



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**TIPIFICACIÓN GENÉTICA Y PREVALENCIA DE *Toxocara catis*
EN MUESTRAS FECALES DE FELINOS ALOJADOS EN
HOGARES DE LA PARROQUIA TOTORAS DEL CANTÓN
AMBATO, PROVINCIA DE TUNGURAHUA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR:

ARIAS RODRÍGUEZ JONATHAN HERNÁN

Riobamba – Ecuador

2022



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

TIPIFICACIÓN GENÉTICA Y PREVALENCIA DE *Toxocara catis*
EN MUESTRAS FECALES DE FELINOS ALOJADOS EN
HOGARES DE LA PARROQUIA TOTORAS DEL CANTÓN
AMBATO, PROVINCIA DE TUNGURAHUA

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: ARIAS RODRÍGUEZ JONATHAN HERNÁN

DIRECTORA: Dra. SANDRA NOEMÍ ESCOBAR ARRIETA, Ms.C.

Riobamba – Ecuador

2022

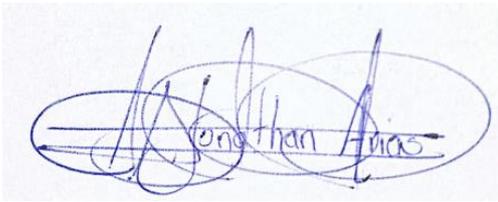
© 2022, Jonathan Hernán Arias Rodríguez

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, JONATHAN HERNÁN ARIAS RODRÍGUEZ, 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, 08-11-2022

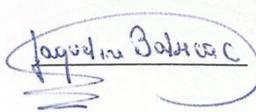
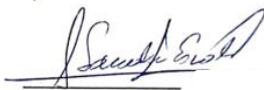
A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Jonathan Arias", is enclosed within a large, stylized blue oval scribble.

Jonathan Hernán Arias Rodríguez

185009944-9

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, **TIPIFICACIÓN GENÉTICA Y PREVALENCIA DE *Toxocara cati* EN MUESTRAS FECALES DE FELINOS ALOJADOS EN HOGARES DE LA PARROQUIA TOTORAS DEL CANTÓN AMBATO, PROVINCIA DE TUNGURAHUA**, realizado por el señor: **JONATHAN HERNÁN ARIAS RODRÍGUEZ**, 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
Dra. Jaqueline Elizabeth Balseca Castro, Mgs PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022 – 11 – 08
Dra. Sandra Noemi Escobar Arrieta, Mgs DIRECTORA DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2022 – 11 – 08
Dra. Verónica Mercedes Cando Brito, Mgs MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2022 – 11 – 08

DEDICATORIA

En el presente Trabajo de Titulación primeramente me gustaría agradecerle Dios, A la Virgen del Tránsito y al Niñito Caporal por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hicieron realidad este sueño anhelado. A mi Tutora la Dra. Sandra Escobar por haberme brindado sus conocimientos experiencia y apoyo para lograr la culminación de este Trabajo de Investigación. Y de manera especial también a la Dra. Verónica Cando mi asesora por la predisposición y ayuda para llevar a cabo este proyecto. A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en especial a la Escuela de Bioquímica y Farmacia por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de formarme como profesional en sus aulas. A mis padres por todo su sacrificio brindado, a mi familia y amigos, por ser en todo momento, pilares fundamentales en la consecución de este logro tan anhelado.

Jonathan

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su constante cuidado y bendiciones en mi vida, A mi padre en el cielo ya que desde allí me está bendiciendo y apoyando para ser cada día un mejor profesional, a mi Madre Mirian que ha dado todo su esfuerzo por verme triunfar cada día más, mi más sincero agradecimiento a ellos porque siempre me han enseñado con mano firme y dura, pero al mismo tiempo amorosa a construir las bases para ser una gran persona. Le doy las gracias también a mi hermana Aracelly y mi cuñado por apoyarme y darme un consejo en todo momento. Y como sencillo gesto de agradecimiento dedicarle también este trabajo a mi pareja Abigail y mi familia en general, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

Jonathan

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
SUMMARY.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

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

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Antecedentes de la investigación.....	6
2.2. Referencias teóricas.....	7
2.2.1. <i>Zoonosis</i>	7
2.2.2. <i>Infecciones frecuentes en felinos</i>	7
2.2.3. <i>Toxocara cati</i>	7
2.2.3.1. <i>Morfología</i>	8

2.2.3.2.	<i>Clasificación Taxonómica</i>	10
2.2.3.3.	<i>Ciclo evolutivo</i>	11
2.2.4.	<i>Toxocariasis</i>	12
2.2.4.1.	<i>Fisiopatología</i>	12
2.2.4.2.	<i>Síntomas</i>	12
2.2.4.3.	<i>Epidemiología</i>	13
2.2.5.	<i>Diagnóstico. Prevención y control</i>	14
2.2.5.1.	<i>Diagnóstico en laboratorio mediante técnica Coprológica</i>	14
2.2.5.2.	<i>Método de Flotación</i>	15
2.2.5.3.	<i>Técnicas cualitativas</i>	15
2.2.5.4.	<i>Diagnóstico Molecular de Parásitos</i>	15
2.2.6.	<i>Tratamiento para Toxocara cati</i>	16
2.2.6.1.	<i>Albendazol</i>	16
2.2.6.2.	<i>Mebendazol</i>	16
2.2.6.3.	<i>Dietilcarbamazina</i>	16
2.2.6.4.	<i>Nitazoxanida</i>	16
2.2.7.	<i>Técnicas Moleculares</i>	17
2.2.7.1.	<i>Métodos moleculares fenotípicos y genotípicos</i>	17
2.2.8.	<i>PCR</i>	17
2.2.8.1.	<i>Origen de la técnica de PCR</i>	18
2.2.8.2.	<i>Procedimiento de PCR</i>	18
2.2.8.3.	<i>Tipos de PCR</i>	20
2.2.8.4.	<i>Aplicaciones</i>	20
2.2.9.	<i>Secuenciación de Sanger</i>	21
2.2.10.	<i>GenBank</i>	21
2.2.11.	<i>FinchTV</i>	22
2.2.12.	<i>MEGA</i>	22

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	23
3.1.	Enfoque de investigación	23
3.2.	Nivel de Investigación	23
3.3.	Diseño de investigación	23
3.3.1.	<i>Según la manipulación o no de la variable independiente</i>	23
3.3.2.	<i>Según las intervenciones en el trabajo de campo</i>	23
3.4.	Tipo de estudio	23

3.5.	Población y Planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra	24
3.5.1.	<i>Localización</i>	24
3.5.2.	<i>Población</i>	24
3.5.3.	<i>Criterios de Inclusión</i>	25
3.5.4.	<i>Métodos de recolección de datos</i>	25
3.6.	Materiales, equipos y reactivos	25
3.6.1.	<i>Material biológico</i>	25
3.6.2.	<i>Material de Laboratorio</i>	25
3.6.3.	<i>Material de oficina</i>	26
3.6.4.	<i>Reactivos</i>	26
3.6.5.	<i>Equipos</i>	26
3.6.6.	<i>Programas usados</i>	26
3.7.	Metodología	27
3.7.1.	<i>Flujograma para el desarrollo de la investigación</i>	27
3.7.2.	<i>Recolección de las muestras</i>	28
3.8.	Métodos de análisis	28
3.8.1.	<i>Examen coproparasitario</i>	28
3.8.1.1.	<i>Procedimiento</i>	28
3.8.2.	<i>Método de Flotación de Willis</i>	29
3.8.2.1.	<i>Procedimiento</i>	29
3.8.3.	<i>Método de análisis mediante PCR</i>	29
3.8.3.1.	<i>Extracción de ADN</i>	30
3.8.4.	<i>Electroforesis en gel de Agarosa</i>	33
3.8.5.	<i>Secuenciación de Sanger</i>	34
3.8.6.	<i>Análisis de Datos</i>	34

CAPÍTULO IV

4.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	35
4.1.	<i>Morfología de <i>Toxocara cati</i></i>	35
4.2.	<i>Análisis de muestras para determinar la prevalencia de <i>Toxocara cati</i></i>	36
4.2.1.	<i>Prevalencia de <i>Toxocara cati</i> en felinos alojados en la parroquia Totoras</i>	36
4.2.2.	<i>Análisis de <i>Toxocara cati</i> según sexo de los felinos muestreados</i>	37
4.2.3.	<i>Casos positivos y negativos a <i>Toxocara cati</i> según la edad.</i>	38
4.2.4.	<i>Análisis de las especies parasitarias encontradas en los felinos</i>	39
4.2.5.	<i>Análisis mediante la técnica de Flotación de Willis</i>	40

4.3.	Resultados de la Tipificación genética realizada al 5% de muestras positivas para <i>Toxocara catis</i>.	41
4.3.1.	<i>Extracción y visualización de ADN genómico</i>	41
4.3.2.	<i>Amplificación del ADNg producto de la extracción</i>	42
4.3.3.	<i>Electroforesis en gel de Agarosa</i>	42
4.3.4.	<i>Productos de PCR punto final analizando control interno de extracción de ADN</i>	43
4.3.5.	<i>Secuenciación de Sanger</i>	44
4.3.6.	<i>Creación de un árbol Filogenético</i>	45
4.3.6.1.	<i>Alineamiento para la creación del árbol Filogenético</i>	45
4.3.7.	<i>Resultado de la determinación de <i>Toxocara catis</i> mediante muestra de Heces y Resuspensión de huevos por la Técnica PCR</i>	47

CAPÍTULO V

5.	MARCO PROPOSITIVO	49
5.1.	Propuesta	49
5.1.1.	<i>Introducción</i>	49
5.1.2.	<i>Metodología</i>	49
5.1.3.	<i>Costo de la propuesta para la elaboración del Shampoo a base de extracto de ruda</i>	51
5.1.4.	<i>Responsables a cargo de la propuesta para la elaboración y uso del Shampoo a base de ruda</i>	51

CONCLUSIONES	53
---------------------	----

RECOMENDACIONES	54
------------------------	----

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Clasificación taxonómica de <i>Toxocara cati</i>	10
Tabla 2-2:	Técnica cualitativa conteo de formas parasitarias	15
Tabla 1-3:	Primers usados para diagnosticar parásitos de <i>Toxocara cati</i> por PCR punto final y secuenciación Sanger.....	31
Tabla 2-3:	Componentes de reacción de PCR convencional para cada muestra ensayada.....	33
Tabla 3-3:	Condiciones de PCR convencional para barcode ITS de los parásitos estudiados.	33
Tabla 1-4:	Prevalencia de <i>Toxocara cati</i>	36
Tabla 2-4:	Prevalencia de <i>Toxocara cati</i> según sexo de los felinos muestreados.	37
Tabla 3-4:	Casos positivos y negativos a <i>Toxocara cati</i> según la edad.....	38
Tabla 4-4:	Prevalencia de las especies parasitarias encontradas en los felinos	39
Tabla 5-4:	Análisis según la técnica de flotación de Willis.....	41
Tabla 6-4:	Cebadores para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	42
Tabla 7-4:	Resultado de la determinación de <i>Toxocara cati</i> mediante muestra de Heces y Resuspensión de huevos por la Técnica PCR.....	47
Tabla 1-5:	Forma de uso, Control de calidad y Ensayos de Tolerancia	50
Tabla 2-5:	Desglose de costos de la propuesta para la elaboración del Shampoo a base de ruda	51
Tabla 3-5:	Responsables a cargo de la propuesta para la elaboración y uso del Shampoo a base de ruda.	51

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2:	Huevos de <i>Toxocara cati</i>	8
Ilustración 2-2:	Larva de <i>Toxocara cati</i>	9
Ilustración 3-2:	Larva de <i>Toxocara cati</i> en eclosión.....	9
Ilustración 4-2:	Forma adulta de <i>Toxocara cati</i> en eclosión.....	10
Ilustración 5-2:	Ciclo evolutivo de <i>Toxocara cati</i>	11
Ilustración 6-2:	Reacción en cadena de polimerasa.....	18
Ilustración 7-2:	Secuenciación de Sanger	21
Ilustración 8-2:	MEGA 11 software.....	22
Ilustración 1-3:	Ubicación Geográfica de la parroquia Totoras vía Google maps	24
Ilustración 2-3:	Flujograma para el desarrollo de la investigación.....	27
Ilustración 3-3:	Procedimiento para examen microscópico general de heces	28
Ilustración 4-3:	Metodología usada para el método de Flotación de Willis.....	29
Ilustración 5-3:	Metodología para la realización de PCR.....	30
Ilustración 6-3:	Instrucciones del fabricante para el uso del kit QIAamp DNA Stool Mini Kit	31
Ilustración 7-3:	Procedimiento realizado paso a paso de la Técnica PCR	32
Ilustración 8-3:	Electroforesis en gel de Agarosa.....	33
Ilustración 9-3:	Procedimiento para la Secuenciación de Sanger	34
Ilustración 1-4:	Huevos de <i>T. cati</i> vistos por examen microscópico directo, objetivo 40x. A. Solución salina 0.9%; B. lugol.....	35
Ilustración 2-4:	Huevos de <i>T. cati</i> vistos por método de Flotación de Willis, objetivo 40x. A. Sln. salina 0.9%; B. <i>T. cati</i> eclosionando; C: <i>T. cati</i> totalmente eclosionado	35
Ilustración 3-4:	Prevalencia total de <i>Toxocara cati</i>	37
Ilustración 4-4:	Prevalencia de <i>T. cati</i> según sexo de los felinos muestreados.	38
Ilustración 5-4:	Casos positivos y negativos según la edad.....	39
Ilustración 6-4:	Prevalencia de las especies parasitarias encontradas en los felinos.....	40
Ilustración 7-4:	Análisis según la técnica de flotación.	41
Ilustración 8-4:	Resultado de la electroforesis en gel de agarosa para determinar <i>Toxocara cati</i>	42
Ilustración 9-4:	Productos de PCR punto final analizando control interno de extracción de ADN	43
Ilustración 10-4:	Picos presentados por el programa GENIUS para la Secuenciación de Sanger	44

Ilustración 11-4: Secuencias Similares según BLAST	44
Ilustración 12-4: Alineación de la secuencia mediante MEGA	45
Ilustración 13-4: Árbol filogenético de <i>Toxocara cati</i>	46
Ilustración 1-5: Procedimiento para elaborar un shampoo a base de RUDA.....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** DATOS DE LAS PARASITOSIS PRESENTADAS POR LOS FELINOS EN LA PARROQUIA TOTORAS
- ANEXO B:** RECOLECCIÓN DE MUESTRAS EN LA PARROQUIA TOTORAS
- ANEXO C:** PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EXAMEN COPROPARASITARIO Y MÉTODO DE FLOTACIÓN DE WILLIS
- ANEXO D:** FORMAS PARASITARIAS ENCONTRADAS
- ANEXO E:** PCR A LA MUESTRA DE HECES

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Nucleósido trifosfato
ELISA	Ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas
ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
IAC	Control de Amplificación interno
LEISHPAREC	Leishmaniosis y otras parasitosis en el Ecuador
MEGA	Análisis de genética evolutiva molecular
mL	Mililitros
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
SNC	Sistema Nervioso Central
ug	Microgramos

RESUMEN

El presente Trabajo de Integración Curricular tuvo como principal objetivo determinar mediante Tipificación genética la prevalencia de *Toxocara cati* en felinos domésticos de la parroquia Totoras del cantón Ambato en la provincia de Tungurahua, durante el período abril – septiembre 2022, esto mediante un análisis coproparasitario directo y el método de flotación de Willis, para ellos se recolectaron 120 muestras de heces fecales de felinos que una vez analizadas dieron como resultado una prevalencia del 26,66 % que se catalogaron por sexo, edad, resultando más infectados los felinos de entre 1 a 3 años y de sexo machos debido a su característica actividad bohemia, posterior a esto se realizó la Tipificación Genética mediante la Técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa, al 5 % de las muestras positivas, para lo cual se sembraron dos muestras, una de heces que no se detectó la presencia del parásito objeto de estudio y otra de resuspensión de huevos en la cual si se logró detectar, por ende, la muestra que si amplificó productos se secuenció mediante SANGER y el resultado obtenido se procedió a comparar con la base de datos GenBank, el cual arrojó un 100 % de identidad para este parásito. Para corroborar este resultado se usó la aplicación MEGA 11 la cual se encarga de alinear la secuenciación resultante en conjunto con secuencias de la base de datos, para después crear un árbol filogenético que corrobora el género y especie de *Toxocara cati*. Se recomienda realizar un estudio a nivel general tanto en los felinos como sus dueños para complementar el estudio anteriormente realizado, permitiendo confirmar o no la relación con la tenencia de mascotas felinas y la predisposición al contagio.

Palabras clave: <*Toxocara cati*>, <FLOTACIÓN DE WILLIS>, <REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA>, <SECUENCIACIÓN DE SANGER>, <ÁRBOL FILOGENÉTICO>.



2147-DBRA-UTP-2022

SUMMARY

The main objective of this research study was to determine through genetic typing, the prevalence of *Toxocara cati* in domestic cats from the Totoras parish of the canton Ambato in Tungurahua province, during the period April - September 2022, through a direct coproparasitic analysis and the Willis flotation method. For this purpose, 120 samples of fecal feces were collected, which once analyzed resulted in a prevalence of 26.66%, which were classified by sex, and age, with felines between 1 to 3 years of age and males being more infected. Due to its bohemian characteristic activity, the Genetic Typing was carried out using the Polymerase Chain Reaction Technique, at 5% of the positive samples, for which two samples were planted, one of feces that did not detect the presence of the parasite under study and another of egg resuspension in which it was possible to be detected. Therefore, the sample that had to amplify products were sequenced using SANGER and the result obtained was compared with the GenBank database, which yielded 100% identification for this parasite. To corroborate this result, the MEGA 11 application was used, which is responsible for aligning the resulting sequencing together with sequences from the database, to later create a phylogenetic tree that corroborates the genus and species of *Toxocara cati*. It is recommended to carry out a study at a general level both in cats and their owners to complement the study previously carried out, allowing to confirm or not the relationship between the possession of feline pets and the predisposition to contagion.

Keywords: <*Toxocara cati*>, <WILLIS FLOATATION METHOD>, <POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)>, <SANGER METHOD>, <PHYLOGENETIC TREE>.



Mgs. Evelyn Carolina Macias Silva

C.I 0603239070

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las infecciones transmitidas por mascotas como los felinos a los humanos, han ido adquiriendo un alto grado de importancia llegando al punto de ser emergentes. Es por ello, que entre uno de los objetivos de este trabajo está el determinar la prevalencia a un parásito que afecta mucho a este tipo de mascotas como es *Toxocara cati*, ya que a pesar de los esfuerzos que realizan muchos propietarios para mantener sanos a esta especie su característica e instinto de cazadores y bohemios los hace vulnerables a infecciones de este tipo.

Por ello el presente trabajo de investigación se enfoca en la parroquia Totoras, este lugar fue elegido debido a que se encuentra en el paso de ser una parroquia rural a urbana que cuenta con un gran número de familias que alojan este tipo de especie y como son mascotas del diario vivir ya sea con adultos o niños, estos se vuelven vulnerables a infecciones zoonóticas que pueden llevar los felinos a sus hogares.

En esta parroquia se realizará la recolección de heces fecales pertenecientes a los felinos, para posteriormente analizarlas mediante un examen coproparasitario directo y una vez que se determine la existencia de huevos pertenecientes a esta especie se proceda a implementar métodos mucho más específicos que permitan analizar esta muestra biológica.

Como es de conocimiento en la actualidad se siguen usando procedimientos de detección como el ya mencionado con el cual solo se obtiene la morfología del parásito, pero este análisis puede ser susceptible a errores debido a que el campo que observemos estará con muchos más restos que pueden ser de tipo alimenticios, por lo que en nuestra investigación se implementó el uso de la técnica de flotación de Willis que nos ayuda a tener un campo mucho más limpio en el cual solo estarán parásitos con alta densidad.

En la presente investigación se prevé implementar también una Tipificación genética mediante el uso de PCR el cual consiste en la amplificación de un fragmento de ADN que nos permite identificar o replicar este fragmento con una aproximación altamente específica y sensible en comparación con otros métodos, esto debido a que en Ecuador no existen estudios de nivel molecular acerca de *Toxocara cati* por ello el realizar una investigación que permita detectar este parásito, secuenciarlo y mediante programas bioinformáticos poder compararlo con estudios realizados en países subdesarrollados (Khademvatan et al.,2014 p.4)

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

La parasitosis es una de las patologías más comunes tanto en animales como en humanos esta ocasiona alta morbilidad y mortalidad ya que los parásitos logran permanecer durante un tiempo largo en el organismo causando una alteración fisiológica en el huésped por tal razón es de suma importancia realizar un estudio que permita caracterizar de mejor manera la infección que estos produzcan, con el fin de prevenir y controlarla (Stensvold, 2011, p. 186-189).

La toxocariasis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial, su amplia presencia se relaciona con la constante necesidad del hombre de vivir rodeado de mascotas (perros y gatos) lo cual ha facilitado su persistencia. Los niños en edad escolar suelen ser el grupo de mayor ocurrencia debido a sus hábitos higiénicos, su frecuente contacto con animales, la exposición a lugares de juego contaminados y el consumo de vegetales y frutas mal lavadas.

La zoonosis causada por los parásitos del género *Toxocara* continúan registrando altas tasas de incidencia en los países lo cual podría convertirse en un obstáculo para el comercio y economía de una ciudad o un país; ya que estas enfermedades son capaces de producir la muerte no solo en animales sino también en los humanos (Despommier, 2003, pp. 265-272).

En la actualidad, los métodos usados para el estudio de parásitos son muy básicos por lo que al realizar un estudio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual consiste en la amplificación de los ácidos nucleicos que permite identificar secuencias de ADN de microorganismos con una aproximación altamente específica y sensible en comparación con otros métodos, siendo posible la obtención de resultados en pocas horas; lo cual demuestra que tiene un alto potencial de aplicación para el diagnóstico de agentes infecciosos.

El diagnóstico molecular nos permite además reconocer la microbiota de una muestra como con la técnica Metagenómica que al obtener secuencias del genoma de los diferentes microorganismos permite extraer y analizar su ADN de forma global, ya que, esta técnica ha revolucionado el modo de manipular, clonar y detectar fragmentos de ADN (Perera y Acevedo, 2018, pp. 1-10).

