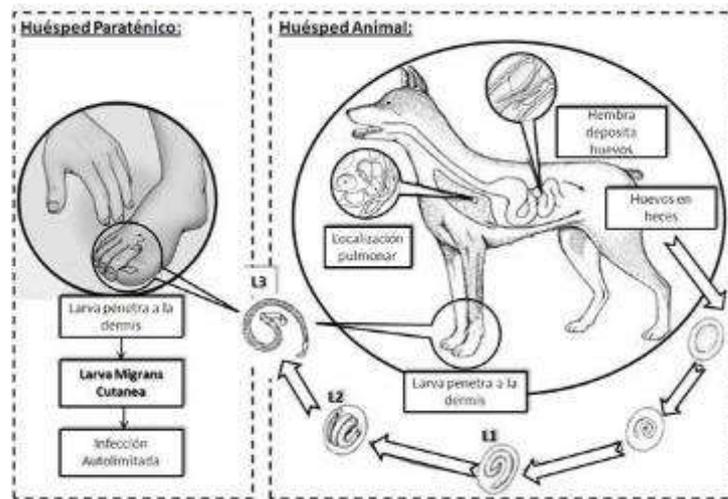


Ilustración 5-2: Caso clínico: larva migrans cutánea

Fuente: (Sánchez & Salazar, 2021, pp. 2-8).

2.2.8. Diagnóstico

El diagnóstico se realiza mediante la identificación de huevos o larvas por distintos métodos ya sea a nivel de laboratorio por técnicas de flotación fecal, examen coproparasitario o técnicas moleculares, así como diagnóstico post-mortem y diferencial.

2.2.8.1. Diagnóstico de laboratorio

El cuadro clínico compatible con anquilostomiasis permite realizar un diagnóstico subjetivo; por otro lado, la observación de huevos en las heces y la asociación con el cuadro de anemia permite confirmarlo. Se recomienda utilizar técnicas de flotación y determinar el valor de hematocrito, grado de anemia, estado general y síntomas. Además, para identificar *Ancylostoma caninum* se puede realizar cultivos de larvas e identificación microscópica.

- **Prueba directa:** es una técnica que permite identificar la presencia de parásitos en heces son frescas utilizando solución salina o lugol en un portaobjetos y se observa bajo un microscopio.
- **Método flotación:** puede ser cualitativo o cuantitativo, puesto que permite identificar las especies parasitarias y determinar el grado de infección. Básicamente los huevos de los parásitos son separados de las masas fecales utilizando soluciones de peso específico elevado.
- Las infecciones por anquilostomiasis también se pueden diagnosticar mediante técnicas moleculares cuando es necesario diferenciar entre especies, producen resultados rápidos y fiables (Inácio & Gomes, 2021, pp. 4-6).

2.2.8.2. *Diagnóstico post mortem*

El diagnóstico post mortem es simple, se lo realiza observando cambios intestinales y la presencia de múltiples formas adultas del parásito. Además, la anemia y la caquexia son muy pronunciadas, a menudo se observan edema y ascitis. El hígado es de color marrón claro y graso. El contenido del intestino es hemorrágico, la mucosa a menudo está inflamada, cubierta de moco y tiene numerosas picaduras de gusanos pequeños, adheridos a la mucosa o a veces libremente de color gris o rojizo dependiendo de la cantidad de sangre en los intestinos (Inácio & Gomes, 2021, pp. 4-6).

2.2.8.3. *Diagnóstico diferencial*

Evidenciar presencia de anemia, dermatitis, acompañado de síntomas similares a infección por *Toxocara ssp.*

2.2.9. *Tratamiento de Ancylostoma caninum*

2.2.9.1. *Tratamiento en canes*

Los medicamentos que actúan contra las infecciones por nematodos se componen de un amplio índice terapéutico, con una actividad, ya sea que se administre por vía oral o parenteral. Entre los medicamentos de elección se tiene:

- **Pamoato de pirantel:** es el antihelmíntico de elección porque es más seguro en animales jóvenes enfermos, con una eficacia del 95% contra los anquilostomas corrientes incluido el *Ancylostoma caninum* que actúa provocando un bloqueo neuromuscular; se utiliza por lo general dosis única de 5 mg de base/kg de peso. Sin embargo, para cachorros, no es tan eficaz por lo que se recomienda una dosis más elevada (15 mg/kg) después de una comida ligera (Nemzek & Lester, 2015, pp. 511).
- **Febantel:** es un antihelmíntico de amplio espectro autorizado para combatir al *Ancylostoma caninum*, la dosis recomendada es de 10 mg/kg diarios por 3 días seguidos. Se puede combinar con el praziquantel (5 mg) y con pamoato de pirantel (5 mg) para una mayor eficiencia.
- **Levamisol:** es un medicamento capaz de eliminar el 95% de *Ancylostoma caninum*, el tratamiento se lo realiza por vía oral a dosis de 10 mg/kg/día por 2 días o inyectable con una dosis de 5.5 mg/kg/día cada 15 días.
- **Ivermectina:** según estudios se ha visto una eficacia alta en la reducción de la transmisión prenatal y transplacentaria de *Ancylostoma caninum*, en las perras tratadas 10 días antes y 10 días después del parto con 0.5 mg/kg (Jiménez, et al., 2020, pp. 22-27).

2.2.9.2. Tratamiento en humanos

La enfermedad es autolimitada; sin embargo, si la infección es local, se puede probar primero con una solución tópica de tiabendazol 10% o un ungüento al 15%. La crema se aplica de 2 a 3 veces al día durante 5 -10 días. Pequeños estudios han demostrado que la mejora del prurito puede ocurrir tan pronto como 48 horas después de comenzar el tratamiento, y se han logrado tasas de curación de hasta el 98% en diez días. La mayor ventaja de la terapia tópica es la falta de absorción sistémica y los efectos secundarios. Aun así, el uso está limitado por múltiples aplicaciones diarias y la utilidad es menos valiosa con múltiples lesiones (Jiménez, et al., 2020, pp. 22-27).

Para lesiones múltiples o infestación severa, el albendazol y la ivermectina son terapias sistémicas de primera línea. El albendazol oral, 400 mg al día durante 3 a 5 días, es muy eficaz con tasas de curación cercanas al 100%. Algunos estudios muestran que un curso de 7 días de albendazol puede disminuir las tasas de enfermedad recurrente. La ivermectina oral también es eficaz y su ventaja es que el paciente solo tiene que tomar una dosis única de 12 mg por vía oral. Tasas de curación cercanas al 100% con la administración de ivermectina (Nemzek & Lester, 2015, pp. 511).

El mebendazol es otro agente antihelmíntico; sin embargo, tiene poca biodisponibilidad, absorción y, en consecuencia, poca eficacia y no debe usarse como medicamento de primera línea.

2.2.10. Técnicas de biología molecular

Con el objetivo de mejorar la especificidad, sensibilidad y la rapidez de las técnicas diagnósticas tradicionales, en la lucha contra las enfermedades infecciosas y gracias a las nuevas investigaciones y la necesidad de diagnósticos eficientes y oportunos, surge las técnicas de biología molecular, aplicada a programas de prevención, control y tratamiento. Entre las alternativas diagnósticas propuestas se tiene técnicas como la PCR; La hibridación del ADN de muestra; secuenciación de genes; secuenciación paralela, también conocida como secuenciación de próxima generación (NGS); pirosecuenciación; Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD); y longitud del fragmento de restricción Polimorfismo (RFLP), cuya introducción en laboratorios tiene por objeto obtener resultados confiables (Merchán & Tórrres, 2017, pp. 1110-1111).

Hay otras técnicas moleculares que han contribuido significativamente a la investigación como la transformación bacteriana, transfección, integración cromosómica, cribado celular, cultivo celular. Además, los Marcadores RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico), que se basan en PCR; debido a su existencia, la detección de los existentes polimorfismos en la secuencia de ADN bajo estudio y RFLP (Longitud del fragmento de restricción polimorfismos) es posible, que expresan la diferencias entre individuos en ADN específico secuencias que son reconocidas por diferentes enzimas que cortan esas secuencias y dan lugar (Merchán & Tórrres, 2017, pp. 1110-1111).

2.2.10.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa ha sido la principal herramienta de diagnóstico que ha aprovechado la bondad de la biología molecular, llegando al punto de alcanzar gran versatilidad como técnica de análisis. La especificidad, eficiencia, y precisión de la PCR está directamente influenciada por las diferentes componentes que lo integran como mezcla de reacción, régimen de ciclo y ADN polimerasa; la técnica permite la amplificación selectiva de cualquier segmento de ADN, conocer las secuencias que la flanquean, y obtener una secuencia de ADN concreta sin recurrir a clonación en un organismo huésped (Garibyan & Avashia, 2013, pp.1-4).

La PCR es un ensayo enzimático simple, que permite la amplificación de un fragmento de ADN específico de un conjunto complejo de ADN. El Dr. Kary Mullis, quien descubrió el ensayo de PCR, afirmó que “le permite elegir el trozo de ADN que le interesa y tener tanto como quiera”. La PCR se puede realizar utilizando ADN de una variedad de tejidos y organismos, incluidos sangre periférica, piel, cabello, saliva y microbios, solo necesitan pequeñas cantidades de ADN para que la PCR genere suficientes copias para ser analizadas utilizando métodos de laboratorio convencionales. Por esta razón, la PCR es un ensayo sensible (Garibyan & Avashia, 2013, pp.1-4).

Sus aplicaciones son variables e ilimitadas, por ejemplo, da la posibilidad de hacer expresiones genéticas, secuenciación directa de secuencias amplificadas, detección de mutaciones, seguimiento de la eficacia en el tratamiento de enfermedades, diagnósticos genéticos y llevar a cabo sofisticados estudios cuantitativos y genómicos de una manera rápida y muy sensible; y en ciencias forenses, se utiliza en la identificación de residuos biológicos, determinación de paternidad y pruebas periciales en criminalística (Merchán & Torres, 2017, pp. 1110-1111).

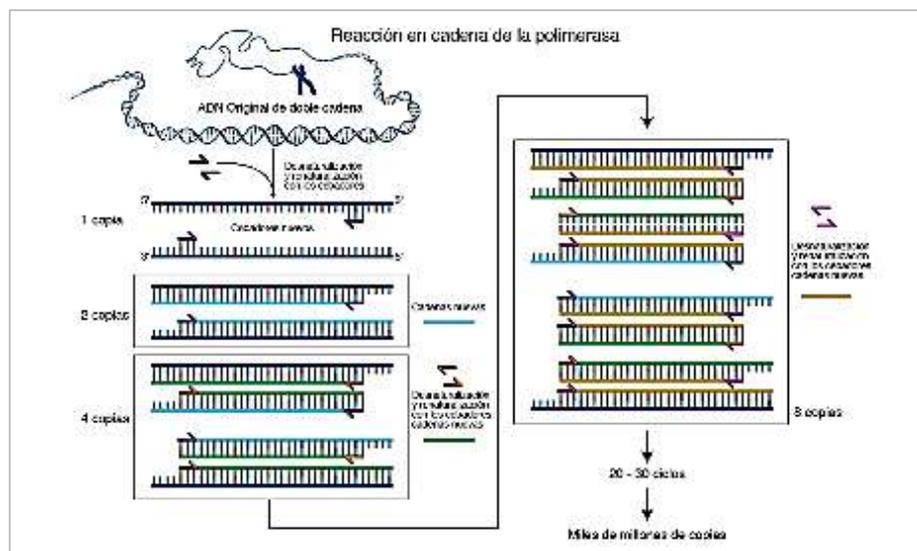


Ilustración 6-2: Principio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Fuente: (Biesecker, 2021, párr.1)

2.2.11. Caracterización molecular por PCR y tipos de PCR

La secuenciación del ADN consiste en determinar la orden de bases A, C, G y T en un fragmento de ADN; este método fue descrito por Sanger en 1977, y permite obtener la secuencia de un determinado fragmento de ADN, un gen o una parte de éste, para ser utilizado en la actualidad. La caracterización molecular por PCR se basa en la amplificación de secuencias de ADN intergénicas repetidas presentes en genomas de microorganismo u otros, que permitiendo amplificar el material genético del agente etiológico y facilitar su observación, obteniéndose los resultados en menor tiempo que con las técnicas convencionales. Actualmente existe una amplia variedad de PCR para la detección de protistas y helmintos entéricos tales como:

Tabla 5-2: Tipos de PCR

Tipos de PCR	Característica	Aplicación
PCR estándar	Amplificación de un segmento de ADN utilizando dos cebadores. La detección de la amplificación es mediante geles de agarosa o poliacrilamida empleados para las observaciones de regiones pequeñas en número de pares de bases.	Detección cualitativa de un segmento de ADN
PCR anidada	En esta variante el producto de amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con iniciadores que se van a ubicar dentro de la primera secuencia amplificada.	Detección cualitativa de un segmento de ADN, altamente sensible y específico.
PCR in situ	Los productos generados a partir de muestras biológicas como secreciones y tejidos pueden visualizarse en el sitio de amplificación, y permiten la detección de cantidades pequeñas de material genético.	
PCR Múltiple	Amplificación de dos o más segmentos de ADN utilizando varios partidores en una sola reacción de amplificación. La detección de la amplificación se visualiza mediante geles de agarosa.	Detección cualitativa de varios segmentos de ADN en una sola reacción de PCR
PCR - RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)	PCR estándar con paso posterior de digestión con enzimas de restricción.	Detección de polimorfismos tipo RFLPs.
PCR con transcriptasa inversa (RT - PCR)	Este tipo de PCR utiliza como molde inicial el ARN y se requiere una transcriptasa inversa para realizar la conversión del ARN a un tipo de ADN llamado ADNc (ADN complementario)	Expresión de genes. Detección de virus ARN

PCR - RT (Real Time) o qPCR	PCR estándar donde se utilizan funciones o sondas con fluoróforos para la detección de los fragmentos amplificados; puede ser del tipo múltiple	Detección cualitativa de uno o varios segmentos de ADN. Cuantificación de ADN en la muestra (cargas) o expresión de genes.)
------------------------------------	---	---

Fuente: (Merchán & Tórres, pp. 1110-1111 2017; Yu & Cao, 2017, pp. 2-5)

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

2.2.12. Secuenciación Sanger

También llamada método de terminación de cadena, es una técnica para la secuenciación de ADN que se fundamenta en la incorporación selectiva de didesoxinucleótidos de terminación de cadena (ddNTP) por la ADN polimerasa. Esta técnica molecular fue desarrollada por Frederick Sanger y sus colegas en el año 1977, la cual se sigue empleando en la investigación clínica moderna debido a sus capacidades rendimiento y costos más bajos por muestra, además posee una precisión del 99,99% siendo el "estándar de oro" para la investigación clínica y secuenciación en las diferentes investigaciones (Berger & Parson, 2012, pp. 331-348).

2.2.12.1. Fundamento de la Secuenciación Sanger

La secuenciación de Sanger comienza con la desnaturalización del ADN de doble cadena. Luego, el ADN monocatenario reconoce los cebadores de oligonucleótidos y se alarga usando una mezcla de trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP), que proporcionan los nucleótidos de adenina (A), citosina (C), timosina (T) y guanina (G) necesarios para construir la nueva estructura de doble cadena. Además, una pequeña cantidad de trifosfato de didesoxinucleótido terminador de cadena (ddNTP) para cada nucleótido está incluido. La secuencia continuará extendiéndose con dNTP hasta que se adjunte un ddNTP. Cada uno contiene un marcador fluorescente. Cuando se une un ddNTP a la secuencia de elongación, la base emitirá fluorescencia según el nucleótido asociado. Por convención, A se indica con fluorescencia verde, T con rojo, G con negro y C con azul. Un láser dentro de la máquina automatizada utilizada para leer la secuencia detecta una intensidad fluorescente que se traduce en un "pico". Cuando se produce una variante heterocigota dentro de una secuencia, dos colorantes fluorescentes de igual intensidad capturarán los loci. Cuando está presente una variante homocigótica, el color fluorescente esperado se reemplaza completamente por el color del nuevo par de base (Gomes y Korf 2018, pp. 47-64).

En resumen, la técnica que da como resultado la formación de productos de extensión de varias longitudes terminados con didesoxinucleótidos en el extremo 3'. Luego, los productos de extensión se separan mediante electroforesis capilar, tal como se lo muestra en la ilustración 7 – 2:

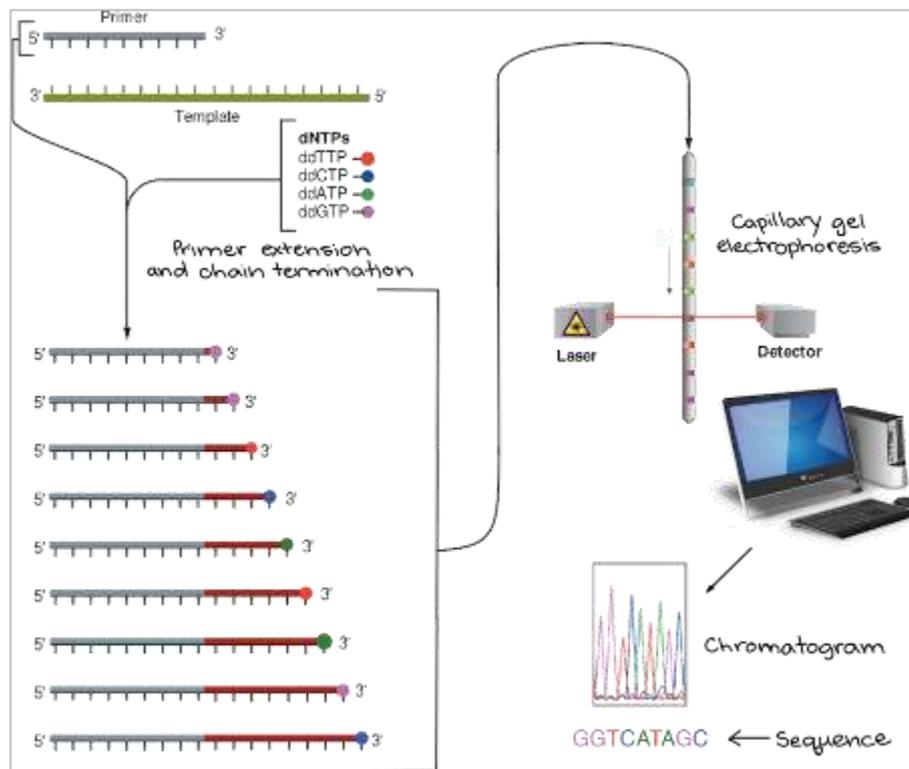


Ilustración 7-2: Secuenciación de Sanger

Fuente: (Berger y Parson, 2012, pp. 331-348).

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Enfoque de investigación

3.1.1. Enfoque cualitativo

Se entiende por enfoque cualitativo a la observación y valoración del fenómeno estudiado, hasta llegar a conclusiones veraces, mediante la ejecución de descripciones, y puntos de vista del investigador (Otero, 2018, pp.10-15).

El presente Trabajo de Integración curricular bajo este enfoque permitió realizar la recolección de datos cualitativos y muestras de los canes del Refugio-Santuario PAE, para su posterior estudio mediante técnicas coproparasitarias y moleculares, que permitieron obtener resultados que fueron analizados de manera comparativa y explicativa hasta llegar a emitir conclusiones.

3.1.2. Enfoque cuantitativo

Este enfoque se centra en aplicar dentro de una investigación, medidas numéricas, además la observación del proceso que involucra la recopilación de datos y análisis para llegar responder las preguntas de investigación planteadas, haciendo uso parámetros estadísticos (Otero, 2018, pp.10-15).

El presente Trabajo de Integración curricular bajo este enfoque permitió realizar el análisis estadístico descriptivo una vez realizada la recolección de datos y muestras de heces de caninos, mediante la obtención frecuencias y estadígrafos de la población canina en cuanto a su edad, sexo, raza, y niveles de parasitosis.

3.2. Nivel de Investigación

3.2.1. Descriptiva

Según (Galarza 2020, pp.1-5) este nivel de investigación se basa en la descripción del fenómeno de estudio de manera cuantitativa donde se emplean análisis de datos de dispersión y tendencia central, a la vez que se centra en el estudio cualitativo en la descripción de características de una situación o fenómeno, respondiendo a las preguntas de dónde, qué, quiénes, cuándo y cómo. En el Trabajo de Integración curricular se empleó la indagación de la presencia de parásitos en heces de una población de caninos, proporcionando su descripción.

3.2.2.Exploratoria

Según (Galarza 2020, pp.1-5) en este alcance es aplicada a aquellos fenómenos que no se han investigado previamente y se tiene el interés de averiguar sus características. Por lo que se debe comenzar explorando el fenómeno hasta tener un primer acercamiento en la comprensión de lo que se estudia.

Para el presente Trabajo de Integración Curricular se aplicó este nivel de investigación para caracterizar molecularmente al parásito zoonótico *Ancylostoma caninum* dado que no existen estudios previos a nivel regional que muestren la presencia de este patógeno en caninos a escala molecular.

3.3. Diseño de investigación

3.3.1. Según la manipulación o no de la variable independiente

Para el desarrollo de este estudio no se realizó la manipulación de variables.

3.3.2.Según las intervenciones en el trabajo de campo

Para el desarrollo de este Trabajo de Integración Curricular se realizó estudios de campo en un lugar específico, donde se recolectó los datos y muestras de heces de caninos para su respectivo análisis orientado a demostrar la prevalencia de parasitosis y la caracterización molecular del parásito *Ancylostoma caninum*.

3.4. Tipo de estudio

El presente trabajo Trabajo de Integración Curricular posee un enfoque no experimental, de tipo:

- **Bibliográfica y documental:** debido a que se recopiló la información de documentos como: libros, artículos científicos, videos, conferencias, además fuentes de información secundarias, a fin de guiar el estudio con datos existentes y realizar análisis comparativos de los resultados.
- **Descriptivo:** debido a que se indaga la presencia de parásitos en heces de una población de caninos, proporcionando su descripción.
- **Transversal:** dado que los datos se recolectan en un solo momento, en un tiempo único y no involucran un seguimiento a través del tiempo.

