



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

Identificación Molecular del ADN en *Toxocara canis* en caninos en Salcedo

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Médicos Veterinarios y Zootecnistas

Autores:

Antamba Yépez Marco Andrés

Milán Chariguaman Mayra Jessenia

Tutora:

Toro Molina Blanca Mercedes Dra. Mg

LATACUNGA- ECUADOR

Agosto 2021

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Marco Andrés Antamba Yépez, con cédula de ciudadanía No. 1003735147; y, Mayra Jessenia Milán Chariguaman, con cédula de ciudadanía No. 1726379173; declaramos ser autores del presente proyecto de investigación: “Identificación Molecular del ADN en *Toxocara canis* en caninos en Salcedo”, siendo la Doctora Mg. Blanca Mercedes Toro Molina, Tutora del presente trabajo; y, eximimos expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

Latacunga, 14 de agosto del 2021

Marco Andrés Antamba Yépez
Estudiante
CC: 1003735147

Mayra Jessenia Milán Chariguaman
Estudiante
CC: 1726379173

Dra. Mg. Blanca Mercedes Toro Molina
Docente Tutora
CC: 0501720999

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **Antamba Yépez Marco Andrés**, identificado con cédula de ciudadanía **1003735147** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Ingeniero Ph.D. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector Encargado, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

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

Historial Académico

Inicio de la carrera: abril 2016 - agosto 2016

Finalización de la carrera: abril – agosto 2021

Aprobación en Consejo Directivo. - 20 de mayo del 2021

Tutor: Dra. Mg. Blanca Mercedes Toro Molina

Tema: “Identificación Molecular del ADN en Toxocara canis en caninos en Salcedo”

CLÁUSULA SEGUNDA. - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.

- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

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

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 14 días del mes de agosto del 2021.

Marco Andrés Antamba Yépez
EL CEDENTE

Ing. Ph.D. Cristian Tinajero Jiménez
LA CESIONARIA

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **Milán Chariguaman Mayra Jessenia**, identificada con cédula de ciudadanía **1726379173** de estado civil casada, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, el Ingeniero Ph.D. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector Encargado y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

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

Historial Académico

Inicio de la carrera: Abril 2016 - Agosto 2016

Finalización de la carrera: Abril - Agosto 2021

Aprobación en Consejo Directivo: 20 de mayo del 2021

Tutor: Dra. Mg. Blanca Mercedes Toro Molina

Tema: “Identificación Molecular del ADN en Toxocara canis en caninos en Salcedo”

CLÁUSULA SEGUNDA. - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **LA CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **LA CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- f) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- g) La publicación del trabajo de grado.

- h) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- i) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- j) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA CEDENTE** podrá utilizarla.

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

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 14 días del mes de agosto del 2021.

Mayra Jessenia Milán Chariguaman
LA CEDENTE

Ing. Ph.D. Cristian Tinajero Jiménez
LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL ADN EN TOXOCARA CANIS EN CANINOS EN SALCEDO”, de Antamba Yépez Marco Andrés y Milán Chariguaman Mayra Jessenia de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también han incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 14 de agosto del 2021

Dra. Mg. Blanca Mercedes Toro Molina

DOCENTE TUTORA

CC: 0501720999

AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, los postulantes: Antamba Yépez Marco Andrés y Milán Chariguaman Mayra Jessenia, con el título de Proyecto de Investigación: **“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL ADN EN TOXOCARA CANIS EN CANINOS EN SALCEDO”**, han considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

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

Latacunga, 14 de agosto del 2021

Lector 1 (Presidente)

Ph.D. Edilberto Chacón Marcheco

CC: 1756985691

Lector 2

Dr. M.Sc. Xavier Quishpe Mendoza

CC: 0501880132

Lector 3

Ing. Mg. Lucia Monserrath Silva Déley

CC: 0602933673

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento, a los docentes de la carrera de Medicina Veterinaria, en especial a la Dra. Mercedes Toro quien nos guio con mucha paciencia y dedicación en este proyecto, por las enseñanzas y consejos, a mi familia, por el apoyo incondicional, por haberme permitido formarme en esta destacada Universidad.

Marco Andrés Antamba Yépez

Utilizo este espacio para agradecer a Dios por haber sido mi fortaleza y mi guía en todo momento, agradezco a mi padre Segundo por haberme impulsado a perseguir y conseguir este anhelado sueño, también a mi madre Piedad y a mi hijo Eithan por ser mi fuente de inspiración y apoyo. De igual manera extendiendo mis agradecimientos a todas las distinguidas autoridades y docentes de esta noble institución educativa “UTC” y en especial a la Dra. MSc. Blanca Mercedes Toro Molina y al DMV. Edilberto Chacón Marcheco PhD por su valiosa colaboración en este proyecto.

Mayra Jessenia Milán Chariguaman

DEDICATORIAS

Este trabajo dedico a mis padres quien con mucho sacrificio y trabajo día a día con su bendición y apoyo pude cumplir mi sueño de estudiar esta hermosa carrera de Medicina Veterinaria.

Marco Andrés Antamba Yépez

El presente trabajo lo dedico principalmente a Dios, por ser mi fortaleza y guiar mi camino. A mis padres Segundo y Piedad quienes con su amor, sacrificio y esfuerzo durante todos estos años me han ayudado para poder alcanzar una meta más, por inculcarme la valentía, la gratitud, y de no temer en las adversidades porque nuestro Dios siempre nos sustentara. A mi hijo que es la luz en mi vida y el motor para seguir luchando. A mi esposo y a todos mis familiares que siempre estuvieron ahí apoyándome, el camino no ha sido sencillo, pero la meta se ha cumplido.

Mayra Jessenia Milán Chariguaman

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “Identificación Molecular del ADN en *Toxocara canis* en caninos en Salcedo”.

AUTORES: Antamba Yépez Marco Andrés

Milán Chariguaman Mayra Jessenia

RESUMEN

La presente investigación se efectuó en la Provincia de Cotopaxi, en los barrios del Cantón Salcedo, el objetivo de estudio fue realizar la secuenciación de la región del espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosómico (ADNr) del *Toxocara canis*. Se recolectaron 106 deposiciones de caninos, entre adultos y cachorros de ambos sexos. La población tiene un rango de edad entre un mes a nueve años. Se tomaron de 3 a 5 gramos de heces, las muestras fueron realizadas en el laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi en el Laboratorio de Biología, bajo la técnica de flotación de Sheather. Resultaron positivos 16 caninos, mostrando la presencia de huevos de *Toxocara canis*, (16.96 %) de prevalencia según las muestras tomadas y analizadas mediante microscopio. Para la obtención del parásito se desparasitó vía oral a la población en estudio, tomando en cuenta las condiciones nutricionales y condiciones que habita la mascota, se recolectó de 24 caninos el parásito adulto, indica un 25.44 % la presencia del nematodo, basado en la morfología macroscópica. En 8 caninos de un mes a seis meses se realizó la desparasitación sin exámenes coprológicos donde hubo expulsión de parásitos. Las 20 muestras aisladas de caninos se identificaron como *Toxocara canis* cuando se compararon usando el BLAST con secuencias previamente depositadas en el GenBank con un 100% de identidad para *T. canis*. Para la Secuenciación del parásito macho adulto se procedió a diseccionar siguiendo el proceso de preservación, la integridad de la muestra biológica, que garantiza la amplificación, purificación, secuenciación del ADN, evitando que se diseccionen órganos reproductores y causen interferencia al momento de realizar la amplificación de fragmentos del ADN. Los exámenes realizados indican la alta confiabilidad en el diagnóstico de herramientas moleculares.