1.2. Limitaciones y delimitaciones

1.2.1. Limitaciones

- Recolección de muestras de heces de cada felino.
- Disponibilidad de equipos y materiales para la tipificación genética en la Escuela Superior

1.2.2. Delimitaciones

El presente Trabajo de Investigación se llevará a cabo en felinos alojados en hogares de la parroquia Totoras cantón Ambato, provincia de Tungurahua, durante los meses de abril-septiembre del año 2022.

1.3. Problema General de Investigación

¿Es factible determinar la tipificación genética y prevalencia de *Toxocara cati* en felinos domésticos de la parroquia Totoras del cantón Ambato en la provincia de Tungurahua, durante el período abril- septiembre 2022?

1.4. Problemas específicos de investigación

- ¿Se puede comparar la morfología de los huevos de *Toxocara cati* entre los métodos coproparasitario y Flotación de Willis?
- ¿Se podrá determinar mediante un examen coproparasitario la prevalencia de infección por *Toxocara cati* en muestras fecales de felinos alojados en hogares de la parroquia Totoras?
- ¿Será útil el caracterizar mediante diagnóstico molecular PCR *Toxocara cati* el genoma que permita el reconocimiento del género parasitario en el 5% de las muestras fecales.?

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Determinar la tipificación genética y prevalencia de *Toxocara cati* en felinos domésticos de la parroquia Totoras del cantón Ambato en la provincia de Tungurahua, durante el período abril-septiembre 2022

1.5.2. Objetivos específicos

- Comparar la morfología de los huevos de *Toxocara cati* entre los métodos coproparasitario directo y Flotación de Willis
- Determinar mediante un examen coproparasitario la prevalencia de infección por *Toxocara cati* en muestras fecales de felinos alojados en hogares de la parroquia Totoras

- Caracterizar mediante diagnóstico molecular PCR *Toxocara cati* el genoma que permita el reconocimiento del género parasitario en el 5% de las muestras fecales.

1.6. Justificación

1.6.1. Justificación Teórica

El presente Trabajo de Investigación es de interés teórico práctico ya que en Ecuador y específicamente en Tungurahua existe escasa información sobre la realidad de infección por *Toxocara cati* en gatos, es importante este tipo de estudio ya que el ser humano en especial los niños que son los más propensos a sufrir zoonosis mantienen un gran vínculo afectivo y emocional hacia las mascotas con las que conviven como en este caso los felinos, por lo cual los resultados obtenidos servirán como aporte epidemiológico para futuras investigaciones con las que se permitirá alertar a la población sobre las consecuencias de esta infección y así evitar problemas de salud.

Sorprendentemente, hay muy poco conocimiento sobre la genética de *Toxocara cati*, especialmente en lo que respecta a su infección, mientras que se han realizado muchas investigaciones sobre *Toxocara canis* en el perro durante las últimas décadas. De hecho, hay pocas investigaciones sobre este tema: como la publicada por Sprent en 1956 y la otra por Swerczek en 1971 que fueron la raíz para el inicio de estudios acerca de este parásito (Coati et al., 2004, pp. 142 - 146).

1.6.2. Justificación Metodológica

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

También el hecho que existen pocos estudios sobre la estructura genética del género *Toxocara* a nivel mundial, como a la fecha han sido secuenciados un número relativamente bajo de nucleótidos de las especies que lo componen. En el GenBank®, la base de datos de secuencias genéticas del NIH, se encuentran secuencias de nucleótidos solo para cinco especies del género *Toxocara* (Bolívar et al., 2013, pp. 120 - 129).

1.6.3. Justificación Práctica

El realizar un reconocimiento mediante PCR que consiste en la amplificación in vitro de un fragmento de ADN específico, al ser este un método de diagnóstico alternativo, rápido, sensible y específico para detectar, identificar y cuantificar a *Toxocara cati*, lo cual, nos permitirá conocer más a profundidad acerca de esta especie y la infección que puede provocar.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Estudios a nivel mundial han demostrado que los perros y gatos desempeñan un papel importante en la transmisión de parásitos zoonóticos, estos animales domésticos pueden actuar como huéspedes definitivos para varios helmintos y protozoos parásitos con gran potencial zoonótico, particularmente, la toxocariasis en humanos es una parasitosis que suele ser asintomática pero que en ocasiones puede presentar síntomas graves que pueden llevar incluso la muerte (Rostami et al., 2019, p. 2).

Según la OMS se calcula que en varios países en vías de desarrollo o subdesarrollados como en el caso de Estados Unidos alrededor del 2,8% de personas con economía media y en estado de extrema pobreza sufren de Toxocariasis. En Alemania también existe una alta tasa como es del 2,5% de la población rural que ha sufrido esta infección, el Caribe es el lugar más afectado ya que presenta un 8,3 %, de la transmisión de esta enfermedad que se desarrolla con mayor frecuencia en climas cálidos y húmedos puesto que hay una gran convivencia con animales de compañía.

Hoy en día, la comunidad de salud pública en general reconoce que la Toxocariasis en todas sus formas clínicas constituye un riesgo importante para la salud, especialmente entre los niños que presentan. *Toxocara cati*, ya que se conoce que los huevos de esta especie aparecen en el 2-88% de muestras de tierra en varios países y regiones (Delgado y Rodríguez, 2021, pp. 19-21).

En el estudio “Detection of *Toxocara cati* Larvae from Ostrich and Wild Boar Meat Intended for Human Consumption” Se realizó un análisis molecular de la carne de avestruz y jabalí destinadas al consumo humano en el que se identificó y confirmó la presencia de la especie *Toxocara cati*. Confirmando así que existe un gran riesgo de infección por el consumo de carne cruda o poco cocida (Rubinsky et al., 2010, pp. 3 - 23).

En el trabajo de investigación “Despistaje de *Toxocara canis* y *Toxocara cati* por el método de ELISA en los niños de la escuela de educación básica “García Moreno”, parroquia San José del Batán provincia de Chimborazo”, se determinó la incidencia de estos parásitos mediante pruebas de Micro Elisa para determinar la presencia de IgG e IgM, dando como resultado anticuerpos de *Toxocara canis* en un 25%, y 5% de anticuerpos para *Toxocara cati* por lo que se establece la relación entre la presencia de Toxocara en perros y gatos con los niños que poseen estas mascotas, lo cual evidencia que la zoonosis que estos pueden crear es muy alta (Pazmiño, 2018, pp. 28- 36).

Sin embargo, se sabe que el uso de microscopía tiene baja sensibilidad, asociada a una mínima carga parasitaria con un requerimiento de recursos humanos poco capacitados y experimentados para la identificación precisa de estructuras parasitarias (Deng et al., 2019, pp. 2 – 3), no obstante, la

sensibilidad y especificidad se puede mejorar mediante el uso de nuevas técnicas con mayor sensibilidad, como PCR Y ELISA , como describe (Djokic.et al, 2014, pp. 67-71).

Las técnica PCR que se basa en la detección de antígenos en heces ha mostrado un amplio rango de sensibilidad y especificidad (Mathis y Deplazes, 1995, pp. 1145-1149), con el advenimiento de las técnicas moleculares se mejoraron ciertos aspectos sin embargo, los insumos y equipos solían ser costosos y los procedimientos requerían recursos humanos con capacitación específica que no están ampliamente disponibles en áreas endémicas, lo que complica su implementación, hoy en día esto se ha reducido ya que gracias a la capacitación de más profesionales los costos disminuyeron haciendo que estas técnicas sean mayormente usadas (Knapp et al., 2016, pp. 2950-2958).

2.2. Referencias teóricas

2.2.1.Zoonosis

Este término proviene del griego zoon (animal) y nósos (enfermedad), por lo cual se establecería la siguiente definición: Enfermedad propia de los animales transmitida al hombre en condiciones naturales (Fisher, 2003, pp. 167-170).

2.2.2.Infecciones frecuentes en felinos

La infecciones parasitarias en los felinos presentan tasas de prevalencia de hasta el 45% en algunas poblaciones. Estos parásitos pueden ser organismos similares a gusanos o protozoarios unicelulares. Es importante destacar que algunos parásitos gastrointestinales de los gatos tienen el potencial de infectar a los humanos.

Entre los principales grupos de parásitos que infectan a los felinos tenemos: Anquilostomas, Tenias y Toxocaras, siendo Toxocara la más frecuente con *Toxascaris leonina* y *Toxocara catis*, estos dos son los parásitos intestinales más comunes de los gatos (Despommier, 2003, pp. 265-272).

2.2.3.Toxocara catis

Toxocara catis es también conocida como la lombriz intestinal común de los gatos, esta produce una zoonosis alarmante si llegase a haber un descuido por parte de sus dueños, ha reportado casos en todo el mundo. Este parásito es un helminto que pertenece al grupo de parásitos intestinales que pueden infectar a los humanos sin saberlo, por lo que la infección que provoca se considera zoonótica (Barrios et al.,2020, pp. 6-22).

2.2.3.1. Morfología

- *Huevo*

Son esféricos, con una cubierta irregular gruesa con hendiduras en la superficie con forma cóncava, de color marrón oscuro a negro, granulares, miden de 70 a 80 μm de tamaño, con tres capas de quitina y una gruesa capa de proteína (Abou, 2018, pp. 189-197).

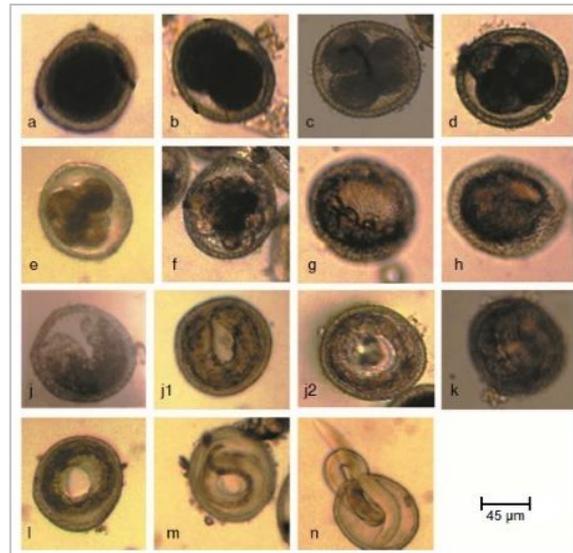


Ilustración 1-2: Huevos de *Toxocara catis*

Fuente: (Abou, 2018, pp. 189-197).

- *Larva*

Las larvas de *Toxocara catis* miden aproximadamente 0,4 micras de longitud por 0,015-0,021 de diámetro y son fácilmente distinguibles de las larvas de otras especies. Tienen un frente redondeado y no presenta ni punta ni filo. El esófago y las regiones caudales están compuestos por glóbulos grandes disecados y gránulos oscuros esparcidos por una región del intestino medio más densa. En el medio externo siempre se encuentran en el interior de los huevos de distintas formas (Abou, 2018, pp. 189-197).

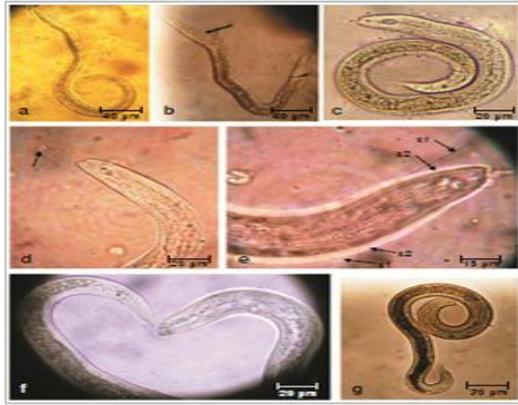


Ilustración 2-2: Larva de *Toxocara cati*

Fuente: (Abou, 2018, pp. 189-197).

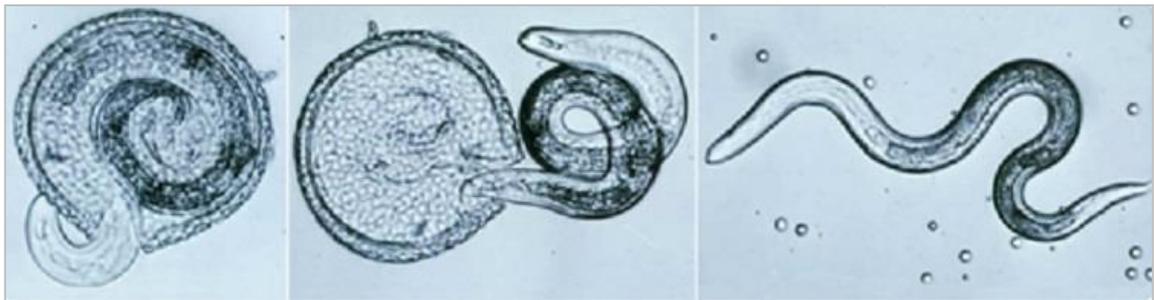


Ilustración 3-2: Larva de *Toxocara cati* en eclosión

Fuente: (Sastre, 2015, pp. 3 – 9)

Sastre (2015, pp. 3 – 9) se han descrito cuatro distintos estados larvarios, estos son:

- **Estado Larvario 1:** En el organismo de los felinos comienzan a ovular y sueltan larvas a partir de los 60 días, las cuales al ser fecundadas forman óvulos sin embriones las cuales se excretan juntamente con las heces fecales.
- **Estado Larvario 2:** Los huevos son depositados en tierra, en un lapso de 2 semanas, para que maduren, es necesario que exista un régimen de temperatura adecuada para el desarrollo del embrión, al cabo de 4 días a una temperatura de 30°C, que estos microorganismos serán infectantes.
- **Estado Larvario 3:** Los felinos a las cinco semanas que ingieran los huevos embrionarios de la tierra, en el huésped hacen que las larvas maduren y viajen a órganos como los pulmones y el sistema respiratorio hasta llegar a los intestinos donde completan su desarrollo.
- **Estado Larvario 4:** Durante la etapa de diferenciación sexual, el parásito hembra pone huevos y se excreta en las heces. El desarrollo de parásitos adultos en larvas varía según el cachorro o perro adulto. En perros mayores de 1 año, las larvas anidan en tejido muscular, corazón, pulmones e hígado en el quiste, atraviesan la placenta y llegan al feto.

- *Forma Adulta*

Es un gusano redondo intestinal que pertenece al filo de los Nematodos. Los gusanos adultos, de color amarillento, tienen forma cilíndrica y en la parte anterior del cuerpo presentan una boca, provista de tres labios bien desarrollados y unas aletas. Machos y hembras se diferencian en el tamaño: los machos tienen de 4 a 6 centímetros (cm) y las hembras, de 6 a 10 cm. Además, la parte posterior del macho es curvada, con papilas caudales, mientras que la parte posterior de la hembra es recta y terminada en punta (Despommier, 2003, pp. 265-272).



Ilustración 4-2: Forma adulta de *Toxocara catis* en eclosión

Fuente: (Sastre, 2015, pp. 3 – 9)

2.2.3.2. Clasificación Taxonómica

La clasificación taxonómica de *Toxocara catis*, es la siguiente:

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

Dominio	Eukaryota
Reino	Animalia
Subreino	Bilateria
Rama	Protostomía
Infra reino	Ecdysozoa
Superphylum	Aschelminthes
Phylum	Nemátodo
Clase	Secernentea
Subclase	Rhabditia

Orden	Ascarida
Suborden	Ascaridina
Superfamilia	Ascaridoidea
Familia	Eukaryota
Género	Toxocara
Especie	<i>Toxocara cati</i>

Fuente: (Pazmiño, 2018, pp. 28- 36).

2.2.3.3. Ciclo evolutivo

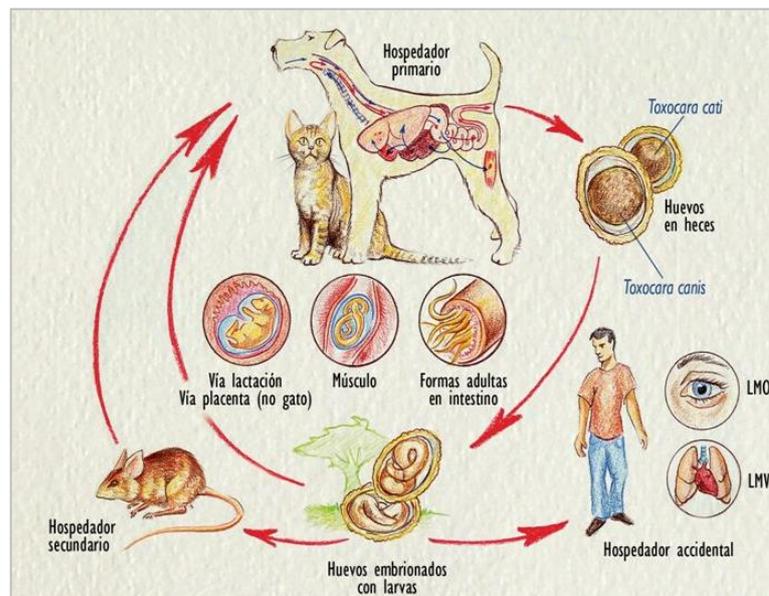


Ilustración 5-2: Ciclo evolutivo de *Toxocara cati*

Fuente: (Fisher, 2003, pp. 167-170).

El ciclo de vida de este parásito consiste en el desarrollo de las larvas en el interior de las heces fecales en el lapso de 15 días aproximadamente, tiene predilección por los gatos, también se ha observado en otros hospederos como ratas y roedores, denominándose a estos huéspedes intermediario, en el cual la larva se enquista y se mantiene en estado de latencia, sin llegar al estado adulto, ya que son ingeridas por un felino y se reactivan en el intestino del gato y alcanzan el estado de madurez (Fisher, 2003, pp. 167-170).

Cuando un roedor o lombriz es ingerida por un gato las larvas estado II, PASAN la pared del intestino, llegando a los pulmones y el hígado a través de la vena porta (Alarcón et al., 2010, pp.10-12).

Es en los pulmones maduran a larvas estado III, atraviesan a la tráquea, por medio del estornudo salen o se quedan en las bocas del animal donde nuevamente son ingeridas, esta larva al llegar al intestino muda a larva estado IV y alcanza el estado adulto, después de unos 25 días que empieza

da la infección y el parásito empieza a producir huevos que serán expulsados con las heces fecales (Junquera, 2017: 1A).

En los gatos adultos no se produce este ciclo vital con mucha frecuencia, en cambio las L-II mediante una migración somática llegando órganos como, corazón, hígado, pulmones y el sistema gastrointestinal, el quiste encapsulan y entrañe un estado de dormancia, en el que todas sus funciones biológicas se suspenden por largos períodos e incluso años (Junquera, 2017: 1A).

2.2.4. Toxocariasis

La Toxocariasis es el término clínico que se aplica a la infección en el huésped humano por *Toxocara canis* o *Toxocara cati* especies de nematodos relacionados que habitualmente infectan a perros y gatos en todo el mundo. La infección en humanos, a diferencia de sus hospedadores definitivos, permanece oculta, lo que a menudo resulta en una enfermedad causada por las etapas larvares migratorias (Delgado y Rodriguez, 2021, pp. 19-21).

Es también una enfermedad zoonótica transmitida por el suelo causada principalmente por la ingestión de huevos larvados de *Toxocara cati* y que se eliminan sin embrionar con heces de felinos y alcanzan la etapa infecciosa en el suelo (Abou, 2018, pp. 189-197).

2.2.4.1. Fisiopatología

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

Este tipo de larvas no logran completar su desarrollo totalmente en el cuerpo humano, pero pueden permanecer vivas durante varios meses produciéndole un gran daño al mismo.

2.2.4.2. Síntomas

▪ Síntomas en el Felino

A ciencia cierta no se conoce el daño que produce esta zoonosis en los felinos pero se cree que en los gatos adultos pueden desarrollar infecciones patentes luego de ingerir huevos o larvas

debido a que hay menos cantidad de larvas que completan la migración traqueal en comparación con los cachorros pero de a ver una infección masiva en el intestino se produce una sintomatología como: falta de apetito, debilidad y facilidad para que contraiga otras enfermedades, llegando inclusive a órganos como la bilis, estas larvas se encuentran principalmente en los músculos (Bolívar et al., 2013, pp. 120 - 129).

Según estudios este tipo de parásitos alteran la función normal del intestino y con ello impiden que el felino infestado pueda absorber y aprovechar óptimamente los alimentos que ingiere. Es posible que no presenten síntomas aparentes (infestación silenciosa), pero los cachorros de corta edad pueden enfermar gravemente e incluso morir. Por otra parte, pueden migrar y provocar lesiones en los tejidos que atraviesan; esto sucede especialmente cuando el parásito migra a través de los pulmones de los felinos (Bolívar et al., 2013, pp. 120 - 129).

▪ *Síntomas en el humano*

En el humano se han descrito tres síndromes provocados por *Toxocara cati* como: larva migrans, visceral, ocular y Toxocariasis encubierta. Algunos autores denotan que a la enfermedad neurológica como un cuarto síndrome. La mayoría de los casos de larva migrans visceral son asintomáticos y se reconocen principalmente por eosinofilia persistente. Los signos típicos en los niños afectados más gravemente incluyen eosinofilia crónica, malestar general, fiebre, hepatomegalia y molestias en la región abdominal superior.

Algunos pacientes también pueden tener náuseas, vómitos o signos respiratorios tales como sibilancia, tos o disnea. También se han registrado exantema prurítico, urticaria crónica, linfadenopatía, artralgia, mialgia, edema angioneurótico y signos neurológicos. En los adultos, los síntomas más comunes son fiebre, debilidad y signos intestinales. Los síntomas de toxocariasis pueden persistir por meses. Las muertes son poco frecuentes, pero se han observado casos de miocarditis, meningoencefalitis eosinofílica o neumonía grave (Arévalo, 2013, p. 76-86).

2.2.4.3. *Epidemiología*

La epidemiología de esta parasitosis se mide en tres campos

- a. La enfermedad en los gatos
- b. La enfermedad en el ser humano
- c. La contaminación ambiental, esta enfermedad es considerada cosmopolita muy frecuente en países de clima cálido

Es necesario considerar como Factor predisponente la cercanía de los niños con sus mascotas ya que pueden ser contaminados por el pelo del animal que puede contener huevos de *Toxocara*. La antigüedad se pensaba que solamente en las áreas rurales estaba el riesgo de contraer la

enfermedad, en la actualidad la toxocariasis es más endémica en la zona urbana (Despommier, 2003, pp. 265-272).