- **De campo:** debido a que se realizó en un lugar específico, donde se recolectó heces caninas para su respectivo análisis orientado a demostrar la prevalencia de parasitosis y la caracterización molecular del parásito *Ancylostoma caninum*.

3.5. Lugar de la investigación

La investigación se llevó a cabo en caninos callejeros alojados en el Refugio-Santuario PAE de la ciudad de Riobamba, durante los meses de abril-septiembre del año 2022.



Ilustración 1-3: Mapa de las ubicaciones del Refugio-Santuario PAE de la ciudad de Riobamba.

Fuente: Google maps, 2022

El procesamiento de las muestras y el análisis coproparasitario se efectuaron en el Laboratorio de Análisis Clínico y Parasitológico de la Facultad de Ciencias en la ESPOCH; mientras que la caracterización molecular por PCR y Secuenciación Sanger se llevó a cabo en el laboratorio BioSin Biociencias Quito-Ecuador, lugar donde se proporciona los equipos necesarios para el desarrollo de las técnicas moleculares.

3.6. Población de estudio

La población estuvo comprendida por 120 caninos alojados en el Refugio-Santuario PAE de la ciudad de Riobamba, durante los meses abril-mayo del año 2022, a los cuales se consideraron para el estudio según las siguientes características:

- Caninos que pertenecientes al Refugio -Santuario PAE.
- Caninos cachorros y adultos.
- Caninos de cualquier raza.

3.7. Metodología

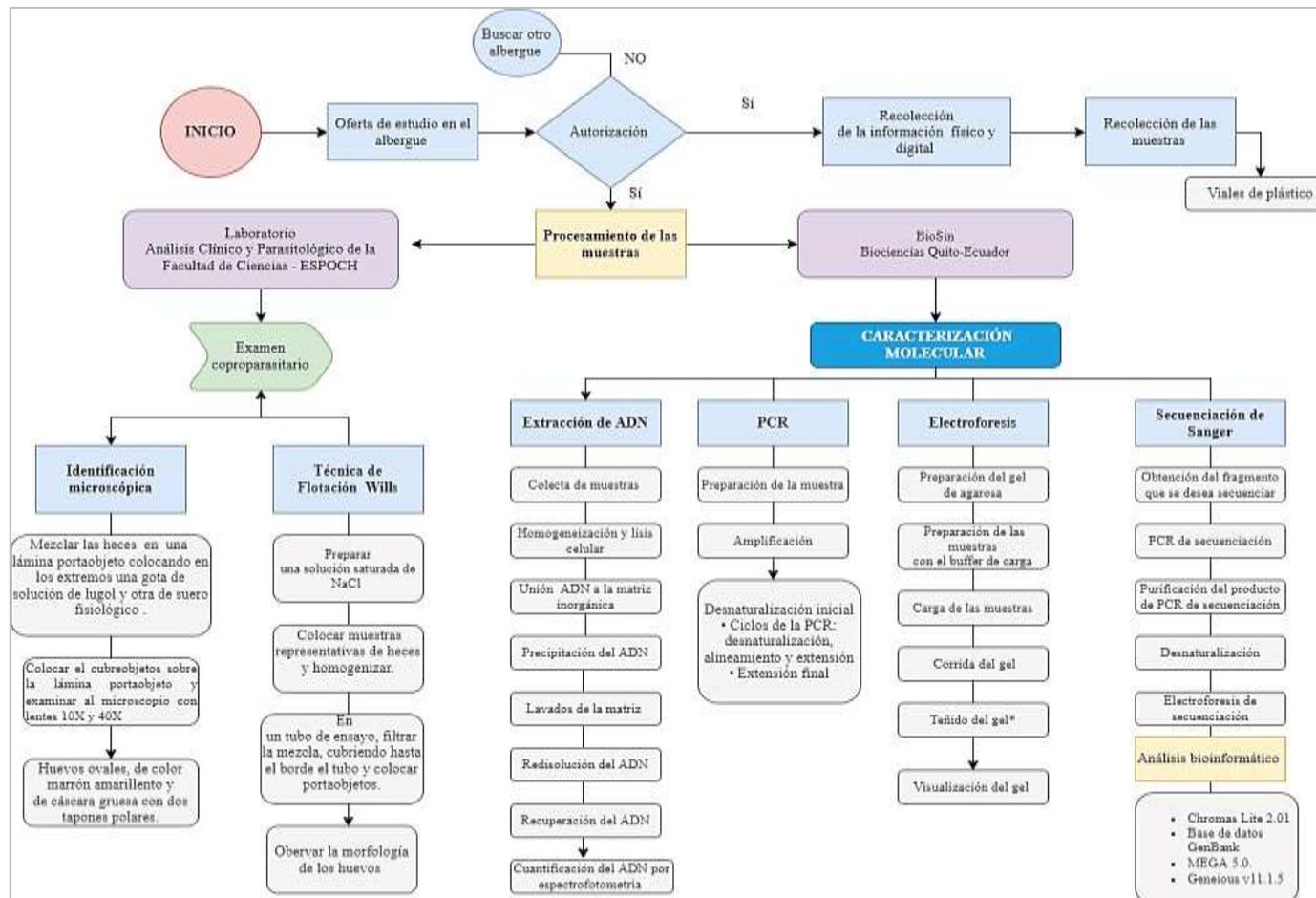


Ilustración 2-3: Metodología general utilizada en la caracterización molecular y prevalencia de *A. caninum*.

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

3.8. Métodos, técnicas e instrumentos de investigación

3.8.1. Recolección y transporte de muestras

Para la recolección de las muestras se acudió al refugio Santuario PAE a las 6:30 am, realizando el registro por cada canino, identificando el sexo, raza, edad aproximada, fecha de recolección y una vez obtenidas las muestras de heces transportándolas en un cooler con gel refrigerante al Laboratorio de Análisis Clínico y Parasitológico de la ESPOCH, lugar en donde se procedió inmediatamente a ejecutar el análisis coproparasitario.

3.8.2. Análisis coproparasitario directo

Para obtener datos de la prevalencia de parásitos y detectar la presencia de huevos de *Ancylostoma caninum*, se realizó un examen microscópico directo mediante la observación de las heces en cloruro de sodio saturado (suero fisiológico) y lugol (Instituto Nacional de Salud, 2016, pp. 271-278).

3.8.2.1. Procedimiento

- Preparar las láminas portaobjetos y cubreobjetos etiquetándolas.
- En un extremo del portaobjetos colocar una gota de suero fisiológico y en el otro extremo la solución yodurada de lugol.
- Tomar una muestra representativa de heces con palillo considerándose su consistencia, color, olor, presencia de mucosas, sangre, coágulos, cuerpos extraños y parásitos o partes de ellos.
- Mezclar con ambas soluciones primero en suero y colocar el cubreobjetos.
- Observar bajo el microscopio la presencia de parásitos con los lentes objetivos de 10x y 40x comenzando en el ángulo superior izquierdo del cubreobjeto.

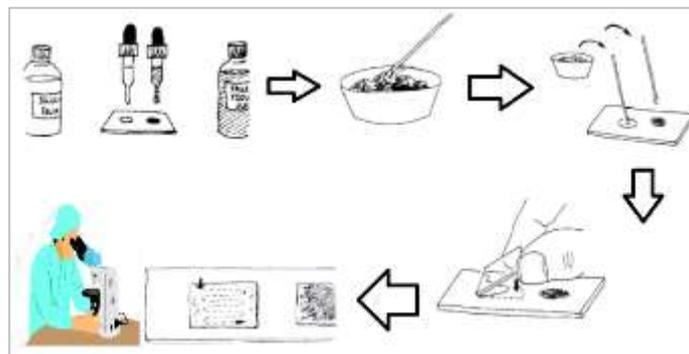


Ilustración 3-3: Análisis coproparasitario directo.

Fuente: (Instituto Nacional de Salud, 2016, pp. 271-278)

3.8.3. Determinación de parásitos por el método de flotación de Wills

Para realizar un adecuado diagnóstico de parásitos caninos como el *Ancylostoma caninum* es recomendable utilizar la técnica de flotación fecal, uno de ellos es el desarrollado por Willis en 1921, que describe un método basado en la propiedad que tienen las soluciones de densidad mayor de hacer flotar objetos menos densos, es recomendado específicamente para la investigación de protozoarios y helmintos, consiste en la preparar la materia fecal con solución saturada de cloruro de sodio (Universidad Continental, 2018, pp. 24-25).

3.8.3.1. Procedimiento

- Pesar 165,5 g de $\text{NaCl}_{(s)}$
- Preparar una solución saturada de NaCl (165,5 g de $\text{NaCl}_{(s)}$ en 500 mL de agua destilada en caliente).
- Colocar 3 g de muestra representativa de heces y homogeneizar.
- Colar la muestra en un vaso de precipitación.
- En un tubo de ensayo, filtrar la mezcla, cubriendo hasta el borde el tubo.
- Colocar un portaobjetos sobre el tubo de manera que el líquido haga contacto con la lámina y esperar 20 minutos.
- Colocar una gota suero fisiológico o lugol en el portaobjetos y colocar el cubreobjetos.
- Examinar la muestra al microscopio con el objetivo 40x, en busca de quistes o huevos.



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

Fuente: (Instituto Nacional de Salud, 2016, pp. 271-278)

3.8.4. Análisis molecular

Para la caracterización molecular, las muestras fecales microscópicamente positivas para *Ancylostoma caninum*, se sometieron a los procedimientos moleculares.

3.8.4.1. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Técnica que consiste en una reacción enzimática que permite la amplificación de fragmentos de ADN de hasta varios miles de pares de bases mediante ciclos repetitivos de tres reacciones llevadas a cabo a distintas temperaturas de incubación en un termociclador:

- a. **Desnaturalización:** se lleva a cabo a temperaturas elevadas (90-95 °C) para romper los puentes de hidrogeno que mantienen unida la doble cadena de ADN
- b. **Hibridación:** requiere temperaturas más bajas, entre 50-60 °C, y consiste en la unión de los cebadores a las secuencias complementarias en los extremos de la región a amplificar.
- c. **Extensión (polimerización):** se lleva a cabo de 68 a 72 °C, temperatura de máxima actividad de la taq polimerasa, que empieza a sintetizar nuevo ADN, en dirección 5'-3' (Lorenz, 2012, pp. 2-6).

3.8.4.2. Extracción de ADN genómico

El ADN se extrajo directamente de las muestras fecales utilizando un kit comercial de extracción de ADN, QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Alemania), de acuerdo con los protocolos del fabricante (QIAGEN, 2020, pp. 22-23).

▪ Procedimiento

- a. Se tomó 200 mg de la muestra de heces frescas.
- b. Se agregó 1 ml de tampón ASL (solución tampón de lisis) en un tubo de 2mL y se homogenizó en un vortex continuamente durante 1 min, y se dejó reposar por 10 minutos.
- c. Se centrifugó a 13000 rpm, la muestra durante 3 min para sedimentar las partículas de heces, una vez obtenido el sobrenadante se transfirió 200 µl a un microtubo de 1.5 mL.
- d. Se pipeteó 15 µl de proteinasa K y se añadió 200 µl de tampón ASL y se agitó en el vortex durante 15 s.
- e. Inmediatamente se incubó a 70°C durante 10 min.
- f. Se centrifugó brevemente para eliminar las gotas del interior de la tapa del tubo.
- g. Se agregó 200 µl de etanol al 96 % al lisado y se mezcló con vortex.

- h. El volumen total del lisado se transfirió a la columna de silica QIAamp insertada dentro de un tubo de colección de 2 mL. Se cerró la tapa y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min para después colocar la columna de silica QIAamp en un recipiente nuevo de 2 ml.
- i. Se abrió con cuidado la columna de silica QIAamp, se añadió 500 µl de tampón AW1, después se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min y posteriormente se colocó la columna de centrifugación QIAamp en un nuevo tubo de recogida de 2 ml, a la vez se desechó el tubo de recogida que contiene el filtrado.
- j. Se abrió con cuidado la columna de silica QIAamp, donde se añadió 500 µl de tampón AW2, se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min y se desechó el tubo de recolección que contiene el filtrado.
- k. Se colocó la columna de silica QIAamp en un nuevo tubo de recogida de 2 ml y se desechó el antiguo tubo de recogida con el filtrado. Después se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min. Este paso ayuda a eliminar la posibilidad de un posible remanente de Buffer AW2.
- l. Se transfirió la columna de centrifugación QIAamp a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml nuevo etiquetado y se pipeteó 50 µl de tampón de resuspensión ATE directamente en la membrana QIAamp.
- m. Se incubó por 3 min a 56 °C, luego se centrifugó 13000 rpm, durante 1 min para eluir el ADN.
- n. El volumen total de ADN extraído se almacenó a -20°C.
- o. Para determinar la calidad, pureza y concentración de ADN extraído se procede a cuantificar mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm (A260) usando el cuantificador, mediante este método también se logró obtener los valores estimados de la pureza del ADN frente a proteínas, entendida como la relación de absorbancia (A260/A280nm).

3.8.4.3. Desarrollo de la Reacción En Cadena de la Polimerasa (PCR)

Una vez extraído el ADN del parásito, se desarrolló la PCR, primero realizando el diseño de primers específicos para el *Ancylostoma caninum* y siguiendo el protocolo específico de ThermoFisher Scientific, USA, que se explica a continuación:

- *Diseño de primers*

La selección de primers, fue fundamental para el desarrollo del PCR y que este sea exitoso en el laboratorio, el diseño se lo realizó según la cadena de secuencia que se quiere codificar para un elemento específico como en este caso el ADN de *Ancylostoma caninum* (Oliveira & Katagiri, 2017, pp. 14-19).

Se diseñaron cebadores directos (Forward primer) RTHF1 y reverso (Reverse primer) RTABCR1 específicos de la especie *Ancylostoma caninum* aislado 1805AC espaciador interno transcrito (ITS) 1, secuencia parcial; gen de ARN ribosomal 5.8S y espaciador interno transcrito (ITS) 2, usando el software Primer 3 y Primer Blast para amplificar aproximadamente 540-bp (Suganya & Porteen 2019, pp. 96-102).

Una vez diseñado los cebadores se procedió a sintetizarlos para ello se realizó el pedido a la empresa Thermofisher a través de la página web donde posee un apartado denominado *PRIMERS*. El procedimiento para el diseño de primers se describe a continuación:

a. Búsqueda para el gen JQ812694.1

Description	Scientific Name	Max. Ident. Score	Ident. Score	Query Cover	E value	Max. Ident. %	Acc. Len	Accession
Ancylostoma caninum isolate 1805AC internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	<i>Ancylostoma caninum</i>	43.1	43.1	100%	1.3	100.00%	620	JQ812694.1
Download alignment	Download images	98.2	98.2	99%	21	100.00%	47837467	LD788948.1
Download alignment	Download images	38.7	38.7	80%	21	100.00%	6610	X810052925.1

Ilustración 5-3: Búsqueda del gen para *Ancylostoma caninum* en base de datos GenBank.

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

En la ilustración 5-3, se puede observar que realizando una búsqueda en la base de datos de GenBank para el gen que se expresa para *Ancylostoma caninum*, JQ812694.1 la compatibilidad es del 100 % con la especie, al realizar un recorrido en BLAST.

b. Selección de parámetros específicos

Ilustración 6-3: Diseño de cebadores y parámetros para PCR

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

c. Parámetros de primers diseñados.

Tabla 1-3: Cebadores a emplearse para síntesis de ADN de *Ancylostoma caninum*

	Secuencia (5'→3')	Longitud inicio	Finalización	Tm	GC%
Cebador directo	TCACGACTTTGTCGGGGAAG	76	95	59.97	55
Cebador inverso	TGCTAAGTTCAGCCGGGTAG	807	788	59.46	55

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

Realizando un corrido en BLAST, del gen JQ812694.1 del *Ancylostoma caninum*, se diseñó el par de cebadores específicos para las regiones del gen tal como se observa en la ilustración, donde los parámetros de longitud, temperatura de melting y el porcentaje de GC son favorables por lo que es viable utilizar dichos primers, que se corroboran a los descritos por (Liu et al., 2013, pp. 1-6).

- *Procedimiento de la Reacción en cadena de la Polimerasa.*
- a. **Preparación de la muestra:** En un tubo para PCR se agregaron los siguientes reactivos: polimerasa DreamTaq Green PCR Master Mix que contiene (Desoxinucleotidos trifosfatos (dNTP), MgCl₂, DreamTaq ADN polimerasa y tampón DreamTaq), el ADN diana, cebadores directo y reverso específicos para *Ancylostoma caninum* y agua libre de nucleasas en volúmenes que se indican a continuación:

Tabla 2-3: Condiciones específicas para PCR.

Reactivos	Volúmenes
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	12.5 µl
Primer forward (10 µM)	1.25 µl
Primer reverse (10 µM)	1.25 µl
ADN diana	100-200 ng
Agua libre de nucleasas csp.	25 ul

Fuente: (Oliveira & Katagiri, 2017, pp.14-19)

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

- b. Se homogenizó los componentes de la reacción en un vórtex durante 3 segundos.
- c. Se centrifugó brevemente para reunir la mezcla en el fondo del tubo.
- d. Para la amplificación y extensión se colocó las muestras en el termociclador programado con las condiciones de amplificación y extensión:

Para la amplificación y extensión se colocó las muestras en el termociclador programado con las condiciones de amplificación y extensión:

Tabla 3-3: Condiciones de PCR convencional para barcode ITS de *Ancylostoma caninum*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	0.75 min	40
Alineamiento	53	0.75 min	
Extensión	72	0.50 min	
Extensión final	72	7 min	1

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

- Las muestras se colocaron en el termociclador con el fin de realizar la desnaturalización inicial que consiste en separar las cadenas de ADN y se llevó a cabo elevando la temperatura a 94.0°C durante un ciclo de 5 minutos.
- Una vez realizada la desnaturalización inicial se procedió a la realizar 40 ciclos consecutivos de desnaturalización (0.75 min), alineamiento (0.75 min) y extensión (0.50 min) aplicando temperaturas de 95, 53 y 72 °C respectivamente, permitiendo que los cebadores se unan por complementariedad al molde de ADN y además que la enzima Taq polimerasa incorpore los nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores.
- Por último, la elongación final se realizó a 72.0°C durante 7 minutos que dio paso a la fase final de reposo a una temperatura de 4.0°C (Furtado & Dias, 2020, pp. 1-7).

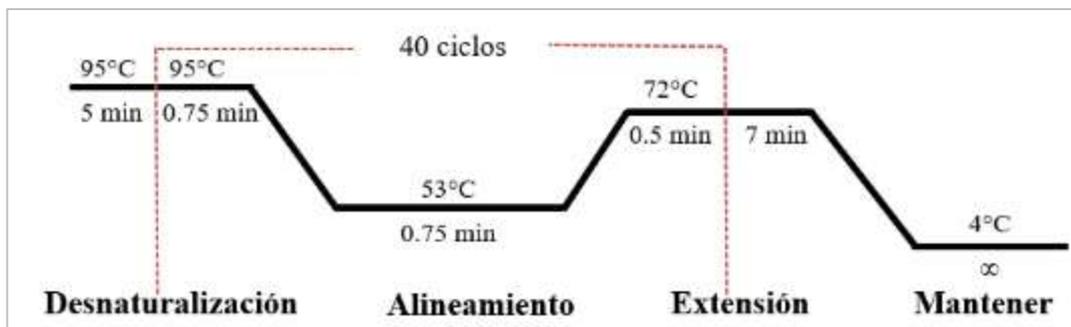


Ilustración 7-3: Esquema de condición de ciclo de PCR para *Ancylostoma caninum*

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

- e. Se procedió a realizar la electroforesis del producto obtenido.

3.8.4.4. Electroforesis

La electroforesis consistió en la separación de biomoléculas del ADN permitiendo que cada fragmento se separe en el gel por su tinción con bromuro de etilo que hace que el ADN sea fluorescente mediante la emisión de luz ultravioleta cuando una corriente eléctrica se aplica sobre el gel de agarosa la carga negativa migró hacia el polo positivo; dicho gel disuelto en un buffer se fundió usando un microondas hasta obtener una solución homogénea y transparente (Osawa & Ikebukuro, 2008, pp. 2-3).

▪ Procedimiento

a. Preparación del gel de agarosa al 2 %

- Se pesó 2 gramos de agarosa en polvo.
- Se añadió la agarosa a 100 ml de buffer (TBE 0.5x) en un matraz.
- Se calentó la disolución en un microondas hasta fundir toda la agarosa.
- Se dejó enfriar la solución de agarosa hasta una temperatura de 50 °C.
- Se añadió el bromuro de etilo al gel a una concentración final de 0.5 µg/ml.
- Posteriormente se preparó el molde en el que se va a hacer el gel sellando los bordes con cinta masking.
- Se vertió la solución de agarosa sobre el molde nivelado y se dejó que solidifique durante al menos 30 min.

b. Preparación de la muestra

- Se mezcló las muestras de ADN como el marcador de tamaño con 0.2 volúmenes del buffer de carga 6x, con un volumen total de 15 µl.

Tabla 4-3: Preparación de la muestra para electroforesis

Cantidad de ADN	H2O a añadir	Colorante 6X	Volumen final
3 µl	9,5 µl	2,5 µl (conc final 1x)	15 µl

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

c. Carga de las muestras y corrida del gel

- Después de que se solidificó el gel se retiró el sellado de los bordes y se colocó el molde con el gel en la cámara de electroforesis.
- Se añadió el buffer de electroforesis (TBE 0.5x) hasta cubrir el gel unos 3-5 mm.
- Se retiró cuidadosamente el peine para que queden libres los pocillos para las muestras.
- Se cargó en los pocillos las muestras con mucho cuidado.
- Se conectó los cables a la fuente alimentación y se aplicó un voltaje de 80 V.