Palabras Clave: ADN, Amplificación de fragmentos, Nematodos, Primer

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: “Molecular identification of DNA in *Toxocara canis* in dogs in Salcedo”.

AUTHORS: Antamba Yépez Marco Andrés
 Milán Chariguaman Mayra Jessenia

ABSTRACT

The present investigation was carried out in Cotopaxi Province, in Salcedo Canton's neighborhoods, the objective of the study was to sequence the internal transcribed spacer region (ITS-2) of the ribosomal DNA (rDNA) of *Toxocara canis*. A total of 106 canine stool samples were collected from adults and puppies of both sexes. The population ranged in age from one month until nine years. The samples were taken from 3 to 5 grams of feces, the samples were taken in the laboratory of the Technical University of Cotopaxi in the Biology Laboratory, under the Sheather flotation technique. Sixteen canines were positive, showing the presence of *Toxocara canis* eggs (16.96 %) of prevalence according to the samples taken and analyzed by microscopy. To obtain the parasite, the population under study was orally dewormed, taking into account the nutritional and living conditions of the pet. The adult parasite was collected from 24 canines, indicating a 25.44 % presence of the nematode, based on the macroscopic morphology. In 8 canines from one month to six months old, deworming was performed without coprological examinations where parasites were expelled. The 20 samples isolated from canines were identified as *Toxocara canis* when compared using BLAST with sequences previously deposited in GenBank with 100% identity for *T. canis*. For the sequencing of the adult male parasite, it was proceeded to dissect following the process of preservation, the integrity of the biological sample, which guarantees the amplification, purification and sequencing of DNA, avoiding the dissection of reproductive organs and causing interference at the time of amplification of DNA fragments. The tests performed indicate high reliability in the diagnosis of molecular tools.

Keywords: DNA, fragment amplification, Nematodes, Primer

INDICE DE PRELIMINARES

DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	iii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	v
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vii
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DEDICATORIAS.....	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO	3
3.1. Beneficiarios directos	3
3.2. Beneficiarios indirectos	3
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
5. OBJETIVOS.....	4
5.1. Objetivos General	4
5.2. Objetivos Específicos	4
6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA.....	5
6.1. Toxocara.....	5
6.2. Morfología.....	5
6.3. Ciclo Biológico	7
6.4. Clasificación Taxonómica	9
6.5. Distribución	9
6.6. Síntomas y signos	9
6.7. Signos clínicos	9
6.8. Lesiones	10
6.9. Patogenia	10
6.10. Tratamiento.....	10
6.11. TÉCNICAS DE LABORATORIO	11
6.11.1 TÉCNICA COPROLÓGICA.....	11
6.11.2. TÉCNICA DE CONCENTRACIÓN DE HECES.....	11

6.11.2.1. Técnica de Ritchie	11
6.11.2.2. Método de Allen and Ridley.....	11
6.11.2.3. Técnica de Kato – Katz.....	11
6.11.3 TÉCNICA DE CONCENTRACIÓN DE HECES POR FLOTACIÓN	12
6.11.3.1. Método de Willis	12
6.11.4. MÉTODOS DE FIJACIÓN DE HECES	12
6.11.4.1. Método Mif	12
6.11.5. TÉCNICAS CUANTITATIVAS	12
6.12. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	12
6.12.1. MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR.....	12
6.12.2. PCR.....	13
6.12.3. TAQ POLIMERASA	13
6.12.4. CEBADOR PARA PCR.....	14
6.12.5. PROCEDIMIENTO DEL PCR.....	14
6.12.6. TIPOS DE PRUEBAS PCR	15
6.12.7. PRIMER.....	16
6.12.8. DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES (PRIMERS).....	16
6.12.9. REPLICACIÓN DEL ADN ENZIMAS	16
7. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS ..	17
8. METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	17
8.1. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL PROYECTO	17
8.2. MUESTREO Y EXTRACCIÓN DE ADN.....	17
8.3. EXAMEN COPROLÓGICO	17
8.3.1. Procedimiento.....	17
8.4. DESPARASITACIÓN	18
8.5. RECOLECCIÓN DEL PARASITO ADULTO TOXOCARA CANIS.....	18
8.6. DISECCIÓN DEL TOXOCARA CANIS ADULTO	19
8.6.1 procedimiento	19
8.7. MATERIALES	19
8.7.1. Materiales y equipo de campo	19
8.7.2. Materiales de oficina	20
8.7.3. Material Biológico	20
8.8. EXTRACCIÓN DE ADN.....	21
8.8.1. procedimiento	21
8.9. Cuantificación y dilución de muestras de ADN	22

8.10. AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS	22
8.11. PURIFICACIÓN DE LA PCR Y REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.....	23
8.12. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS	24
8.13. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	24
8.13.1. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	24
9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	24
9.1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	26
9.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	27
10. IMPACTOS.....	29
11. CONCLUSIONES.....	30
12. RECOMENDACIONES.....	30
13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	31
14. BIBLIOGRAFÍA IMÁGENES.....	39
15. ANEXOS.....	40

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 Diluciones muestras de ADN de *Toxocara canis* 22

Tabla N° 2 Componentes para la PCR de amplificación del gen nad1 23

INDICE DE IMÁGENES

Figura N° 1 Macho y hembra adulto <i>Toxocara canis</i>	6
Figura N° 2 Primer plano extremo anterior del <i>Toxocara canis</i> que muestra los 3 labios	7
Figura N° 3 Ciclo biológico <i>Toxocara canis</i>	7
Figura N° 4 Huevos de <i>Toxocara canis</i>	25
Figura N° 5 BLAST (porcentaje de identidad) entre secuencias de ITS-2 del ADNr (383 pb) de los aislados <i>Toxocaras canis</i> y otras secuencias recuperadas del GenBank.	26
Figura N° 6 Alineamiento entre secuencias de ITS-2 del ADNr (383 pb) de los aislados <i>Toxocaras canis</i> y otras secuencias recuperadas del GenBank.....	27
Figura N° 7 Árbol de relaciones filogenéticas según el algoritmo Neighbor-Joining, basado en las secuencias de ITS-2 del ADNr (383 pb) de los aislados <i>Toxocaras canis</i> y otras secuencias recuperadas del GenBank. Los valores de Bootstrap para 1000 réplicas se muestran para cada agrupamiento.	28

INDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1 Hoja de vida estudiante 1	40
Anexo N° 2 Hoja de vida del estudiante 2.....	41
Anexo N° 3 Hoja de vida Tutora	42
Anexo N° 4 Recolección de Muestras.....	43
Anexo N° 5 Desparasitación en diferentes barrios de Salcedo	50
Anexo N° 6 Aval de traducción Ingles.....	55
Anexo N° 7 Resultado URKUN	56

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

“Identificación Molecular del ADN en *Toxocara canis* en caninos en el cantón Salcedo”

Fecha de Inicio: abril 2021

Fecha de Finalización: agosto 2021

Lugar de Ejecución:

- ✓ Provincia: Cotopaxi
- ✓ Cantón: Salcedo
- ✓ Barrios: San Francisco, San Antonio, San Marcos, El calvario, ciudadela del maestro, Rumipamba de Navas, La Tebaida, Mulluquindil.