Varios países del mundo han reportado prevalencia de Toxocariasis hasta en 35%, existen factores asociados para la infestación por *Toxocara*, son propensas las personas que tienen muy cercano a una mascota, los niños tienden a comer tierra y jugar al aire libre en parques y lugares donde los dueños sacan a sus mascotas a hacer sus necesidades biológicas es por esta razón que las personas menores a 20 años son más propensas a esta enfermedad.

Se reporta la presencia de toxocariasis en varias partes del mundo de un 37%, los factores asociados son la cercanía de los niños con sus mascotas, los hábitos de comer tierra en parques y jardines, situación que no ocurre con las personas adultas, otro factor que incrementa esta parasitosis es la situación socioeconómica de los dueños de los felinos especialmente en regiones cálidas (Alarcón et al., 2010, pp.10-12).

2.2.5. Diagnóstico. Prevención y control

El diagnóstico de la enfermedad en el ser humano es problemático, ya que el estadio larval de *Toxocara cati* no puede ser detectado directamente, salvo por estudio de biopsias. Por otra parte, como en el ser humano las larvas no completan su evolución, no llegan a la postura de huevos, lo cual torna imposible el diagnóstico directo. El único método posible entonces es el diagnóstico indirecto mediante la detección de anticuerpos en sangre u otros fluidos biológicos.

La técnica serológica más utilizada actualmente es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) que utiliza como antígeno los productos de excreción–secreción de larvas de segundo estadio (ES/L2) que se obtienen manteniendo a las larvas en un medio de cultivo libre de proteínas. Estos productos antigénicos se originan en los órganos secretorios del parásito (glándula esofágica y el poro secretor) y dado que en su mayoría son glicoproteínas, no son específicos de especie (Rodríguez et al., 2006, pp. 4-7).

2.2.5.1. Diagnóstico en laboratorio mediante técnica Coprológica

- **Examen macroscópico.** Debe realizarse inmediatamente a las muestras tomadas, considerándose su consistencia, color, olor, presencia de mucosas, sangre, coágulos, cuerpos extraños y aún la posibilidad de encontrar parásitos o partes de ellos, elementos de importancia para evitar errores de procedimiento.
- **Examen microscópico.** Para realizar un adecuado diagnóstico de parásitos gastrointestinales felinos como el *Toxocara* es recomendable detectarlos mediante la técnica de flotación fecal con solución azucarada de Sheather o de Cloruro de Sodio (NaCl). Sin embargo, es importante tomar en cuenta la aparición de signos clínicos y una adecuada anamnesis antes de la fase de

excreción del parásito, de esta manera se podrá determinar correctamente el tratamiento. El diagnóstico puede parecer fallido por la ausencia de huevos y larvas o su excreción fecal intermitente, incluso en los casos sintomáticos, no obstante, se puede realizar análisis de tres muestras o más, en días alternos para así aumentar la tasa de probabilidad de diagnosticar la parasitosis en estadios positivos (Rodríguez et al., 2006, pp. 4-7).

2.2.5.2. Método de 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 (Inácio et al., 2021, pp. 4-6).

2.2.5.3. Técnicas cualitativas

Una técnica cualitativa muy usada es el sistema de cruces según el número de formas parasitarias encontradas:

Tabla 2-2: Técnica cualitativa conteo de formas parasitarias

Infección baja	Campos con 1 a 3 formas parasitarias	(+)
Infección leve	Campos con 4 a 7 formas parasitarias	(+ +)
Infección moderada	Campos con 8 a 10 formas parasitarias	(+ + +)
Infección grave	Campos con más de 10 formas parasitarias	(+ + + +)

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

2.2.5.4. Diagnóstico Molecular de Parásitos

Los métodos de biología molecular se caracterizan por ser específicos y poseer elevada sensibilidad, ya que detectan el ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito, aunque exista una cantidad pequeña de estos en la circulación sanguínea. En un principio se usaron las técnicas de hibridación y actualmente el diagnóstico molecular se basa en la detección de fragmentos específicos de ADN del genoma del parásito.

Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés “Polymerase Chain Reaction”. que tiene como finalidad amplificar varias veces un pequeño fragmento de

ADN, para obtener múltiples copias resultando muy sensible, ya que detecta poca cantidad de ADN, debido a la amplificación de una secuencia específica del ADN de *Toxocara cati* (Peñaherrera, 2019, pp. 34 - 41).

2.2.6. Tratamiento para *Toxocara cati*

2.2.6.1. Albendazol

Como se ha mencionado es la droga de elección en el tratamiento de los estudios clínicos han demostrado que pacientes que reciben 5 días de tratamiento con albendazol, a una dosis oral de 10 mg/kg/día dividido en dos dosis, mejoran significativamente más que pacientes recibiendo tiabendazol. Una dosis de 400 mg de albendazol por vía oral dos veces al día por 5 días es el esquema recomendado de elección (Delgado y Rodriguez, 2021, pp. 19-21).

2.2.6.2. Mebendazol

Es una droga alternativa en el tratamiento de la toxocariasis. Desafortunadamente como otros benzoimidazoles, exceptuando el albendazol, tiene poca absorción y por ende su uso en infecciones extraintestinales es limitado. Se ha reportado que podría ser más exitoso su uso en la toxocariasis si se usase a una dosis de 1 gramo o por más de 21 días de tratamiento, ya que la dosis habitualmente recomendada es de 100 a 200 mg vía oral dos veces al día por 5 días (Delgado y Rodriguez, 2021, pp. 19-21).

2.2.6.3. Dietilcarbamazina

Hasta hace unos pocos años se consideraba la droga de elección para la toxocariasis, pero en países como Estados Unidos de América ya no es usado para esta indicación, al igual que ocurre con la ivermectina. Esta droga se administra a una dosis de 3 mg/kg, vía oral, cada 8 horas por 21 días (Delgado y Rodriguez, 2021, pp. 19-21).

2.2.6.4. Nitazoxanida

Este fármaco es un miembro de las drogas de la clase de tiazolidas, la primera de ellas, con documentada actividad principalmente contra parásitos y bacterias anaerobias. Esta ha sido usada en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias anaerobias, virus de Hepatitis B, virus de Hepatitis C, protozoarios y helmintos (Delgado y Rodriguez, 2021, pp. 19-21).

2.2.7. Técnicas Moleculares

Las técnicas moleculares es un término general que engloba un conjunto de técnicas de biología molecular empleadas para la identificación y análisis de marcadores biológicos, mediante las técnicas moleculares es posible detectar la presencia de patógenos y plagas en tejidos vegetales, muestras de agua, suelo o cualquier sustrato ya que trabaja a partir de la molécula de ADN (Perera y Acevedo, 2018, pp. 1-10).

Los métodos de biología molecular se caracterizan por ser específicos y poseer elevada sensibilidad, ya que detectan el ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito, aunque exista una cantidad pequeña de estos (Perera y Acevedo, 2018, pp. 1-10).

2.2.7.1. Métodos moleculares fenotípicos y genotípicos

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

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

Dentro de las técnicas empleadas en genotipificación se describen: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuencia del genoma que implica la secuenciación NGS y pirosecuencia, hibridación con sondas de ADN, RAPD y RFLP (Huapaya et al., 2009, pp. 283-290)

2.2.8. PCR

Reacción en Cadena de la Polimerasa, es una técnica de biología molecular que permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula basándose en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (Larrachea, 1997, 247-249).

La técnica de la PCR consiste en la amplificación de una región específica de ADN utilizando unos primers o cebadores (secuencias de ADN que delimitan la zona de amplificación, que tienen

una longitud de 15-30 nucleótidos y son complementarios a la región del ADN que se quiere amplificar).

Se basa en la acción de diferentes enzimas, entre ellas la ADN polimerasa, que incorpora los nucleótidos en la síntesis de nuevas cadenas de ADN (amplificación). En esta técnica se reproduce lo que tiene lugar en el interior de la célula. La muestra de ADN se añade en un tubo eppendorf junto con los primers, los desoxinucleótidos, una ADN polimerasa termoestable y un cofactor de esta enzima (normalmente magnesio).

2.2.8.1. Origen de la técnica de PCR

La PCR surgió en 1971 cuando Gobind Khorana describe la técnica al explicar la replicación de un fragmento de ADN usando dos iniciadores. Pero fue en 1983 cuando Kary Mullis y sus colaboradores de la compañía californiana Cetus Corporation la llevaron a cabo por primera vez mientras trabajaban en la fabricación de oligonucleótidos y en el uso de iniciadores para la secuenciación de ADN. Para llevarlo a cabo usaron dos iniciadores que se alineaban con cada una de las hebras del ADN, adicionaron ADN polimerasa I de *Escherichia coli* y nucleótidos trifosfatados. Como resultado obtuvieron la replicación exponencial del fragmento de ADN flanqueado por los iniciadores (Serrato et al, 2008, p. 53).

2.2.8.2. Procedimiento de PCR

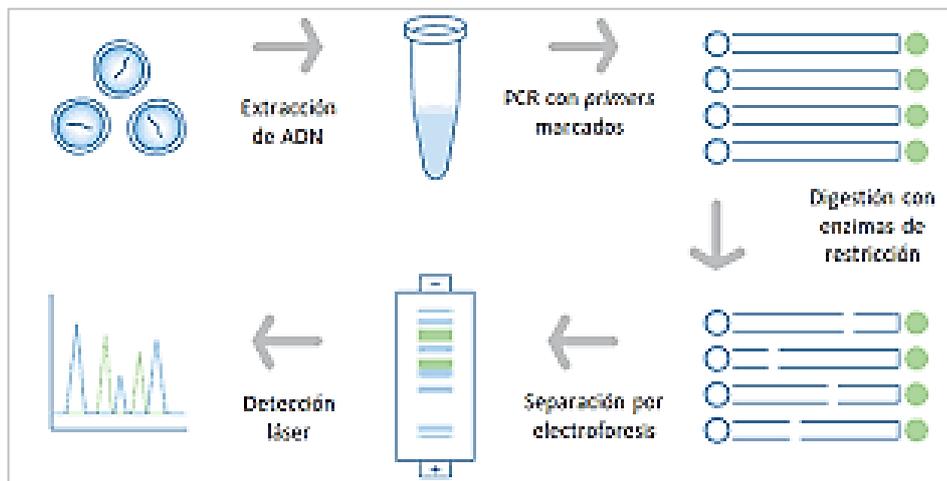


Ilustración 6-2: Reacción en cadena de polimerasa

Fuente: (Dreyer, 1956, p.97).

Este paso consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96 °C (o 98 °C si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos 35. Esto sólo es necesario para ADN polimerasas que requieran activación por calor. En el proceso de

desnaturalización, las dos cadenas del ADN se separan una de la otra y permiten que la matriz “template” se encuentre como cadena simple, necesaria para la actividad llevada a cabo por la polimerasa termoestable durante los pasos de amplificación (Peñaherrera, 2019, pp. 34 - 41)

En el siguiente paso del ciclo, la temperatura se reduce a un valor que oscila en el rango de los 40 °C a los 60 °C. A esta temperatura, cada uno de los oligonucleótidos (primers) hibrida con la secuencia complementaria en cada una de las cadenas simples de ADN, que se han separado en el paso anterior, y sirven como cebadores para la síntesis, por la polimerasa termoestable. La síntesis de ADN se inicia cuando la temperatura de la reacción llega al valor óptimo para la actividad de la polimerasa.

Para la mayoría de las polimerasas esta temperatura se encuentra en, aproximadamente los 72 °C. Luego se permite la síntesis durante 30 s a 2 min. Este paso completa un ciclo y el siguiente ciclo se inicia con el retorno a los 94-95 °C para la desnaturalización.

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

En la reacción de PCR ideal, existen tres fragmentos de ácidos nucleicos. El fragmento de ADN de doble cadena a ser amplificado (molécula blanco o target) y dos oligonucleótidos de cadena simple que hibridaban en alguna región del ADN blanco (iniciadores o primers) (Rodríguez et al., 2006, pp. 4-7).

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

Sin embargo, el segundo ciclo de desnaturalización, hibridación y síntesis produce dos productos de cadena simple que componen en conjunto un producto de doble cadena en el cual posee la longitud exacta del fragmento original delimitado entre los primers. Cada cadena de este producto discreto es complementaria a uno de los dos primers incluidos en la reacción y puede en consecuencia participar como blanco en los ciclos subsiguientes (Rodríguez et al., 2006, pp. 4-7).

2.2.8.3. Tipos de PCR

- *PCR Anidada*

Se desarrolló, principalmente para aumentar la sensibilidad del ensayo usando dos parejas de cebadores con las que se consigue amplificar muestras mínimas de ADN a miles de millones de fragmentos (Perera y Acevedo, 2018, pp. 1-10).

- *PCR múltiplex*

La PCR múltiplex es un proceso de amplificación en la que dos o más parejas de cebadores específicos para diferentes dianas se introducen en el mismo tubo. Por lo tanto, más de un ADN diana en una muestra puede ser detectado simultáneamente (Perera y Acevedo, 2018, pp. 1-10).

- *Reverso transcripción-PCR*

La RT-PCR fue desarrollada para moléculas diana de ARN que a partir del ARN se obtiene un ADN complementario (ADNc), esta conversión se logra con el empleo de la enzima transcriptasa reversa o reverso transcriptasa, este es un método conveniente para la caracterización de especies, especialmente aquellas que son difíciles de distinguir morfológicamente. La técnica PCR-RT es actualmente uno de los métodos moleculares más utilizados para el diagnóstico de especies. Se basa en la digestión de los productos de PCR por enzimas de restricción o endonucleasas. Estas enzimas cortan el ADN en fragmentos de cierto tamaño, cuyos análisis en gel de agarosa o poliacrilamida dan como resultado diferentes patrones de tamaños de fragmentos, lo que permite la identificación (Mikaeili et al., 2017, pp. 549-556).

2.2.8.4. Aplicaciones

La PCR es la técnica más importante en la biología molecular porque con ella se ha logrado la simplificación e innovación de muchas técnicas moleculares que permiten abordar nuevas líneas de investigación en diferentes ramas de la ciencia como biotecnología, ecología, evolución, biología de la conservación, arqueología, patología, medicina forense, entre otras (Serrato et al, 2008, p. 53).

Hemos desarrollado un sistema cuantitativo de PCR en tiempo real para determinar la carga parasitaria en muestras de sangre o heces periférica usando como blanco molecular la secuencia satélite e iniciadores modificados para aumentar la capacidad de reconocimiento de los distintos linajes parasitarios. Para mejorar la precisión de la cuantificación se ha incorporado al ensayo un

plásmido recombinante lineal como estándar interno (IAC) que se agrega a la muestras de heces original y se utiliza para normalizar el valor crudo de la carga parasitaria, según el rendimiento de la extracción de ADN, la muestra y la eficiencia de amplificación (Rubio, 2011, p. 3).

2.2.9. Secuenciación de Sanger

Este método se basa en sintetizar, de forma secuencial, una hebra de ADN en presencia de ADN polimerasa, con polimerización del mismo y el uso de dideoxinucléotidos que sirven como terminadores de la reacción. Para dar como resultado fragmentos secuenciados de diferente tamaño, según dónde se hayan incorporado los dideoxinucléotidos. Para posterior a esto con una electroforesis, se va a poder dilucidar la secuencia esperada (Garrigues, 2017: 1A).

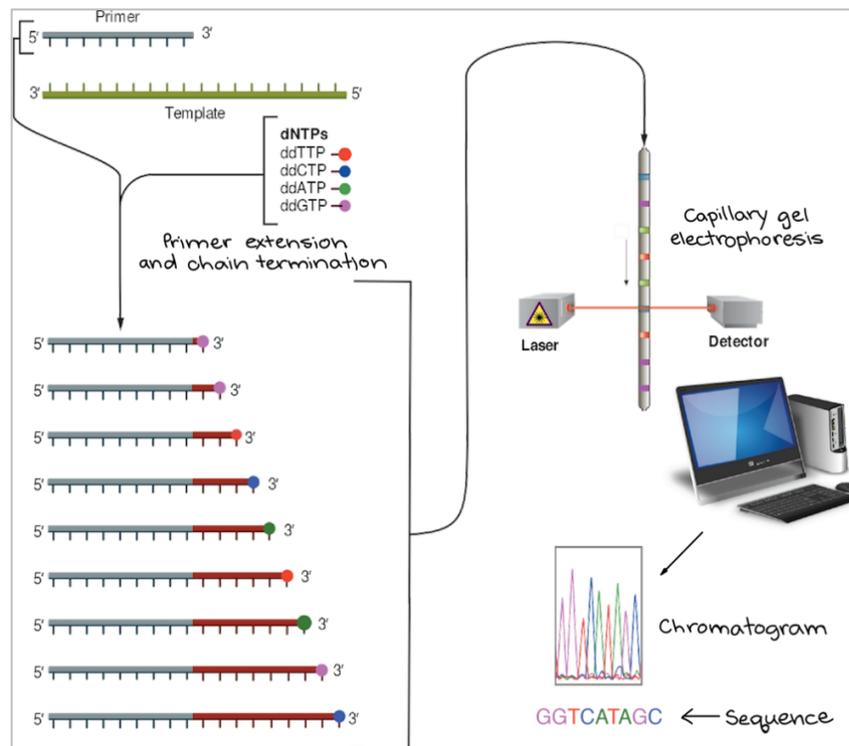


Ilustración 7-2: Secuenciación de Sanger

Fuente: (Garrigues, 2017: 1A).

2.2.10. GenBank

El GenBank es una base de datos que posee secuencias de nucleótidos y su traducción a proteínas, su uso es libre y de acceso abierto, forma parte del consorcio internacional donde también están el European Nucleotide Archive (ENA) y el DNA Data Bank de Japón, (DDBJ), estas en conjunto intercambian datos diariamente, se diseñó para proporcionar a la comunidad científica información acerca de secuencias de ADN.

2.2.11. FinchTV

El visor de cromatogramas denominado FinchTV es una muy conocida aplicación para computadoras creada por Geospiza, Inc. para lograr traducir los datos de seguimiento de la secuenciación de ADN obtenida de la Secuenciación de Sanger. Este software nos permite visualizar secuencias obtenidas por medio de cromatogramas es decir en forma de picos con los cuales sabremos la calidad de la secuenciación, también nos permite eliminar las condiciones que no son útiles para el momento de validarla (Rueda et al., 2015, pp. 541-548).

2.2.12. MEGA 11

El programa MEGA 11 (Análisis genético evolutivo molecular) es una herramienta integrada para la alineación de secuencias automática y manual, la inferencia de árboles filogenéticos, la extracción de bases de datos basadas en la web, la estimación de tasas de evolución molecular y la prueba de hipótesis evolutivas.

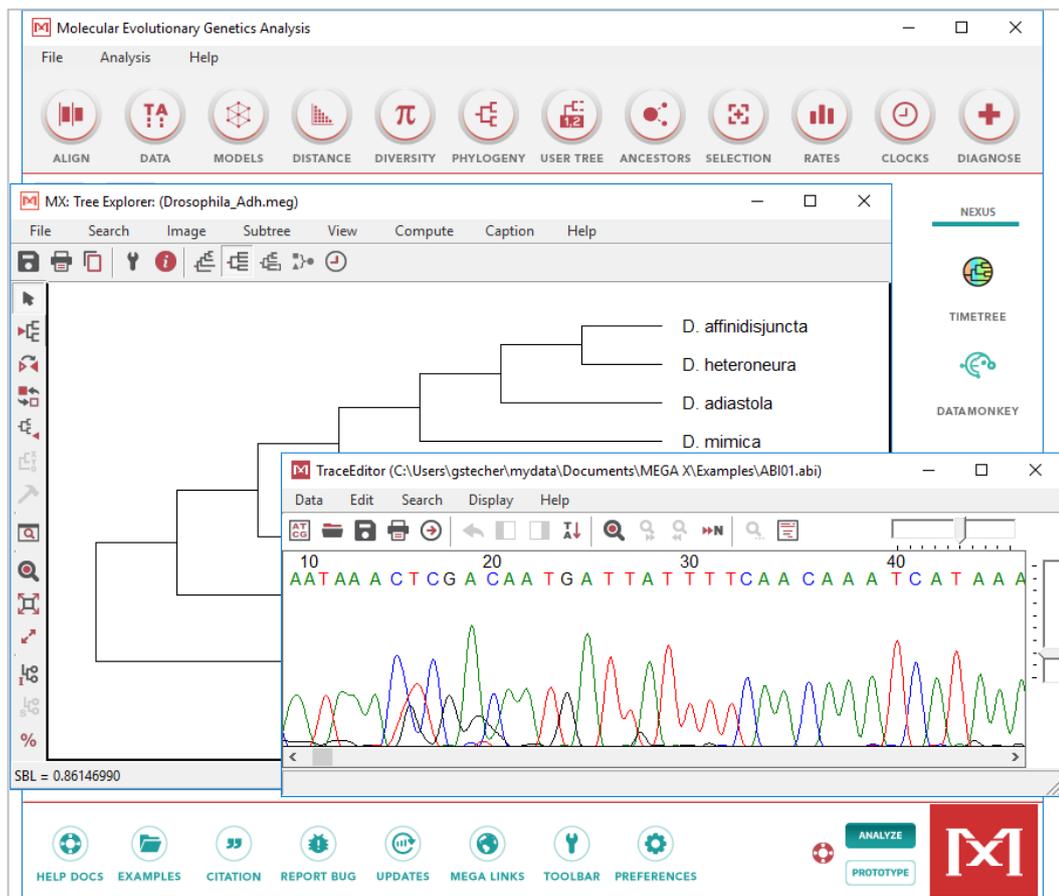


Ilustración 8-2: MEGA 11 software

Fuente: (Cummings, 2004: A1)

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Enfoque de investigación

El presente trabajo de investigación posee un enfoque cualitativo debido a que se realizó la recolección de muestras de los felinos para su posterior estudio mediante técnicas coproparasitarias y moleculares, también posee un enfoque cuantitativo debido a que permitió realizar el análisis estadístico descriptivo una vez realizada la recolección de datos y muestras de heces de felinos, en cuanto a su edad, sexo, raza, y niveles de parasitosis.

3.2. Nivel de Investigación

El nivel de investigación fue de tipo descriptivo ya que se indaga entre una o más variables para que al obtener los datos, se realice una descripción de ellos, prospectivo por que la información se registra durante el proceso que dura la investigación y de corte transversal ya que los datos se recolectan en un solo momento y no involucran un seguimiento a través del tiempo en los Felinos alojados en hogares de la parroquia Totoras del cantón Ambato, provincia de Tungurahua.