- Se dejó correr el gel hasta que el colorante esté a una distancia del borde de aproximadamente un 25% de la longitud total del gel.
- d. Tinción del gel y visualización del ADN
- Se colocó el gel sobre un transiluminador y se encendió la lámpara de luz ultravioleta ($\lambda \approx 300$ nm), el ADN se visualizó como bandas de color anaranjado (Cornejo, Serrato & Rocha 2014, pp. 27-51).

3.8.5. Secuenciación Sanger

Antes de proceder con la secuenciación Sanger, los productos de PCR de alrededor de 500 pb se volvieron a amplificar por PCR usando los mismos primers y condiciones de PCR para separarlos de los otros productos amplificados. Es importante resaltar que las muestras analizadas se realizó un control de PCR amplificando la región 16S de bacterias.

La secuenciación Sanger se realizó para las 2 muestras que amplificaron los productos esperados.

3.8.5.1. Procedimiento

A continuación, se muestra el procedimiento utilizado en la secuenciación Sanger:

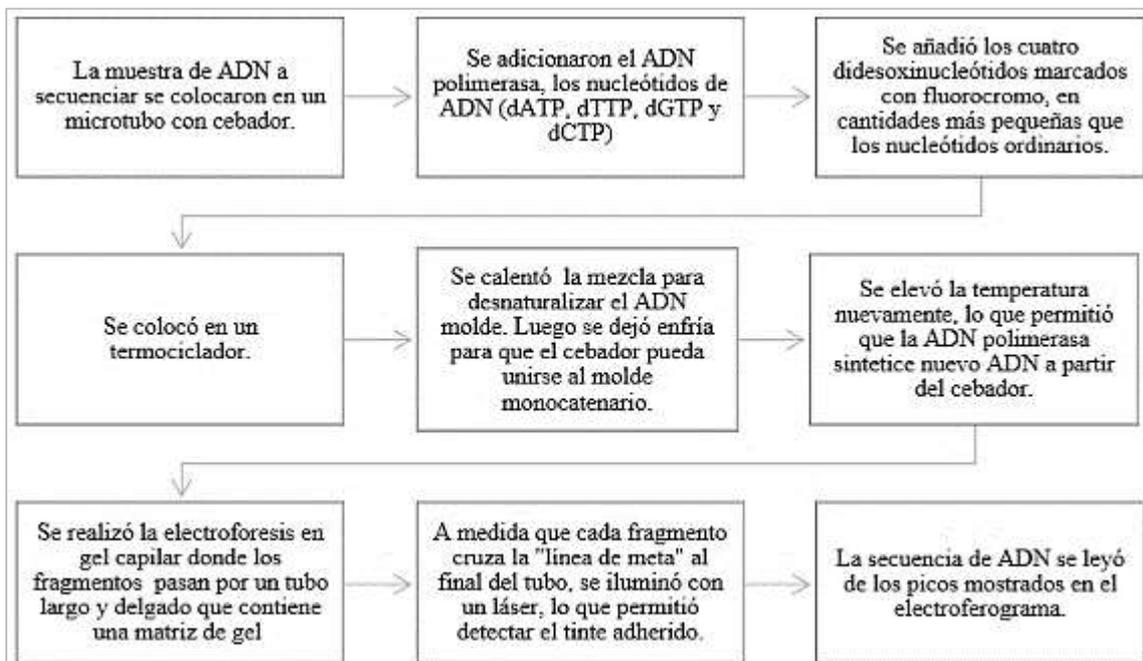


Ilustración 8-3: Procedimiento de la Secuenciación de Sanger.

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

3.8.5.2. Análisis de resultados de Secuenciación

Las secuencias de nucleótidos resultantes de electroferogramas se analizaron utilizando Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Brisbane, Australia) y búsquedas nBLAST de la base de datos GenBank en Geneious v11.1.5, y se alinearon con las secuencias de referencia utilizando el programa de alineación de secuencias MEGA 5.0. Los análisis de unión de vecinos se realizaron utilizando estimaciones de distancia de parámetros de Tamura-Nei, y se construyó un árbol filogenético utilizando el programa bioinformático Geneious v11.1.5 (Oliveira & Katagiri, 2017, pp. 14-19).

3.8.6. Instrumentos de investigación

3.8.6.1. Materiales

- *Materiales de campo*
 - Cofia, mascarilla y mandil
 - Guantes de látex
 - Frascos de muestras de heces
 - Paletas de madera
 - Bolsas plásticas

- *Materiales de laboratorio*

Tabla 5-3: Materiales de laboratorio utilizados.

Examen coproparasitario	Extracción de ADN	PCR	Electroforesis
- Laminas Portaobjetos	- Tubos estériles de microcentrifuga de 1.5 ml.	- Guantes de nitrilo	- Micropipetas
- Laminas Cubreobjetos	- Micropipetas de 2, 10, 200 y 1 000 uL.	- Tubos para PCR	- Puntas para micropipeta
- Tubos de ensayo	- Puntas para micropipetas con filtro	- Puntas para micropipetas	- Tubos eppendorf
- Vasos de precipitación		- Baño de hielo	- Matraz, probetas y vasos de precipitados.
- Varilla de vidrio		- Gradilla	- Espátulas

<ul style="list-style-type: none"> - Gradilla - Papel toalla - Colador - Palillos de madera 	<ul style="list-style-type: none"> - Gradilla para tubos de 1.5 y 2 ml. - Guantes - Marcadores - Bata de laboratorio - Toallas de papel - Contenedores de desechos líquidos y puntas. 		<ul style="list-style-type: none"> - Guantes
Secuenciación de Sanger	<ul style="list-style-type: none"> - Micropipetas de 2, 10, 20, 100, 200 y 1000 µl - Gradillas para microtubos de 1.5 ml y para placas de 96 pozos - Microtubos de 1.5 ml. - Microtubos para PCR - Puntas para micropipetas - Columnas Centrisep con Sephadex Applied Biosystems - Placas de 96 pozos para secuenciador 3100 AB - Tapas para placas de 96 pozos - Base para placas de 96 pozos - Juego de 4 capilares para secuenciador 3100 		

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

▪ *Materiales de oficina*

- Libreta de notas
- Computadora
- Etiquetas adhesivas
- Cámara de fotos

3.8.6.2. *Reactivos*

Tabla 6-3: Reactivos empleados

Examen coproparasitario	Extracción de ADN	PCR	Electroforesis
-------------------------	-------------------	-----	----------------

<ul style="list-style-type: none"> - Alcohol etílico al 70 % - Suero fisiológico - NaCl - Lugol 	<ul style="list-style-type: none"> - Etanol grado biología molecular - Fenol - Proteinasa K - RNAsa A - TBE (Tris base, EDTA, ácido bórico) 	<ul style="list-style-type: none"> - Muestra de ADN - Buffer - Cloruro de Magnesio (MgCl₂) - Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) - Primers - Taq polimerasa - Agua destilada 	<ul style="list-style-type: none"> - Agarosa - Tris base - Ácido acético glacial - Ácido bórico - NaOH - Sacarosa - Glicerol - Azul de bromofenol - Xileno cianol - Bromuro de etidio - Marcador de peso molecular de 1 Kb
Secuenciación de Sanger	<ul style="list-style-type: none"> - Big dye terminator V3.0 Applied Biosystems - Buffer 2.5 X - Agua grado biología molecular - Templado de DNA - Iniciadores para la región a secuenciar - Polímero para secuenciador AB 3100 POP6 		

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

3.8.6.3. Equipos

Tabla 7-3: Equipos empleados

Examen coproparasitario	Extracción de ADN	PCR	Electroforesis
<ul style="list-style-type: none"> - Microscopio - Balanza analítica - Reverbero 	<ul style="list-style-type: none"> - Baño maría - Microcentrífuga - Vortex - Balanza analítica - Agitador magnético 	<ul style="list-style-type: none"> - Termociclador - Vortex - Microcentrífuga 	<ul style="list-style-type: none"> - Cámara de electroforesis horizontal. - Molde para hacer gel, peine, cables para conectar a la fuente de alimentación

	<ul style="list-style-type: none"> - Campana de extracción - Ultracongelador - Espectrofotómetro 		<ul style="list-style-type: none"> - Fuente de alimentación - Transiluminador (fuente de luz UV) - Equipo fotográfico
Secuenciación de Sanger	<ul style="list-style-type: none"> - Espectrofotómetro - Termociclador - Vortex - Centrífuga para microtubos - Secuenciador automatizado ABI PRISM 3100 		

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

3.9. Análisis estadístico

Para el presente estudio en base a sus características, no se llevaron a cabo análisis estadísticos paramétrico y pruebas de significancia, en su lugar se serializo los análisis de tipo numérico y proporcional, por ello para el cálculo de la prevalencia de parasitosis se lo realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Muestras positivas}}{\text{Total de muestras}} \times 100$$

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Tras el desarrollo de la metodología, para el análisis y tabulación de datos se utilizó la estadística descriptiva, de tipo numérico y proporcional, al aplicar la fórmula de casos positivos relacionándolo con los casos totales, y mediante este se encontró que la prevalencia de parasitosis en perros del refugio Santuario-PAE de la ciudad de Riobamba, corresponde el 68,33 %; de las 82 muestras analizadas microscópicamente mediante las técnicas del examen directo en soluciones de suero fisiológico y lugol, se identificaron 27 muestras positivas para *Ancylostoma caninum*, confirmándose morfológicamente mediante la técnica de flotación de Wills. También se describen los resultados del análisis molecular PCR y Secuenciación de Sanger, seleccionando los casos más prevalentes del parásito, resultados que se describen a continuación.

4.1. Frecuencia de canes del refugio - Santuario PAE

4.1.1. Número de canes según el sexo

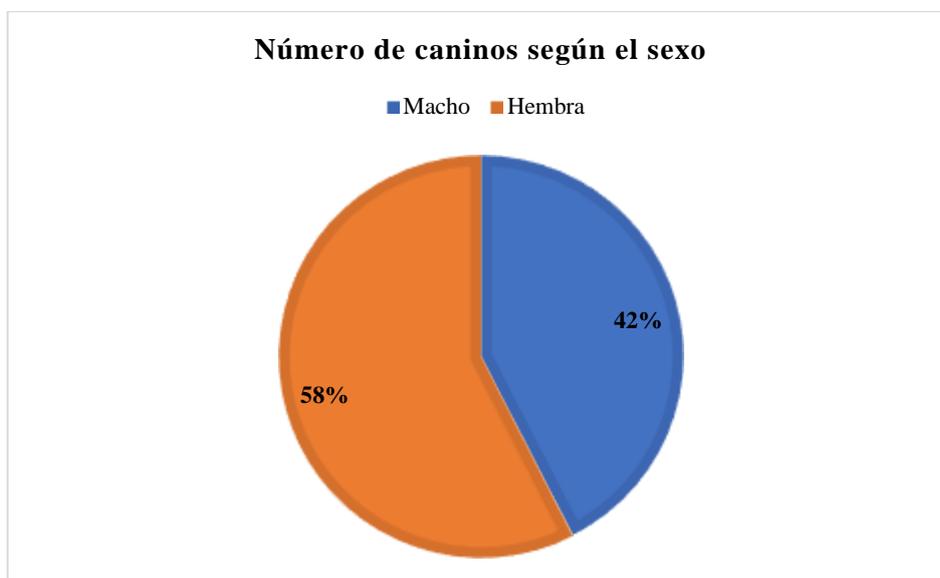


Ilustración 1-4: Número de canes según el sexo

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

Según los datos obtenidos de canes del refugio Santuario-PAE, de un total de 120 perros, se registró que 69 de ellos son hembras, que representa el 58 %; mientras que 51 canes que corresponde a 41 % son machos.

4.1.2. Rango de edad en canes del refugio -Santuario PAE

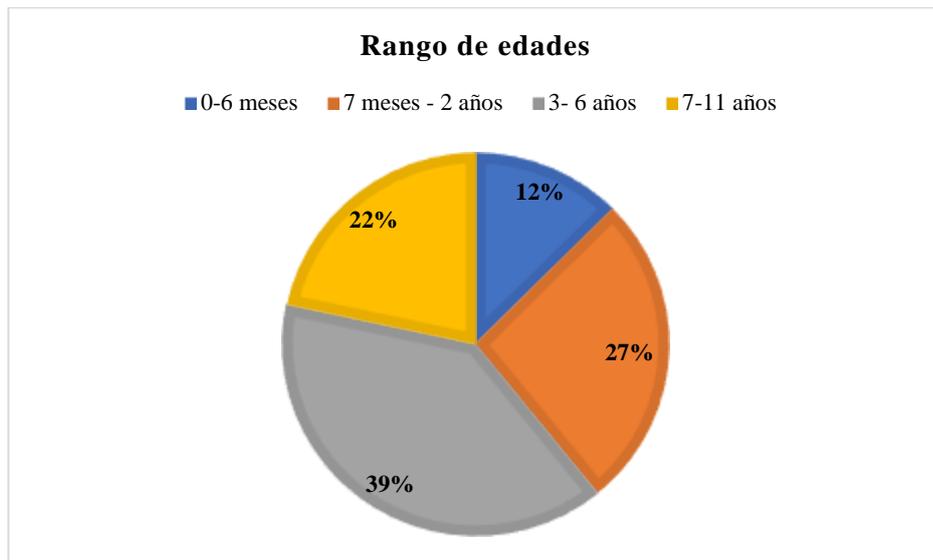


Ilustración 2-4: Rango de edad en canes del refugio santuario-PAE

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

De los 120 canes, 47 se encuentran dentro del rango de edad de 3 a 6 años que corresponde al 39 %, seguido por 32 canes de 7 meses a 2 años con el 27%, mientras que menormente se encuentran 26 perros geriátricos de 7 a 11 años que representa el 22 %, y finalmente se encuentran 15 cachorros de 0 a 6 meses que pertenece al menor porcentaje que es 12 %, cifras que son semejantes a los reportados por la Fundación Affinity, donde se indica que más del 57% de perros que ingresan a los refugios son adultos.

4.1.3. Número de canes según la raza

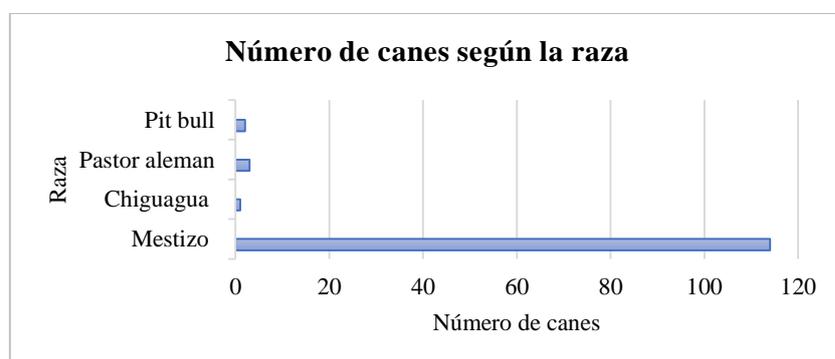


Ilustración 3-4: Número de canes según la raza

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

La raza que mayoritariamente prevalece en el refugio con 114 canes es la mestiza, seguido por 3 canes que son de la raza pastor alemán, 2 Pitt Bull y finalmente solo un perro chiguagua.

4.2. Prevalencia de parasitosis

4.2.1. Frecuencia de especies parasitarias

Tabla 1-4: Frecuencia según las especies parasitarias

Parásitos	Muestras (+)	Porcentaje (%)
<i>Giardia lamblia</i>	56	35.90
<i>Chilomastix mesnili</i>	24	15.38
<i>Ancylostoma caninum</i>	27	17.31
<i>Cystoisospora sp.</i>	8	5.13
<i>Toxocara canis</i>	30	19.23
<i>Dipylidium caninum</i>	4	2.56
<i>Iodamoeba bütschlii</i>	3	1.92
<i>Hymenolepis nana</i>	1	0.64
<i>Entamoeba histolytica</i>	2	1.28
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	0.64
TOTAL	156	100.00

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

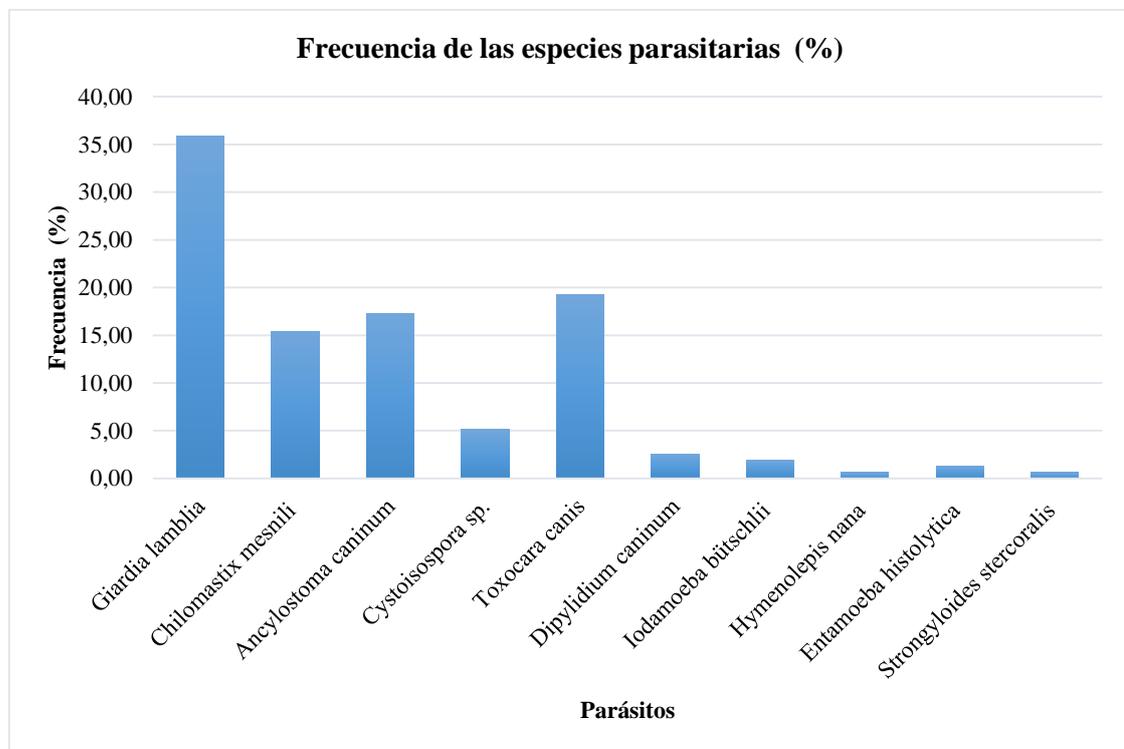


Ilustración 4-4: Diagrama de barras de la frecuencia de las especies parasitarias

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

La frecuencia según las especies parasitarias observados en el análisis coproparasitario, se indica en la tabla 1-4 ; cabe recalcar que el número de muestras positivas es diferente a las muestras indicas al inicio debido a que en una misma muestra se observaron más de un parásito; por lo tanto, los resultados obtenidos muestran que el parásito que se presenta con mayor prevalencia es el protozoo *Giardia lamblia* (35.90%), seguido por los parásitos *Toxocara canis* (19.23%), *Ancylostoma caninum* (17.31%), *Chilomastix mesnili* (15.38%), *Cystoisospora sp* (5.13%), *Dipylidium caninum* (2.56%), *Iodamoeba bütschlii* (1.92%), *Entamoeba histolytica* (1.28%) , *Hymenolepis nana* (0.64%) y *Strongyloides stercoralis* (0.64%). Los resultados mencionados anteriormente son semejantes a los hallazgos realizados, por (Lozano, S., 2015, pp. 54-59), en el cual se encontró una prevalencia alta del protozoo *Giardia lamblia* (74%) de las 100 muestras tomadas de un consultorio veterinario de la ciudad de Guayaquil. Mientras que para el resto de los parásitos concuerdan con los resultados encontrados por (Tuasa, 2015, pp. 16-80), que, a partir de 278 muestras analizadas de caninos de parques de la ciudad de Ambato, se encontró una prevalencia para *Toxocara canis* (25,00%), seguido por el *Dipylidium caninum* (18,00%), *Ancylostoma caninum* (12,00%), y en menor frecuencia los helmintos *Strongyloides stercoralis* (5,00%), *Ascaris lumbricoides* 3,00%, *Trichuris vulpis* (1,00%) (Tuasa, 2015, pp. 16-80).

Por otro, los porcentajes de prevalencia encontrados para el *Toxocara canis* y *Ancylostoma caninum*, varían en comparación con la investigación realizado por (Basantes, 2021, pp. 55-60), que en base al análisis de 379 muestras de caninos del cantón Orellana se halló una prevalencia mayor para el *Ancylostoma caninum* (65.96%), seguido por el *Toxocara canis* (27.7%) y *Cystoisospora sp.* (4.00%) (Basantes, 2021, pp. 55-60).

Los porcentajes altos de prevalencia encontrados en cada uno de los parásitos, da una clara muestra del riesgo de infección que padecen los caninos de la ciudad de Riobamba, especialmente por el protozoario, seguido por los helmintos tales como el *Ancylostoma caninum* y *Toxocara canis*, que se presentan en mayor prevalencia lo cual se traduce en una mayor probabilidad de ocurrencia de zoonosis entre el animal y el hombre; además que estos helmintos son más comunes en canes por su alta resistencia a climas variados desde el frío al calor y permanecen infectantes durante largos periodos de tiempo en cualquier ambiente ya sea suelos con humedad, suciedad; sumado a ello el incremento de la población canina en distintas zonas , hacinamiento, desnutrición, mala higiene y otros factores, no hacen más que incrementar la prevalencia de parasitosis.