Facultad que auspicia: Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia: Medicina Veterinaria

Proyecto de investigación vinculado: Determinación de enfermedades infecciosas y parasitarias de animales domésticos de la zona 3

Equipo de trabajo:

Marco Andrés Antamba Yépez (Anexo 1)

Mayra Jessenia Milán Chariguaman (Anexo 2)

Dra. MSc. Blanca Mercedes Toro Molina (Anexo 3)

Área de Conocimiento: 64 Veterinaria

Línea de Investigación: Salud animal

Sub líneas de investigación de la carrera: Microbiología, Parasitología, Inmunología y Sanidad Animal

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Los endoparásitos son aquéllos que habitan en el aparato digestivo del huésped, en este caso, de las mascotas, se pueden dividir en tres categorías: nemátodos, gusanos y protozoos, también encontramos Áscaris, Taenia, siendo el grupo de Áscaris, el género de *Toxocara canis*, esta es una especie de nematodo que afecta a caninos en todo el mundo, es una de las enfermedades endémicas siendo una de las parasitosis más comunes que afecta al animal.

Los nematodos constituyen un importante problema de salud pública, generan potenciales riesgos de enfermedades infecciosas o zoonóticas, como las parasitosis.

Los humanos son accidentales huéspedes de *Toxocara spp.* y se infectan a través de ingestión de huevos infecciosos del medio ambiente o de artículos contaminados con heces de animales infectados, los síntomas clínicos incluyen larva migrans visceral, ocular larva migrans, meningoencefalitis eosinofílica, toxocariasis encubierta y toxocariasis neurológica (1).

El *Toxocara canis* afectan a los caninos, siendo los más vulnerables los cachorros desde las 2 primeras semanas de su nacimiento, debido a su inmadurez inmunológica, la población canina es la especie que más habita en esta ciudad. Estos parásitos gastrointestinales son agentes patógenos con una alta tasa de mortalidad y morbilidad cuya infestación acarrea consigo diversos síntomas vómito, diarrea, anemia, anorexia hasta el decaimiento.

El diagnóstico molecular es un método que se encuentra en continuo desarrollo, permitiendo la detección e identificación con precisión de los nemátodos ascaridoides (2).

Por ello la identificación del nemátodo ascarídidos *Toxocara canis* de aislamientos en caninos del cantón Salcedo mediante la secuenciación de la región del espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosómico (ADNr), constituye el objetivo del presente estudio.

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

3.1. Beneficiarios directos

- Propietarios de las mascotas.
- Los investigadores principales del proyecto, requisito previo a la obtención del título de Médico Veterinario.

3.2. Beneficiarios indirectos

- Sectores aledaños
- Laboratorios que apliquen técnicas específicas para la identificación de parásitos.

4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La infección parasitaria es la enfermedad más común en el mundo, no solo afecta seriamente la salud de las mascotas, sino que también afecta seriamente la salud de los propietarios de estos animales, convirtiéndose en un grave problema de salud pública. Los parásitos intestinales se consideran un problema de salud pública mundial. Además de afectar la salud humana, también tienen repercusiones sociales, económicas.

La infección por *Toxocara canis* en perros tiene una distribución a nivel global que varían de 0 a 99,4%, con altas tasas de prevalencia en perros y en humanos en Latinoamérica (2).

La detección de los parásitos nemátodos como *Toxocara canis*, *Toxocara cati* y *Toxocara leonina* se realiza fundamentalmente a través de análisis microscópico y pruebas serológicas, sin embargo ambos métodos resultan insuficientes para diferenciar especies estrechamente relacionadas como lo son *T. canis* y *T. cati* (3). Por ello se han implementado los métodos moleculares para una identificación precisa, como es el caso del segundo espaciador transcrito interno (ITS-2) utilizado para identificar nemátodos en perros, zorros y gatos (4).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivos General

Determinar la presencia del nemátodo ascarídidos *Toxocara canis* de aislamientos en caninos del cantón Salcedo mediante la secuenciación de la región del espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosómico (ADNr).

5.2. Objetivos Específicos

- ✓ Establecer la presencia del *Toxocara canis* en muestras fecales de caninos del cantón Salcedo mediante exámenes coproparasitarios.
- ✓ Identificar al *Toxocara canis* mediante la secuenciación del gen ITS-2 del ADN ribosómico, de aislamientos en caninos del cantón Salcedo.

6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA

6.1. Toxocara

Son nematodos de tono blanquecino, alargado, con una cutícula que posee delgadas estriaciones diagonales. Posee tres labios y lateralmente dos alas cervicales (5). La parte trasera de la hembra tiene un extremo romo y en forma de dedo en los machos con dos espículas desarrolladas, son pequeñas no segmentadas, recubiertos por una cutícula gruesa compuesta por tres capas, consta de un tubo digestivo provisto de estructuras que le permiten anclarse y atravesar las paredes del intestino del hospedador (6).

En los animales, la infección inicia al ingerir huevos de este parásito o alimentarse de hospedadores de transporte.

6.2. Morfología

Los nematodos Ascáridos son gusanos dioicos, cilíndricos, nacarados y no segmentados; presentan cutícula, hipodermis y células musculares, tienen cavidad corporal interior (7). Constan de aparato digestivo (boca trilabiada, intestino y ano), así como sistemas excretor, nervioso y reproductor. La hembra, mide de 6.5 a 15 cm de longitud y 2.5 a 3 mm de diámetro (7).

El macho mide de 4 a 6 cm de longitud y 2.5 mm de diámetro; se caracteriza porque su extremo caudal termina en curva, en donde se localiza la cloaca con dos series de 20 a 30 papilas preanales y cinco papilas postanales a cada lado. Los huevos miden aproximadamente 90 por 75 micras (8).

Sistema Nervioso: Se componen de un anillo circumesofágico es decir una conexión de tritocerebro al ganglio subesofágico, cordones nerviosos longitudinales dorsales, ventrales y laterales (9).

Cavidad Bucal: En el orificio bucal tiene una cápsula bucal y en su fondo posee ganchos, dientes u otras complicadas modificaciones cuticulares.

Esófago: Es un potente órgano muscular y de succión, la función es segregar enzimas a través de tres glándulas en sus músculos. Una válvula esofágico-intestinal separa la

faringe del intestino. La función es impedir el regreso del alimento hacia la cavidad bucal (9).

Intestino: Es un tubo cilíndrico con pared no muscular, formado por una capa, el nematodo absorbe los nutrientes del hospedador, gracias a los enterocitos que al igual que el sistema digestivo de los animales vertebrados ayuda las micro vellosidades a absorber sustancias nutritivas (9).