3.3. Diseño de investigación

3.3.1. Según la manipulación o no de la variable independiente

No se realizaron manipulaciones de variables en el presente estudio.

3.3.2. Según las intervenciones en el trabajo de campo

El presente trabajo de Investigación se realizó en la parroquia Totoras donde se recolectó por una sola ocasión en cada casa que tenga albergado a un felino.

3.4. Tipo de estudio

El presente trabajo de Investigación posee un enfoque no experimental, de tipo: Descriptivo ya que se indaga la presencia de parásitos en heces de una población de felinos, 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 porque se realizó en un lugar específico, donde se

recolectó heces felinas para su respectivo análisis y se determinó la prevalencia de parasitosis y la tipificación genética de *Toxocara cati*.

3.5. Población y Planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra

3.5.1. Localización

A dos mil metros sobre el nivel del mar se ubica la parroquia Totoras, una de las más conocidas de Ambato y Tungurahua, por ser el paso obligado al Oriente Ecuatoriano, Tiene una superficie total de 841,8 hectáreas, Posee una población de 7913 habitantes, de los cuales 3986 son mujeres y 3927 son hombres; con porcentajes de 50,4% y 49,6% respectivamente (GAD Parroquial Rural de Totoras, 2015, pp. 10).



Ilustración 1-3: Ubicación Geográfica de la parroquia Totoras vía Google maps

Fuente: Google maps

3.5.2. Población

El total de felinos analizados fueron 120 los cuales se encontraban alojados en hogares de la parroquia Totoras del cantón Ambato, provincia de Tungurahua que no se encuentren desparasitados, durante el periodo de abril – septiembre del 2022.

3.5.3. Criterios de Inclusión

Se consideraron como unidad muestral todos aquellos felinos que reúnan los siguientes criterios:

- Felinos que no se encuentren desparasitados hace 6 meses.
- Felinos que bajo previo el consentimiento de sus dueños autoricen la recolección de las muestras.
- Felinos que se encuentren alojados en hogares de la parroquia Totoras.

3.5.4. Métodos de recolección de datos

La recolección de datos se efectuó mediante el método de campo que inició con un previo consentimiento verbal con los dueños de los felinos quienes nos proporcionaron las medidas higiénicas que estos tienen en el hogar, posterior a esto se analizó las muestras por las técnicas parasitarias y moleculares que ayudaron a la ejecución del proyecto hasta llegar a las conclusiones del mismo, proceso que se describe a continuación.

3.6. Materiales, equipos y reactivos

3.6.1. Material biológico

- Muestras fecales de los felinos

3.6.2. Material de Laboratorio

- Tubos de Ensayo
- Cernidor
- Gradillas de laboratorio
- Pinzas
- Pipeta
- Tubos Eppendorf
- Palillos
- Couler para transporte
- Guantes
- Mandil
- Placas porta y cubre objetos

3.6.3.Material de oficina

- Cuaderno de apuntes
- Cámara
- Computadora

3.6.4.Reactivos

- Suero fisiológico
- Lugol
- Primers
- Buffer de Extracción
- Agua Milli Q o TE
- Kit comercial de extracción de ADN
- BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit
- Agarosa en TBE

3.6.5.Equipos

- Microscopio
- Balanza analítica
- Termociclador
- Espectrofotómetro

3.6.6.Programas usados

- MEGA
- FINCH TV
- GENIUS

3.7. Metodología

3.7.1. Flujograma para el desarrollo de la investigación

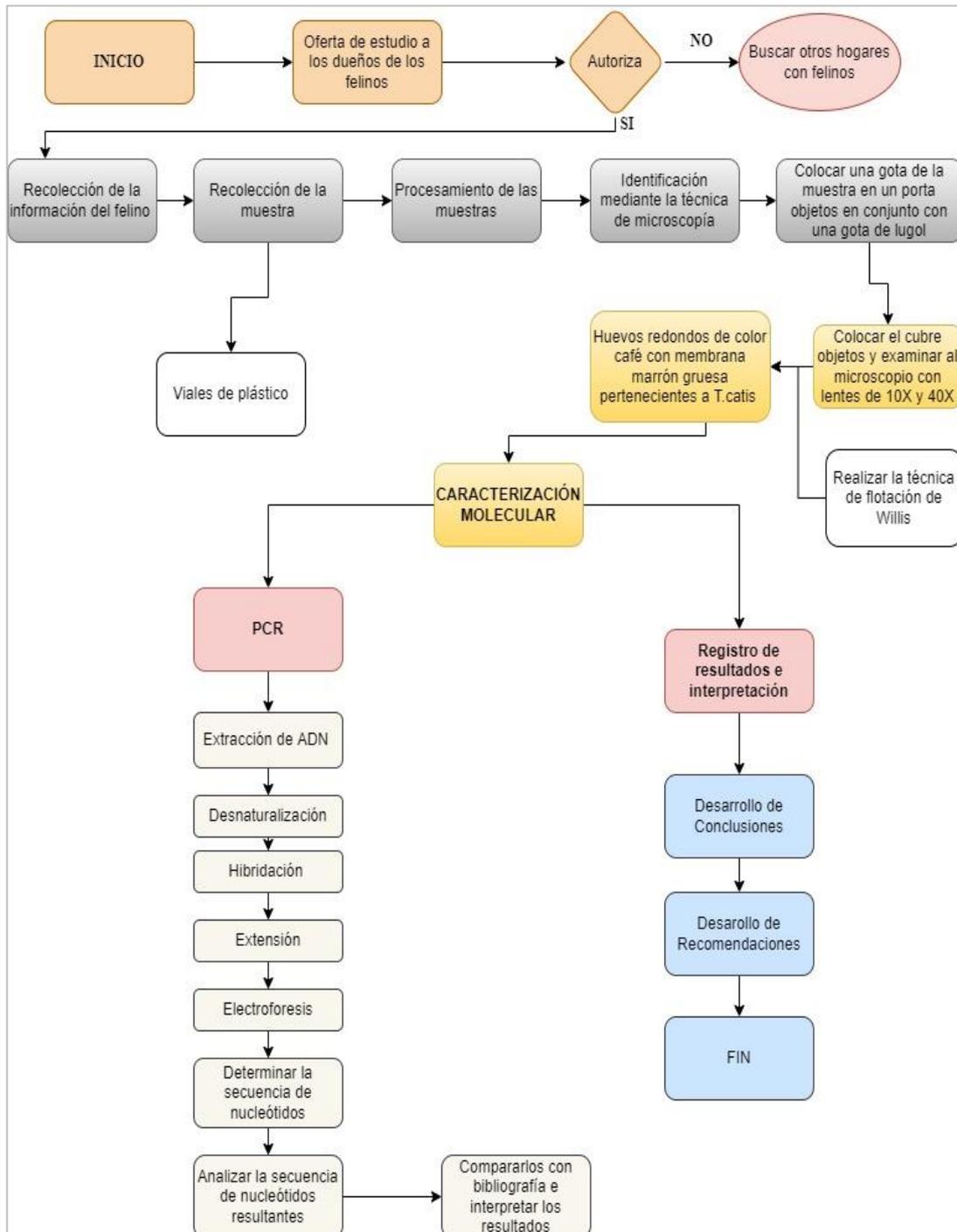


Ilustración 2-3: Flujograma para el desarrollo de la investigación.

Fuente: (Yuste, 2019, p. 39; Leon, 2017: 1A ; Perera y Acevedo, 2018, pp. 1-10).

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

3.7.2. *Recolección de las muestras*

La recolección de las muestras se realizó durante 3 meses en horarios dados en dependencia a la disponibilidad de tiempo de los dueños, el registro por cada felino se dio identificando el sexo, edad aproximada, fecha de recolección y una vez obtenido las muestras de heces se las transportó 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 y método de Flotación de Willis.

3.8. Métodos de análisis

3.8.1. *Examen coproparasitario*

Para el examen coproparasitario, se utilizaron las heces de los felinos, estas se prepararon directo en suero fisiológico y Lugol con láminas porta objetos y cubre objetos y se procedió a observar al microscopio.

3.8.1.1. *Procedimiento*

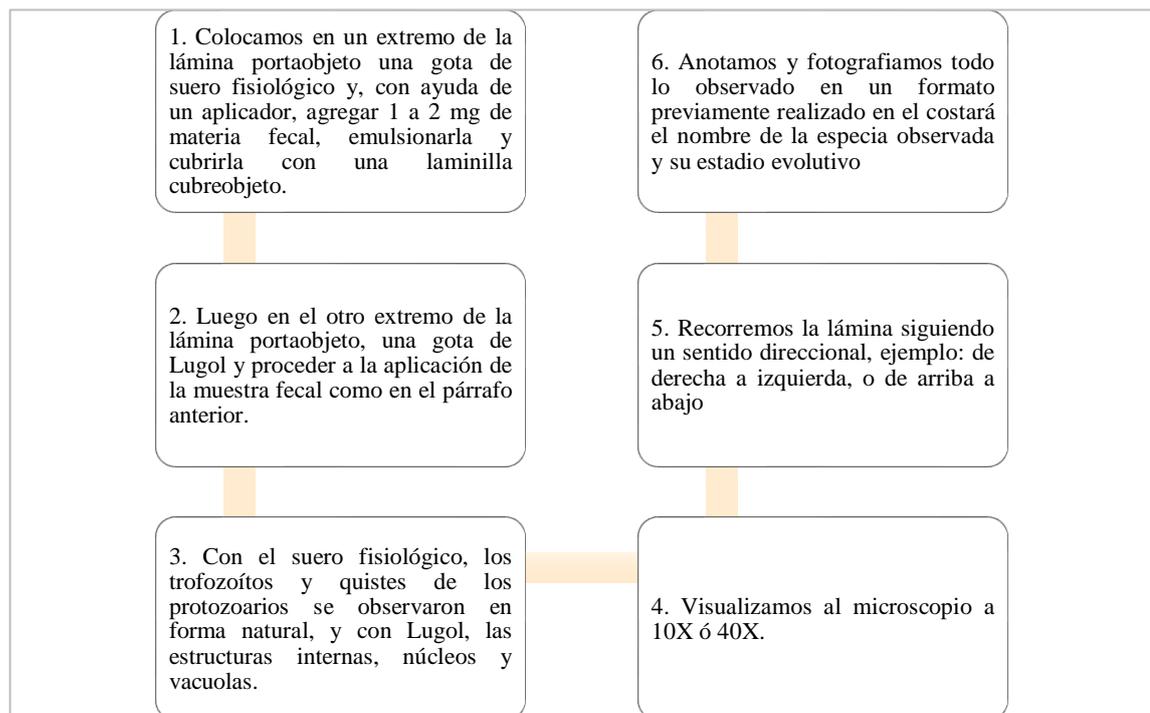


Ilustración 3-3: Procedimiento para examen microscópico general de heces

Fuente: (Salvatella y Eirale, 1996, pp. 215-223)

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022

3.8.2. Método de Flotación de Willis

Es una técnica que permite la separación de quistes de protozoos y huevos de ciertos helmintos del exceso de residuos mediante el uso de una solución con elevada gravedad específica como es el NaCl. Los elementos parasitarios son recuperados de la capa superficial y los residuos se mantienen en el fondo del tubo. Con estas técnicas los preparados son más limpios que los obtenidos por sedimentación (Navone et al., 2005, pp. 178-181).

3.8.2.1. Procedimiento

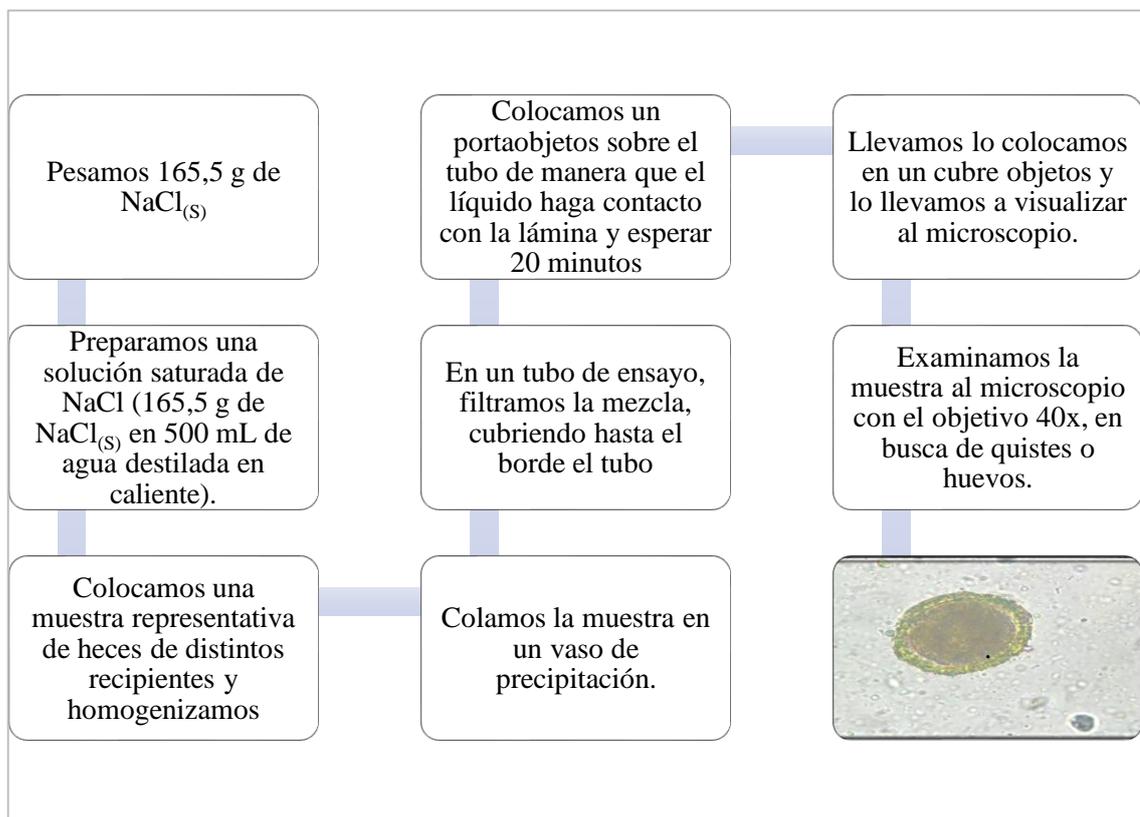


Ilustración 4-3: Metodología usada para el método de Flotación de Willis

Fuente: (Navone et al., 2005, pp. 178-181).

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

3.8.3. Método de análisis mediante PCR

El diagnóstico molecular utilizando PCR, p determinar ADN del parásito en muestras de heces siendo una gran ventaja en comparación con otras técnicas.

La identificación mediante diagnóstico molecular PPCR nos permitió la identificación (extracción de ADN, síntesis de primers específicos, amplificación de barcode ITS, purificación,

secuenciación Sanger, limpieza de productos de PCR y búsqueda en base de datos) del parásito objeto de estudio en muestras de heces siendo una gran ventaja en comparación con otras técnicas.

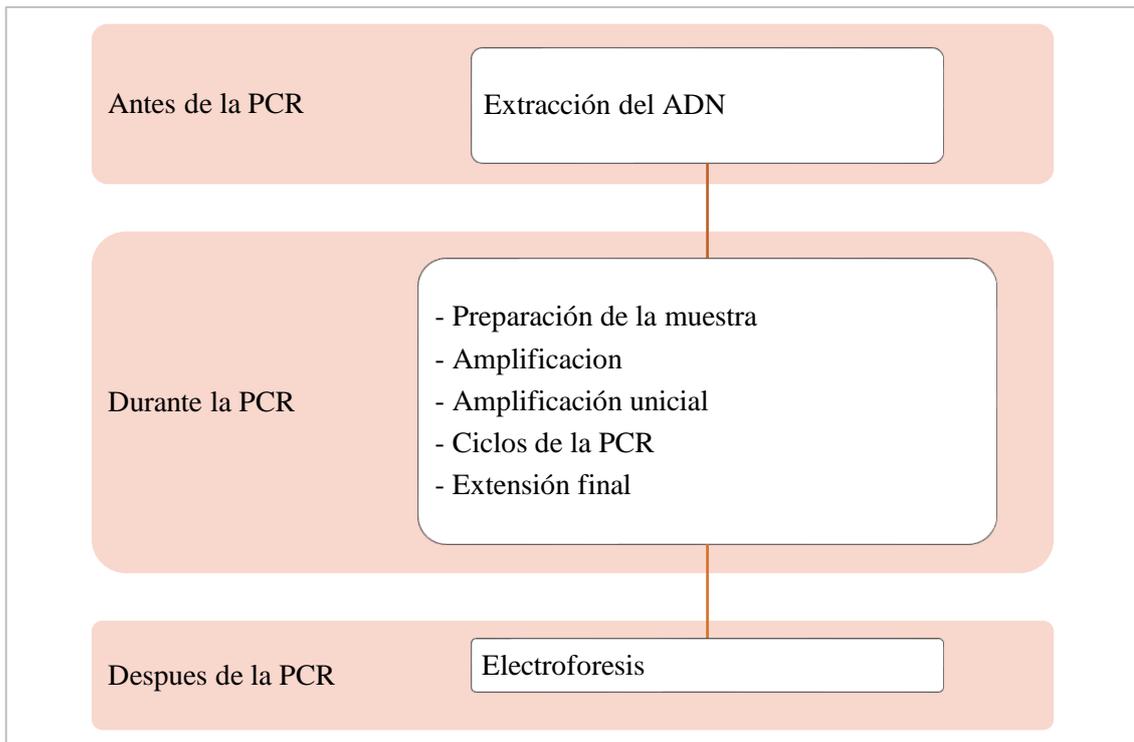


Ilustración 5-3: Metodología para la realización de PCR

Fuente: (Yuste, 2019, p. 39)

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

3.8.3.1. *Extracción de ADN*

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

▪ *Detalles técnicos*

Se usaron 2 primers específicos para el parásito *Toxocara cati*, con target en la región ITS fueron sintetizados químicamente y su calidad evaluada por espectrometría de masas MALDI-TOF (Macrogen, Korea).

Tabla 1-3: Primers usados para diagnosticar parásitos de *Toxocara cati* por PCR punto final y secuenciación Sanger.

Primer	Secuencia (5'-3')	Cebadores
NC2	TAGTTTCTTTTCTCCGCT	Cebador directo
Tcat1	GGAGAAGTAAACTC	Cebador inverso

Fuente: (Kaneva et al., 2020, p.26)

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

- *Muestras usadas*
 - 3 muestras heces fecales
 - 3 muestras resuspendido de huevos de parásitos

- *Extracción de ADN*

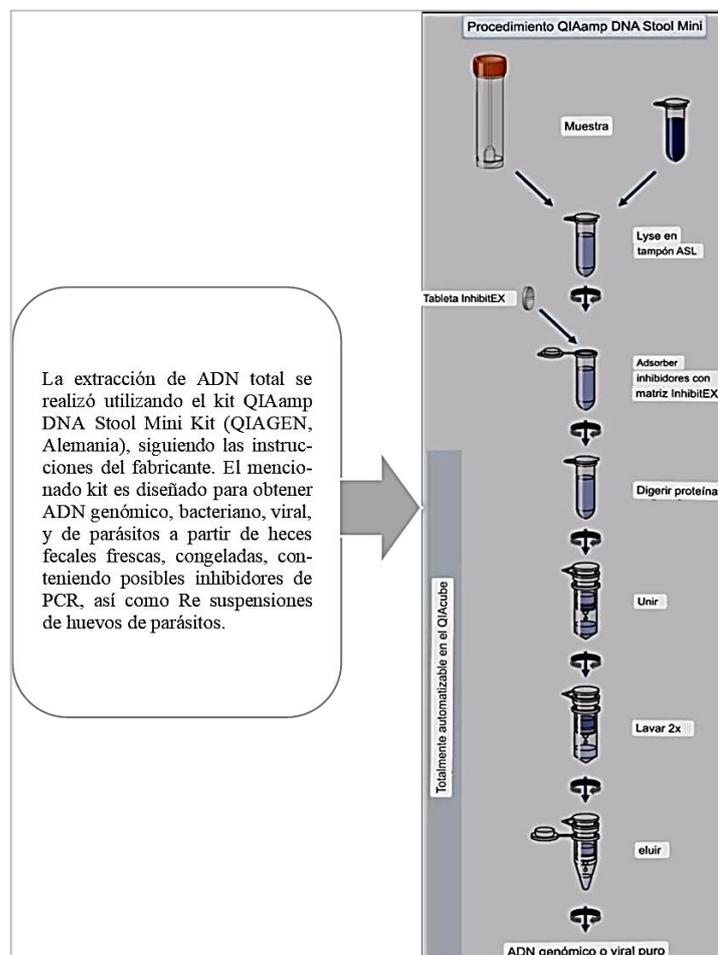


Ilustración 6-3: Instrucciones del fabricante para el uso del kit QIAamp DNA Stool Mini Kit

Fuente: (Yuste, 2019, p. 39)

▪ *Procedimiento Técnica PCR*

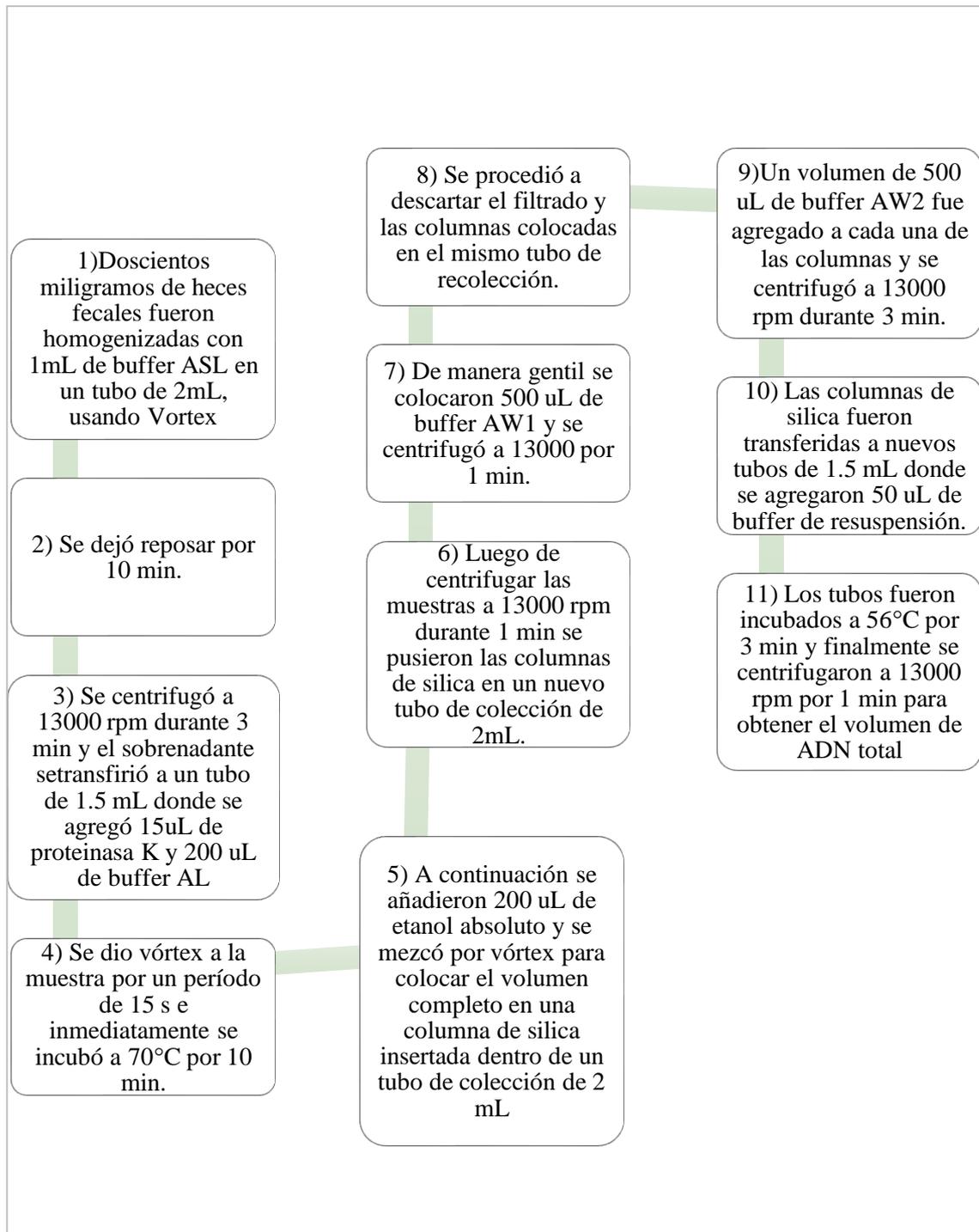


Ilustración 7-3: Procedimiento realizado paso a paso de la Técnica PCR

Fuente: (Wang et al., 2018, pp. 2-3).