4.2.2. Frecuencia de parásitos según el sexo

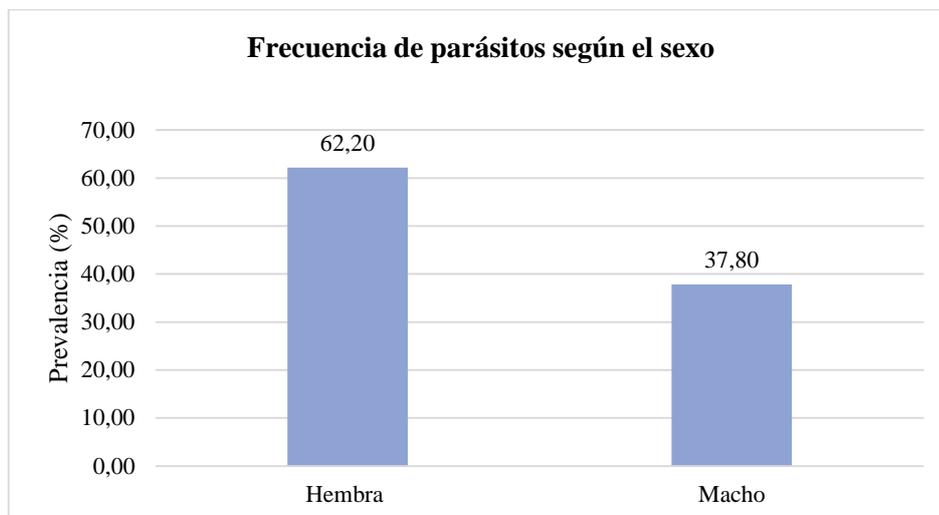


Ilustración 5-4: Diagrama de barras de frecuencia de parásitos según el sexo

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

La frecuencia de parasitosis según el sexo de las 82 muestras positivas, el 62,20% corresponde a caninos hembras y el 37,80 % a machos, lo que indica que la prevalencia de parasitosis en perros alojados en el refugio Santuario-PAE en su mayoría se presentan en hembras, porcentajes que se correlacionan con los encontrados por (Basantes, 2021, pp. 55-60), que en base al análisis 379 muestras positivas en caninos atendidos en clínica veterinaria, el 50,27 % corresponden a hembras y 49,73 % a machos, esta tendencia se debe a que las hembras llegan a tener mayor número de situaciones de estrés, tales como el estado de celo, preñez, lactancia, que son factores que favorecen la susceptibilidad de las canes a que se produzca se de infecciones causados por parásitos (Opazo & Barrientos, 2019, pp. 330-338).

4.2.3. Frecuencia de parasitosis según la edad

Tabla 2-4: Frecuencia de parasitosis según la edad

Rango de edad	Muestras (+)	Muestras (-)	Frecuencia (%)
0-6 meses	14	1	17.07
7 meses - 2 años	27	5	32.93
3- 6 años	24	23	29.27
7-11 años	17	9	20.73
TOTAL	82	38	100.00

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

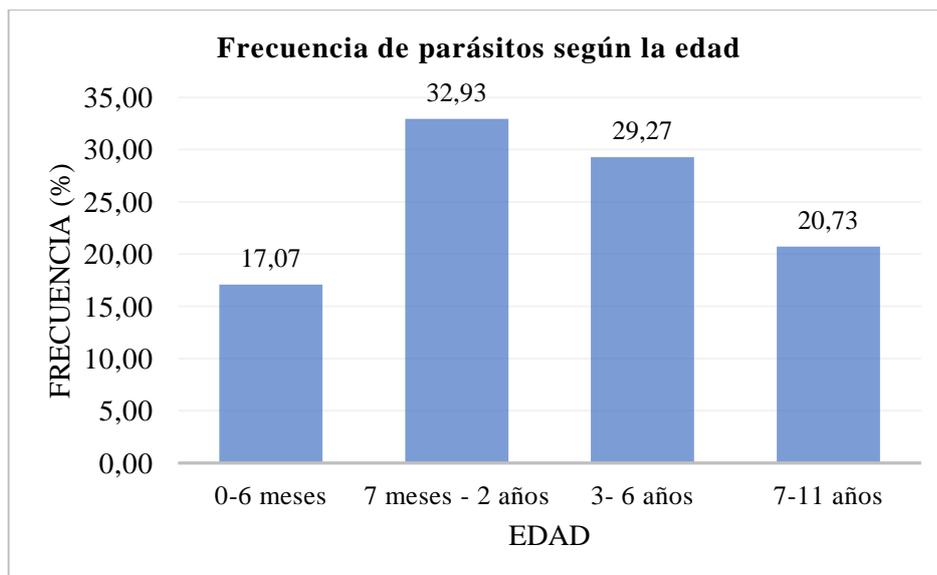


Ilustración 6-4: Diagrama de barras de la frecuencia de parásitos según la edad

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

En base a los resultados obtenidos de la frecuencia de parasitosis según la edad de los canes, de las 82 muestras positivas se puede evidenciar que existen 27 canes en un rango de edad de 7 meses a 2 años que presentan mayor número de casos positivos que equivale a una mayor frecuencia (32,93%), seguido por canes de entre 3 a 6 años (29,27 %), 7 a 11 años (20,73%) y de 0 a 6 meses que presentan una menor frecuencia de parásitos (17,07%); estos resultados concuerdan con los estudios previos realizados por (Álvarez, 2022, pp. 20-35), donde se encontró que de un total de 320 muestras de heces obtenidas de caninos de un albergue, el 84,22% corresponde a cachorros (edad aproximado de 0 a 2 años), adultos (7,22%) y geriátricos (8,56 %), lo cual es un claro indicativo que los canes menores de 2 años tienden a presentar una mayor prevalencia de parasitosis (Álvarez, 2022, pp. 20-35).

Este hecho se justifica dado que los canes más jóvenes tienden a adquirir la infección de una manera más fácil ya sea por la curiosidad propia que los hacen más susceptibles, también se puede deber a un sistema inmunológico debilitado donde se incluyen los canes de todas las edades, existen casos en cachorros donde la infección se da directamente de su madre a través de la leche y pueden presentarse signos tiempo después (Raza et al., 2018, pp. 108-123).

4.2.4. Frecuencia de parasitosis según la raza

Tabla 3-4: Frecuencia de parásitos según la raza

Raza	Muestras (+)	Frecuencia (%)
Mestizo	76	92.68
Chiguagua	1	1.22

Pastor alemán	3	3.66
Pitbull	2	2.44
TOTAL	82	100.00

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

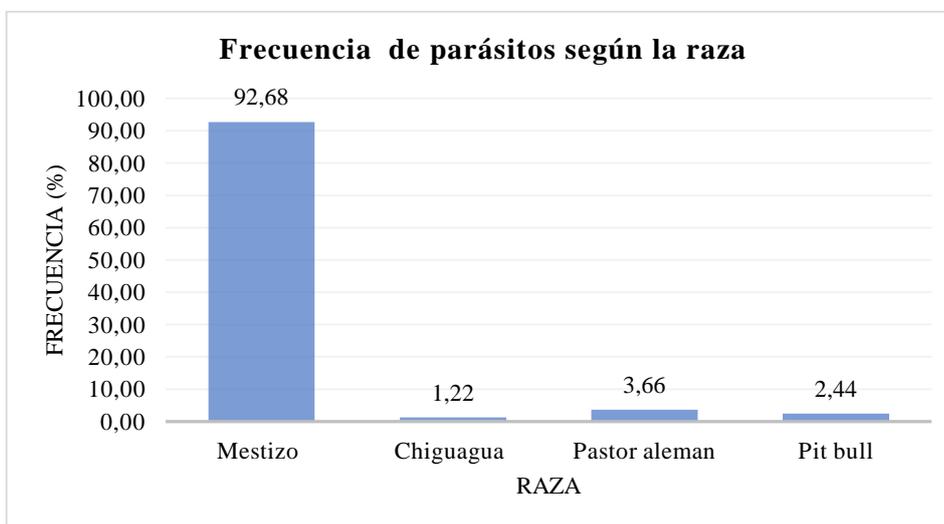


Ilustración 7-4: Diagrama de barras de la frecuencia de parásitos según la raza

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

En cuanto a la frecuencia de parásitos según la raza de los canes, se obtuvo un porcentaje 92,68% para los caninos de raza mestizo con una frecuencia de 76 de un total de 82 muestras positivas, seguido por la raza pastor alemán (3,66%), pit bull (2,44%) y chiguagua (1,22%); estos resultados son semejantes a los encontrados por (Falcón, 2019, pp,57-58), mostrando una alta prevalencia de parasitosis en perros de raza mestizo (39,82%) y en menor porcentaje en otras razas. La alta cantidad de perros de raza mestiza y baja cantidad de los de raza, se puede deber a que la mayoría de las personas prefieren poseer en sus hogares canes de raza y en menor medida a los mestizos, por lo que se da un incremento de estos en las calles, además que los mismos adoptantes prefieren a un canino de raza antes que un can mestizo (Álvarez, 2022, pp. 30-35).

4.2.5. Prevalencia total de parasitosis

Tabla 4-4: Prevalencia de parasitosis en perros del refugio Santuario-PAE de la ciudad de Riobamba

No. de muestras	Muestras (+)	Muestras (-)	Prevalencia (%)
120	82	38	68.33

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

De las 120 muestras de heces procedentes de perros callejeros alojados en el refugio-Santuario PAE de la ciudad de Riobamba, mediante el análisis coproparasitario se encontró que 82 muestras son positivas y 38 muestras son negativas para parásitos, mostrando una prevalencia global de parasitosis del 68.33 %, resultados que concuerdan con el alto nivel de parasitosis encontradas en un estudio realizado por (Tuasa, 2015, pp. 16-80), donde se halló una prevalencia del 84.17% equivalente a 234 muestras positivas de un total de 278 analizadas, en perros callejeros de parques de la ciudad de Ambato (Tuasa, 2015, pp. 16-80).

4.3. Reconocimiento morfológico de *Ancylostoma caninum*

4.3.1. Identificación morfológica de *Ancylostoma caninum* en examen microscópico directo

De las 82 muestras de heces positivas para parásitos procedentes de perros callejeros alojados en el refugio Santuario-PAE de la ciudad de Riobamba, 27 muestras fueron positivas para *Ancylostoma caninum* mostrando una prevalencia del 17.31 %; para la identificación morfológica de este parásito primeramente se realizó un examen microscópico directo mediante la observación de las heces en cloruro de sodio saturado (suero fisiológico) y lugol, utilizando los lentes objetivos 10X y 40X visualizándose, de la siguiente forma:

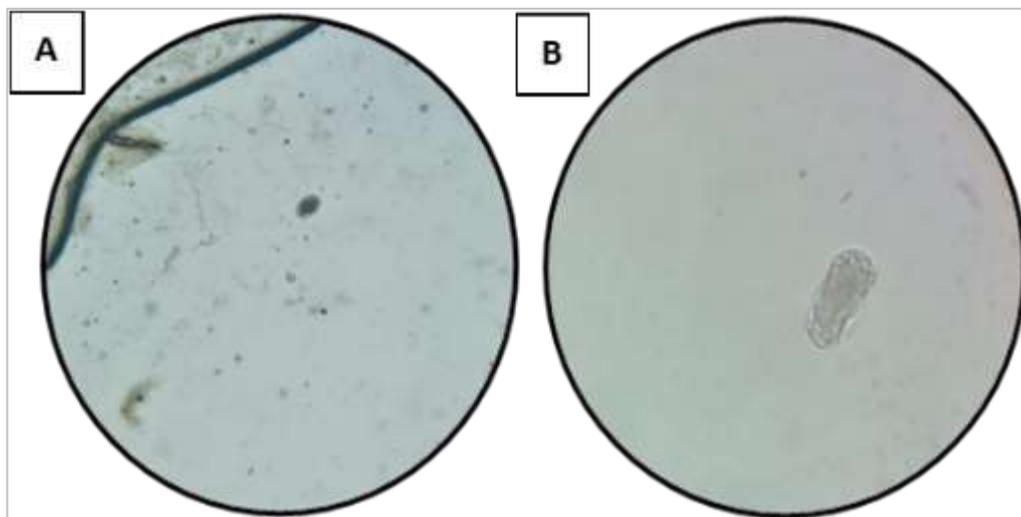


Ilustración 8-4: Fotografías de *Ancylostoma caninum* en suero fisiológico bajo el microscopio óptico con lentes objetivos de 10X (A) y 40X (B).

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

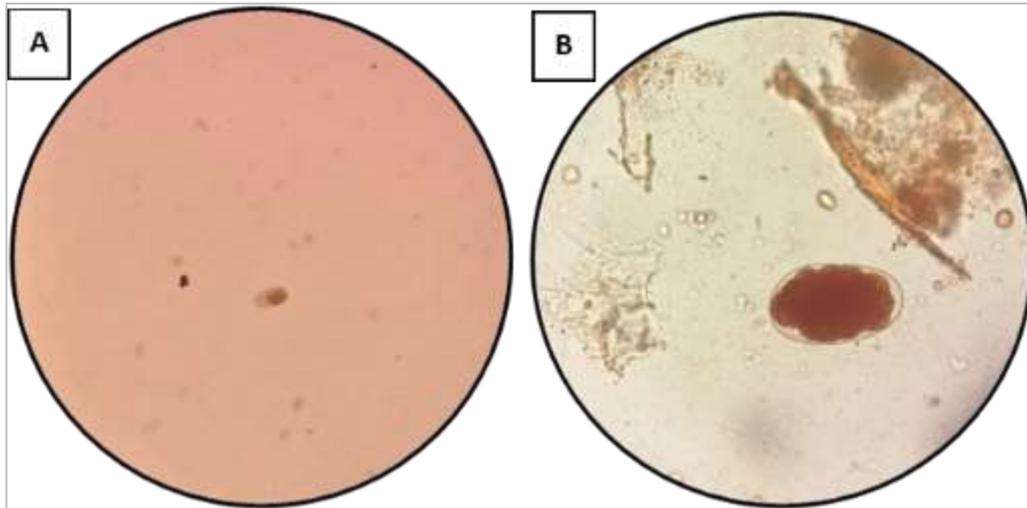


Ilustración 9-4: Fotografías de *Ancylostoma caninum* en solución yodurada (lugol) bajo el microscopio óptico con lentes objetivos de 10X (A) y 40X (B).

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

En la solución de cloruro de sodio saturado (suero fisiológico) tal como se indica en la ilustración 8-4, utilizando los lentes objetivos de 10x y 40x se puede visualizar la presencia del parásito *Ancylostoma caninum* mas no se puede diferenciar de forma clara la morfología; por otro lado, en la solución yodurada (lugol) en la ilustración 9-4, se puede apreciar la estructura interna con mayor detalle, los huevos del *Ancylostoma caninum*, se observa que tienen una forma ovalada, con la membrana de la cáscara delgada transparente, morfologías que se relacionan con lo descrito por (Lucio et al. 2012, pp. 1041-1044), que menciona que a más de las características antes mencionadas los huevo de *Ancylostoma caninum*, contienen en su interior un óvulo segmentado en la etapa de 4 u 8 células (Lucio et al. 2012, pp. 1041-1044).

4.3.2. Identificación morfológica de Ancylostoma caninum por el método de flotación de Wills

Para un mejor reconocimiento de la morfología del *Ancylostoma caninum* a las 27 muestras positivas para el parásito se las utilizó para aplicar la técnica de flotación fecal de Wills, observándose de la siguiente manera:

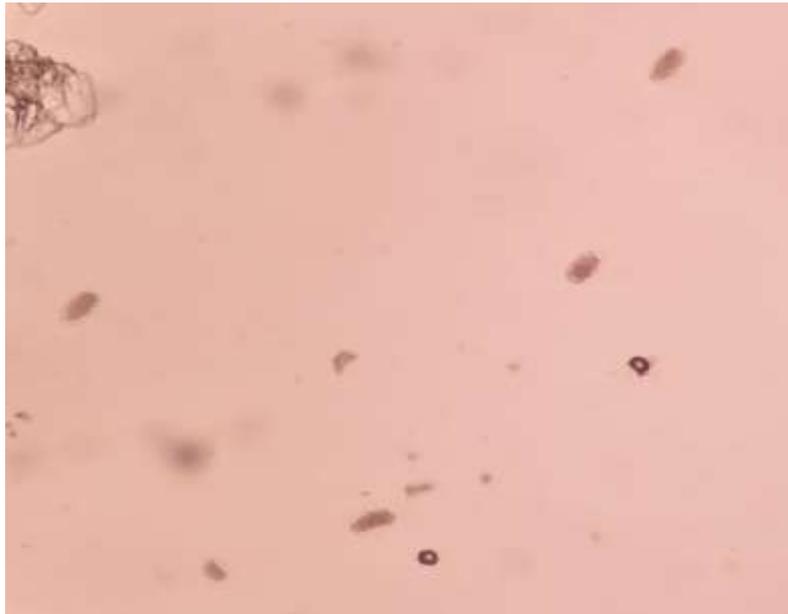


Ilustración 10-4: Fotografía de *A. caninum* por el método de flotación de Wills, objetivo de 10X.

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

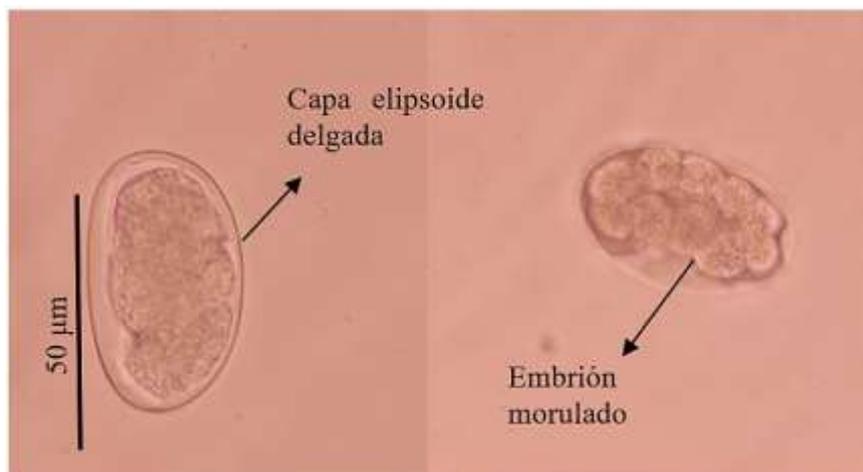


Ilustración 11-4: Fotografía de *Ancylostoma caninum* por el método de flotación de Wills con lente objetivo de 40X.

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

En las ilustraciones 10-4 y 11-4, se puede apreciar al parásito *Ancylostoma caninum* por el método de flotación de Wills, primero bajo el lente 10x donde se evidencia una gran cantidad de parásitos, que al hacer un aumento al lente de 40x, se observan de forma ovalado alargado que según (Shin, 2010, pp. 246-260), miden aproximadamente de 50 a 70 μm de largo por 30 a 50 μm de ancho. Además, el huevo tiene una cáscara fina y lisa con un embrión en desarrollo de color marrón grisáceo oscuro, este embrión puede estar en una variedad de etapas de desarrollo y, a veces,

parece una masa dentro de las células, mientras que otras veces se pueden visualizar de 8 a 16 células redondas distintas (Shin, 2010, pp. 246-260).

4.4. Caracterización molecular de *Ancylostoma caninum*

De las 27 muestras de heces positivas para *Ancylostoma caninum*, procedentes de perros callejeros alojados en el refugio Santuario-PAE de la ciudad de Riobamba, se conservaron en etanol al 70 % a -20°C y posteriormente para su análisis molecular se utilizaron aquellas muestras con mayor prevalencia del parásito:

Tabla 5-4: Prevalencia de *Ancylostoma caninum* y selección de muestras para PCR

Muestras	N° muestra	<i>Ancylostoma caninum</i>	Muestras para PCR
1	5	+	
2	12	+	
3	15	+	
4	16	+	
5	19	+	
6	24	+	
7	25	++	25
8	27	+	
9	37	+	
10	44	+	
11	49	+	
12	54	++	54
13	56	+	
14	59	++	59
15	69	++	69
16	72	+	
17	75	+	
18	77	+	
19	83	+	
20	85	+	
21	90	++	90
22	95	++	95
23	100	+	
24	104	+	

25	111	+	
26	114	+	
27	116	++	116
TOTAL			7

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

Se seleccionaron siete muestras (25,54,59,69,90,95 y 116) microscópicamente positivas para *Ancylostoma caninum*, a partir de estas se mezcló para obtener una muestra única de heces, además se realizó una resuspensión de parásitos por el método de flotación de willis, por lo tanto, se sometieron al procedimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos muestras.

4.4.1.Resultado extracción del ADN

Siguiendo el protocolo de extracción de ADN (QIAamp DNA Stool Mini Kit), se completó con éxito todo el proceso de extracción del ADN de ambas muestras, en aproximadamente 35 minutos, obteniéndose los siguientes valores de absorbancia:

Tabla 6-4: Datos de absorbancia obtenida de ADN por espectrofotometría.

ABSORBANCIA	HECES	RESUSPENSIÓN HUEVOS
A ₂₆₀	51,3426	50,8854
A ₂₈₀	23,3693	23,9524
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	2,1970	2,1244
A ₂₃₀	23,1065	23,2035
A ₂₆₀ /A ₂₃₀	2,2219	2,1930
CONCENTRACIÓN	2,53541 ug/uL	2,03541 ug/uL

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

En la tabla 6-4, se presentan los valores de las absorbancias obtenidas por espectrofotometría, de ADN extraídos de muestras de heces fecales y resuspensión de huevos de *Ancylostoma caninum*. Según los parámetros proporcionados por (QIAGEN,2022, p.1) la calidad de ADN extraído se considera aceptable si la relación:

- A₂₆₀/280 tiene un valor entre 1.8-2.0. por lo cual es muy estable y de pureza óptima.
- A₂₆₀/280 tiene un valor de 1.6-2.2 es de pureza aceptable.
- A₂₆₀/230 se sitúa en torno 1.8-2.2 es aceptable (QIAGEN 2022, p. 1).