Recto: Es una invaginación cuticular, cubierto por una cutícula que desembocan en el esfínter, en las hembras y en los machos da lugar a la cloaca, por el ano a través de ella salen los espermatozoides y en sus paredes se originan los órganos copuladores (9).

Sistema reproductor: Las partes del órgano reproductor del macho son testículos, vesícula seminal, vaso deferente y conducto eyaculador, En las hembras está constituido por el ovario, oviducto, receptáculo seminal, útero y vagina, la abertura vaginal está situada en la línea media ventral del nematodo (10).

Figura N° 1 Macho y hembra adulto *Toxocara canis*



Fuente: (1).

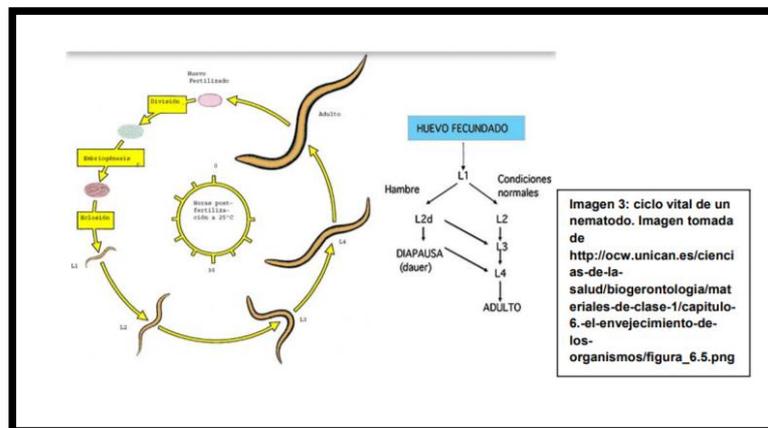
Figura N° 2 Primer plano extremo anterior del *Toxocara canis* que muestra los 3 labios



Fuente: (2).

6.3. Ciclo Biológico

Figura N° 3 Ciclo biológico *Toxocara canis*



Fuente: (3).

La propagación entre caninos es directa, se infectan por algunas vías: ingestión de huevos con larvas que infectan al animal, dispersos en el suelo, por alimentarse de hospederos como roedores es decir animales paratenicos, por vía placentaria o mamaria, los cachorros se enferman al ingerir huevos de *Toxocara canis* (11).

Las hembras dejan huevos encapsulados sin segmentar en el intestino delgado, estos huevos pasan a través de las heces, son fuertes por su cubierta, pueden perdurar varias semanas en el medio ambiente (12).

Las larvas del *Toxocara* Luego de desarrollarse en el intestino se dirigen a invadir órganos vitales del canino como el pulmón, útero, glándula mamaria, músculos, hígado, riñones. A la sexta semana las larvas L-II infesta el sistema respiratorio inferior, bronquios, bronquiolos se distribuyen por migración somática (13).

La larva II (L-II) en esta fase infecta, se encuentra dentro del huevo después de la primera muda, hasta que un hospedador se alimente de materia contaminada con el parásito, luego de ingerir se libera dentro del organismo del animal, intervienen varios hospedadores como ratas, aves, las larvas se adhieren a los tejidos, se encapsulan y permanecen latentes (14).

Después de la eclosión las larvas se dirigen a las paredes del intestino delgado, atraviesan la mucosa del intestino se dirigen hacia la circulación sanguínea, iniciando una migración intraorgánica de tipo ascaroides, en el lapso de 24 a 48 horas, llegan al hígado por la vía porta, a través de la circulación llegan a pulmones, pasan por venas hepáticas, cava posterior (15).

La larva L-II infectan los pulmones, migran por las vías traqueal y digestiva, se manifiestan a las 6 semanas de vida del cachorro. Inicia atravesando los alvéolos y bajan por el árbol bronquial para ser ingeridos por secreciones traqueo bronquiales, luego pasa al aparato digestivo, sigue desarrollándose en el estómago para finalizar en el intestino, cambiando a larva (L-V), alcanza la madurez de 3 a 5 semanas después de la infección. En hembras gestantes de 40-42 días de preñez, las larvas somáticas que se mantenían en descanso se activan y viajan hacia placenta y glándula mamaria (13).

El mecanismo de infección del *Toxocara canis* en los perros se produce a través de transplacentario o transmamario. La tasa de contagio por vía placentaria de los ascáridos intestinales es del 95.5% y el 98.5%. La reactivación de las larvas, depende del estado nutricional y hormonal del cachorro, las larvas migran al hígado del embrión atravesando la placenta (16).

Después del nacimiento del cachorro las larvas (L-III) siguen madurando después de producir una muda poco antes del parto.

La maduración sexual alcanza a las 4 semanas en el intestino del cachorro, No hace falta que la perra se infecte nuevamente para que las camadas a través del calostro pasan las larvas de *Toxocara canis*, infectando a los neonatos (17).

6.4. Clasificación Taxonómica:

- **Clase:** *Secernentea*
- **Sub clase:** *Rhabditia*
- **Orden:** *Ascaridida*
- **Suborden:** *Ascaridina*
- **Superfamilia:** *Ascaridoidea*
- **Familia:** *Ascarididae*
- **Género:** *Toxocara*
- **Especie:** *Canis*

6.5. Distribución

Los ascáridos de la especie *Toxocara canis* de los carnívoros se encuentran entre los endoparásitos más frecuentes de estos hospedadores pueden encontrarse en la tierra en todo el mundo.

En las muestras recogidas en varios países y regiones aparecen huevos de nemátodos en una taza de 2% – 88%, Los factores que ayudan a la transmisión de la especie *Toxocara* es la humedad, ambiente trópico, y temperaturas altas (18).

6.6. Síntomas y signos

Las infecciones moderadas no tienen manifestaciones clínicas evidentes en la fase de migración intraorganica. En las infestaciones intensas pueden manifestarse por tos, taquipnea, flujo nasal y signos nerviosos como intranquilidad, que podría ser a una acción irritativa de su forma adulta en el intestino (19).

6.7. Signos clínicos

Decaimiento, dolor abdominal, diarrea, vomito, fiebre, abdomen colgante, retardo en el crecimiento y pelo hisuto, pueden cerrar la luz del intestino causando la muerte del animal por obstrucción, perforación intestinal o intususcepción (20). Se producen granulomas eosinofilicos cuando las larvas van hacia hígado y pulmones. En esta etapa en el vómitos o diarrea presenta la expulsión de áscaris. En etapa crónica existe una desnutrición progresiva con estado de deshidratación a causa de diarreas intermitentes, falta de crecimiento a causa de anemia (21).

Se manifiesta como una enfermedad del sistema digestivo, como heces blandas, a veces diarrea y, a menudo, se acompaña de grandes cantidades de moco y sangre. El

abdomen es muy ancho y tiene una respuesta dolorosa a la palpación, no es infrecuente que los nematodos se eliminen espontáneamente a través del vómito o las heces. Las enfermedades comunes en los cachorros pueden ser causadas por la fuerte invasión de *Toxocara canis* (22).