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

Tabla 2-3: Componentes de reacción de PCR convencional para cada muestra ensayada.

COMPONENTE	VOLUMEN
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	12.5 uL
Primer forward (10 µM)	1.25 uL
Primer reverse (10 µM)	1.25 uL
ADN template	100-150 ng
Agua libre de nucleasas	a 25 uL

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

Tabla 3-3: Condiciones de PCR convencional para barcode ITS de los parásitos estudiados.

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: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

3.8.4. Electroforesis en gel de Agarosa

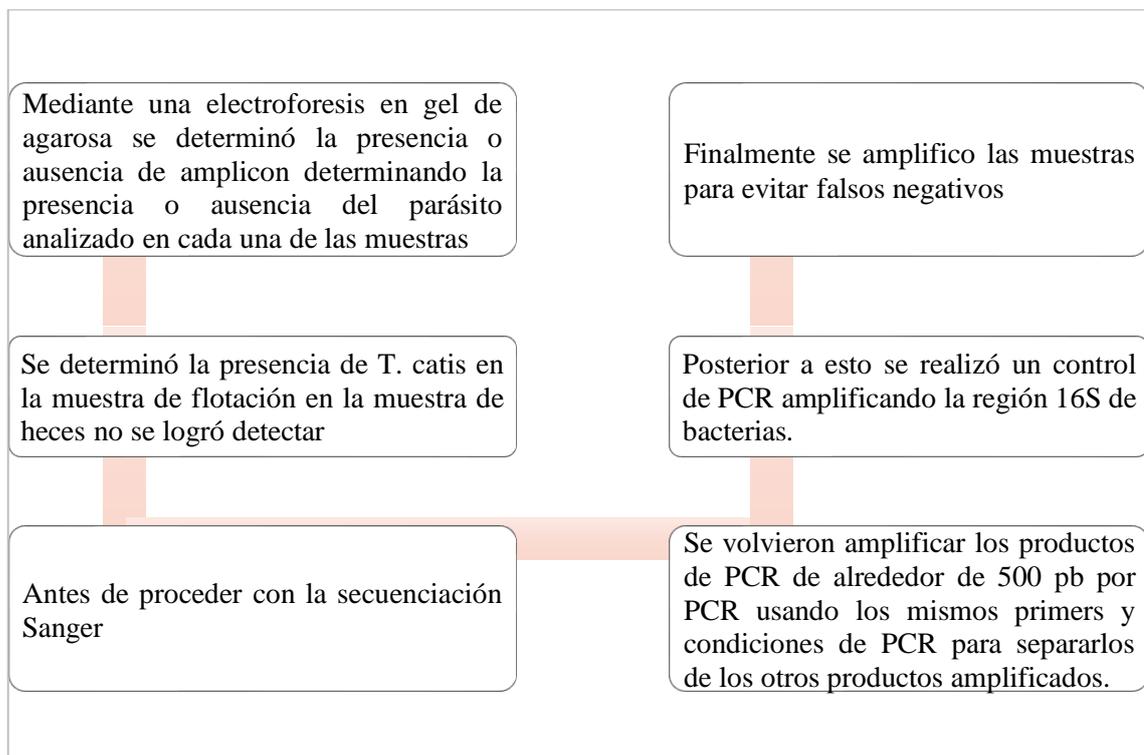


Ilustración 8-3: Electroforesis en gel de Agarosa

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

3.8.5. Secuenciación de Sanger

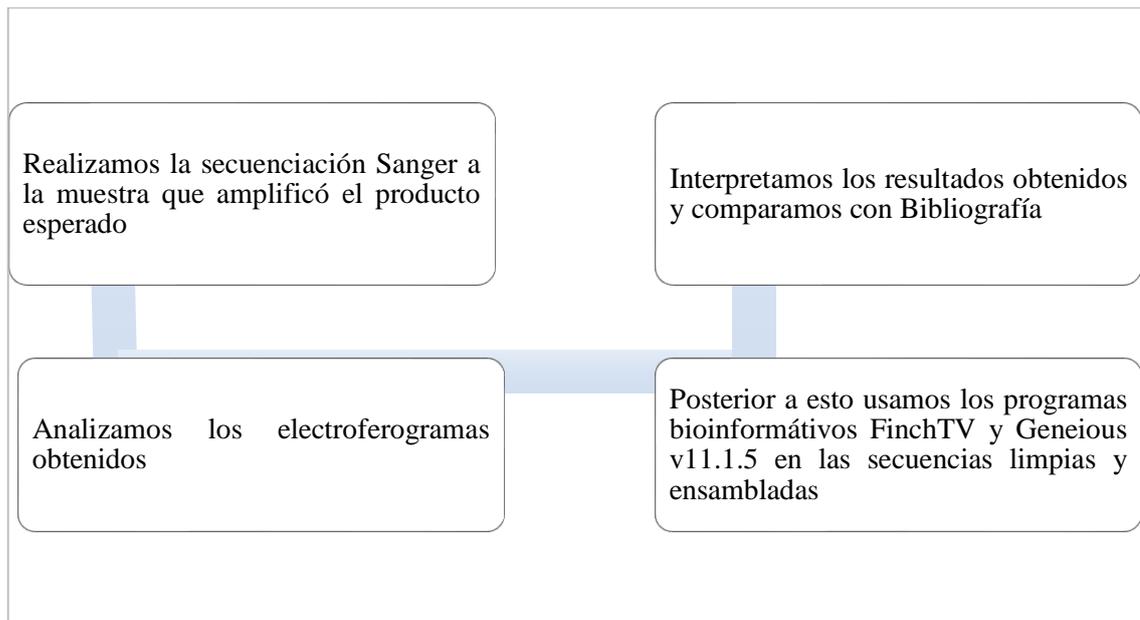


Ilustración 9-3: Procedimiento para la Secuenciación de Sanger

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

3.8.6. Análisis de Datos

Para comparar las secuencias de nucleótidos resultantes se analizaron utilizando programas y búsquedas en BLAST que es la base de datos GenBank, y se alinearon con las secuencias de referencia utilizando el programa de alineación de secuencias MEGA. Los análisis de unión de vecinos se realizaron utilizando estimaciones de distancia de parámetros de Tamura y Nei (2011, pp. 512-526), y se construyó un árbol filogenético utilizando MEGA 11 (Cummings, 2004: A1). Los valores de arranque se obtuvieron utilizando 1000 repeticiones (Serrato et al, 2008, p. 53).

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Morfología de *Toxocara cati*

Se analizaron 120 muestras de heces fecales pertenecientes a felinos alojados en la parroquia Totoras provincia de Tungurahua con ayuda del examen coproparasitario directo y método de Flotación de Willis para identificar la morfología del parásito y establecer la prevalencia de parasitosis gastrointestinal a su vez también se realizó una comparación entre estas dos técnicas.

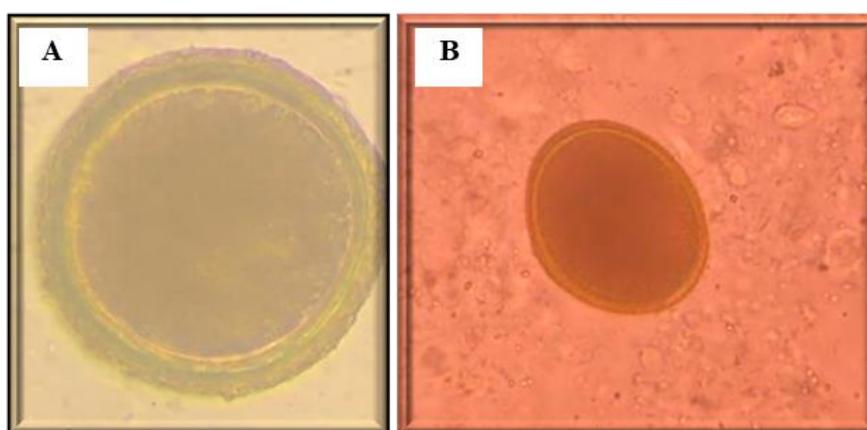


Ilustración 1-4: Huevos de *T. cati* vistos por examen coproparasitario directo, objetivo 40x. **A.** Solución salina 0.9%; **B.** lugol.

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

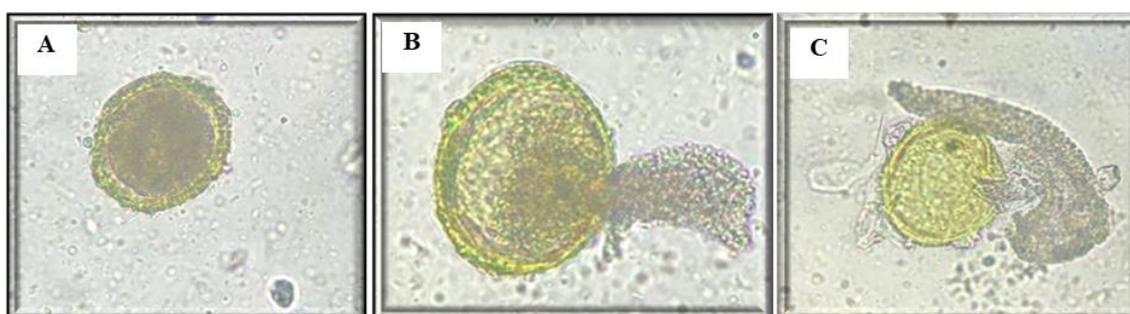


Ilustración 2-4: Huevos de *T. cati* vistos por método de Flotación de Willis, objetivo 40x. **A.** Sln. salina 0.9%; **B.** *T. cati* eclosionando; **C:** *T. cati* totalmente eclosionado

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

En las ilustraciones 1 – 4 y 2 – 4 se puede notar diferencias significativas entre estos dos métodos, el examen coproparasitario directo solo permite observar una morfología de huevo redondeado con una cubierta gruesa que aloja en su interior lo que será la larva con el paso de los días en

comparación con el Método de Flotación de Willis en el cual podemos a más de visualizar lo mencionado permite observar la eclosión, los rasgos característicos y nos presenta un campo limpio en el que va estar solo los huevos que tienen mayor densidad, pero al querer dar una comparación entre estas dos técnicas y usarlas como método de detección para todo tipo de parásitos no se podría hacer ya que como explica Coati et al. No se pueden comparar las dos técnicas debido a que cada una identifica diferentes *phylum* o clases de parásitos es decir la primera técnica detecta todo tipo de parásitos, pero la segunda técnica tiene sus desventajas debido a que no permite observar parásitos con densidad baja. (2004, pp.142-146).

4.2. Análisis de muestras para determinar la prevalencia de *Toxocara catis*

El presente trabajo de investigación se ejecutó en los meses de Mayo / Junio del 2022, en la parroquia Totoras con la finalidad de determinar la prevalencia de *Toxocara catis* donde se empleó el análisis coprológico directo y la técnica de Flotación de Willis.

4.2.1. Prevalencia de *Toxocara catis* en felinos alojados en la parroquia Totoras

Tabla 1-4: Prevalencia de *Toxocara catis*

	POSITIVOS	(%)	NEGATIVOS	(%)	TOTAL
FELINOS	32	26,66	88	73,33	120

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

Como podemos observar en la Tabla 1-4, se denota que si existieron diferencias considerables entre los casos positivos que fueron 32 con un porcentaje de 26,66% y negativos 88 con un porcentaje de 73,34% en base a estos valores se calcula la prevalencia general según la siguiente fórmula:

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Casos Positivos}}{\text{Casos Totales}} * 100$$

$$\text{Prevalencia} = \frac{32}{120} * 100$$

$$\text{Prevalencia} = 26,66\%$$

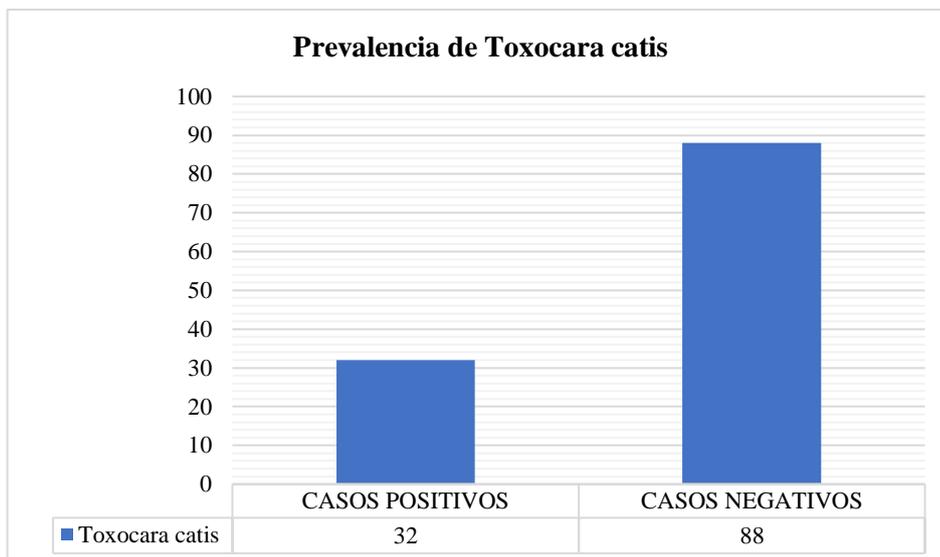


Ilustración 3-4: Prevalencia total de *Toxocara cati*

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

Comparando con el estudio realizado por Gallegos (2012, pp. 66-67) que determinó la prevalencia de parásitos Intestinales y Externos en determinadas Zonas del Ecuador solo el 7,5% de felinos analizados presento este parásito el cual es un valor muy bajo a comparación con el obtenido en nuestra investigación. Según manifiesta Chávez (2021, pp. 1 - 3), la prevalencia de parasitosis dependerá de varios factores como hábitat, alimentación y limpieza, cabe indicar también que el grado de parasitismo y prevalencia de nuestro estudio fue de categoría leve, es decir que las muestras analizadas solo poseían una pequeña presencia de parásitos en el organismo, por lo que no mostraron signos clínicos de la infestación.

4.2.2. Análisis de *Toxocara cati* según sexo de los felinos muestreados

Tabla 2-4: Prevalencia de *Toxocara cati* según sexo de los felinos muestreados.

Felinos	No. Machos	(%) Casos (+)	No. Hembras	(%) Casos (-)	No. Total	(%) Total
POSITIVOS	23	19,16	9	7,5	32	26,66
NEGATIVOS	20	16,66	68	56,66	88	73,34
Total	43	35,82	77	64,18	120	100

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

Según la tabla 2-4 de las 120 muestras de los felinos analizados se tiene como resultado que los machos representaron el valor más alto con 23 animales positivos, lo que corresponde al 19,16%; en relación con las hembras que presentan 9 casos positivos con el 7,5%; valor que se debería a

que los machos por su característica independencia de vagabundeo tienden a salir más de casa, lo que incrementaría más sus posibilidades de contagio. Esto significa que el 64,18% de felinos de la población total fueron negativos.

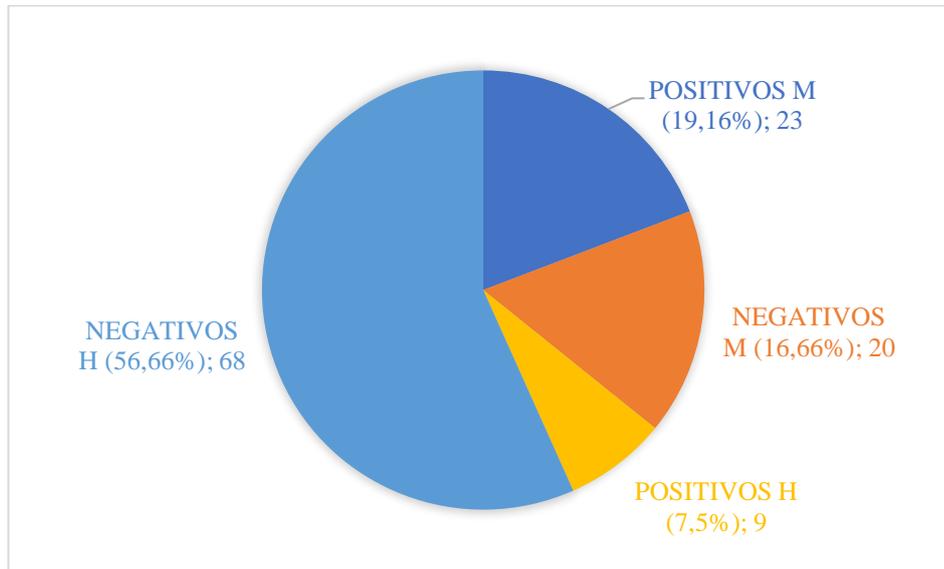


Ilustración 4-4: Prevalencia de *T. cati* según sexo de los felinos muestreados.

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

Según Pazmiño se encontró que el 63 % de felinos analizados pertenecientes a machos, tuvieron huevos de *T. cati*, lo cual evidencia que un alto porcentaje de mascotas de este sexo se infestan con este parásito, que puede ser adquirido por los huevos que depositan en la tierra otras mascotas y estos al tener una independencia de vagabundos son más probables a contagiarse (2018, pp. 28 - 36).

4.2.3. Casos positivos y negativos a *Toxocara cati* según la edad

Tabla 3-4: Casos positivos y negativos a *Toxocara cati* según la edad.

Felinos	No. Positivos	(%) Casos	No. Negativos	(%) Casos	No. Total	(%) Total
		(+)		(-)		
3-11 meses	5	4,16	8	6,67	13	10,83
1-3 años	21	17,50	58	48,33	79	65,84
Mayor a 3 Años	6	5	22	18,33	28	23,33
TOTAL	32	26,66	88	64,18	120	100

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

Con base en la tabla 3-4 la relación con la edad se obtiene el valor más alto para 1 a 3 años con un número de 21 casos positivos representando al 17,50 % del total de la muestra, seguido de la

edad de más 3 años, con un número de 6 casos que corresponde al 5%, y por último de 3-11 meses que presenta 5 casos con el 4,16%. Estos valores se explicarían debido a que ya tenemos animales de 1 a 3 años considerados ya adultos que se encuentran en edad reproductiva y sentido de independencia. De igual manera el 64,18 % de la población no presenta *Toxocara cati*.

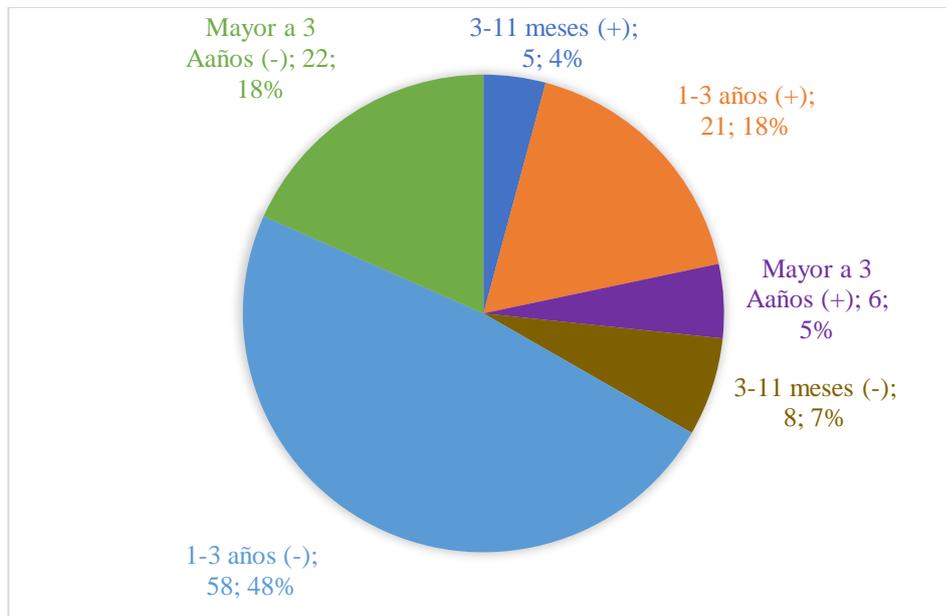


Ilustración 5-4: Casos positivos y negativos según la edad

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

4.2.4. Análisis de las especies parasitarias encontradas en los felinos

Tabla 4-4: Prevalencia de las especies parasitarias encontradas en los felinos

Parásitos	Muestras Positivas	Prevalencia	Tipo de infestación
<i>Giardia felis</i>	87	72,50	Grave
<i>Toxocara cati</i>	32	43,33	Grave
<i>Isospora felis</i>	26	32,50	Leve
<i>Toxoplasma gondii</i>	14	11,67	Leve
<i>Entamoeba histolítica</i>	9	7,50	Leve
<i>Ancylostoma spp</i>	2	1,67	Leve

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

En los resultados obtenidos en la tabla 4 - 4 nos indican que no solo se encontró el parásito objeto de estudio sino también se encontraron parásitos como: *Giardia felis* con un 72,50% que es indicativo a que puede existir una zoonosis denominada Giardiasis en la población de esta

parroquia, *Isospora felis* con un 32,50% y *Toxoplasma gondii* con un 11,67% también poseen un carácter prevalente y zoonótico en nuestro estudio. Estos resultados son similares con Cañar y Lojano (2015, p.79) que identificaron con mayor frecuencia *Toxocara cati*, *Mesocestoides sp.*, *Giardia felis*, entre otras, además, podemos acotar que al haberse observado una parasitosis de origen doméstico se debería poner en acción nuestro plan propositivo para disminuir esta prevalencia y evitar riesgos epidemiológicos a futuro en la zona estudiada.