Por lo tanto, realizando una comparación del valor obtenido de la extracción de ADN para heces, el parámetro A₂₆₀/280 es 2,1970 lo cual indica que la calidad del ADN es de pureza aceptable,

mientras que $A_{260/230}$ fue de 2,2219 superando ligeramente el valor permitido lo cual indica posible presencia de impurezas que podría comprometer los resultados. En cambio, para el ADN extraído de resuspensión de huevos de *Ancylostoma caninum* la relación entre los parámetros $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ presentan valores de 2,1244 y 2,1930 respectivamente, por lo que la calidad y pureza del ADN extraído es aceptable y óptimo para la realización de la PCR. En cuanto a la concentración el ADN para heces mostró un valor de 2,53541 ug/uL, mientras que para la resuspensión de huevos 2,03541 ug/uL, siendo óptimos para su utilización (Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN, 2020, pp.1-10).

4.4.2. *Primers utilizados para diagnosticar Ancylostoma caninum por PCR y secuenciación Sanger*

Tabla 7-4: Primers sintetizados para diagnosticar el parásito *Ancylostoma caninum* por PCR punto final y secuenciación Sanger

Primers	Secuencia (5'-3')	Referencia
Cebador directo (RTHF1)	TCACGACTTTGTCGGGGAAG	(Lucio et al. 2012, pp. 1041-1044)
Cebador inverso (RTABCR1)	TGCTAAGTTCAGCCGGGTAG	(Lucio et al. 2012, pp. 1041-1044)

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

Los cebadores empleados para la caracterización molecular del *Ancylostoma caninum* se lo puede evidenciar en la tabla 7-4, los cuales fueron diseñados con éxito y sintetizados de manera óptima.

4.4.3. *Resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa*

Tabla 8-4: Resultados de las determinaciones por PCR del parásito *Ancylostoma caninum* en heces y resuspensión de huevos.

Hospedero	Fuente	Determinación	Barcode	Resultado	Identidad (%)	Calidad
<i>Canis lupus familiaris</i>	Heces	<i>Ancylostoma caninum</i>	ITS1, 5.8S, ITS2	Detectado	49.1	30.4
<i>Canis lupus familiaris</i>	Resuspensión huevos	<i>Ancylostoma caninum</i>	ITS1, 5.8S, ITS2	Detectado	100	82.9

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

En la tabla 8-4, se evidencia de manera resumida los resultados obtenidos de la PCR del parásito *Ancylostoma caninum*, evidenciándose que para ambas fuentes tanto de heces y resuspensión de huevos, se detectó el parásito motivo a estudio, obteniéndose con un porcentaje de identidad del 49.1 y 100 y de calidad 30,4 y 82,9 % respectivamente.

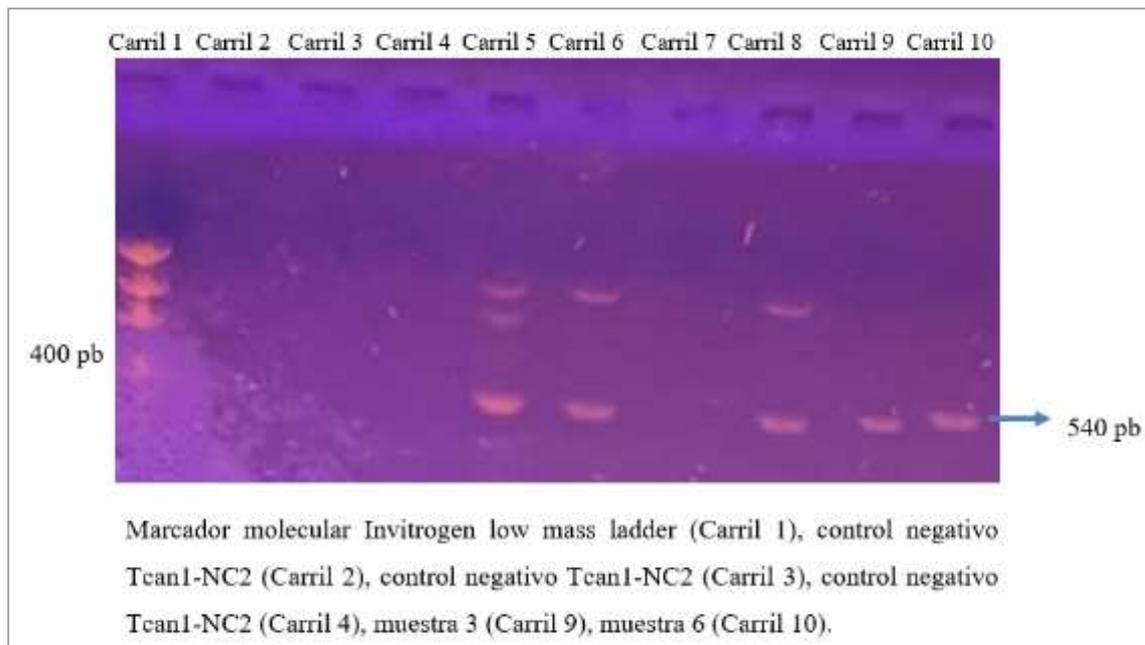


Ilustración 12-4: Productos de PCR punto final analizando presencia del parásito *Ancylostoma caninum* a partir de muestras de heces y resuspensión de huevos.

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

Después de realizar la electroforesis en gel de agarosa al 2% se determinó la presencia o ausencia del parásito *Ancylostoma caninum*, por lo que se evidenció la presencia del parásito tanto en la muestra de heces fecales (muestra 3) como en la de resuspensión de huevos (muestra 6) correspondientes a la formación de bandas en los carriles 9 y 10 tal como se observa en la ilustración 12-4. Cabe recalcar que en los carriles restantes se utilizó el marcador molecular Invitrogen low mass ladder (Carril 1), control negativo Tcan1-NC2 (Carril 2), control negativo Tcan1-NC2 (Carril 3), control negativo Tcan1-NC2 (Carril 4).

Una vez finalizado el PCR, se puede apreciar los resultados de la investigación en la ilustración 12-4, donde se evidencian la presencia de bandas obtenidas de la amplificación del PCR, el primer carril 1 representa al marcador de pares de base o molecular de 1000 pb, las bandas del 9 y 10 son las muestras de ADN positivas para *Ancylostoma caninum* que corresponden a un tamaño aproximado de 540 pb tal como se lo había diseñado, un detalle importante que se puede evidenciar es la escasa formación de banda en el carril 9, el cual puede deberse a la escasa muestra de ADN o posibles interferencias presentadas durante el análisis de PCR. Los carriles 2, 3 y 4 se observa que no existe formación de bandas dado que son los controles negativos.

Estos resultados son semejantes a los encontrados por (Rehman et al., 2017, pp. 559-564), quien, al realizar el análisis de PCR, de 89 muestras de heces de caninos 58 resultaron positivas para *Ancylostoma caninum* con ampliaciones de tamaño de 160 pb en todas las muestras (Rehman et al., 2017, pp. 559-564). Otro estudio realizado por (Lucio et al. 2012, pp. 1041-1044), a partir muestras fecales de caninos que resultaron positivas para *Ancylostoma spp.* por microscopía fueron sometidos a

PCR para la detección de *Ancylostoma caninum* dirigiéndose al gen RTGHF1 y RTABCR1, en los resultados de PCR encontraron que de las 45 muestras sometidas a PCR, 38 muestras fueron positivas, para el parásito con un tamaño de producto específico de 540 pb, además se menciona que no todas las muestras formaron bandas lo que podría deberse a factores inhibidores de la PCR de origen fecal, cantidad inadecuada de ADN en la muestra y presencia de otros *Ancylostoma spp.* distintos de *Ancylostoma caninum* por (Lucio et al. 2012, pp. 1041-1044).

De forma similar se llevó a cabo un estudio en Australia en el cual se analizaron mediante PCR las muestras fecales de perros y gatos que dieron positivo por microscopía para *Ancylostoma caninum*. Los resultados del estudio mostraron, que, de 96 muestras microscópicas positivas para anquilostomiasis de perros, 92 fueron amplificado con éxito por PCR, los investigadores también han documentaron que la incapacidad para amplificar todas las muestras era asociada con factores inhibitorios dentro de la reacción de PCR o una cantidad inadecuada de ADN en la muestra (Palmer & Thompson 2008, pp. 181-190).

Otro estudio realizado por (Oliveira & Katagiri 2017, pp.14-19), a partir de 158 muestras positivas para huevos de anquilostomiasis, 106 (67,1%) fueron amplificados por PCR y, de ellos, 88 (55,7%) fueron secuenciados con éxito para la identificación de especies. Los análisis moleculares revelaron que las infecciones individuales con *A. caninum* o con *A. braziliense* se registraron en 61,4% y 12,5% de los perros, respectivamente por (Oliveira and Katagiri 2017, pp.14-19).

Todas estas investigaciones realizadas que se correlacionan a los hallazgos realizados en el estudio dan una clara muestra de gran utilidad de la técnica molecular de la PCR en la detección de parásitos como el *Ancylostoma caninum*, además posibilitando la diferenciación de infecciones, detección con mayor sensibilidad y presión para aquellos parásitos helmintos zoonóticos y parásitos protozoarios en perros y distintos animales.

4.4.4. Resultados de la secuenciación Sanger y construcción de árbol filogenético del parásito *Ancylostoma caninum*

4.4.4.1. Amplificación de productos de PCR punto final analizando control interno de extracción de ADN para evaluar su calidad

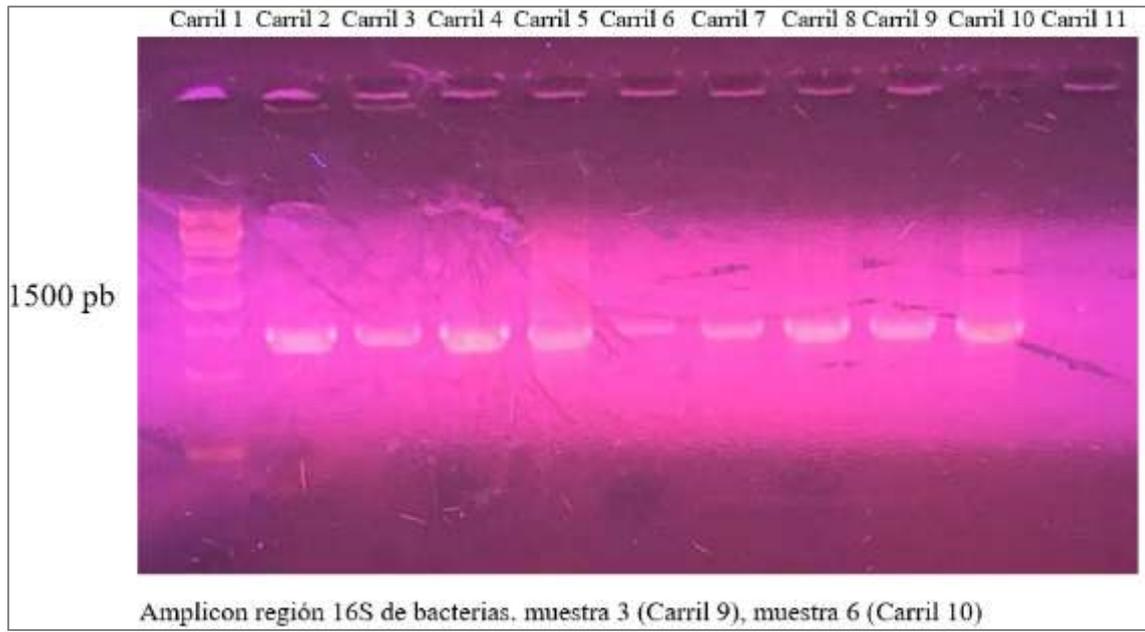


Ilustración 13-4: Productos de PCR punto final analizando control interno de extracción de ADN para evaluar su calidad

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

En la ilustración 13-4, se puede observar la amplificación realizada a los productos de la PCR de alrededor de 500 pb, en el carril 1 se tiene la formación de bandas del marcador molecular ProxiO 1kb ladder plus (Carril 1), mientras que la formación de bandas en los carriles 2, 3 y 4 corresponden al control de PCR amplificando la región 16S de bacterias, el cual se amplificó de manera exitosa, de forma similar se visualiza la formación de bandas en los carriles 9 (muestra 3: muestra de heces) y carril 10 (muestra 6: resuspensión de huevos), en el carril 11 no se evidencia la formación de bandas dado que se trata del control negativo.

Con los resultados obtenidos en esta segunda corrida de PCR y la amplificación exitosa en todas las muestras y controles 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 del parásito *Ancylostoma caninum*. Por otra parte, si se da una escasa o nula formación de bandas una posible razón es la no detección de los parásitos, que puede ser por la escasa concentración de material genético que daría cuenta de baja carga parasitaria tal como lo indica (Wang, Li & Xu 2019, pp. 610-613).

4.4.4.2. Electroferogramas obtenidos por Secuenciación de Sanger

- *Electroferograma de la muestra 3*

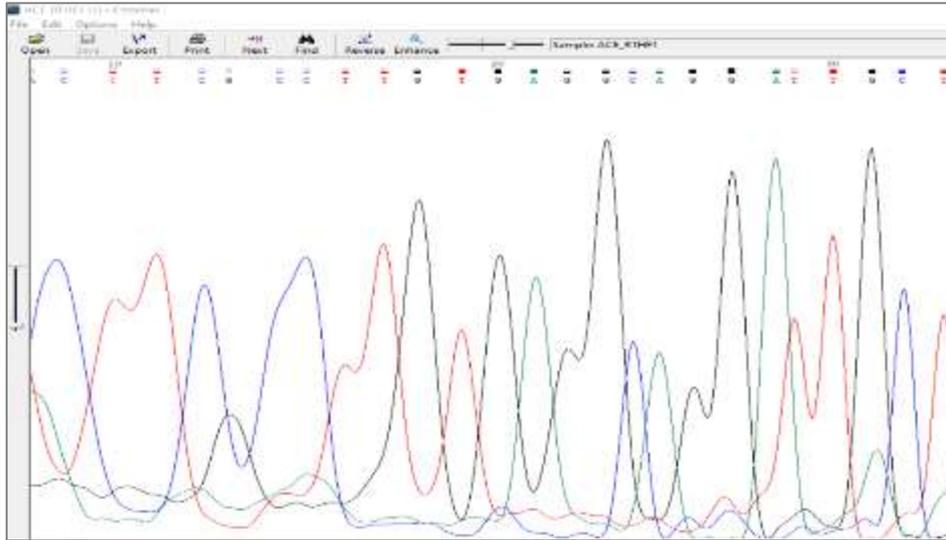


Ilustración 14-4: Secuencias de nucleótidos resultantes de electroferogramas (muestra 3) observados en Chromas Lite 2.01

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

- *Secuencias consenso obtenidas del electroferograma de muestra 3 mediante programa MEGA 5.0*

>Muestra 3

```
ACTTCGCCTTGTGAGGCAGGATTGCTAACCTTGTACTGAGCGGTGATGTCCTTGCCG
TTGTGGAGAGTCTGCAACTGGATGTTTCCCTTTTGAGAGATTTACAGCAAGATACGCA
GCAGGGTCTATATCCCGTGCCTTGCCATCCGCAGAGATGCTTTTCACCCCAAATGC
AGATGCTCACCAGTGGTTCTGGTTCCCGTATTGCCAGTCACGCCCAATCGCTGACCG
GCATTTACAGTGTGCCTGTCTTGACGGCAATGCTGCTCAGGTGCATGTAGGTACAT
TGATACTTGCTGCCGTCATTTCTGTTGTATTCTACAGTTACAGACAGTCCACCTGCA
GTATTCGGATTGTTGTTGACCTGAGTGACCTTGCCCTTGTCTTCCGTTGCCAGTACA
TTGTCATGCTTGGCTTGAATGTCGATGCCCTTGTGCATTTGCGTCTT
```

- *Electroferograma de muestra 6*

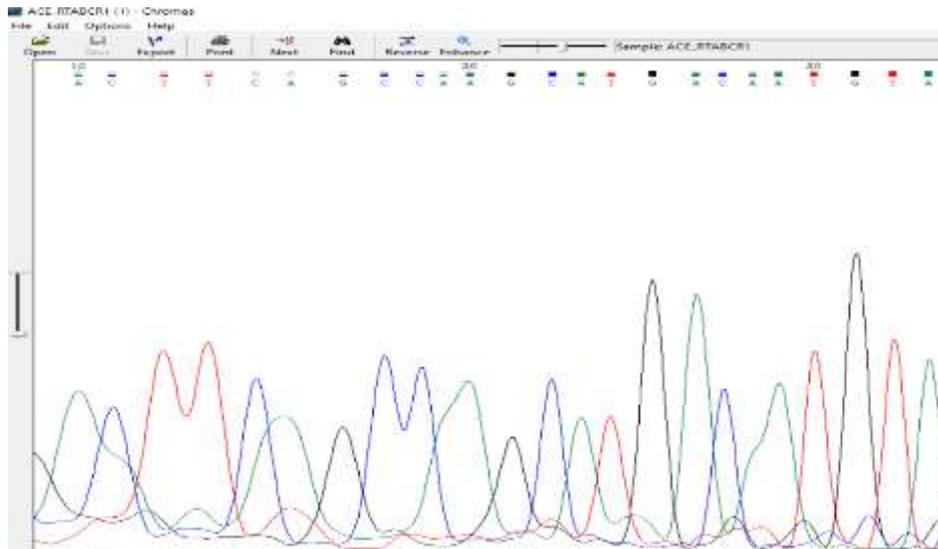


Ilustración 15-4: Secuencias de nucleótidos resultantes de electroferogramas (muestra 6) observados en Chromas Lite 2.01

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

- *Secuencias consenso obtenidas del electroferograma de muestra 6 mediante programa MEGA 5.0.*

>Muestra 6

```

ACTTCAGCCAAGCATGACAATGTAATCGCCACCGTTACAGCCCTATGTAAGGTGT
CTATGTGCAGCAAGAGTCGTTACTGGGTGGCGGCAGTGATTGCTGTGCGAAGTTCG
CGTTTCGCTGAGCTTTAGACTTGATGAGCATTGCATGAATGCCGCTTACTGCTTGT
TGTCTTGGTTGAGCATTAGGCTAACGCCTGATGCGGCACCTGTCTGTCAGGAAACCT
TAATGATCTGCTAACGCGGACGCCAGTACAGCAATAACTTTTTACGTTTAATGTTTG
CAGAATCGTGACTTTACGTCACAATCGACTAGCTTCAGCGATGGATCGGTCGATTC
GCGTATCGATGAAAACGCAGCTAGCTGCGTTATTTACCACGAATTGCAGACGCTT
AGAGTGGTGAAATTTGAACGCATAGCGCCGTTGGGTTTTCCCTTCGGCAC

```

A partir de la Secuenciación de Sanger se pudo obtener los electroferogramas de las muestras 3 y 6 correspondientes al ADN purificado de huevos de *Ancylostoma caninum* extraído de heces y resuspensión de huevos, tal como se observa en la ilustración 14-4 y 15-4. En ambos casos se pudo visualizar los picos formados por cada nucleótido gracias a la aplicación Chromas Lite 2.01, posteriormente se extrajo la secuencia completa de nucleótidos (446 bases) con la ayuda de la aplicación Mega 5.0, obteniendo las secuenciaciones mostradas anteriormente.

La formación de los picos en el electroferograma proporcionó el orden de las bases en la secuenciación de fragmentos de ADN del *Ancylostoma caninum*, y a cada una de las bases le

correspondió un color que el equipo interpretó como un pico colocado en la parte superior de acuerdo con su intensidad de fluorescencia. Al visualizar los picos bien definidos, se puede deducir que no existe contaminación con otra secuencia de ADN, sin embargo, cabe resaltar que existe algo de ruido en ambas electroferogramas, las causas podrían estar asociados a la presencia de mínimas cantidades de contaminantes ya sea ADN o con otro cebador que comúnmente suele ser el cebador reverso tal como lo indica (Cornejo, Serrato & Rocha 2014, pp. 27-51), menormente se distinguen secuencias encimados lo cual brinda una información importante para preparar de una manera más específica la amplificación durante el PCR. En cuanto a la secuencia obtenida se obtuvo un total de 446 bases para ambas muestras en la ampliación mega 5.0., los cuales posteriormente se ordenaron y compararon con secuencias de bases de datos.

4.4.4.3. Alineación de las secuencias utilizando el programa MEGA 5.0

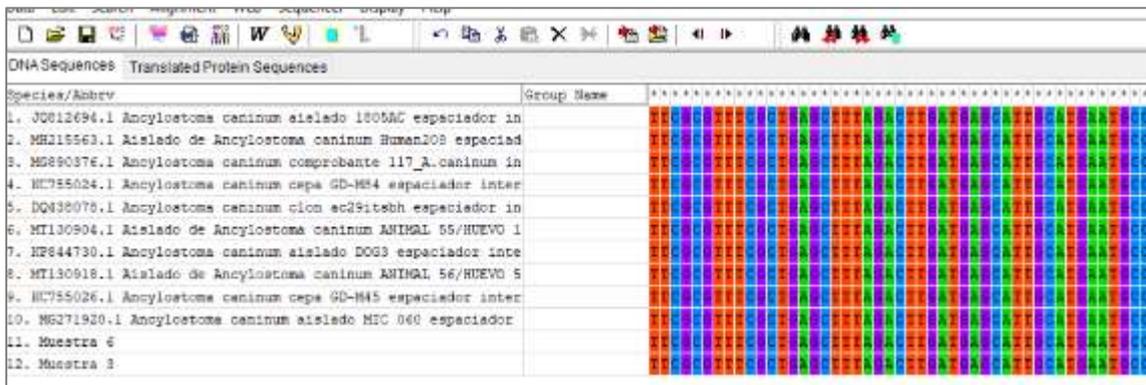


Ilustración 16-4: Alineación de secuencias de muestras con secuencias de referencia disponibles en GenBank por sus números de acceso, utilizando el programa MEGA 5.0

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

Una vez obtenido la secuencia del parásito *Ancylostoma caninum*, se comparó con las secuencias disponibles en las diferentes bases de datos, para ello se utilizó el programa Geneious v11.1.5. con el algoritmo de búsqueda, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) específicamente para la base de datos NCBI, encontrándose más de 30 resultados semejantes para las secuencias introducidas en el programa, de los cuales se seleccionaron 10 secuencias de referencia mostrados en la ilustración 16-4, estos fueron seleccionados en base al porcentaje de similitud mayor a 90%, además se discriminaron a aquellas investigaciones basadas en el gen mitocondrial de la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI), debido a que estos no son adecuados para estudiar variaciones intraespecíficas, o diferencias entre especies, al tener índices bajos de mutación, con ello la imposibilidad de realizar comparaciones filogenéticas, por lo tanto únicamente se seleccionaron a aquellos con el gen de la subunidad 2 (ND2) ya que este se conserva lo suficiente

como para estar presente en diversos grupos de especies, asimismo siendo suficientemente variable para examinar relaciones evolutivas (Biointeractive 2015, párr.2-4).