6.8. Lesiones

Dañan varios órganos mientras migran por el organismo como hígado, pulmón, riñón, intestino, causando inflamaciones, hemorragias de carácter granulomatoso eosinofílico.

Los riñones presentan petequias blanquecinas irregulares en la superficie de un milímetro en la corteza, manifiesta lesiones parecidas en bazo, diafragma, y miocardio. La luz del intestino con abundante moco a causa de la infestación de los *Toxocara* enrollados (16).

6.9. Patogenia

Proviene de las migraciones larvarias y de su localización en diferentes tejidos y órganos ejerce una acción traumática acompañada de la mecánica obstructiva de su paso por la pared intestinal, hígado, pulmones, con ruptura de capilares y alveolos (23). Los ascaridos juveniles y adultos en su fase intestinal ocasionan acciones mecánicas, irritativas y obstructivas que pueden interferir con el tránsito y la digestión normal de los alimentos (24).

6.10. Tratamiento

Existen varios productos que nos pueden ayudar a eliminar los parásitos intestinales del hospedador para poder realizar esta investigación, el desparasitante que se utilizara es: Pamoato de pirantel 75 mg, Praziquantel 25 mg, Aceite de hígado de bacalao 40 mg, vehículo saborizado y excipientes (25).

Administrar en perros y gatos: 15 mg x kg de pamoato de pirantel y 5 mg x kg de peso de praziquantel, equivalentes a 1 ml x cada 5 kg de peso. Repetir la dosis a las 2 semanas y luego cada 3 meses.

Los antihelmínticos son efectivos para los gusanos de los intestinos, pero las larvas hipobióticas de los tejidos son resistentes al tratamiento. En los perros, los parásitos que renuevan su migración durante la preñez son susceptibles a varios medicamentos (11).

El desparasitante Génesis One contiene Abamectina 0.2 mg/kg, prazicuantel 5 mg/kg, vía oral. Dosis práctica: 1 tableta por cada 10 kilogramos de peso (26).

6.11. TÉCNICAS DE LABORATORIO

6.11.1 TÉCNICA COPROLÓGICA

Los exámenes coprológicos buscan determinar la presencia o ausencia de endoparásitos en las heces del canino, como huevos, larvas, quistes, ooquistes (27).

El análisis de heces es una serie de pruebas que se realizan, para ayudar a diagnosticar ciertas afecciones que afectan el tubo digestivo. Estas afecciones pueden incluir infección como de parásitos, bacterias, se debe hacer de manera rápida para que los resultados sean los esperados, mantener en una temperatura adecuada hasta la llegada al laboratorio (28).

6.11.2. TÉCNICA DE CONCENTRACIÓN DE HECES

6.11.2.1. Técnica de Ritchie

Esta técnica ayuda a concentrar huevos y quistes a través de la sedimentación con ayuda de la centrifugadora, se coloca en el tubo formol y éter esto para separar y observar de mejor manera el contenido de la materia fecal. Es más útil para la concentración de huevos de helmintos, es ideal para observar trofozoítos (29).

6.11.2.2. Método de Allen and Ridley

Esta técnica tiene los mismos pasos que la técnica de Ritchie, se debe diluir las heces, se añade 3ml de éter etílico se tapa el tubo, se agita, se pasa a la centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos, para observar al microscopio se puede diluir el sedimento con dos gotas de suero fisiológico (30).

6.11.2.3. Técnica de Kato – Katz

Por medio de esta técnica se puede estudiar helmintos, tiene un límite 100 huevos/g, por debajo del cual las infecciones no se pueden detectar de forma fiable, aclara el sedimento espeso con glicerina. Los materiales que se necesita en esta técnica son: La solución de Kato, que está constituida de: Glicerina (100 ml), Agua destilada (100 ml), Verde malaquita al 3% (1 ml), Papel celofán en trocitos de aproximadamente 2x4 cm (31).

6.11.3 TÉCNICA DE CONCENTRACIÓN DE HECES POR FLOTACIÓN

6.11.3.1. Método de Willis

El método de concentración por flotaón es recomendado para estudiar protozoos y helmintos.

6.11.4. MÉTODOS DE FIJACIÓN DE HECES

6.11.4.1. Método Mif

Facilita la observación de formas vegetativas de protozoos a través del microscopio, se utiliza la solución de Mertiolato/Formol y la solución de Yodo (32).

6.11.5. TÉCNICAS CUANTITATIVAS

La técnica cuantitativa es utilizada en veterinaria para observar la presencia de huevos, quistes de nematodos, cestodos, helmintos, a través del método de flotación. Con la solución sacarosa con densidad entre 1.2 -1.3 gramos/ cm³ se puede observar huevos de menor densidad y luego los más densos, los huevos de los nematodos flotan a una densidad de 1.10 – 1.20 gramos/ cm³ (33).

6.12. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Es un área dinámica en constante desarrollo que ha revolucionado el diagnóstico clínico. La detección y cuantificación específica de material genético en una muestra biológica ha mostrado un significativo impacto en todas las áreas de la salud, sobre todo en las áreas de las enfermedades infecciosas (34).

El desarrollo de nuevas tecnologías, más rápidas y precisas, clave para el equipo clínico en directo beneficio del paciente, en este proceso se usa para identificar una enfermedad por medio del estudio de las moléculas, tales como proteínas, ADN y ARN, de un tejido o líquido corporal (35).

6.12.1. MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR

La técnica de tipificación se divide en Fenotípicas: es el análisis de las características expresadas por el microorganismo y genotípicas aplica para realizar serotipificación,

perfiles de resistencia a los antimicrobianos y Genotípicas: es el análisis de ADN cromosomal y estracromosomal como PCR, VNTR, PFGE (36).

Son útiles en la vigilancia y control de brotes porque nos permiten comprender la clonalidad entre aislamientos, identificar reservorios y determinar la ruta de transmisión (37).

6.12.2. PCR

La Reacción en Cadena de Polimerasa o fotocopiado molecular es una técnica que permite realizar varias copias de una parte determinada del *Toxocara canis* del ADN in vitro, es la prueba de referencia que permite detectar el ADN del parásito, a través de reacciones químicas, la amplificación del ADN nos permite estudiar la molécula del ADN para análisis moleculares y genéticos (38).

La prueba será positiva cuando el análisis se detecte material genético del nematodo. Una vez amplificado, se puede secuenciar, visualizar por electroforesis en gel o clonar en un plásmido, el ADN producido por la RCP nos ayuda a realizar un mapeo del genoma del *Toxocara canis* (39).

Para realizarlas pruebas de PCR se utiliza cebadores de ADN o primer diseñados específicamente para la región de ADN de interés, se somete repetidamente a un ciclo de cambios de temperatura que permiten la producción de muchas copias de la región blanco (40).

6.12.3. TAQ POLIMERASA

La técnica PCR se llama Taq polimerasa, por la bacteria tolerante al calor de la que se aisló (*Thermus aquaticus*). Esta prueba requiere de una enzima ADN polimerasa que produzca nuevas cadenas de ADN mediante el uso de las cadenas existentes como molde. *T. aquaticus* vive en aguas termales y fuentes hidrotermales (41). Su ADN polimerasa es muy termoestable y su mayor actividad se presenta cerca de los 70 °C. La Taq polimerasa es ideal para la PCR gracias a esta estabilidad térmica. Como veremos, la PCR utiliza altas temperaturas repetidamente para desnaturalizar el molde de ADN o separar sus cadenas (42).