Toxocara cati fue el segundo género parasitario más frecuente en este estudio, con una prevalencia del 43,33%, que, comparándolo con el estudio dado en zonas urbanas y rurales de Santa Clara, Cuba se reportó la presencia de *Toxocara cati* con porcentajes de 9% y 40% respectivamente (Castillo, 2016, pp. 1 - 5). En Quito-Ecuador, la frecuencia de *Toxocara cati*, del 33%, fue reportada por Latorre y Nápoles (2014, pp. 66-67). Dicho resultado es mayor que el encontrado en este estudio el cual fue ya mencionado. Como es de conocimiento científico este género parasitario es un helminto, que según estudios se puede encontrar en el pelaje de los animales, por lo que podría ser un factor de transmisión sobre todo a la población infantil que está en mayor contacto con mascotas (Chiodo, 2009, pp. 1 -7).

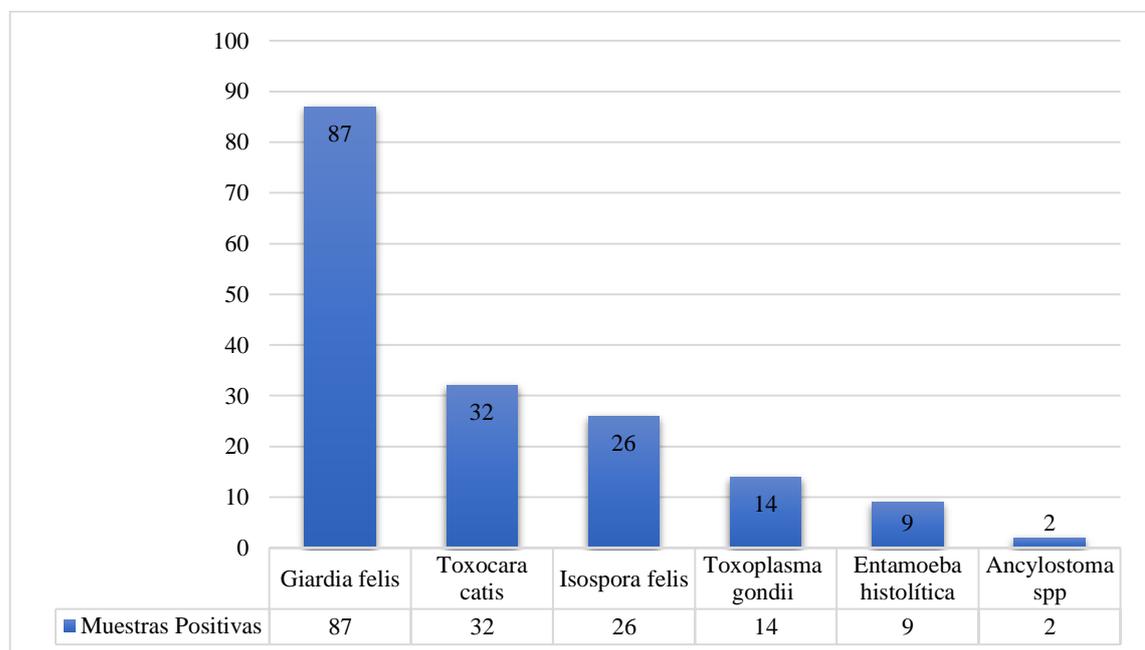


Ilustración 6-4: Prevalencia de las especies parasitarias encontradas en los felinos

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

4.2.5. Análisis mediante la técnica de Flotación de Willis

En el trabajo de investigación se realizó la técnica de flotación para determinar los huevos de *Toxocara cati*. Esta es una técnica rápida para la determinación de huevos de alta densidad de parásitos que a la vez nos brinda buenos resultados.

Tabla 5-4: Análisis según la técnica de flotación de Willis

	POSITIVAS	NEGATIVAS	Muestras Leídas
Método de Flotación	36	12	48

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

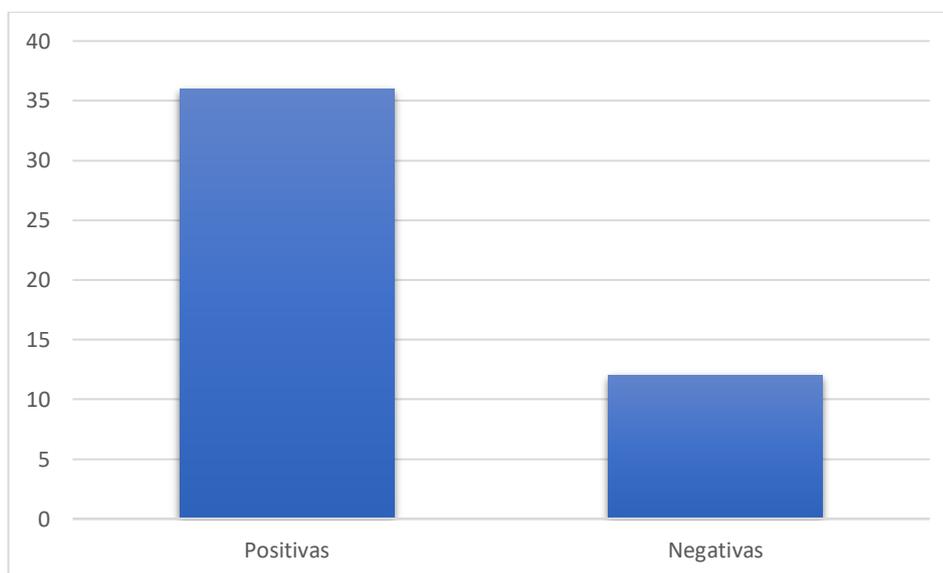


Ilustración 7-4: Análisis según la técnica de flotación.

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

De la población de estudio (120 felinos) que se leyeron mediante análisis coproparasitario al realizar la técnica de flotación se tomaban 15 muestras para mezclar y realizar la técnica mencionada obteniendo de estas solo 6 placas para lectura al microscopio es decir se leyeron 48 placas por el método de flotación de las cuales 36 muestras fueron positivas a *Toxocara cati* denotando así una mayor incidencia de este tipo de helmintos, correlacionando con el estudio de Cañar y Lojano, en el que también usaron la técnica mencionada obtuvieron la mayoría de casos leves y solo uno de categoría muy grave para nuestro parásito objeto de estudio (2015, p.80).

4.3. Resultados de la Tipificación genética realizada al 5% de muestras positivas para *Toxocara cati*

4.3.1. Extracción y visualización de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de *Toxocara cati*, se realizó mediante el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Alemania), de la que se obtuvo ADN genómico, bacteriano, viral, y de

parásitos a partir de heces fecales frescas, congeladas, conteniendo posibles inhibidores de PCR, así como resuspensiones de huevos de parásitos. El ADN de *Toxocara cati* se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa

4.3.2. Amplificación del ADN producto de la extracción

Según la bibliografía se utilizó el cebador Tcat1 y el NC24

Tabla 6-4: Cebadores para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Primer	Secuencia (5'-3')	Referencia
NC2	TAGTTTCTTTTCCTCCGCT	(Mikaeili et al., 2017, pp. 549-556).
Tcat1	GGAGAAGTAAACTC	(Mikaeili et al., 2017, pp. 549-556).

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

4.3.3. Electroforesis en gel de Agarosa

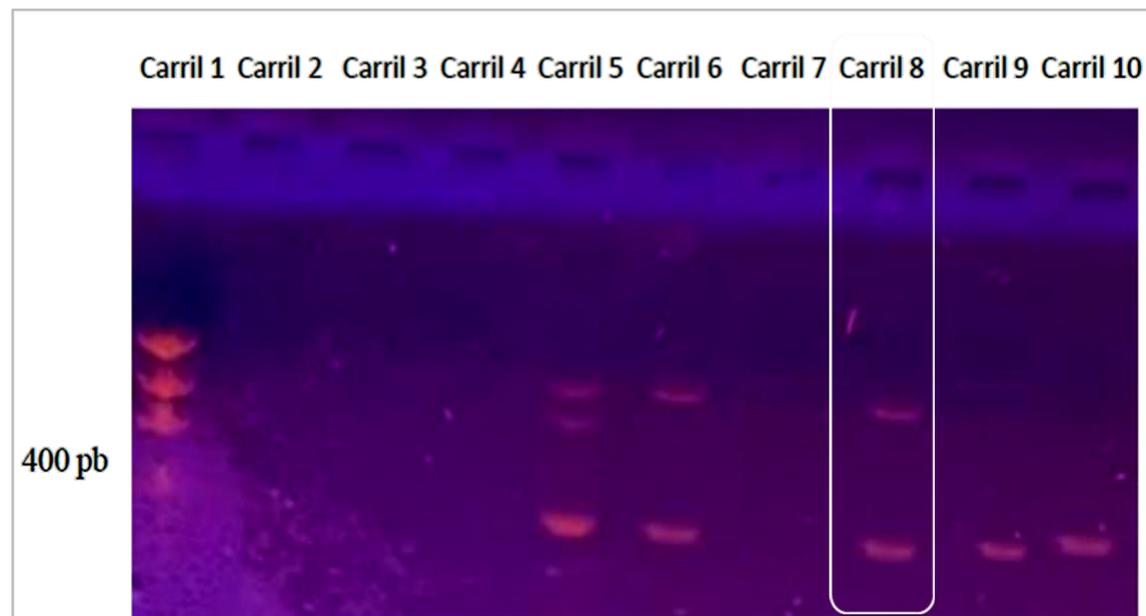


Ilustración 8-4: Resultado de la electroforesis en gel de agarosa para determinar *Toxocara cati*

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

Los productos de PCR punto final se analizaron en presencia de parásitos *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, y *Ancylostoma caninum* a partir de muestras de heces y resuspensión de huevos. Con el marcador molecular Invitrogen low mass. En el carril 7 se sembró la muestra de heces y en el carril 8 se sembró la muestra de resuspensión de huevos, estos productos de amplificación se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa que determinó la presencia o ausencia

de este parásito analizado en cada una de las muestras. Se determinó la presencia de ADN perteneciente a *Toxocara cati* en la muestra de resuspensión de huevos (carril 8), en la muestra de heces fresca (Carril 7) no se logró la detección de este esto se pudo deber a que la muestra de heces tomada para extracción de ADN no poseía una cantidad necesaria de parásitos para realizar el procedimiento PCR.

En base a los resultados observados en la electroforesis, se podría afirmar la efectividad de la técnica de extracción elegida. A su vez, se consideró que la elución de *Toxocara cati* en el carril 8 es útil para realizar la reacción en cadena de la polimerasa con la finalidad de analizar la especificidad de la técnica propuesta. Si bien el ADN de *Toxocara cati* se visualizó algo degradado, puede ser utilizado para realizar la PCR.

4.3.4. Productos de PCR punto final analizando control interno de extracción de ADN

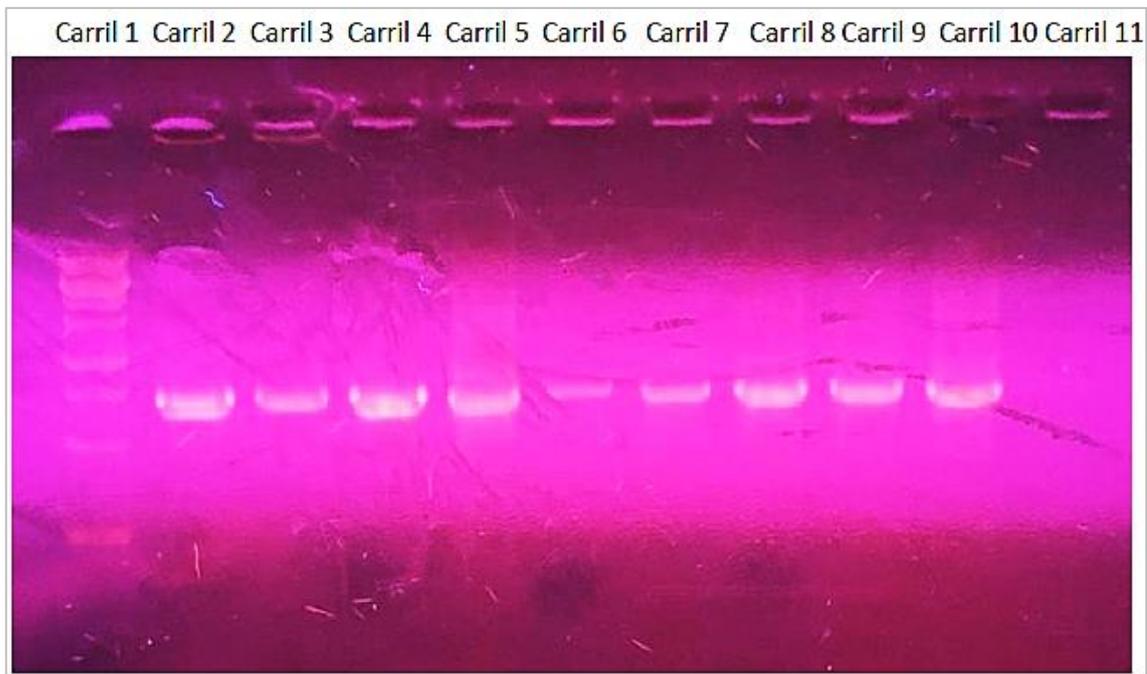


Ilustración 9-4: Productos de PCR punto final analizando control interno de extracción de ADN

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

Antes de proceder con la secuenciación Sanger, el producto de PCR de alrededor de 500 pb se volvieron a amplificar usando los mismos primers y condiciones de PCR para separarlos de los otros productos amplificados como se puede observar en la Ilustración 9 – 4 con esto se pudo evaluar su calidad.

4.3.5. Secuenciación de Sanger

Se realizó la secuenciación de Sanger para la 1 muestra que amplificó los productos esperados. Los electroferogramas fueron analizados y las secuencias limpias y ensambladas usando los programas bioinformáticos FinchTV y Geneious v11.1.5. Con los cuales finalizado dio la siguiente secuenciación de ADN “TCGCGGGTGCTCCGACTGAGCTGAGGTCACATTGAGCACTAACATTTGAA CGCACATTGCGCCATCGGGTTCATTCCCGTTGGCACG”

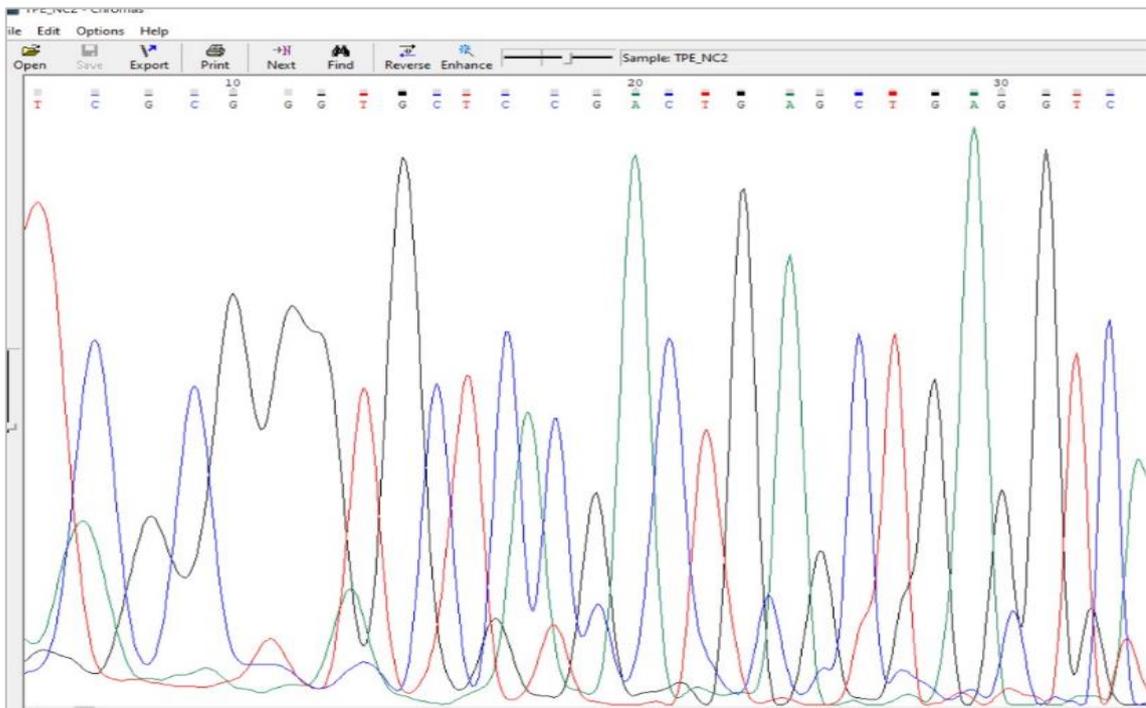


Ilustración 10-4: Picos presentados por el programa GENIUS para la Secuenciación de Sanger

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	valor E	Por. Identificador
<input checked="" type="checkbox"/> Toxocara cati espaciador interno transcrito 1 _secuencia parcial_ gen de ARN ribosomal 5.8S _secuencia... Toxocara gato		113	113	69%	3e-21	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Rostellascaris spinicaudatum aislado NC5F _espaciador interno transcrito 1 _secuencia parcial_ gen de A... Rostellascaris s...		113	113	69%	3e-21	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Aislamiento de Toxocara cati Tcat.R12 _espaciador interno transcrito 1 _secuencia parcial_ gen de ARN ri... Toxocara gato		113	113	69%	3e-21	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Aislamiento de Toxocara cati Tcat.M86 _espaciador interno transcrito 1 _secuencia parcial_ gen de ARN ri... Toxocara gato		113	113	69%	3e-21	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Aislamiento de Toxocara cati Tcat.E135 _espaciador interno transcrito 1 _secuencia parcial_ gen de ARN ri... Toxocara gato		113	113	69%	3e-21	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Aislamiento de Toxocara cati Tcat.D145 _espaciador interno transcrito 1 _secuencia parcial_ gen de ARN r... Toxocara gato		113	113	69%	3e-21	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Aislamiento de Toxocara cati Tcat.D10 _espaciador interno transcrito 1 _secuencia parcial_ gen de ARN ri... Toxocara gato		113	113	69%	3e-21	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Aislamiento de Toxocara cati Tcat.C30 _espaciador interno transcrito 1 _secuencia parcial_ gen de ARN ri... Toxocara gato		113	113	69%	3e-21	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Aislamiento de Toxocara cati Tcat.B72 _espaciador interno transcrito 1 _secuencia parcial_ gen de ARN rib... Toxocara gato		113	113	69%	3e-21	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Aislamiento de Toxocara cati Tcat.B6 _espaciador interno transcrito 1 _secuencia parcial_ gen de ARN ribo... Toxocara gato		113	113	69%	3e-21	100.00%

Ilustración 11-4: Secuencias Similares según BLAST

Fuente: (NIH, 2022: A1)

Mediante el resultado arrojado por el programa GENUIS ilustración 10-4 en la cual se puede observar que si hubo formación de picos por presencia de bases y posterior formación de la secuencias se procedió a comparar la similitud de las mismas con las del banco de datos GenBank, el cual arrojó que la especie a la que pertenece esta secuenciación es *Toxocara cati* con un 100% de Identidad como podemos observar en la ilustración 11-4.

4.3.6. Creación de un árbol Filogenético

Se procedió a crear un árbol filogenético con base en la secuenciación obtenida, para corroborar que la misma es perteneciente al parásito que estamos estudiando, este nos muestra un conjunto de posibles nucleótidos en cada nodo ancestral en función de su probabilidad inferida para corroborar que se trata de *Toxocara cati*

4.3.6.1. Alineamiento para la creación del árbol Filogenético

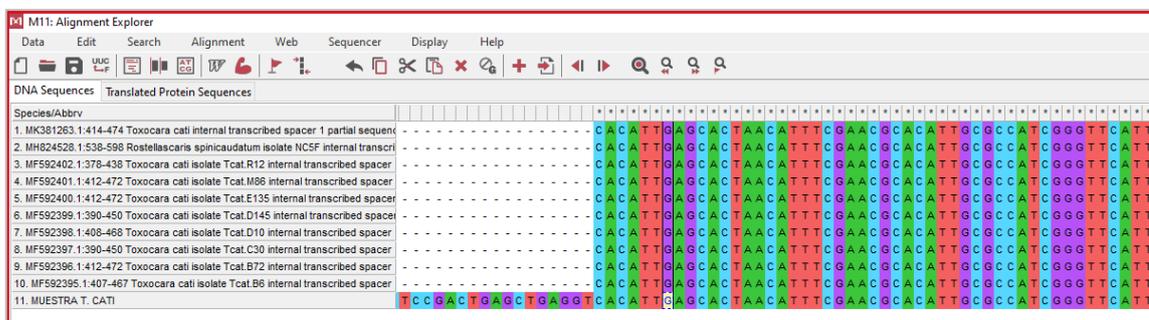


Ilustración 12-4: Alineación de la secuencia mediante MEGA

Fuente: MEGA 11

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

Como podemos observar en la ilustración 12-4 con ayuda del programa MEGA se alineó nuestra secuenciación en conjunto con 10 secuenciaciones obtenidas del GenBank para proceder con la creación del árbol filogenético de nuestro parásito objeto de estudio.