Posteriormente, se alinearon las 10 secuencias de referencia (JQ812694, MH215563, MG271920, KP844730, DQ438078, MT130918, KC755026, MT130904, MG890376 y KC755024) por sus números de acceso en el programa MEGA 5.0, con las dos secuencias obtenidas, deslizado las bases hasta encontrar el patrón que maximizó la similitud entre todas ellas, que se observan en la ilustración 16-4, este proceso de alineamiento permitió reconocer diferencias que se reflejan entre relaciones evolutivas (Hernández, Quijada & Eiros 2020, pp.150-161).

4.4.5.Árbol filogenético de aislamientos de *Ancylostoma caninum* basado en las secuencias de ARNr ITS1 y 5.8S ITS2

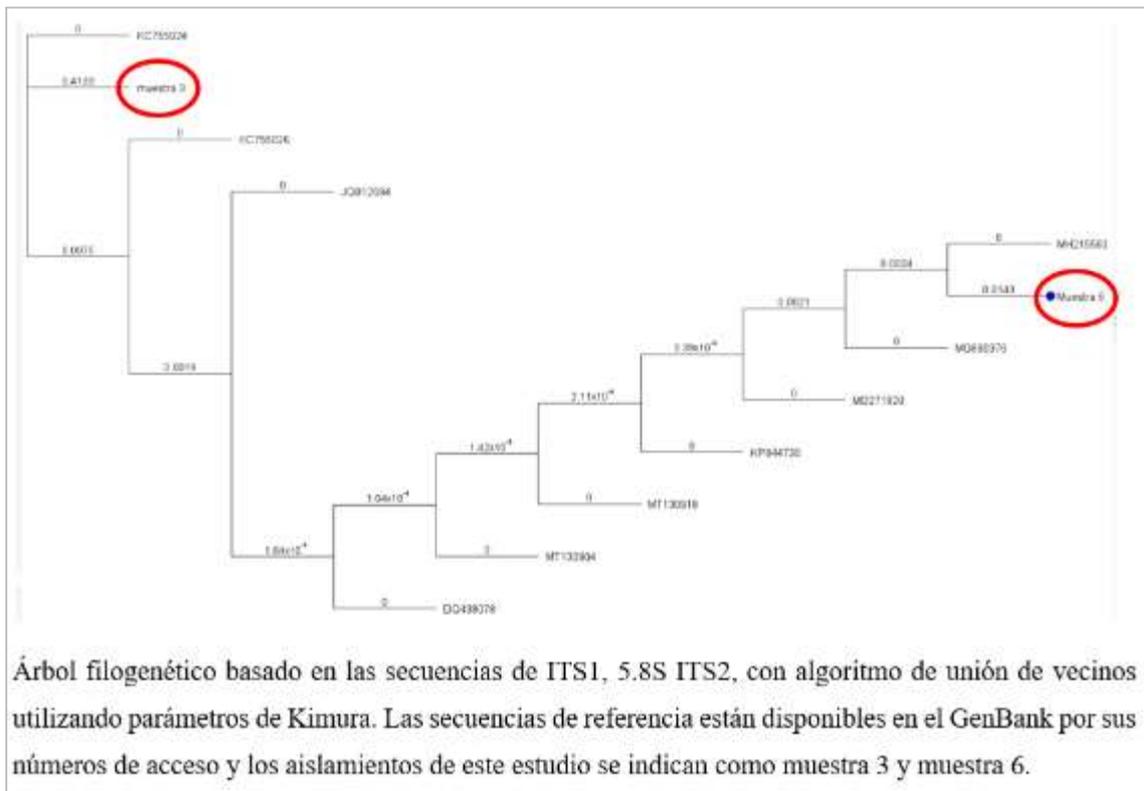


Ilustración 17-4: Árbol filogenético de aislamientos de *Ancylostoma caninum* basado en las secuencias de ITS1, 5.8S ITS2

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

El árbol filogenético fue diseñado en el programa Geneious v11.1.5, donde se puede observar las relaciones ancestrales entre las distintas secuencias del parásito *Ancylostoma caninum* obtenidas en este estudio y comparadas con las secuencias de referencia, cada división en ramas representa un proceso de especiación o el grado de mutación entre especies, y en base a los parámetros de Kimura que estable que una secuencia pertenece a la misma especie si el grado de separación es

menor al 2%, por lo tanto se visualiza que en cada rama la separación es menor del 2% , por lo que se afirma con certeza que se trata de la misma especie es decir del parásito *Ancylostoma caninum* (Casanelas 2018, pp. 241-257). Tal es el caso que la secuencia de la muestra seis posee una similitud del 99, 81% con la secuencia JQ812694, que corresponde al *Ancylostoma caninum* aislado 1805AC espaciador interno transcrito 1, secuencia parcial; gen de ARN ribosomal 5.8S y espaciador interno transcrito 2, derivada del perro, resultados que concuerdan con los hallazgos esperados, también posee una gran similitud del 99,76% con la secuencia MH215563, que corresponde al aislado de *Ancylostoma caninum* Human208 espaciador interno transcrito 1 y gen de ARN ribosomal 5.8S, secuencia parcial con código de acceso MH215563. En cuanto a la muestra tres posemos observar que comparte un grado de similitud del 58,67 % con la secuencia KC755024.1. Estos resultados comparten grados de similitud altos con los estudios realizados por (Oliveira & Katagiri, 2017, pp.14-19), donde se realizó una comparación de 33 secuencias de *Ancylostoma* spp., encontrándose mediante la realización de un árbol filogenético que 10 son infecciones únicas causados por *Ancylostoma caninum*, de igual manera otro estudio realizado por (Liu et al., 2013, pp. 1-6), se presentan secuencias ITS completas de *A. caninum* derivadas de gatos (GenBank: KC755026, KC755028 y KC755029), la longitud de las secuencias obtenidas (738 pb) fue idéntica a la secuencia ITS de *A. caninum* derivada de perro, así como el rango de similitud de secuencias fue del 98,6 % al 100 %. Este hallazgo indicó que podría haber una infección cruzada de *A. caninum* entre perros y gatos en las áreas estudiadas.

CAPÍTULO V

5. MARCO PROPOSITIVO

5.1. Propuestas

- Elaboración de un jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya para el control de parasitosis en perros del refugio-Santuario PAE de la ciudad de Riobamba.
- Implementación de técnicas de biología molecular: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de parásitos zoonóticos en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

5.1.1. Descripción de la propuesta: Elaboración de un jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya para el control de parasitosis en perros

En base a los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Integración Curricular como alternativa para controlar la alta prevalencia de parásitos encontrados en perros callejeros de la ciudad de Riobamba, se propone elaborar un jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya como una alternativa viable y económica para el control de parásitos en canes, además que los desparasitantes existentes en el mercado suelen ser nocivos para el medio ambiente, aumentan el costo de producción, no abarcan la totalidad de los parásitos y perjudican a largo plazo la salud de los animales que son sometidos a estos tratamientos.

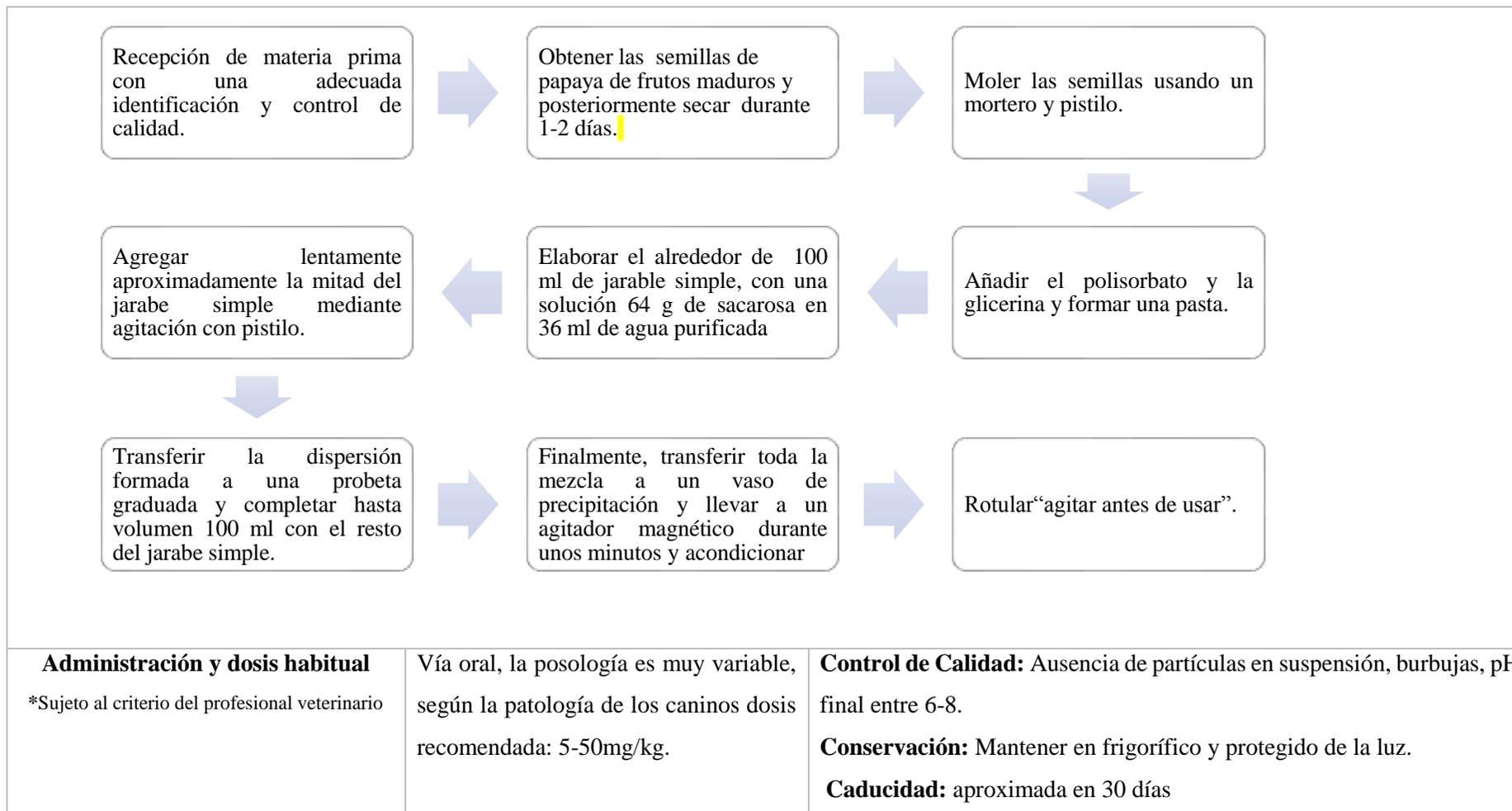
La papaya (*Carica papaya L.*) pertenece a la familia Caricaceae es una fruta muy común en el Ecuador, se cultiva tanto en plantaciones y huertos familiares, el tronco alcanza una altura de 3-8 m. y está cubierto de cicatrices visibles de pecíolos de hojas. El fruto es grande, carnoso, que contiene pequeñas semillas negras que constituyen alrededor del 15% del peso de la fruta y las semillas se unen en 5 filas al interior pared de la fruta (Sapaat & Satrija 2012, pp. 508-512).

Un gran número de compuestos farmacológicamente activos han sido aislado de *C. papaya*, de distintas partes de la planta que son utilizados por los curanderos como medicina tradicional para el tratamiento de diversas dolencias. Según diversos estudios las semillas del fruto han mostrado actividad bactericida y antiparasitaria especialmente en parásitos protozoarios y helmintos que son altamente zoonóticos, con el análisis fitoquímico se encontró que las enzimas proteolíticas como la papaína, alcaloide llamado carpaína y el isotiocianato de bencilo son los ingrediente antihelmíntico bioactivos de las semillas que interactúan con los grupos tiol de las enzimas de los patógenos, lo que resulta en su inactivación y muerte (Kugo & Keter 2018, p.337)

5.1.1.1. Plan de acción de la propuesta: elaboración de jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya.

Tabla 1-5: Plan de acción de la propuesta: elaboración de jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya.

Antecedentes:		Objetivo:	
Alta prevalencia de giardiasis y helmintiasis en perros callejeros de la ciudad de Riobamba.		Elaborar un jarabe antiparasitario de 100 mg/ml a base de semillas de papaya para el control de parasitosis del refugio-Santuario PAE de la ciudad de Riobamba.	
Formulación			
Materia Prima	Cantidad	Características Fisicoquímicas	Propiedades Farmacológicas
Semillas de papaya	10 g	Polvo marrón	Enzimas antiparasitarias, que ayudan a eliminar parásitos de forma natural.
Polisorbato 20	0.5 ml	Líquido oleoso, amarillo, soluble en agua etanol anhidro.	Agente emulgente no iónico y suspensor (Quiñoy & Abarca 2021, pp. 107-109).
Glicerina	10 ml	Líquido siruposo, límpido, incoloro, higroscópico y untuoso al tacto. Miscible en agua y etanol 96°.	Agente deshidratante osmótico con propiedades antibacterianas, edulcorante y disolvente de sustancias orgánicas y minerales (Quiñoy & Abarca 2021, pp. 107-109).
Excipiente jarabe Simple csp	100 ml	Líquido transparente, incoloro, viscoso, con olor dulce.	Vehículo de formulaciones orales líquidas en solución o suspensión y edulcorante (Quiñoy & Abarca 2021, pp. 107-109).
Metodología			



Fuente: (Quiñoy & Abarca 2021, pp. 107-109)

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

5.1.1.2. Costo de la propuesta para la elaboración de jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya

Tabla 2-5: Costo de la propuesta para la elaboración de jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya.

Materia Prima	Cantidad requerida	Valor unitario (\$)	Cantidad comercial	Valor unitario (\$)	Valor total (\$)
Semillas de papaya	10 g	3	10 g	3	300
Polisorbato 20	0.5 ml	0,20	27 ml	7,30	14,60
Glicerina	10 ml	0,20	120 ml	2,40	20
Excipiente jarabe Simple csp	100 ml	0,75	Agua purificada (20 L)	2,50	9,25
			Sacarosa (1 kg)	0,90	
COSTO TOTAL		4,15	-	16,1	343,85

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

En la tabla 2-5, se puede evidenciar el costo necesario para la elaboración del jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya, se observa que el costo individual para un perro es de 4,15 \$, que resulta mucho más económico que los jarabes antiparasitarios comerciales que rondan los 12 \$, además si realizamos un coste total para el refugio Santuario PAE, que alberga alrededor de 100 canes el valor total es de 343,85 \$. En dependencia de la cantidad de canes a los que se requiera administrar la preparación permite predecir el valor para implementar la presente propuesta.

5.1.1.3. Responsables de la ejecución de la propuesta para la elaboración de jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya

Para la ejecución de la propuesta de la elaboración de un jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya para el control de parasitosis en perros del refugio-Santuario PAE de la ciudad de Riobamba, serán responsables:

Tabla 3-5: Responsables de la ejecución de la propuesta para la elaboración de jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya.

EQUIPO RESPONSABLE DEL PLAN		
RESPONSABLE	FUNCIONES	PARTICIPACIÓN
Responsable del Refugio	Aprobación del estudio desarrollado para la posterior implementación de la propuesta.	80%
Profesional Bioquímico Farmacéutico	Elaboración del jarabe de acuerdo con la formulación establecida.	100%
Profesional Veterinario	Adecuar la dosis de administración	100%
Responsable del cuidado de canes del refugio	Administrar el jarabe antiparasitario a base de semillas de papaya.	90%

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

5.1.2.Descripción de la propuesta: Implementación de técnicas de biología molecular: PCR para la identificación de parásitos zoonóticos en la ESPOCH

En base a los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Integración Curricular se demostró que las técnicas moleculares de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) son altamente sensibles y precisas para la identificación y discriminación de parásitos con gran probabilidad zoonótica, tales como el *Ancylostoma caninum*, *Toxocara canis*, *Giardia Lamblia* etc., por lo que aplicar estas técnicas para identificar diferentes especies de parásitos es una alternativa viable a fin de controlar la alta prevalencia de parásitos encontrados en perros callejeros de la ciudad de Riobamba.

La propuesta se encamina a que una institución de prestigio dedicada a la investigación como lo es la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, que dispone de instalaciones adecuadas en la Facultad de Ciencias específicamente en el área de laboratorio Clínico, posibilite el implementar las técnicas moleculares antes mencionadas, para de esta manera brindar una solución a las enfermedades parasitarias en perros, ya que la mayoría de los albergues no proporciona un tratamiento adecuado y específico para controlar las infecciones parasitarias, al no realizarse pruebas de laboratorio para la identificación del patógeno de manera específica ya sea por el alto costo o por la escasa disponibilidad de técnicas moleculares en la ciudad y además tomado en cuenta que la eficacia de un tratamiento depende del diagnóstico oportuno en especial para las enfermedades zoonóticas (Xu et al., 2021, pp.537-545).

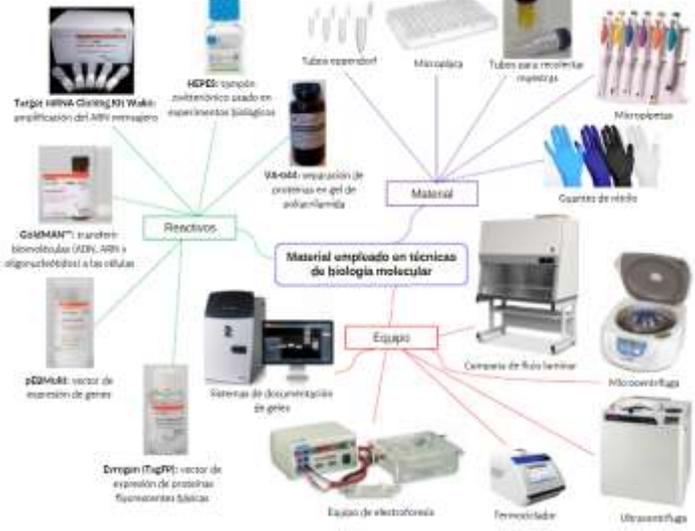
5.1.2.1. Plan de acción de la propuesta: Implementación de PCR para la identificación de parásitos zoonóticos en la ESPOCH

Tabla 4-5: Plan de acción: Implementación de PCR para la identificación de parásitos zoonóticos en la ESPOCH.

Antecedentes:	Objetivo:
Las técnicas moleculares de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) son altamente sensibles y precisas para la identificación y discriminación de parásitos con gran probabilidad zoonótica.	Implementar las técnicas de biología molecular: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de parásitos zoonóticos en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
Para la implementación de las técnicas moleculares se debe considerar las instalaciones, el equipamiento y el personal.	
INSTALACIÓN	<p>Se debe adaptar el laboratorio en tres áreas: Extracción, preparación de reactivo y la amplificación para evitar contaminación, además tener en cuenta el flujo de arie y el trabajo que debe ser unidireccional.</p> 

EQUIPAMIENTO

En cada área debe estar distribuidas los equipamientos necesarios para la realización de la PCR y secuenciación los cuales deben ser aprobados para uso en diagnóstico in vitro sea por la FDA (Food and Drug Administration) o por la CE (autrización europe).



PERSONAL

En relación con el personal debe ser aquel que posea competencias en el área y en gestión de calidad y además deben ser capaces de trabajar en equipo con alta concentración especialmente para evitar contaminación con productos de PCR, que es el principal problema por prevenir.



Debe ser incorporado también un sistema de gestión de calidad, rigiéndose en la norma ISO 15189 que especifica los requisitos necesarios que deben cumplir los laboratorios clínicos lo cual incluye manejo de la documentación, realización de control de calidad, l verificación y validación de método.

Fuente: (Tapia, Vega & Rojas 2015, pp. 794-801)

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

5.1.2.2. Costo de la propuesta de la propuesta: Implementación de PCR para la identificación de parásitos zoonóticos en la ESPOCH

- Costo de instalaciones para implantación de técnicas moleculares

Tabla 5-5: Costo de instalación de técnicas moleculares

Instalaciones	Cantidad (m2)	Costo estimado \$
Área para pre-PCR	4 x 4	5000.00
Área de preparación de reactivos	4 x 4	5000.00
Área post-PCR	4 x 4	5000.00
TOTAL	48	15000.00

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

Para la implementación de técnicas moleculares, se requieren tres áreas con costos estimados en cada uno que se observan en la 5-5.

- Costo de equipamientos para implementación de técnicas moleculares

Tabla 6-5: Costo de equipamientos para implementación de técnicas moleculares.