6.12.4. CEBADOR PARA PCR

La polimerasa Taq solo puede producir ADN con cebadores, que son secuencias de nucleótidos cortas que forman el punto de partida para la síntesis de ADN. En una reacción de PCR, la región de ADN que será copiada, o amplificada. Los cebadores para PCR son pedazos cortos de ADN de cadena sencilla, generalmente de unos 20 nucleótidos de longitud (40).

Se utilizan dos cebadores en cada reacción de PCR, y estos cebadores están diseñados para ubicarse en el lado del área objetivo (el área a copiar). Es decir, les agregan secuencias para que se unan a la hebra opuesta de la plantilla de ADN solo al final de la región a replicar. El cebador está unido al molde por complementariedad de bases (43).

6.12.5. PROCEDIMIENTO DEL PCR

Para realizar la amplificación las muestras se colocan en el termociclador programado con las condiciones de amplificación establecidas previamente, por lo general se utilizan los siguientes pasos.

Esta etapa consta de tres fases:

- **La desnaturalización** es a 96 °C, la reacción se calienta hasta separar o desnaturalizar las cadenas de ADN, separación de la doble hélice porque los puentes de hidrógeno se rompen. Esto proporciona varios moldes de cadena única para el siguiente paso (44).
- **El Templado** es a 55-65 °C, la reacción se enfría para que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla. La tercera fase es la Extensión a 72°C, la temperatura de la reacción se eleva para que la Taq polimerasa extienda los cebadores y sintetice así nuevas cadenas de ADN.
- En una reacción de PCR típica, este proceso se repite de 25 a 35 veces y suele tardar de 2 a 4 horas, dependiendo de la longitud de la región de ADN que se va

a copiar. Si la respuesta es eficaz (funciona bien), se pueden generar miles de millones de copias a partir de una o varias copias del área objetivo.

- **Extensión:** Esta etapa, también llamada elongación, amplificación o polimerización, consiste en la síntesis de nuevas cadenas de ADN, el proceso utiliza cuatro dNTP como sustratos y comienza desde el extremo 3' del iniciador a través de la acción del ADN polimerasa. En la mayoría de las reacciones, el paso de extensión se realiza a 72°C porque esta es la temperatura a la que la polimerasa Taq (la enzima más utilizada) alcanza su máxima actividad.
- El tiempo de extensión depende de la longitud del fragmento a amplificar, la polimerasa Taq agrega 500 a 1000 nucleótidos por minuto (45).

6.12.6. TIPOS DE PRUEBAS PCR

- **PCR anidada:** Se utiliza dos pares de cebadores, consigue amplificar una región del genoma, se usa para ampliar fragmentos de una región específica del genoma (46).
- **RT-PCR:** Este método convierte el ARN de una muestra en ADN, se utiliza la enzima retrotranscriptasa, se puede utilizar para saber si un gen se está expresando en una muestra biológica. Otra función es genotipar diferentes virus de ARN, como el VIH o SARS (47).
- **PCR cuantitativa:** Esta prueba mide el grado de fragmentos de ADN que se producen, se colocan en tubos de ensayo que se unen únicamente a secuencias específicas del ADN retrotranscrito del virus y emiten fluorescencia, entre más fluorescencia más cantidad de copias del ADN (47).
- **PCR múltiple:** en este tipo de PCR se realizan amplificaciones simultáneas de más de un fragmento de ADN. Para ello, se utilizan varios cebadores diferentes en una misma reacción (48).
- **PCR in situ:** esta PCR se realiza en células o tejidos. Se utiliza para poder detectar secuencias de ADN en el interior de las células que no son detectables mediante otras técnicas (46).

- **PCR digital:** es una de las últimas generaciones en técnicas de amplificación de ADN. Está basada en la separación de cada muestra en múltiples particiones (microgotas), de forma que la reacción de amplificación se produce de forma independiente cada una de ellas (46).

6.12.7. PRIMER

Los "primers" o cebadores son pequeñas piezas de ADN que anillan a secuencias específicas, en este caso se usan dos primers el 27F y el 1525R, que se "pegan" a los extremos opuestos del gen del ARN ribosómico 16S, uno en cada hebra de ADN (49).

Una vez que los "primers" se anillan los ADN polimerasas extiende e ADN desde el extremo 5' hasta el 3' final. Los primers se seleccionan en manera tal que, cuando se forman las dos nuevas copias ellos se superponen ("overlap") en la región de interés. Estos se hibridizan a las cadenas opuestas del blanco, de manera tal que la síntesis llevada a cabo por ADN polimerasa se extiende a través de todo el segmento del ADN blanco situado entre ellos (41).

Son universales, es decir que anillan del gen del ARN ribosómico 16S de cualquier bacteria (excepto quizás las más inusuales). Esto es porque las secuencias a los cuales se "pega" el primer son extremadamente similares entre las especies parasitarias, bacterianas (secuencias altamente conservadas).

6.12.8. DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES (PRIMERS)

Los Primers mal diseñados pueden amplificar otros fragmentos de ADN diferentes a los buscados (amplificación inespecífica). El diseño tiene que ser delicado de los primers para realizar un PCR de acorde a las necesidades del laboratorio (50).

6.12.9. REPLICACIÓN DEL ADN ENZIMAS

Helicasa: La función es fracturar los puentes de hidrogeno entre las bases nitrogenadas del ADN y ARN permite la replicación, pertenece al grupo de enzimas de tipo proteica hidrolítica llamadas proteínas motoras (51).

Ligasa: Son enzimas que ayudan a la formación de moléculas o transformar a partir de las dos moléculas ya existentes, capaz de catalizar, proporciona energía en estas reacciones (52).

Topoisomerasa: Son enzimas isómeras modifican el número de vueltas de una molécula del ácido desoxirribonucleico modificando la topología (53).

7. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS

H1: Se llegó a identificar la cadena molecular del *Toxocara canis*.

H2: No se llegó a identificar la cadena molecular del *Toxocara canis*.

8. METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

8.1. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL PROYECTO

Esta investigación se realizó en la provincia de Cotopaxi, cantón Salcedo, latitud: -1.043602, longitud: -78.590737, en los barrios de esta ciudad con una duración de 100 días.

8.2. MUESTREO Y EXTRACCIÓN DE ADN

Fueron muestreados 106 caninos de diferentes edades y sectores del cantón Salcedo en la Provincia de Cotopaxi. Se obtuvieron entre 2 a 6 parásitos de cada canino, del género *Toxocara canis* según la identificación morfológica en campo.

8.3. EXAMEN COPROLÓGICO

Para determinar la presencia de *Toxocara canis* en los caninos se utilizó la técnica de flotación de Sheather, nos permite diagnosticar diversas infecciones parasitarias en los perros, a través de la solución sacarasa los huevos flotan en el tubo.

8.3.1. Procedimiento

1. Colocar la deposición del canino en una tarrina o funda, el material fecal debe ser fresco y rotular el nombre, edad, lugar donde se recolecto.