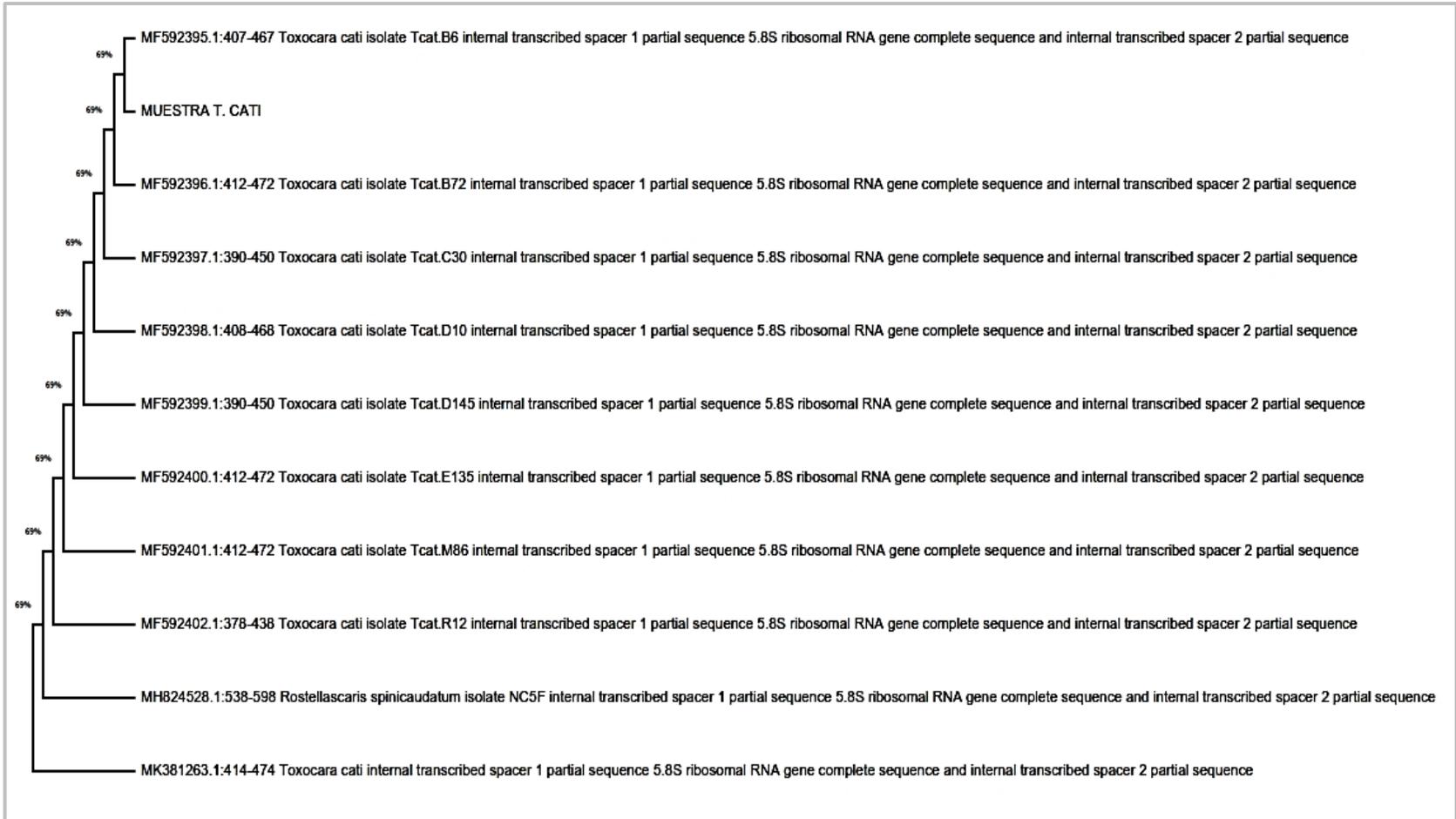


Ilustración 13-4: Árbol filogenético de *Toxocara cati*

Fuente: MEGA 11

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

En la ilustración 13-4 podemos observar el Árbol Filogenético perteneciente a nuestra muestra de *Toxocara cati* el cual es un Análisis evolutivo por el método de Máxima Verosimilitud que muestra el árbol con la verosimilitud logarítmica más alta, Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas mediante el modelo Tamura y Nei y luego seleccionando la topología con un valor logarítmico de verosimilitud superior. La proporción de sitios donde al menos 1 base inequívoca está presente en al menos 1 secuencia para cada lado descendiente se muestra al lado de cada nodo interno en el árbol. Este análisis involucró 11 secuencias de nucleótidos, 10 pertenecientes al Gen Bank y la última perteneciente a nuestro estudio secuenciación. Las posiciones de codón incluidas fueron 1°-2°-3° sin codificación, hubo un total de 88 posiciones en el conjunto de datos final, denotando así un 100% de identidad para nuestro parásito, en la Ilustración mencionada la MUESTRA *Toxocara cati* se encuentra a la misma distancia de la muestra MF592395.1 y no muy alejada de las otras muestras del mismo género y especie. Al no haber estudios filogenéticos acerca de *Toxocara cati* no se puede realizar una comparación bibliográfica, pero si se puede aseverar según lo obtenido que la muestra estudiada fue perteneciente a *Toxocara cati*.

4.3.7. Resultado de la determinación de *Toxocara cati* mediante muestra de Heces y Resuspensión de huevos por la Técnica PCR

Tabla 7-4: Resultado de la determinación de *Toxocara cati* mediante muestra de Heces y Resuspensión de huevos por la Técnica PCR

Muestra	Código BioSin	Hospedero	Fuente	Parásito	Bacorde	Resultado	Identidad %	Calidad
1	TGH	Felis silvestris catus	Heces	<i>Toxocara cati</i>	ITS 2	No detectado	-	-
2	TGE	Felis silvestris catus	Resuspensión de huevos	<i>Toxocara cati</i>	ITS 2	Detectado	99,78	82,86

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

En la tabla 7-4 se denota resultado de la Tipificación de *Toxocara cati* el cual da a entender que en la muestra de heces no hubo detección de este parásito esto pudo deberse a que la muestra enviada no tenía una cantidad representativa de huevos o que se debió administrar algún tipo de helmíntico a los felinos para obtener una muestra rica en huevos en comparación, con la muestra

de resuspensión de huevos en la que si se detectó la identidad y con una buena calidad el parásito, Estos resultados son semejantes a los encontrados por Wang, quien, al realizar el análisis de PCR, de heces gatos infectados naturalmente después de la administración de antihelmínticos en un refugio de animales en Miyazaki, Japón obtuvo con una identidad del 99,26% y una calidad de 83,76 siendo positivas para *Toxocara cati* con ampliaciones de tamaño de 160 pb en todas las muestras (Wang et al., 2018, pp. 2-3).

CAPÍTULO V

5. MARCO PROPOSITIVO

Elaboración de un shampoo a base del extracto de RUDA para el cuidado y desinfección corporal de las mascotas

5.1. Propuesta

5.1.1. Introducción

Elaborar un shampoo a base del extracto de RUDA (*Ruda graveolens*), con materias primas orgánicas y limpias con el ambiente, sería de gran ayuda para los dueños de los felinos debido a que ayudaría a disminuir la proliferación de plagas causantes de enfermedades infecciosas transmisibles al humano, como por ejemplo la Toxocariasis provocada por *Toxocara cati*, ya que, al momento de acariciar a estos felinos en su pelaje se pueden encontrar restos fecales de los mismos que podrían iniciar su ciclo evolutivo el cual provocarían una zoonosis en los humanos, cabe indicar también que ayudaríamos a concientizar los riesgos a los que están expuestos los dueños.

5.1.2. Metodología

Las materias primas por utilizar son

- Texapón
- Fragancia
- Comperlan
- Planta Ruda
- Colorante
- Agua destilada

A continuación, se describe el paso a paso de la elaboración del shampoo, donde tratamos de aprovechar al máximo todos los beneficios que nos proporciona la planta “ruda” y los componentes adicionales que agregamos.

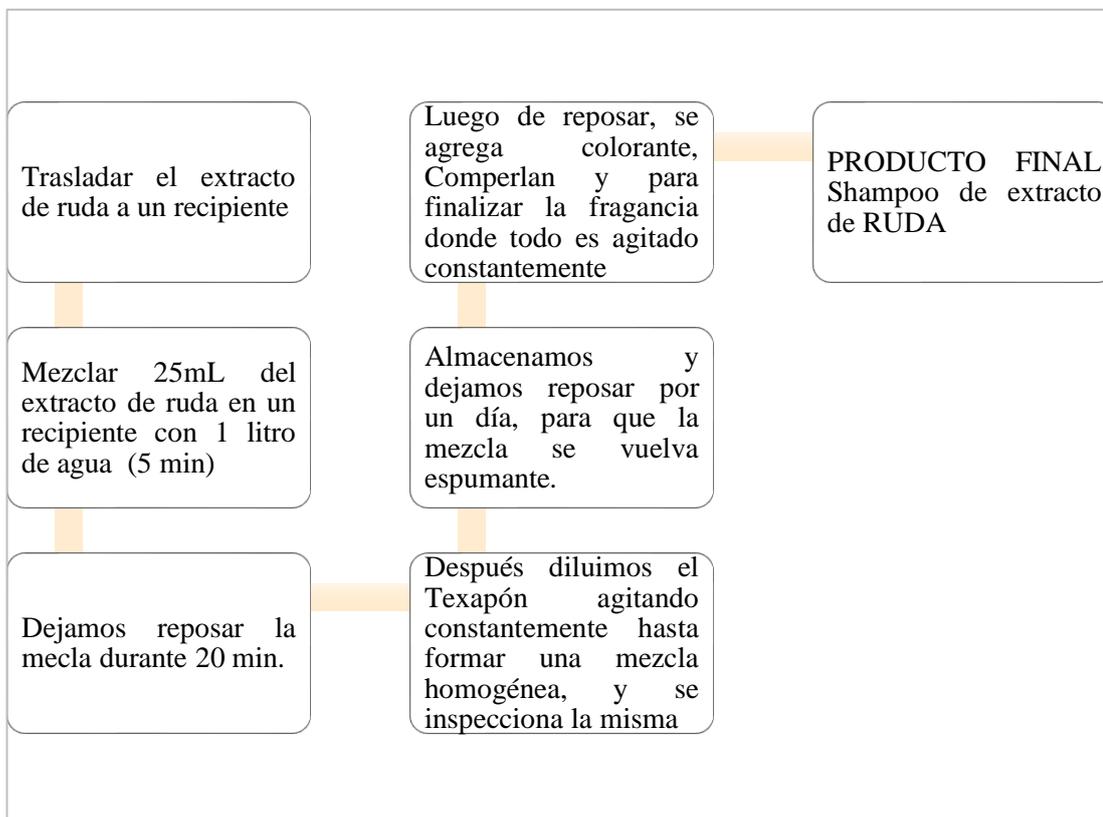


Ilustración 1-5: Procedimiento para elaborar un shampoo a base de RUDA

Fuente: (Cobeña et al., 2020, pp. 3-6)

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

Tabla 1-5: Forma de uso, Control de calidad y Ensayos de Tolerancia

Forma de uso	Corporal
Control de calidad	<p>Color: Perlado</p> <p>Olor: Característico (frescura)</p> <p>pH: 7 – 8</p> <p>Viscosidad: 3000+/- 1000 cps.</p> <p>Materias extrañas: Ausencia</p> <p>Almacenamiento: Lugar fresco</p> <p>Caducidad: Aproximadamente 6 meses</p>
Ensayo de Tolerancia	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayo de irritación ocular • Ensayo de irritación cutánea primaria • Ensayos in vitro no se sobre células en cultivo o tejidos aislados

Fuente: (Basto, 2016, pp. 5 - 16)

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

5.1.3. Costo de la propuesta para la elaboración del Shampoo a base de ruda

Tabla 2-5: Desglose de costos de la propuesta para la elaboración del Shampoo a base de ruda

Materia Prima	Cantidad Requerida	Valor Unitario (\$)	Cantidad Comercial	Valor Unitario (\$)
Extracto de Ruda	25 mL	0,50	200 mL	4
Texapón	100g	0,60	1200g	7,20
Coperland	250g	0,35	3000g	4,20
Colorante	2 mL	0,15	16 mL	1,20
Fragancia	10 mL	0,20	80 mL	1,60
Agua destilada	1 L	0,55	12 litros	6,60
Costo Total		2,35	Costo Total	24,80

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

En la Tabla 2 -5 , tenemos el costo total para realizar esta propuesta que es un shampoo a base de RUDA (*Ruda graveolens*) que si deseamos realizar 1 L que sería para cada dueño de los felinos el costo total es de 2,35 dólares que al comparar con los precios de marcas reconocidas de shampoo es un gran ahorro ya que un shampoo Felino ronda por los 5 dólares y si se deseara realizar una campaña de desinfección del pelaje de los felinos la elaboración de 12 litros de shampoo tendría un valor de 24,80 el cual nos serviría para que cada dueño de los felinos sea acreedor a 100 mL de shampoo.

5.1.4. Responsables a cargo de la propuesta para la elaboración y uso del Shampoo a base de ruda

Tabla 3-5: Responsables a cargo de la propuesta para la elaboración y uso del Shampoo a base de ruda.

RESPONSABLE	FUNCIONES	PARTICIPACIÓN
Presidente del GAD Totoras	Aprobar la propuesta para desarrollarla en la parroquia	20%
Dueño de los felinos	Cuidado y alimentación sana	40%
Profesional BQF	Elaborar el shampoo con los correctos estándares de control de calidad	100%

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

Los responsables a cargo de la elaboración de este shampoo cumplen un rol muy importante como, el profesional Bioquímico Farmacéutico que será el encargado de elaborar un shampoo que contenga los estándares para asegurar una alta desinfección del pelaje de los felinos y cada dueño que se encargará de usar apropiadamente este producto.

CONCLUSIONES

- El reconocimiento morfológico de los huevos de *Toxocara cati* se dedujo mediante el método coproparasitario y el de Flotación de Willis, cabe indicar que no pueden ser comparadas entre si ya que cada una identifica diferentes phylum de parásitos pero se logró mediante esta última concentrar los huevos de mejor manera sin restos fecales y al momento de observar al microscopio se observa claramente su morfología en diferentes formas dando como resultado que estos son casi esféricos, poseen una cubierta gruesa y rugosa con varias capas concéntricas que son de color marrón oscuro, no segmentado y su contenido ocupa prácticamente todo el interior de los huevos.
- Se determinó la prevalencia perteneciente a *Toxocara cati* en 120 muestras de felinos domésticos mediante el método coproparasitario, dando un resultado positivo del 26,66% que corresponde a 32 muestras, por ende, 68 de ellas resultaron negativas para este parásito, que catalogándolos según la edad datarían en 5 felinos (6 a 11 meses) que corresponde 4,16%, 21 felinos (1 a 3 años) con el 17,5% ,6 felinos (> de 3 años) con el 5%, y 64,18% de casos negativos que equivalen al porcentaje de la población total. Con base en el sexo 23 machos y 9 hembras presentaron este parásito dando a conocer que los felinos machos por su característica conducta bohemia tienden a salir más de casa y a ser más propensos a contagios.
- La caracterización molecular para *Toxocara cati* se realizó mediante la técnica PCR, misma que fue llevada a cabo con un 5% de muestras positivas correspondiente al 4,16%, efectuando primero los protocolos preestablecidos por los fabricantes de los kits a usar, empezando por amplificar el ADNg por electroforesis en gel de Agarosa, de manera que obtuvimos una amplificación positiva solo para la muestra de resuspensión de huevos a la que se le realizó la Secuenciación de Sanger, de manera que, con ayuda de programas bioinformáticos dio la secuenciación mencionada en la Pág. 44, comparándola en el programa Genius presenta la formación de picos que al buscarla en el GenBank arrojó 100% de identidad para *Toxocara cati*, con esto se pudo crear un árbol filogenético con ayuda de MEGA 11 el cual nos aseveró que la muestra estudiada fue 100% *Toxocara cati*, concluyendo así, que esta técnica al ser más sensible y específica ayuda a una determinación más factible del género y especie de dicho parásito.

RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio a nivel general tanto en los felinos como sus dueños complementaría el estudio anteriormente realizado, permitiendo confirmar o no la relación con la tenencia de mascotas felinas y la predisposición al contagio.
- Empezar un tratamiento de desparasitación a los felinos que dieron positivo a los exámenes coproparasitario.
- Usar mayormente la técnica de flotación ya que gracias a la alta densidad que posee permite un enriquecimiento de huevos en la parte superior y una mejor observación de la morfología de los mismo
- Implementar técnicas moleculares como PCR en los laboratorios de la ESPOCH ya que al ser un método sensible y específico nos permite dar un mejor diagnóstico de patógenos parasitarios con alta probabilidad zoonótica.
- Tomar mayor precaución al momento de acariciar a los felinos ya que los huevos de *Toxocara cati*, se pueden encontrar en el pelaje de los animales, lo que podría ser un factor de transmisión sobre todo a la población infantil que está en mayor contacto con mascotas.

GLOSARIO

ADN: Abreviación de Ácido Desoxirribonucleico. Es la forma de almacenamiento de nuestro material genético. Todas las instrucciones para la producción de nuestras proteínas están codificadas en nuestro ADN (Garrigues, 2017: 1A).

Agarosa: Compuesto no tóxico con diversas propiedades y especificaciones que la hacen útil como gelificante en muchas aplicaciones, como la electroforesis de ácidos nucleicos (Armisen, 2003, pp. 17).

Bacorde: Es un código de barras de ADN que permite diferenciar taxonómicamente, pero está flanqueada por secuencias de ADN que son iguales para todas estas especies para que se unan los cebadores (Bento Bioworks, 2013: A1).

Cebador: Los cebadores son secuencias cortas de ADN que indican qué región de ADN que se amplificará en una PCR (Pérez, 2011, p. 10).

Codón: Un triplete de nucleótidos que codifican para un aminoácido (Illana, 2014, pp. 1 - 2).

Filogenético: La filogenética es una rama de la biología evolutiva que se encarga trazar la relación ancestro descendiente de los organismos a diferentes niveles taxonómicos con base a diversos caracteres homólogos tanto morfológicos como moleculares (Conogasi, 2017: A1).

Nucleótido: Es uno de los componentes estructurales o unidades constituyentes del ADN o del ARN. Un nucleótido consta de una base (adenina, timina, guanina, uracilo o citosina), más una molécula de azúcar y una de ácido fosfórico (Kovanen y Cantell, 1980, p.4).

Polimerasa: La polimerasa es una enzima capaz de transcribir o replicar ácidos nucleicos, que resultan cruciales en la división celular (ADN polimerasa) y en la transcripción del ADN (Larrachea, 1997, 247-249).

Proteína: Una molécula compuesta por una o más cadenas de aminoácidos. Las proteínas desempeñan una amplia gama de actividades vitales en la célula (Roper, 2000, pp. 1-7).

Tipificar: Identificación y caracterización de microorganismos patógenos que permite establecer la identidad de los microorganismos causantes de brotes infecciosos (Bolivar et al., 2014, pp. 25-33).

BIBLIOGRAFÍA

ABOU, I. Developmental stages and viability of *Toxocara canis* eggs outside the host. *Biomedica*, vol. 38, no. 2 (2018), pp. 189-197.

ALARCÓN, Miriam, et al. Parasitosis intestinal, factores de riesgo y seroprevalencia de toxocariosis en pobladores del Parque Industrial de Huaycán, Lima, Perú. *Neotropical Helminthology*, vol. 4, no 1 (2010), pp.10-12.

ARÉVALO, J. et al. Ocular toxocariasis. *Journal of Pediatric Ophthalmology & Strabismus*, vol. 50, no 2 (2013), p. 76-86.

ARMISÉN, M. *Nuevos métodos de caracterización y activación de geles de agarosa como soportes para la inmovilización de proteínas de interés industrial.* [En línea]. Universidad Complutense de Madrid. Servicio de Publicaciones. 2003, pp. 17. [Consulta: 31 junio 2022]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/39157698_Nuevos_metodos_de_caracterizacion_y_activacion_de_geles_de_agarosa_como_soportes_para_la_inmovilizacion_de_proteinas_de_interes_industrial

BARRIOS, Patricia, et al. Toxocariasis: manifestaciones clínicas y de laboratorio en niños asistidos en un prestador integral de salud privado de Montevideo, Uruguay (2014-2018). *Revista Médica del Uruguay*, 2020, vol. 36, no 1, p. 6-22.

BASTO, A. 2016. *Manual Del Sistema De Análisis De Peligros Y Control De Puntos Críticos En Una Línea De Producción De Shampoo* [en línea]. UNMSM. 2016. pp. 5 - 16. Disponible en: https://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtualData/Tesis/Ingenie/Arroyo_B_J/anexos.pdf.

BENTO BIOWORKS. DNA Barcoding PCR Protocol. [en línea]. 2020. Disponible en: <https://bento.bio/protocol/dna-barcoding/dna-barcoding-pcr-protocol/>.

BOLÍVAR, A., et al. Manifestaciones cardiovasculares de la toxocariasis humana. *Archivos de Cardiología de México*, vol. 83, no. 2 (2013), pp. 120-129.

BOLIVAR, Ana. et al. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en biomedicina*, vol. 3, no 1 (2014), p. 25-33.