Equipamientos	Cantidad	V. unitario \$	V. Total \$
Equipos			
Centrífuga Labnet MPS 1000	1.00	640.10	640.10
Centrífuga refrigerada 5424 R	1.00	226.98	226.98
Minicentrífuga personal Minispin de Eppendorf	1.00	1610.00	1610.00
Cabina de seguridad biológica tipo II A2 120 Cm	1.00	5230.00	5230.00
Termociclador SimpliAmp™	1.00	5660.00	5660.00
Thermo Scientific™ Sistemas de electroforesis en minigel Owl™ EasyCast™ B2	1.00	502.00	502.00
Cole-Parmer™ Transiluminadores de luz blanca	1.00	900.00	900.00
Cámara de incubación	1.00	2930.00	2930.00
Ultracongelador Isotemp™	1.00	11985.00	11985.00
SUBTOTAL			29684.08
Reactivos			
Taq DNA Polimerasa	1.00	105.73	105.73

Tth-pol DNA Polimerasa	1.00	334.17	334.17
Pfu DNA Polimerasa (DNA-tested)	1.00	334.17	334.17
Klein-Taq	1.00	126.4	126.4
4 dNTPs mix 40mM	1.00	18.30	18.30
100bp DNA Ladder	1.00	57.53	57.53
SUBTOTAL			976.30
Instrumentos de apoyo			
Micropipetas de volumen ajustable Elite™(0.2 a 2 µl y 2 a 20 µl)	2.00	257.00	514.00
Micropipetas de volumen variable Reference™ (100 a 1000 µl)	1.00	404.00	404.00
Micropipetas mecánicas Tacta (20 a 100 µl)	1.00	364.00	364.00
Fisherbrand™ Digital Vortex Mixer	1.00	265.00	265.00
Scienceware™ Gradillas para tubos de microcentrífuga	1 (paquete de 5)	94.40	94.40
SUBTOTAL			3594.00
Consumibles			
Puntas de pipeta con filtro Finntip™ Flex (1000 µl. 300 µl. 30 µl. 10 µl)	4 (paquetes de 50)	60.35	241.40
Tubos de PCR	1 (paquete de 500)	87.85	87.85
Tubos para Microcentrífuga (1.5 y 2 ml)	2 (paquetes de 500)	284.69	284.69
SUBTOTAL			5335.34
TOTAL COSTO			39589.72

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

En la tabla 6-5, se puede observar los diferentes valores cotizados para los equipamientos necesario en la implementación de la técnica molecular PCR en diferentes casas comerciales: Thermo Fisher Scientific Inc, scientific y Merck

- *Costo de personal para implementación de técnicas moleculares*

Tabla 7-5: Costo de personal para implementación de técnicas moleculares.

Personal	Cantidad	V. unitario \$	V. Total \$
Profesional Bioquímico	2	800.00	1600.00
Farmacéutico o afín			
TOTAL	2	800.00	1600.00

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

5.1.2.3. Responsables de la ejecución: Implementación de PCR para la identificación de parásitos zoonóticos en la ESPOCH

Para la ejecución de la propuesta de implementación de técnicas de biología molecular: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de parásitos zoonóticos en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, serán responsables:

Tabla 8-5: Responsables de la ejecución de la propuesta: Implementación de PCR para la identificación de parásitos zoonóticos en la ESPOCH

EQUIPO RESPONSABLE DEL PLAN		
RESPONSABLE	FUNCIONES	PARTICIPACIÓN
Gestión	Evaluación de la propuesta	100%
Decanato Facultad de Ciencias		100%
Comisión académica	Evalúa la necesidad de la propuesta	100%
Decanato: POA PA		100%
Consejo Politécnico	Aprobación para la ejecución de la propuesta	100%
Financiero	Aprueba el monto económico necesario para la ejecución de la propuesta	100%
Planificación	Planifica para ejecución de la propuesta.	100%

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022.

CONCLUSIONES

- Se determinó la prevalencia de parasitosis en 120 muestras de heces de perros callejeros del Refugio-Santuario PAE de la ciudad de Riobamba, mostrando un porcentaje total del 68.33 %, siendo el más prevalente el protozoo *Giardia lamblia* (35.90%), seguido por los helmintos *Toxocara canis* (19.23%) y *Ancylostoma caninum* (17.31%); según el sexo las hembras presentan mayor frecuencia de parasitosis con el 62,20%; en cuanto a la edad los canes dentro del rango de 7 meses a 2 años presentan mayor número de casos positivos que equivale a una mayor prevalencia (32,93%), además el 92,68% de parasitosis se da en perros de raza mestiza; todos estos resultados dan una muestra clara del riesgo de infección que padecen los caninos de la ciudad, lo cual se traduce en una mayor probabilidad de ocurrencia de zoonosis entre el animal y el hombre, que corresponde a un problema de salud pública que sumado a alta capacidad resistencia de los parásitos a climas variados, el incremento de la población canina, hacinamiento, la desnutrición, mala higiene y otros factores, no hacen más que incrementar la prevalencia de parasitosis.
- Se reconoció la morfología de *Ancylostoma caninum* en muestras fecales de perros del Refugio- Santuario PAE de la ciudad de Riobamba, primero en la solución de suero fisiológico, donde se visualizó la presencia del parásito más no se pudo diferenciar de forma clara la morfología, en cuanto a la solución de lugol se observó a mayor detalle la morfología de los huevos, los cuales tienen una forma ovalada, con la membrana de la cáscara delgada transparente, y en su interior un óvulo segmentado en la etapa de 4 u 8 células, para un mejor reconocimiento de la morfología a las 27 muestras positivas se las utilizó para aplicar la técnica de flotación fecal de Wills, donde se evidenció una gran cantidad de parásitos, con dimensiones de 50 a 70 µm de largo por 30 a 50 µm de ancho presentando una membrana lisa con un embrión en desarrollo de color marrón grisáceo oscuro.
- Se caracterizó molecularmente al *Ancylostoma caninum* mediante la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), a partir de una muestra de heces y resuspensión de huevo, primero realizando la extracción del ADN obteniéndose resultados de los parámetros de A260/280 y A260/230 para el primero 2,2219 y 2,2219, y para el segundo 2,1244 y 2,1930 mostrando que el ADN extraído es aceptable y puro; se diseñaron cebadores directo (5'- TCACGACTTTGTCGGGAAG -3') y reverso (5'- TGCTAAGTTCAGCCGGGTAG -3') específicos de la especie *Ancylostoma caninum* dirigidas a la región ITS1, 5.8S, ITS2 a fin de amplificar 545-bp, una vez finalizado el PCR se amplificó con éxito ambas fuentes tanto de heces y resuspensión de huevos, al detectarse la formación de bandas en los carriles de electroforesis a 540 pb visualizadas bajo el transiluminador, por lo cual se concluye la presencia de muestras positivas para la especie

Ancylostoma caninum con un porcentaje de identidad del 49.1 % y 100 % y de calidad 30,4 % y 82,9 % respectivamente.

- Se identificó la especie *Ancylostoma caninum*, realizando una segunda corrida de PCR que permitió verificar que la amplificación del ADN total extraído fue de calidad para las muestras y controles, además no se encontró inhibidores de PCR que pudieran haber generado falsos negativos; una vez finalizada la Secuenciación de Sanger se obtuvo los electroferogramas con picos bien definidos, que permitieron extraer la secuencia completa de nucleótidos (446 bases), posteriormente se alinearon con 10 secuencias disponibles en bases de datos Genbank, seleccionadas en base al porcentaje de similitud (mayor 90%), finalmente se diseñó el árbol filogenético en el programa Geneious v11.1.5, donde se puede observar las relaciones entre las distintas secuencias del parásito *Ancylostoma caninum* con algoritmo de unión de vecinos utilizando parámetros de Kimura, afirmándose con certeza que las secuencias halladas pertenecen al parásito al mostrar una similitud del 99,81% con la secuencia JQ812694, del 99,76% con la secuencia MH215563, y 58,67 % con la secuencia KC755024.1.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda a las entidades públicas de la ciudad de Riobamba, buscar programas de control estratégico para prevenir las altas tasas de parasitosis encontradas en perros callejeros alojados en el refugio, a fin de evitar riesgos de transmisión zoonótico, a la vez que se controle la sobrepoblación y la salud en la población canina, de igual forma brindar capacitaciones a la ciudadanía sobre la importancia de las enfermedades zoonóticas y buenos hábitos de higiene.
- Para la identificación morfológica correcta de un parásito se recomienda utilizar técnicas de flotación, que permitan una mejor claridad en su observación, y además que se evita la presencia de elementos no parasitarios que interfieren con la identificación del parásito.
- Los resultados de este estudio demostraron que la técnica PCR es un método rápido y directo para la identificación y discriminación de parásitos tales como el *Ancylostoma caninum* que permiten una mejora en el diagnóstico de patógenos, por lo que se recomienda aplicar esta técnica para identificar diferentes especies de parásitos con alta probabilidad zoonótica.
- Con el objetivo de obtener mejores resultados en la extracción del ADN, se recomienda realizar primero una resuspensión de las heces, lo cual proporciona que las muestras contengan mayor pureza y calidad para la realización de PCR y secuenciación.

GLOSARIO

Ácido desoxirribonucleico (ADN): Componente químico primario de los seres vivos que se encuentran en los cromosomas y forma parte del material genético (Watson, 2018, p. 56).

Electroferograma: Representación gráfica de datos de secuencia generados por un secuenciador de ADN automatizado (Cuadrados, 2007, p.126).

Espaciador Transcrito Interno (ITS): Fragmento del genoma llamado ADN espaciador, ubicado entre el ADN ribosómico (ADNr), contiene elementos que sirven como estimuladores de la transcripción (Rittenour & Ciaccio, 2014, p. 34).

Giardiasis: Enfermedad causada por un protozoo patógeno llamado *Giardia lamblia* que se caracteriza por parasitar el tracto digestivo en humanos y otros mamíferos como canes (Olalla, 2011, p.35).

Larva Migrans Cutánea (CLM): Infección parasitaria causada por ascárides que se encuentran en los intestinos de perros y gatos, se caracteriza por generar lesiones cutáneas (Gómez, 2013, pp. 455).

Parasitosis: Son enfermedades infecciosas causadas por parásitos, que son aquellos seres vivos que necesitan de otra especie para sobrevivir, estos huéspedes pueden ser temporales o permanentes y proporcionan alimento y refugio al parásito responsable de causar una determinada enfermedad (Olalla, 2011, p.34).

PCR: Técnica de laboratorio que permite amplificar rápidamente fragmentos cortos de ADN a varios miles de millones de un segmento particular para su estudio detallado (Garibyan & Avashia, 2013, pp.1-4).

Secuenciación: Implica determinar el orden de las bases que constituyen el ADN, este proporciona a los científicos la información genética que se transporta en un segmento concreto de ADN (Berger & Parson, 2012, pp. 331-348).

Zoonosis: Enfermedad infecciosa transmitido de un animal no humano a humanos, pueden ser causados por agentes bacterianos, virales o parasitarios, pudiendo propagarse a través de los alimentos, el agua o el medio ambiente o por contacto directo (Organización Mundial de la Salud, 2020, párr.1-2).

BIBLIOGRAFÍA

ALMEIDA, S., & BONILLA, R. Prevalencia de *Ancylostoma caninum* en perros domésticos de las parroquias San Luis y Velasco del Cantón Riobamba [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Técnica de Ambato, Medicina y Veterinaria, Riobamba, Ecuador. 2016. pp.36-40. [Consulta: 2022-04-3]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/19921>

ÁLVAREZ, T. Determinación de la prevalencia de parásitos gastrointestinales zoonóticos en un albergue mediante coprología [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Politécnica Salesiana, Medicina Veterinaria, Quito, Ecuador. 2022. pp. 20-35. [Consulta: 2022-07-8]. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/21848>

BASANTES, J. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en caninos en una clínica veterinaria [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Politécnica Salesiana. Medicina Veterinaria, Cuenca, Ecuador. 202. pp. 55-60. [Consulta: 2022-07-8]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/20792/1/UPS-CT009236.pdf>

BERGER, C., & PARSON, W. *Análisis de secuencia de la región de control del ADN mitocondrial canino a partir de muestras de pelo mudado en investigaciones criminales* [en línea]. S.l.: s.n., 2011, pp. 331-348. [Consulta: 3 agosto 2022]. Disponible en: 10.1007/978-1-61779-461-2_23

BIESECKER, L. *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)* [en línea]. 2021. [Consulta: 23 abril 2022]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>.

BIOINTERACTIVE. *Alineamiento de secuencias: Introducción* [en línea]. 2015. [Consulta: 23 agosto 2022]. Disponible en: https://www.biointeractive.org/sites/default/files/Sequence-Alignment_Spanish.pdf.

BOWMAN, D., MONTGOMERY, S., & ZAJAC, A. Anquilostomas de perros y gatos como agentes de larva migrans cutánea. *Tendencias en Parasitología* [en línea], 2010, (EE. UU.), 26 (4), pp. 162-167. [Consulta: 2 abril 2022]. ISSN 14714922. Disponible en: 10.1016/j.pt.2010.01.005.

CASANELLAS, M. El modelo evolutivo de Kimura: un enlace entre el álgebra, la estadística y la biología. *La Gaceta de la RSME* [en línea], 2018, 21 (2), pp. 241-257. [Consulta: 23 agosto 2022]. Disponible en:

<https://gaceta.rsme.es/abrir.php?id=1444#:~:text=El%20modelo%20de%20Kimura%203,filogen%C3%A9tica%20que%20se%20usan%20actualmente.>

COELLO, R., PAZMIÑO, B. & REYES, E. Un caso de Larva Migrans Cutánea en un niño de Vinces, Ecuador. *Revista Estadounidense de Informes de Casos* [en línea], 2019, (EE. UU.), 20(1), pp. 1402-1406. [Consulta: 17 abril 2022]. ISSN 1941-5923. Disponible en: 10.12659/AJCR.915154.

CONSEJO EUROPEO PARA EL CONTROL DE PARASITOSIS DE LOS ANIMALES DE COMPAÑÍA. *Control de Protozoos Intestinales en Perros y Gatos* [en línea], Barcelona-España: ESCCAP, 2013. [Consulta: 2 abril 2022]. Disponible en: https://www.esccap.org/uploads/docs/3sbvfy71_ESCCAP_Guide_6_spanish_version_def.pdf

CORNEJO, A., SERRATO, A. & ROCHA, M. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Tlalpan, México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2014. pp. 27-51.

CUADROS, J. Herramienta de visualización y procesamiento de señales electroforéticas desarrollada usando software libre. *Ciencia e Ingeniería* [en línea], 2007, 28 (3), p. 126. [Consulta: 28 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/5075/507550780001.pdf>

D'AMELIO, S. & CAVALLERO, S. *Módulo de Referencia en Ciencias Biomédicas: Geohelminths enciclopedia de Infección e Inmunidad* [en línea]. Roma-Italia: Elsevier, 2022, pp. 560-569. [Consulta: 17 abril 2022]. Disponible en: 10.1016/B978-0-12-818731-9.00025-2

DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD DEL BANCO NACIONAL DE ADN. *Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN* [en línea]. Salamanca-España. 2020. [Consulta: 21 agosto 2022]. Disponible en: <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>.

FURTADO, L., & DIAS, O. El genotipado de los huevos revela la posibilidad de una infección patente por *Ancylostoma caninum* en el intestino humano. *Reporte Científico* [en línea], 2020,

(Brasil), 10 (1), pp. 1-7. [Consulta: 17 abril 2022]. ISSN 2045-2322. Disponible en: 10.1038/s41598-020-59874-8.

GALARZA, C. Los Alcances de una Investigación . *CienciAmérica* [en línea], 2020, (Ecuador) 29 (3), pp. 1-5. [Consulta: 5 septiembre 2022]. Disponible en: file:///C:/Users /59399/Downloads/Dialnet-LosAlcancesDeUnaInvestigacion-7746475.pdf.

GARIBYAN, L., & AVASHIA, N. Reacción en cadena de la polimerasa. *Revista de Dermatología Investigativa* [en línea], 2013, (EE. UU.), 133 (3), pp. 1-4. [Consulta: 24 abril 2022]. ISSN 0022202X. Disponible en: 10.1038/jid.2013.1.

GERARDI, F; et al. Infecciones parasitarias en perros involucrados en intervenciones asistidas por animales. *Revista italiana de Ciencia Animal* [en línea], 2018, (Italia) 17(1), pp. 269-272. [Consulta: 17 abril 2022]. ISSN 1828-051X. Disponible en: 10.1080/1828051X.2017.1344937.

GIRALDO, M., GARCÍA, N., & CASTAÑO, J. Prevalencia de helmintos intestinales en caninos del departamento del Quindío. *Biomédica* [en línea], 2005, 25(1), pp. 346-352. [Consulta: 2 abril 2022]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v25n3/v25n3a10.pdf>

GOMES, A. & KORF, B. *Técnicas de Pruebas Genéticas. Genética del cáncer pediátrico* [en línea]. S.l.: Elsevier, 2018, pp. 47-64. [Consulta: 23 agosto 2022]. Disponible en: 10.1016/B978-0-323-48555-5.00005-3

GÓMEZ, A. Larva migrans cutánea relacionada con Ancylostomas. *Dermatol Rev Mex* [en línea], 2013, 57 (6), p. 455. [Consulta: 28 septiembre 2022]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/A-Gomez-3/publication/259334640_Larva_migrans_cutanea_relacionada_con_Ancylostomas/links/02e7e52b0ee02cf58f000000/Larva-migrans-cutanea-relacionada-con-Ancylostomas.pdf

HERNÁNDEZ, M., QUIJADA, N. & EIROS, J. Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología* [en línea], 2020, (Argentina), 52 (2), pp. 150-161. [Consulta: 24 agosto 2022]. ISSN 03257541. Disponible en: 10.1016/j.ram.2019.06.003.

INÁCIO, S., & GOMES, J. Diagnóstico Automatizado: Avances en el Diagnóstico de Infecciones Parasitarias Intestinales en Humanos y Animales. *Fronteras en la Ciencia Veterinaria*

[en línea], 2021, (Brasil), 8 (1), pp. 4-6. [Consulta: 3 mayo 2022]. ISSN 2297-1769. Disponible en: 10.3389/fvets.2021.715406.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Procedimientos de Laboratorio: Parasitología y micología. *Parasitología y micología* [en línea]. Perú: Capac Y, 2016, pp. 271-278. [Consulta: 21 mayo 2022]. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/2660-1.pdf>.

JIMENEZ P., MANSOUR, A., & CHARLES, S. Evaluación de la eficacia de productos antihelmínticos contra una infección por el anquilostoma canino (*Ancylostoma caninum*) aislado Worthy 4.1F3P en perros. *Revista Internacional de Parasitología: Drogas y Resistencia a las Drogas* [en línea], 2020, (EE. UU.), 13(1), pp. 22-27. [Consulta: 3 mayo 2022]. ISSN 22113207. Disponible en: 10.1016/j.ijpddr.2020.04.003.

KUGO, M., & KETER, L. El fortalecimiento de las semillas de la fruta *Carica papaya* en las meriendas escolares puede ayudar a los programas de desparasitación masiva en África: un estudio preliminar. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [en línea], 2018,18(1), pp. 327. [Consulta: 26 agosto 2022]. ISSN 1472-6882. Disponible en: 10.1186/s12906-018-2379-2.

LIU, Y., ZHENG, G., & ALSARAKIBI, M. Identificación molecular de *Ancylostoma caninum* aislada de gatos en el sur de China basada en la secuencia ITS completa. *Investigación BioMed Internacional* [en línea], 2013, (China), 13(1), pp. 1-6. [Consulta: 3 abril 2022]. ISSN 2314-6133. Disponible en: 10.1155/2013/868050.

LORENZ, T. Reacción en cadena de la polimerasa: protocolo básico más estrategias de optimización y solución de problemas. *Revista de experimentos visualizados* [en línea], 2012, (EE. UU.) (63), pp. 2-6. [Consulta: 5 junio 2022]. ISSN 1940-087X. Disponible en: 10.3791/3998.

LUCIO, A., LIOTTA, J., YAROS, J., BRIGGS, K., & BOWMAN, D. Diferenciación morfológica de los huevos de *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma tubaeforme* y *Ancylostoma braziliense* de perros y gatos en Estados Unidos. *Revista de Parasitología* [en línea], 2012, (EE. UU.), 98(5), pp. 1041-1044. [Consulta: 9 julio 2022]. ISSN 0022-3395. Disponible en: 10.1645/GE-2928.1.

MEDINA, R., RODRÍGUEZ, R. & BOLIO, M. Nematodos intestinales zoonóticos en perros de parques públicos de Yucatán, México. *Biomédica* [en línea], 2018, (México) 38(1), p.105. ISSN 0120-4157. [Consulta: 17 abril 2022]. Disponible en: 10.7705/biomedica.v38i0.3595.

MERCHÁN, A., & TÓRRES, C. Técnicas de biología molecular para el desarrollo de la investigación. Una revisión de la literatura. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* [en línea], 2017, (Colombia), 16(1), pp. 1100-1111. [Consulta: 23 abril 2022]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/325653748_Molecular_biology_techniques_for_research_development_A_literature_review.

MULINGE, E., NJENGA, S., & ODONGO, D. Identificación molecular de anquilostomas zoonóticos en perros de cuatro condados de Kenia. *Revista de Helminología*, [en línea], 2020, (Kenia) 94 (1), pp. 43-94. [Consulta: 3 abril 2022]. ISSN 0022-149X. Disponible en: 10.1017/S0022149X1900018X.