2. En la balanza pesar de 3 a 5 gramos de heces de cada muestra recolectada.
3. En un vaso plástico o de precipitación colocar 50 ml de solución sacarosa
4. Colocar 20 ml de solución sacarosa con 3 gr de heces, con una paleta mezclar hasta que sea homogénea la muestra.
5. En vasos de plástico colocar un cernidor o gasas, poner con ligas para evitar que la gasa se mueva.
6. Luego de cernir, colocar en un tubo de ensayo taparlo y rotúralo.
7. Al momento de colocar en la centrifuga los tubos de ensayo se debe colocar en X para equilibrar, la velocidad de centrifugación es 1250 rpm por 10 minutos.
8. Tener cuidado al momento de manipular los tubos de ensayo ya que los huevos de los parásitos se encuentran en la superficie.
9. Con la pipeta colocar tres gotas en el porta objetos, cubrir con el cubre objetos evitando que se haga burbujas, colocar el tubo en una rejilla.
10. Colocar en el microscopio la muestra.
11. Analizar cada muestra, proceder a buscar los huevos del parasito en estudio.

8.4. DESPARASITACIÓN

Se desparasito a los caninos que presentaron huevos de *Toxocara canis* en el examen coprológico, con Pamoato de pirantel 75 mg, Praziquantel 25 mg, Aceite de hígado de bacalao 40 mg, equivalentes a 1 ml x cada 5 kg de peso de bongo forte. La recolección del parasito adulto se hizo al día siguiente.

8.5. RECOLECCIÓN DEL PARASITO ADULTO TOXOCARA CANIS

1. La recolección de *Toxocara canis* se realizó en varios sectores de Salcedo, los parásitos son expulsados en la deposición.
2. Para limpiar a los parásitos se lavó con agua para evitar que la materia fecal dañe la estructura, se coloca en frascos de orina con alcohol al 70%.
3. Se rotulo los frascos con el código que identifica la zona, y la edad del canino.

8.6. DISECCIÓN DEL TOXOCARA CANIS ADULTO

8.6.1 procedimiento

1. Para esta investigación se utilizó *Toxocara canis* macho, se separó de las hembras a través de la morfología de los parásitos.
2. Se coloca en una caja Petri el parásito, identificar la cola y diseccionar el último tercio.
3. Con la balanza analítica se pesó la parte diseccionada, y se realizó varios cortes.
4. Para el envío al laboratorio se colocó en tubos Eppendorf la parte diseccionada, se añadió 1 ml de alcohol al 70% para mantener la muestra hasta el laboratorio.
5. Cada tubo se fue identificado con su código Tox-S
6. Se enviaron las muestras en un termo a una temperatura de 20° C a las instalaciones de QUERI, al laboratorio de investigación molecular de la Universidad de las Américas en el distrito metropolitano de Quito.

8.7. MATERIALES

8.7.1. Materiales y equipo de campo

- Alcohol al 70%
- Balanza
- Centrifuga
- Cofia
- Gasas
- Guantes
- Hojas de bisturí
- Ligas
- Microscopio
- Palos de helado
- Pipeta
- Placas Petri
- Porta y cubre objetos

- Primers forward ATCGATGAAGAACGCWGC (200 nmol)
- Primers reverse TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT (200 nmol)
- Solución Sacarosa
- Tubos de ensayo
- Tubos Eppendorf 1.5 ml
- Vaso de recolección de orina
- Vasos de plástico
- Jeringuilla
- Agua libre de nucleasas
- 5'-ATCGATGAAGAACGCWGC-3' directo
- 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3' inverso
- Proteinasa K
- Buffer de Extracción
- Fenol/Cloroformo/Isoamílico
- Agua Milli Q o TE
- Resina Chelex al 10%
- BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit
- Qiagen Multiplex MasterMix
- Agarosa en TBE teñido con SYBR
- Agitador vortex
- Centrifuga

8.7.2. Materiales de oficina

- Cámara
- Cartulinas
- Cuaderno
- Esferos
- Hojas de papel bond
- Impresora
- Laptop

8.7.3. Material Biológico

- 20 Toxocara canis Adultos
- Muestras Fecales

8.8. EXTRACCIÓN DE ADN

8.8.1. procedimiento

La preparación de las muestras se realizó en el Laboratorio de Biología y Parasitología de la Universidad Técnica de Cotopaxi - UTC; el análisis molecular fue desarrollado en el Laboratorio de Investigación de la Universidad de las Américas - UDLA.

Se extrajo ADN de una porción de tejido de cada parásito mediante el método Fenol-Cloroformo:

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

8.9. Cuantificación y dilución de muestras de ADN

La cuantificación de las concentraciones de ADN se realizó mediante espectrofotómetro – nanodrop, posteriormente se procedió a diluir hasta alcanzar una concentración final de 5 ng/uL (Tabla N°1). Las muestras fueron almacenadas en Freezer a -20°C hasta su uso.

Tabla N° 1 Diluciones muestras de ADN de *Toxocara canis*

DILUCIONES			
VOLÚMEN FINAL (μL)			20
CONCENTRACIÓN FINAL (ng/μL)			5
ID MUESTRA	C. INICIAL	V. ADN	V. AGUA
T001	21	4,76	15,24
T002	128,5	0,78	19,22
T003	189,7	0,53	19,47
T004	42,8	2,34	17,66
T005	55,4	1,81	18,19
T006	86,8	1,15	18,85
T007	201,1	0,50	19,50
T008	99	1,01	18,99
T009	18,6	5,38	14,62
T010	130,6	0,77	19,23
T011	159,7	0,63	19,37
T012	61,6	1,62	18,38
T013	55,1	1,81	18,19
T014	89,1	1,12	18,88
T015	224,8	0,44	19,56
T016	222,3	0,45	19,55
T017	80,6	1,24	18,76
T018	54,8	1,82	18,18
T019	237,5	0,42	19,58
T020	143,8	0,70	19,30

8.10. AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS

La amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosómico (ADNr) se realizó utilizando el siguiente par de cebadores (primers) específicos para parásitos cestodos, diseñados por investigadores de la Universidad Técnica de Cotopaxi – UTC y la Universidad de las Américas - UDLA.

5'-ATCGATGAAGAACGCWGC-3' directo

5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3' inverso

Las reacciones de PCR fueron realizadas a un volumen final de 15 µl para cada muestra (Tabla N° 2), compuesta de:

Tabla N° 2 Componentes para la PCR de amplificación del gen nad1

COMPONENTE	C. Inicial	C. Final	Vol. 1 Rx (µL)	Vol. 60 Rx (µL)
Agua MQ			8,8	528
Buffer	10X	1X	1,5	90
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,45	27
dNTP Mix	10 mM	0,2	0,3	18
Primer Fw	20 µM	0,5 µM	0,375	22,5
Primer Rv	20 µM	0,5 µM	0,375	22,5
Taq Polimerasa*	10 U/µL	2 U/µL	0,2	12
ADN	5 ng/µL	1 ng/µL	3	
Volumen Final			15	

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

Los fragmentos fueron generados por PCR mediante el uso de termocicladores, con las siguientes condiciones: temperatura inicial de desnaturalización de 94°C por 2 min (1 ciclo), seguido de 35 ciclos continuos de (desnaturalización a 94°C por 1 min, acoplamiento de los primers a 58°C por 30 seg, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final de los productos a 72°C por 5 min), finalizando con 10 min de reposo a 4°C.