CAÑAR, P. y LOJANO, C. Identificación y frecuencia de parásitos gastrointestinales en felinos silvestres en cautiverio en unidades de manejo de vida silvestre de la provincia del Azuay. [En línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado). Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera De Medicina Veterinaria Y Zootecnia. Cuenca, Ecuador. 2015. pp. 79 - 80. [Consulta: 16 septiembre 2022]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/29599/1/Trabajo%20de%20titulaci%c3%b3n.pdf>

CASTILLO, Julio, et al. Prevalencia y factores de riesgo asociados con la infección de *Toxocara canis* y *Ancylostoma caninum* en canes de compañía. *The Biologist (Lima)*, vol. 14, no 1 (2016). pp. 1 - 5

CHÁVEZ, Debbie, et al. Identificación de parásitos gastrointestinales predominantes en bovinos de la Península de Santa Elena. *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, vol. 7, no. 2 (2021), pp. 1 - 3

CHIODO, Paula; BASUALDO, Juan. Temas de Zoonosis IV: Toxocariosis. *Revista Veterinaria Argentinas*, vol. 39, no 414 (2009), pp. 1 - 7

COATI, N., SCHNIEDER, T. y EPE, C. Vertical transmission of *Toxocara cati* Schrank 1788 (Anisakidae) in the cat. *Parasitology Research*, vol. 92, no. 2 (2004), pp. 142-146.

COBEÑA, JEREMY, et al. *Décima Competencia De Proyectos Académicos De La Facultad De Ingeniería Industrial (Elaboración De Shampoo Para El Cuidado Corporal De Las Mascotas A Base De Ruda)*. [en línea]. Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Industrial. 2020. pp. 3 - 6 [Consulta: 31 junio 2022]. Disponible en: <https://gifii.files.wordpress.com/2020/09/shampoo-organico.pdf>

CONOGASI. Aprender es conocer Introducción a la filogenética. [blog]. 2017. [Consulta: 31 junio 2022]. Disponible en: <https://conogasi.org/articulos/introduccion-a-la-filogenetica/>

CUMMINGS, M.P. 2004. *Dictionary of Bioinformatics and Computational Biology*. [blog]. MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). 2004. [Consulta: 31 junio 2022]. Disponible en: https://www.megasoftware.net/show_eua.

DELGADO, Olinda; RODRÍGUEZ, Alfonso. Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariasis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina. *Boletín de malariología y salud ambiental*, vol. 49, no 1 (2009), pp. 19 - 21 .

DENG, Lei, et al. Epidemiology of Blastocystis sp. infection in China: a systematic review. *Parasite*, vol. 26, no. 1 (2019), pp. 2 - 3

DESPOMMIER, Dickson. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clinical microbiology reviews*, , vol. 16, no 2 (2003), pp. 265-272.

DJOKIC, Vitomir, et al. Mini-FLOTAC for counting Toxoplasma gondii oocysts from cat feces—comparison with cell counting plates. *Experimental parasitology*, 2014, vol. 147, p. 67-71.

DREYER, M. Enfermedades infecciosas. *Prensa Médica Argentina*, vol. 43, no. 44 (1956), pp. 97

FISHER, M. *Toxocara cati*: An underestimated zoonotic agent. *Trends in Parasitology*, vol. 19, no. 4 (2003), pp. 167-170.

GAD PARROQUIAL RURAL DE TOTORAS. *Plan de desarrollo y Ordenamiento Territorial 2015 - 2023*. [En línea]. Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial Rural de Totoras, 2015. [Consulta: 13 abril 2022]. Disponible en: https://gadtotoras.gob.ec/images/cwattachments/106_a350216f827510c640b2b21fa1260101.pdf

GALLEGOS, Gilma. Determinación de prevalencia de parásitos intestinales y externos en gatos domésticos (*felis catus*) en determinadas zonas del Ecuador. [En línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado). Universidad de las Américas, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. Quito, Ecuador. 2012. pp. 66 - 67. [Consulta: 16 julio 2022]. Disponible en: <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/2815/1/UDLA-EC-TMVZ-2012-01%28S%29.pdf>

ILLANA, José. Biología molecular y estructura del ADN. *Anales de Química de la RSEQ*, vol. 110, no 3 (2014). pp. 1 - 2

INÁCIO, Sandra, et al. Automated Diagnostics: Advances in the Diagnosis of Intestinal Parasitic Infections in Humans and Animals. *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 8, no. 1 (2021), pp. 4-6

JUNQUERA, P. *Ancylostoma spp, gusanos nematodos intestinales de perros y gatos: Biología, prevención y control.* [blog]. Parasitipedia. 2017. [Consulta: 31 abril 2022]. Disponible en: https://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=1463&Itemid=1594

KANEVA, Eleonora, et al. Application of PCR method for detection and species identification of *Toxocara spp.*, no. December. *PROBLEMS of Infectious and Parasitic Diseases*, vol. 48, no 3 (2020), p. 26

KHADEMVATAN, S., ABDIZADEH, R. y TAVALLA, M., Molecular characterization of *Toxocara spp.* from soil of public areas in Ahvaz southwestern Iran. *Acta Tropica*. vol. 135, no. 1 (2014). p. 4.

KNAPP, Jenny, et al. Development of a real-time PCR for a sensitive one-step coprodiagnosis allowing both the identification of carnivore feces and the detection of *Toxocara spp.* and *Echinococcus multilocularis*. *Applied and environmental microbiology*, 2016, vol. 82, no 10, p. 2950-2958.

KOVANEN, J. Failure of interferon to modify Creutzfeldt-Jakob disease. *British Medical Journal*, vol. 280, no. 6218 (1980), p. 4

LARRACHEA, E. Reaccion en cadena de la Polimerasa. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria*, vol. 35, no. 2 (1997), pp. 247-249.

LATORRE, Erika; NÁPOLES, Mónica. Estudio para determinar la contaminación con parásitos zoonóticos caninos en parques de la zona urbana del Distrito Metropolitano de Quito. [En línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias de la Salud. Quito, Ecuador. 2014. pp. 66 - 67. [Consulta: 16 julio 2022]. Disponible en: <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3119/1/000110197.pdf>

LEON, I. ¿Cuáles son las diferencias entre PCR, RTPCR, QPCR?. [blog]. Allscience. 2017. [Consulta: 31 agosto 2022]. Disponible en: <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/cuales-son-las-diferencias-entre-pcr-rt-pcr-qpcr-y-rt-qpcr>

MATHIS, Alexander; DEPLAZES, Peter. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania spp.* in diagnostic samples from humans and dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 33, no 5 (1995), p. 1145-1149.

MIKAEILI, Fattaneh, et al. Differentiation of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* based on PCR-RFLP analyses of rDNA-ITS and mitochondrial *cox1* and *nad1* regions. *Acta parasitologica*, vol. 62, no 3 (2017), p. 549-556.

NAVONE, Graciela T., et al. Estudio comparativo de recuperación de formas parasitarias por tres diferentes métodos de enriquecimiento coproparasitológico. *Parasitología latinoamericana*, vol. 60, no 3-4 (2005), p. 178-181.

NIH. Basic Local Alignment Search Tool. [blog]. National Institutes of Health. 2022. [Consulta: 31 agosto 2022]. Disponible en: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1708300454

PAZMIÑO, M. Despistaje de *Toxocara canis* y *Toxocara cati* por el método de Elisa en los niños de la Escuela de Educación Básica “García Moreno”, parroquia rural San José del Batán provincia de Chimborazo. [En línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador. 2018. pp. 28 - 36. [Consulta: 16 abril 2022]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/9020/1/56T00807.pdf>

PEÑAHERRERA, María. Tipificación Genética de *Toxocara canis* en la Zona Urbana de Latacunga. [En línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado). Universidad Técnica de Cotopaxi Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales Carrera de Medicina Veterinaria. Latacunga, Ecuador. 2019. pp. 34 - 41. [Consulta: 16 abril 2022]. Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/5973/6/PC-000754.pdf>

PERERA, Carmen; ACEVEDO, Ana. Nuevas tendencias en el diagnóstico de enfermedades virales en los animales. *Revista de Salud Animal*, 2018, vol. 40, no 3 (2018). pp. 1-10.

PÉREZ, A. *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. [en línea]. Repositorio Institucional de la Universitat Politècnica de València. 2011. pp. 10. Disponible en: [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacción en cadena de la polimerasa.pdf](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacción%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf).

QIAGEN. *QIAamp DNA Stool Mini Kit*. [blog]. QIAGEN. 2022. [Consulta: 15 agosto 2022]. Disponible en: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-stool-mini-kit/>

RODRÍGUEZ, P. et al. Toxocara canis y Síndrome Larva Migrans Visceralis (Toxocara canis and Syndrome Larva Migrans Visceralis). *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, vol. 7, no. 4 (2006), pp. 4-7

ROPERO, Ana. *PROTEÍNAS Las constructoras de tejidos* [en línea]. Universidad Miguel Hernández. 2000. pp. 1-7. Disponible en: <http://badali.umh.es/assets/documentos/pdf/artic/proteinas.pdf>

ROSTAMI, Ali, et al. Seroprevalence estimates for toxocariasis in people worldwide: A systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, vol. 13, no 12 (2019), p. 2

RUBINSKY, G., et al. Human toxocariasis: Diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 104, no. 1 (2010), pp. 3-23.

RUBIO, J. et al. Uso de PCR múltiple en el diagnóstico simultáneo de parasitosis. *Biomédica*, vol. 31, no. 1 (2011) p. 3.

RUEDA, J. et al. GenoType MTBDRplus 1.0® para la detección de resistencia cruzada entre isoniácida y etionamida en aislamientos de Mycobacterium tuberculosis multirresistentes. *Biomedica*, vol. 35, no. 4 (2015), pp. 541-548.

SALVATELLA, R. y EIRALE, T. Examen coproparasitario . Metodología y empleo. Revisión técnico-metodológica. *Rev Med Uruguay*, vol. 12, no. 3 (1996), pp. 215-223.

SASTRE, Ángela. Epidemiología de la toxocariosis en España.[En línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Madrid, España. 2015. p. 8. [Consulta: 25 julio 2022]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/48677/1/ANGELA%20SASTRE%20MATESANZ.pdf>

SERRATO, Alejandra, et al. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 2008, p. 53.

STENSVOLD, Christen; et al. Toxocariasis. *Ugeskrift for Laeger*, vol. 173, no 3 (2011), p. 186-189.

TAMURA, Koichiro; NEI, Masatoshi. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, vol. 10, no 3 (1993), p. 512-526.

WANG, Zhenzhen, et al. Development of nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Ascaris suum* contamination in meat and organ meats. *Parasitology international*, vol. 67, no 5 (2018), p. 2 - 3

YUSTE, F. Genetic diagnosis by PCR. *Sociedad Española de Genética*, 2019, pp. 39.

ANEXOS

ANEXO A: DATOS DE LAS PARASITOSIS PRESENTADAS POR LOS FELINOS EN LA PARROQUIA TOTORAS

N ° Muestra	SEXO	SEXO		EDAD	EDAD			<i>Toxocara cati</i>	<i>Giardia felis</i>	<i>Isoospora felis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Ancylostoma spp.</i>
		MACHO	HEMBRA		3-11 MESES	1-3 AÑOS	> 3 AÑOS						
1	MACHO	X		2 Años	X			POSITIVO	POSITIVO				
2	MACHO	X		9 Mes	X			POSITIVO	POSITIVO				
3	HEMBRA		X	4 Años		X							
4	HEMBRA		X	1 Año		X							
5	HEMBRA		X	2 Años		X		POSITIVO	POSITIVO		POSITIVO		
6	HEMBRA		X	3 Mes	X				POSITIVO				POSITIVO
7	MACHO	X		1 Año		X							
8	HEMBRA		X	2 Años		X							
9	HEMBRA		X	1 Año		X		POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO			
10	MACHO	X		3 Mes	X								
11	MACHO	X		2 Años		X			POSITIVO				
12	HEMBRA		X	7 Años		X							
13	MACHO	X		1 Año		X			POSITIVO				
14	HEMBRA		X	3 Mes	X				POSITIVO	POSITIVO		POSITIVO	
15	MACHO	X		1 Año		X		POSITIVO	POSITIVO		POSITIVO		
16	HEMBRA		X	8 Años		X							
17	HEMBRA		X	2 Años		X			POSITIVO				
18	HEMBRA		X	7 Mes	X			POSITIVO	POSITIVO				
19	MACHO	X		1 Año		X			POSITIVO				
20	HEMBRA		X	2 Años		X							
21	MACHO	X		4 Años		X			POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO		
22	HEMBRA		X	5 Mes	X				POSITIVO			POSITIVO	
23	MACHO	X		6 Años		X			POSITIVO				
24	HEMBRA		X	4 Mes	X								
25	HEMBRA		X	1 Año		X		POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO			
26	HEMBRA		X	2 Años		X							
27	HEMBRA		X	7 Años		X			POSITIVO				
28	MACHO	X		1 Año		X							
29	MACHO	X		3 Años		X		POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO			
30	HEMBRA		X	2 Años		X			POSITIVO		POSITIVO		
31	HEMBRA		X	1 Año		X			POSITIVO	POSITIVO		POSITIVO	
32	MACHO	X		5 Años		X							
33	HEMBRA		X	6 Mes	X								
34	HEMBRA		X	6 Años		X			POSITIVO				
35	MACHO	X		1 Año		X		POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO		
36	HEMBRA		X	2 Años		X			POSITIVO				
37	HEMBRA		X	1 Año		X							
38	MACHO	X		6 Años		X			POSITIVO				
39	HEMBRA		X	2 Años		X			POSITIVO	POSITIVO			
40	HEMBRA		X	2 Años		X			POSITIVO	POSITIVO			
41	HEMBRA		X	5 Mes	X			POSITIVO	POSITIVO			POSITIVO	
42	MACHO	X		1 Año		X			POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO		
43	HEMBRA		X	2 Años		X							
44	HEMBRA		X	7 Años		X		POSITIVO	POSITIVO				
45	MACHO	X		1 Año		X			POSITIVO	POSITIVO			
46	HEMBRA		X	2 Años		X			POSITIVO			POSITIVO	
47	HEMBRA		X	4 Mes	X								
48	MACHO	X		8 Años		X			POSITIVO		POSITIVO		
49	HEMBRA		X	2 Años		X			POSITIVO				POSITIVO
50	HEMBRA		X	1 Año		X							
51	MACHO	X		7 Años		X		POSITIVO	POSITIVO				
52	HEMBRA		X	2 Años		X		POSITIVO	POSITIVO				
53	HEMBRA		X	2 Años		X		POSITIVO	POSITIVO				
54	MACHO	X		2 Años		X		POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO			
55	HEMBRA		X	2 Años		X		POSITIVO	POSITIVO		POSITIVO	POSITIVO	
56	MACHO	X		6 Años		X		POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO			
57	HEMBRA		X	2 Años		X			POSITIVO	POSITIVO			
58	MACHO	X		2 Años		X			POSITIVO				
59	HEMBRA		X	3 Años		X		POSITIVO	POSITIVO		POSITIVO		
60	HEMBRA		X	1 Año		X							

61	MACHO	X		2 Años		X							
62	HEMBRA		X	3 Años		X			POSITIVO				
63	MACHO	X		1 Año		X							
64	HEMBRA		X	3 Años		X			POSITIVO				
65	MACHO	X		2 Años		X			POSITIVO	POSITIVO			
66	MACHO	X		1 Año		X		POSITIVO	POSITIVO			POSITIVO	
67	HEMBRA		X	2 Años		X		POSITIVO	POSITIVO				
68	MACHO	X		2 Años		X		POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO			
69	HEMBRA		X	1 Año		X			POSITIVO				
70	HEMBRA		X	3 Años		X							
71	MACHO	X		3 Años		X		POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO			
72	HEMBRA		X	2 Años		X			POSITIVO		POSITIVO		
73	HEMBRA		X	1 Año		X		POSITIVO	POSITIVO				
74	MACHO	X		1 Año		X							
75	MACHO	X		2 Años		X							
76	HEMBRA		X	6 Años			X		POSITIVO				
77	HEMBRA		X	2 Años		X			POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO		
78	HEMBRA		X	3 Mes	X								
79	HEMBRA		X	5 Años			X		POSITIVO				
80	MACHO	X		2 Años		X			POSITIVO	POSITIVO		POSITIVO	
81	HEMBRA		X	1 Año		X							
82	HEMBRA		X	7 Años			X		POSITIVO		POSITIVO		
83	MACHO	X		2 Años		X			POSITIVO				
84	HEMBRA		X	3 Años		X			POSITIVO	POSITIVO			
85	HEMBRA		X	8 Mes	X			POSITIVO	POSITIVO				
86	MACHO	X		6 Años			X	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO			
87	HEMBRA		X	2 Años		X							
88	HEMBRA		X	2 Años		X							
89	MACHO	X		1 Año		X							
90	HEMBRA		X	4 Años			X		POSITIVO				
91	HEMBRA		X	2 Años		X		POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO			
92	HEMBRA		X	1 Año		X			POSITIVO				
93	HEMBRA		X	12 Años			X		POSITIVO		POSITIVO		
94	HEMBRA		X	4 Años			X		POSITIVO				
95	HEMBRA		X	8 Años			X		POSITIVO				
96	HEMBRA		X	2 Años		X							
97	HEMBRA		X	7 Años			X		POSITIVO				
98	HEMBRA		X	2 Años		X			POSITIVO		POSITIVO		
99	MACHO	X		5 Años			X		POSITIVO				
100	HEMBRA		X	1 Año		X		POSITIVO	POSITIVO				
101	MACHO	X		3 Años		X			POSITIVO				
102	HEMBRA		X	2 Años		X			POSITIVO				
103	HEMBRA		X	8 Años			X	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO		
104	HEMBRA		X	6 Mes	X			POSITIVO	POSITIVO				
105	MACHO	X		3 Años		X			POSITIVO				
106	HEMBRA		X	1 Año		X			POSITIVO			POSITIVO	
107	HEMBRA		X	2 Años		X							
108	HEMBRA		X	7 Años			X	POSITIVO	POSITIVO		POSITIVO		
109	HEMBRA		X	2 Años		X			POSITIVO				
110	HEMBRA		X	2 Años		X			POSITIVO				
111	HEMBRA		X	1 Año		X		POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO			
112	MACHO	X		5 Años			X		POSITIVO				
113	HEMBRA		X	3 Años		X							
114	MACHO	X		2 Años		X							
115	HEMBRA		X	6 Años			X		POSITIVO				
116	MACHO	X		2 Años		X			POSITIVO				
117	HEMBRA		X	1 Año		X		POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO		
118	MACHO	X		4 Años			X		POSITIVO				
119	HEMBRA		X	2 Años		X							
120	MACHO	X		1 Año		X		POSITIVO	POSITIVO				

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

ANEXO A: RECOLECCIÓN DE MUESTRAS EN LA PARROQUIA TOTORAS.



Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.

**ANEXO B: PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EXAMEN COPROPARASITARIO Y
MÉTODO DE FLOTACIÓN DE WILLIS**



Pesamos 165,50 g de sal



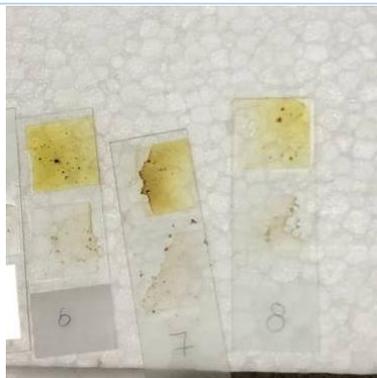
Lo diluimos en 500 mL



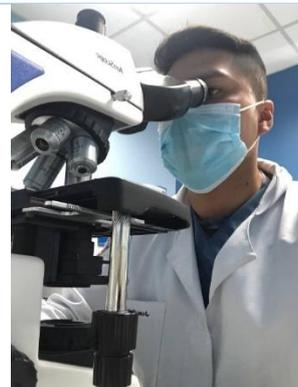
Filtramos la solución que se encuentra
con las muestras



Colocamos cubre objetos en cada tubo
para que los parásitos suban por
densidad

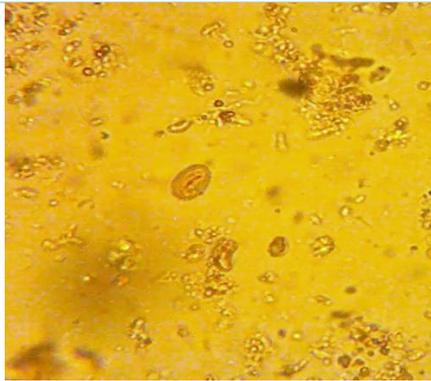


Colocación en placas y numeración



Oservación al microscopio

ANEXO C: FORMAS PARASITARIAS ENCONTRADAS



Giardia felis
Lente: 40X



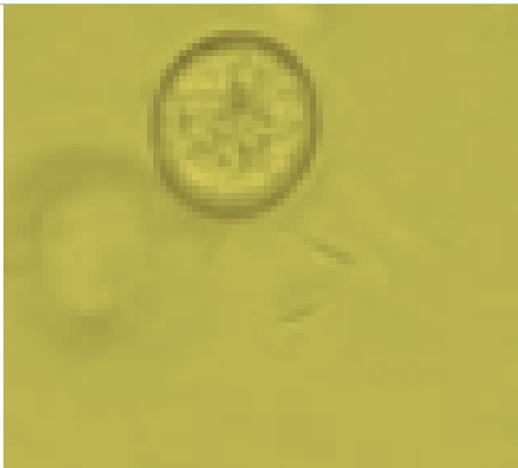
Isospora felis
Lente: 40X



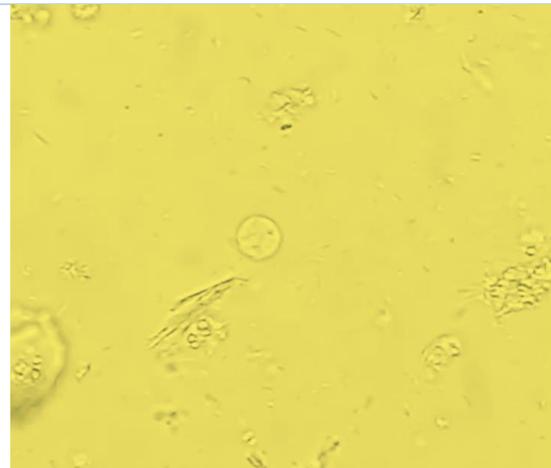
Ancylostoma spp
Lente: 40X



Ancylostoma spp
Lente: 40X



Toxoplasma gondii
Lente: 40X



Entamoeba histolytica
Lente: 40X

ANEXO D: PCR A LA MUESTRA DE HECES



Pipetas para uso de los reactivos para PCR



Calibración del Termociclador Applied Biosystems™ Sistema de PCR ProFlex™, 3 x 32 pocillos



Corrido de las muestras en el Termociclador



Resultado arrojado por el Termociclador

Realizado por: Arias Rodríguez, Jonathan, 2022.