NAGAMORI, Y., HALL SEDLAK, R., & DEROSA, A. Evaluación de VETSCAN IMAGYST: un sistema de detección de parásitos fecales caninos y felinos en clínica integrado con un algoritmo de aprendizaje profundo. *Parásitos & Vectores* [en línea], 2020, (EE. UU) 13 (1), pp. 346-354. ISSN 1756-3305. [Consulta: 17 abril 2022]. Disponible en: 10.1186/s13071-020-04215-x

NAUPAY, I., CASTRO H., & TELLO A. Prevalencia de parásitos intestinales con riesgo zoonótico en *Canis lupus familiaris* de la localidad de Retes, Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* [en línea], 2019, (Perú), 30 (1), pp. 320-329. [Consulta: 2 abril 2022]. ISSN 1682-3419. Disponible en: 10.15381/rivep.v30i1.15766.

NEMZEK, J., & LESTER, P. *Biología y Enfermedades de los Perros: Medicina de animales de laboratorio* [en línea]. Colegio Americano de Medicina. Elsevier, 2015. pp. 511-512. [Consulta: 3 mayo 2022]. Disponible en: 10.1016/B978-0-12-409527-4.00012-2

OLALLA, R. Parasitosis comunes internas y externas. *Educación Sanitaria* [en línea], 2011, 30 (4), pp. 35. [Consulta: 28 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-X0212047X11247484>.

OLIVEIRA, A., & KATAGIRI, D. Identificación molecular de especies de *Ancylostoma* de perros y evaluación del riesgo zoonótico en hogares de bajos ingresos, estado de São Paulo, Brasil. *Diario de Helminología* [en línea], 2017, (Brasil) 91 (1), pp. 14-19. [Consulta: 3 abril 2022]. ISSN 0022-149X. Disponible en: 10.1017/S0022149X15001145.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Zoonosis* [en línea]. 2020. [Consulta: 28 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>.

OSAWA, Y., & IKEBUKURO, K. Detección sencilla y rápida de productos PCR específicos de genomas bacterianos mediante proteínas Zn finger. *Investigación de ácidos nucleicos* [en línea], 2008, (Japón) 36(11), pp. 2-3. [Consulta: 6 junio 2022]. ISSN 0305-1048. Disponible en: 10.1093/nar/gkn274

OTERO, A. *Enfoques de la Investigación: Métodos para el diseño del proyecto de Investigación* [en línea]. 1. Colombia: Universidad del Atlántico, 2018, pp. 10-15. [Consulta: 9 septiembre 2022]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/326905435_ENFOQUES_DE_INVESTIGACION

PALMER, C., & THOMPSON, A. Estudio nacional sobre los parásitos gastrointestinales de perros y gatos en Australia. *Parasitología veterinaria* [en línea], 2008, (Australia), 151(2), pp. 181-190. [Consulta: 22 agosto 2022]. ISSN 03044017. Disponible en: 10.1016/j.vetpar.2007.10.015.

QIAGEN. *Control de calidad de muestras de ADN* [en línea]. 2022, p. 1. [Consulta: 21 agosto 2022]. Disponible en: <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/bench-guide/ngs/dna-sequencing/dna-sample-qc-for-ngs>.

QIAGEN. *QIAamp® Fast DNA Stool Mini Handbook* [en línea], 2020, pp. 22-23. [Consulta: 4 junio 2022]. Disponible en: file:///C:/Users/59399/Downloads/HB-1764-002_HB_QA_FastDNA Stool_0220_WW.pdf.

QUIÑOY, R. & ABARCA, E. *Formulación de medicamentos individualizados en veterinaria* [en línea]. 2021. I.S.I.: s.n. [Consulta: 25 agosto 2022]. Disponible en: <https://www.lasemi.es/wp-content/uploads/2021/02/Formulario-veterinaria-Acofarma.pdf>.

RAZA, A., RAND, J., QAMAR, A., JABBAR, A., & KOPP, S. Parásitos Gastrointestinales en Perros de Refugio: Ocurrencia, Patología, Tratamiento y Riesgo para los Trabajadores de Refugio. *Animales* [en línea], 2018, (Australia), 8(7), p. 108-123. ISSN 2076-2615. [Consulta: 17 abril 2022]. Disponible en: 10.3390/ani8070108

REHMAN, A., AKHTAR, R., & AKBAR, H. Primer reporte de detección molecular de *Ancylostoma caninum* en Lahore, Pakistán: la amenaza de los animales domésticos. *Medicina*

veterinaria [en línea], 2017, 62 (10), pp. 559-564. [Consulta: 3 abril 2022]. ISSN 03758427. Disponible en: 10.17221/14/2017-VETMED.

SAARI, S., NÄREAHO, A. & NIKANDER, S. *Parásitos Caninos y Enfermedades Parasitarias: Nematodos (gusanos redondos)* [en línea]. Helsinki-Finlandia: Elsevier, 2019, pp. 83-149. Disponible en: 10.1016/B978-0-12-814112-0.00005-2

SAEED, S. Morfología: *Ancylostoma caninum* [Blog]. Michigan: Universidad de Michigan. 2003. [Consulta: 16 abril 2022]. Disponible en: https://animaldiversity.org/accounts/Ancylostoma_caninum/

SÁNCHEZ, J., & SALAZAR, J. Caso clínico: larva migrans cutánea. *Práctica Familiar Rural* [en línea], 2021, (Ecuador), 6(1), pp. 2-8. [Consulta: 24 abril 2022]. ISSN 2477-9164. Disponible en: <https://practicafamiliarrural.org/index.php/pfr/article/view/197>

SAPAAT, A., & SATRIJA, F. Actividad antihelmíntica de semillas de papaya en infecciones por *Hymenolepis diminuta* en ratas. *Tropical Biomedicine* [en línea], 2012, (Malasia), 29 (4), pp. 508-512. [Consulta: 26 agosto 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23202594/>

SHIN, S. Enfermedades parasitarias de los animales de compañía. *Reseñas médicas de Hanyang* [en línea], 2010, (China), 30 (3), pp. 246-260. [Consulta: 9 julio 2022]. ISSN 1738-429X. Disponible en: 10.7599/hmr.2010.30.3.246.

SUGANYA, G. & PORTEEN, K. Prevalencia y caracterización molecular de helmintos zoonóticos en perros. *Revista de enfermedades parasitarias* [en línea], 2019, (India) 43 (1), pp. 96-102. [Consulta: 20 agosto 2022]. ISSN 0971-7196. Disponible en: 10.1007/s12639-018-1066-z.

TAPIA, C., VEGA, T., & ROJAS, C. Implementación del laboratorio clínico moderno. *Revista Médica Clínica Las Condes* [en línea], 2015, (Chile), 26(6), pp. 794-801. [Consulta: 27 agosto 2022]. ISSN 07168640. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864015001558>

THOMPSON, R., & CONLAN, J. Temas emergentes y zoonosis parasitarias en la región del Sudeste Asiático y Australasia. *Parasitología Veterinaria* [en línea], 2011, 181 (1), pp. 69-73. [Consulta: 2 abril 2022]. ISSN 03044017. Disponible en: 10.1016/j.vetpar.2011.04.025.

TUASA, C. Prevalencia de helmintos gastrointestinales zoonóticos de caninos en tres parques turísticos de la Ciudad de Ambato [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Técnica de Ambato, Medicina y Veterinaria, Ambato, Ecuador. 2015. pp. 16-80. [Consulta: 2022-07-7]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/18365>

UNIVERSIDAD CONTINENTAL. *Guías de Laboratorio de Parasitología* [en línea]. Lima-Perú: Instituto Nacional de Salud, 2018. [Consulta: 21 mayo 2022]. Disponible en: https://repositorio.continental.edu.pe/bitstream/20.500.12394/3340/6/DO_FCS_508_GL_ASUC_00640_2018.pdf

WANG, K., LI, H. & XU, Y. MFEprimer-3.0: control de calidad de los cebadores de PCR. *Investigación de ácidos nucleicos* [en línea], 2019, (China), 47(1), pp. 610-613. [Consulta: 23 agosto 2022]. ISSN 0305-1048. Disponible en: 10.1093/nar/gkz351.

WATSON, J. *ADN. El secreto de la vida* [en línea]. Barcelona-España: Penguin Random House Grupo Editorial España, 2018. [Consulta: 28 septiembre 2022]. Disponible en: https://books.google.es/books?id=nshQDwAAQBAJ&dq=ADN&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s

WELLER, P. *Harrison. Principios de Medicina Interna: Introducción a las helmintosis*. 19. Madrid-España: McGraw Hill, 2019, pp.255-320.

WHEELER, L. Anquilostomas de animales: *Ancylostoma sp.* [en línea]. 2018. [Consulta: 16 abril 2022]. Disponible en: <https://www.veterinaryparasitology.com/ancylostoma.html>.

XU, F., NIU, Y., & CHEN, Q. Anquilostomiasis en China central: diagnóstico morfológico y molecular. *Revista Parásitos & Vectores* [en línea], 2021, (China)14 (1), pp. 537-545. [Consulta: 3 abril 2022]. ISSN 1756-3305. Disponible en: 10.1186/s13071-021-05035-3.

YU, M., & CAO, Y. El principio y la aplicación de las nuevas tecnologías de PCR. *Serie de conferencias IOP: Ciencias ambientales y de la tierra* [en línea], 2017, (China), 100 (1), pp. 2-5. [Consulta: 3 abril 2022]. ISSN 1755-1307. Disponible en: 10.1088/1755-1315/100/1/012065.

ANEXOS

ANEXO A: REGISTRO DE INFORMACIÓN Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS FECALES DE CANES ALOJADOS EN EL REFUGIO SANTUARIO-PAE



Registro de información de canes alojados en el refugio Santuario-PAE



Recolección de muestras fecales de los canes

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

ANEXO B: PREPARACIÓN DE MUESTRAS FECALES PARA ANÁLISIS COPROPARASITARIO DIRECTO Y MEDIANTE LA TÉCNICA DE FLOTACIÓN DE WILLS



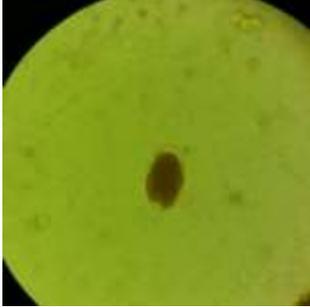
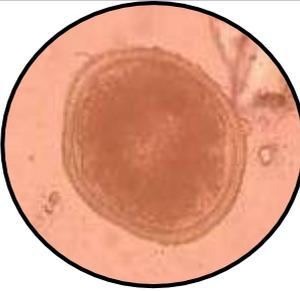
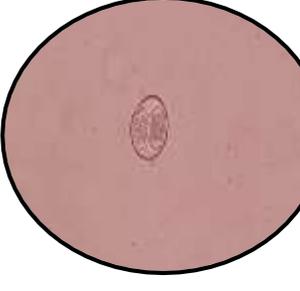
Preparación de muestras fecales para análisis coproparasitario directo



Desarrollo de la técnica de flotación de Wills: (A) pesado de cloruro de sodio; (B) solución de cloruro de sodio con agua destilada; (C) homogenización de la muestra en la solución; (D) filtrado y reposo

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

**ANEXO C: ANÁLISIS Y OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS MUESTRAS
FECALES MEDIANTE EL EXAMEN COPROPARASITARIO DIRECTO Y
TÉCNICA DE FLOTACIÓN**

 <p align="center">Análisis microscópico de heces</p>	 <p align="center">Observación de campos en solución de lugol</p>	 <p align="center">Registro de parásitos observados</p>
 <p align="center"><i>Ancylostoma caninum</i> en lugol bajo lente de 40X.</p>	 <p align="center"><i>Toxocara canis</i> en lugol, bajo lente de 40X.</p>	 <p align="center"><i>Dipylidium caninum</i> en suero fisiológico, bajo lente de 40x</p>
 <p align="center">Larva de <i>strongyloides stercoralis</i>, en lugol, bajo lente de 40X.</p>	 <p align="center"><i>Cystoisospora sp.</i> mediante flotación, lente 40X.</p>	 <p align="center"><i>Ancylostoma caninum</i> mediante flotación, lente 40X.</p>
 <p align="center"><i>Giardia lamblia</i>, en lugol, bajo lente de 40X.</p>	 <p align="center"><i>Giardia lamblia</i>, en suero fisiológico, bajo lente de 40X.</p>	

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

ANEXO D: DESARROLLO DE TÉCNICAS MOLECULARES

		
Equipos para PCR	Materiales para PCR	Preparación de Reactivos
		
Microtubos para PCR	Extracción de ADN	Columna para extracción de ADN
		
Calibración y corrida en termociclador según parámetros	Preparación de electroforesis en gel de agarosa al 2%	Colocación de las muestras y control en electroforesis
		
Análisis de los resultados obtenidos de PCR y Secuenciación Sanger		

Realizado por: Tene Quinchi, Kleber, 2022

ANEXO E: REGISTRO DE CANINOS DEL REFUGIO-SANTUARIO PAE

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO						
REGISTRO DE CANINOS "REFUGIO-SANTUARIO PAE"						
Trabajo de Integración Curricular		CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Ancylostoma caninum</i> Y PREVALENCIA DE PARASITOSIS EN PERROS DEL REFUGIO-SANTUARIO PAE DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA				
TESISTA:		Tene Quinchi Kleber Adrian				
		N° CANINOS	SEXO	RAZA	EDAD APROXIMADO	
		1	Hembra	mestizo	7 años	
		2	Hembra	mestizo	5 años	
		3	Hembra	mestizo	8 años	
		4	Macho	mestizo	9 años	
		5	Hembra	mestizo	2 años	
		6	Macho	mestizo	8 años	
		7	Macho	mestizo	3 años	
		8	Hembra	mestizo	11 años	
		9	Hembra	mestizo	1 años	
		10	Hembra	mestizo	6 años	
		11	Hembra	mestizo	2 años	
		12	Macho	mestizo	9 meses	
		13	Macho	mestizo	6 meses	
		14	Macho	Pastor aleman	5 años	
		15	Hembra	mestizo	8 meses	
		16	Hembra	mestizo	2 años	
		17	Macho	mestizo	4 años	
		18	Hembra	mestizo	10 meses	
		19	Hembra	Pit bull	5 años	
		20	Hembra	mestizo	1 año	
		21	Hembra	mestizo	4 años	
		22	Macho	mestizo	4 años	
		23	Hembra	mestizo	9 meses	
		24	Hembra	mestizo	10 meses	
		25	Macho	mestizo	1 año	

			26	Hembra	mestizo	2 años							
			27	Macho	mestizo	7 años							
			28	Macho	mestizo	11 meses							
			29	Macho	mestizo	8 años							
			30	Macho	mestizo	2 años							
			31	Hembra	Chiguagua	4 años							
			32	Hembra	mestizo	4 meses							
			33	Hembra	mestizo	2 años							
			34	Hembra	mestizo	4 meses							
			35	Hembra	mestizo	7 años							
			36	Macho	mestizo	2 años							
			37	Hembra	mestizo	5 años							
			38	Hembra	mestizo	1 año							
			39	Hembra	mestizo	1 año							
			40	Macho	mestizo	6 meses							
			41	Macho	mestizo	2 años							
			42	Hembra	mestizo	2 meses							
			43	Hembra	mestizo	4 años							
			44	Hembra	mestizo	7 meses							
			45	Macho	mestizo	6 años							
			46	Hembra	mestizo	8 meses							
			47	Hembra	mestizo	5 años							
			48	Hembra	mestizo	3 años							
			49	Macho	mestizo	7 meses							
			50	Macho	mestizo	6 años							
			51	Hembra	mestizo	4 años							
			52	Macho	Pastor A.	4 años							
			53	Macho	mestizo	9 años							
			54	Macho	mestizo	11 meses							
			55	Hembra	mestizo	1 mes							
			56	Hembra	mestizo	11 años							
			57	Hembra	mestizo	7 años							
			58	Macho	mestizo	7 años							
			59	Hembra	mestizo	2 años							
			60	Hembra	mestizo	1 año							
			61	Hembra	mestizo	6 meses							
			62	Macho	mestizo	8 meses							
			63	Macho	mestizo	3 años							
			64	Macho	mestizo	3 años							
			65	Hembra	mestizo	4 meses							
			66	Hembra	mestizo	2 meses							
			67	Hembra	mestizo	3 años							
			68	Hembra	mestizo	4 meses							
			69	Hembra	Pastor aleman	10 años							
			70	Macho	Pit bull	5 años							
			71	Hembra	mestizo	2 años							
			72	Macho	mestizo	8 años							
			73	Macho	mestizo	8 años							
			74	Hembra	mestizo	3 años							
			75	Macho	mestizo	3 años							

			76	Macho	mestizo	9 meses							
			77	Hembra	mestizo	6 años							
			78	Hembra	mestizo	9 años							
			79	Hembra	mestizo	3 años							
			80	Hembra	mestizo	3 años							
			81	Macho	mestizo	1 año							
			82	Macho	mestizo	5 años							
			83	Hembra	mestizo	9 años							
			84	Hembra	mestizo	7 años							
			85	Hembra	mestizo	7 años							
			86	Hembra	mestizo	3 años							
			87	Macho	mestizo	6 años							
			88	Hembra	mestizo	10 años							
			89	Macho	mestizo	4 años							
			90	Macho	mestizo	4 años							
			91	Macho	mestizo	3 años							
			92	Hembra	mestizo	3 años							
			93	Macho	mestizo	5 meses							
			94	Macho	mestizo	2 años							
			95	Macho	mestizo	3 años							
			96	Macho	mestizo	4 meses							
			97	Hembra	mestizo	5 años							
			98	Hembra	mestizo	3 meses							
			99	Macho	mestizo	3 años							
			100	Hembra	mestizo	4 años							
			101	Macho	mestizo	6 años							
			102	Hembra	mestizo	6 años							
			103	Hembra	mestizo	5 meses							
			104	Hembra	mestizo	7 años							
			105	Hembra	mestizo	7 años							
			106	Macho	mestizo	7 años							
			107	Macho	mestizo	3 años							
			108	Hembra	mestizo	6 meses							
			109	Macho	mestizo	9 meses							
			110	Hembra	mestizo	5 años							
			111	Macho	mestizo	9 años							
			112	Hembra	mestizo	3 años							
			113	Hembra	mestizo	11 años							
			114	Macho	mestizo	4 años							
			115	Macho	mestizo	4 años							
			116	Hembra	mestizo	9 años							
			117	Hembra	mestizo	4 años							
			118	Hembra	mestizo	4 años							
			119	Macho	mestizo	7 meses							
			120	Macho	mestizo	8 años							

ANEXO F: RESULTADOS DEL ANÁLISIS COPROPARASITARIO

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO								
REPORTE DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS COPROPARASITARIO								
Trabajo de Integración Curricular:		CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Ancylostoma caninum</i> Y PREVALENCIA DE PARASITOSIS EN PERROS DEL REFUGIO-SANTUARIO PAE DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA						
PARÁSITOS OBSERVADOS								
N° muestra	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Chilomastix mesnili</i>	<i>Ancylostoma caninum</i>	<i>Cystoisospora sp.</i>	<i>Toxocara canis</i>	<i>Dipylidium caninum</i>	Otros	
1	+	-	-	-	-	-		
2	-	-	-	-	-	-		
3	++	+	-	-	-	-		
4	++	-	-	-	-	-		
5	+	-	+	-	-	-		
6	-	-	-	-	-	-		
7	+	-	-	+	-	-		
8	-	-	-	-	-	-		
9	-	+	-	-	+	-		
10	-	-	-	-	-	-		
11	-	+	-	-	-	-		
12	++	+	+	-	++	-		
13	-	+	-	-	-	-		
14	+	+	-	-	-	-		
15	+	-	+	-	-	-		
16	+	+	+	-	-	-		
17	-	-	-	-	-	-		
18	+	-	-	-	-	-	<i>Iodamoeba bütschlii</i> (+)	
19	++	-	+	+++	+	-		
20	-	-	-	-	+	-		
21	-	-	-	-	-	-		
22	-	-	-	-	-	-		
23	+	-	-	-	-	-	<i>Hymenolepis nana</i> (+)	
24	-	+	+	-	-	-		
25	+	-	++	-	-	-		

81	-	-	-	-	-	-	-	
82	-	-	-	-	-	-	-	
83	+	-	+	-	-	+	-	
84	+	+	-	-	-	-	-	
85	-	-	+	-	-	+++	-	
86	++	-	-	-	-	-	-	
87	-	-	-	-	-	-	-	
88	++	-	-	-	-	-	-	<i>Iodamoeba bütschli (+)</i>
89	-	-	-	-	-	-	-	
90	+	-	++	-	-	+	-	
91	-	-	-	-	-	-	-	
92	-	-	-	-	-	+	-	
93	+	-	-	-	-	-	-	
94	-	-	-	-	-	-	+	
95	-	+	++	-	-	-	-	
96	+	-	-	-	-	-	-	
97	+	-	-	-	-	-	-	
98	-	-	-	-	-	+	-	
99	-	-	-	-	-	+	-	
100	-	-	+	-	-	++	-	
101	-	-	-	-	-	-	-	
102	+	+	-	-	-	-	-	
103	-	-	-	-	-	+	-	
104	-	-	+	-	-	+++	-	
105	+	-	-	-	-	-	-	
106	-	-	-	-	-	-	-	
107	-	-	-	-	-	-	-	
108	-	-	-	-	-	-	-	
109	-	-	-	-	-	-	-	
110	-	-	-	-	-	-	-	
111	+	-	+	-	-	++++	-	
112	-	-	-	-	-	-	-	
113	-	-	-	-	-	-	-	
114	-	-	+	-	-	+	-	
115	-	-	-	-	-	-	-	
116	+	-	++	-	-	+++	-	
117	+	+	-	+	-	-	-	
118	-	-	-	-	-	-	-	
119	-	-	-	-	-	-	-	
120	+	-	-	-	-	+++	+	



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: 14 / 12 / 2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)

Nombres – Apellidos: Kleber Adrian Tene Quinchi

INFORMACIÓN INSTITUCIONAL

Facultad: Ciencias

Carrera: Bioquímica y Farmacia

Título a optar: Bioquímico Farmacéutico

f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.



2177-DBRA-UTP-2022