Los productos de las amplificaciones fueron visualizados en geles de agarosa 2 % para identificar posibles fallas. Los geles fueron coloreados con SYBR Safe, analizados sobre luz ultravioleta y fotografiados. En cada caso se corrió un control negativo para verificación de contaminación.

8.11. PURIFICACIÓN DE LA PCR Y REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

El producto amplificado fue secuenciado con kit de secuenciación BigDye v3.1 (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación fueron purificadas mediante purificación enzimática, protocolo basado en resina de filtración en gel. Se empleó la matriz de secuenciación Sanger (BigDye - 3.1), analizada en electroforesis capilar.

En el estudio fueron secuenciados un total de 383 pb de la región del gen ITS-2 del ADN ribosómico (ADNr) de *T. canis* aislados de caninos.

8.12. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias fueron alineadas y editadas con el programa MEGA X (54), a partir de la secuencia de referencia (MK309928.1) disponible en el GenBank (55).

8.13. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Las secuencias del gen ITS-2 de *T. canis* obtenidas en el presente estudio fueron editadas y alineadas inicialmente en el programa MEGA X (54). La identidad de cada aislado fue confirmada mediante una búsqueda de similitud, al comparar su secuencia de nucleótidos con otras secuencias de nemátodos ascaridoides disponibles en el GenBank, a partir del algoritmo NCBI BLAST.

8.13.1. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Los árboles filogenéticos generados entre secuencias de la región del espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosómico (ADNr) de *T. canis* y la comparación con otras secuencias depositadas en el GenBank con los números de acceso: MK447598; MK447599 (56) MK309928 (55), MK728991; MK728992 (57), JN617989 (56), KP406763 (58) para *Toxocara canis*; KY003089; KY003091; KY003065; KY003080 para *Toxocara cati*; KT737382 (59), FJ418784 (60), KJ777160, MK100346 para *Toxocara vitulorum* y MT341323 (61) para *Ascaris suum*, fueron construidos utilizando el método NJ (neighbor-joining) (62). La confiabilidad de los árboles obtenidos se determinó con un test de replicaciones (bootstrapping) con (1000 réplicas), se muestra junto a las ramas (63). Todos los análisis se realizaron en programa MEGA X (54).

9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Exámenes Coprológicos

La población de caninos de este estudio es de diferentes edades, y diferentes condiciones de vida lo que podría aumentar o disminuir el grado de parasitosis. Se

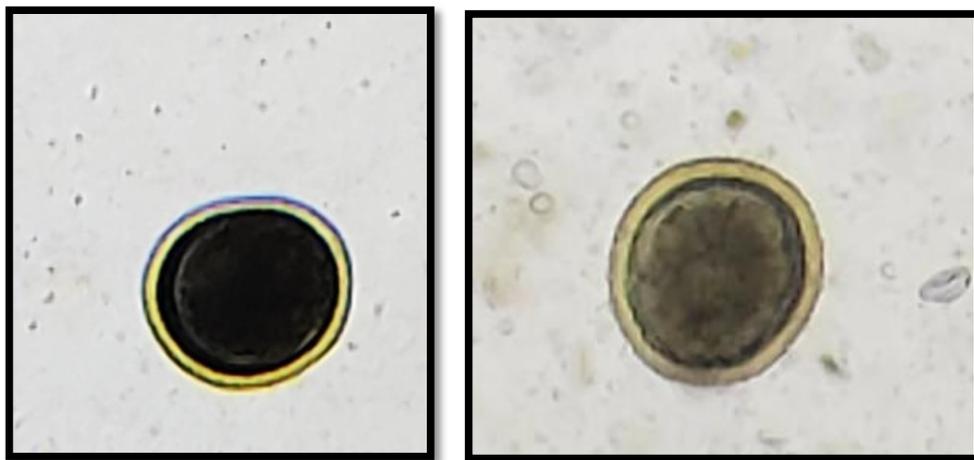
recolectaron 106 muestras de las cuales se identificó la presencia de huevos de *Toxocara canis* en 16 caninos es decir el 16.96 % de prevalencia a través del microscopio, este examen se realizó en las instalaciones de la universidad Técnica de Cotopaxi en el laboratorio de biología, todos los individuos fueron desparasitados con bongo forte suspensión, 1ml/kg ya que algunos caninos no presentaban síntomas de parásitos gastrointestinales, se llegó a obtener 24 muestras cada perro arrojó entre 3 a 6 parásitos adultos, representando el 25.44% de prevalencia, la presencia del nematodo, basado en la morfología macroscópica. Hubo varias muestras que por situaciones de los propietarios no se pudieron recolectar, las muestras se obtuvieron de cachorros entre un mes a 6 meses de edad.

Identificar al *Toxocara canis* mediante la secuenciación del gen ITS-2 del ADN ribosómico, de aislamientos en caninos del cantón Salcedo

El árbol filogenético basado en secuencias ITS-2 muestra la formación de dos agrupamientos principales, confirmando la identidad de los aislados estudiados, como pertenecientes al género *Toxocara*, particularmente la especie *Toxocara canis*.

Las secuencias de *Toxocara cati* y de *Toxocara vitulorum* se muestran distantes formando grupos independientes, lo cual corrobora la identificación del *T. canis* y los resultados obtenidos coinciden con los reportes de Audu, Z por lo tanto determinamos que el gen ITS-2 es una herramienta buena y sensible para la identificación de gusanos adultos de *Toxocara spp.* Y precisando su epidemiología y caracterización genética.

Figura N° 4 Huevos de *Toxocara canis*



Fuente: Directa.

9.1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Los 20 aislados de caninos se identificaron como *Toxocara canis* cuando se compararon usando el BLAST con secuencias previamente depositadas en el GenBank (Figura 5), con un 100% de identidad para *T. canis* reportado por (57). MK728991 y MK728992. Este resultado sirvió como análisis primario para la confirmación de los aislamientos en caninos del cantón Salcedo como *T. canis*.

Figura N° 5 BLAST (porcentaje de identidad) entre secuencias de ITS-2 del ADNr (383 pb) de los aislados *Toxocara canis* y otras secuencias recuperadas del GenBank.

BLAST® » blastn suite » results for RID-EDT62HCE013

Home Recent Results Saved Strategies Help

< Edit Search Save Search Search Summary

How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

Job Title 3 sequences (Toxocara canis_Ecuador-3)

RID EDT62HCE013 Search expires on 07-09 19:42 pm Download All

Results for 1:|c||Query_37747_Toxocara canis_Ecuador-3(383bp)

Program BLASTN Citation

Database nt See details

Query ID |c||Query_37747

Description Toxocara canis_Ecuador-3

Molecule type dna

Query Length 383

Other reports Distance tree of results MSA viewer

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

+ Add organism

Percent Identity E value Query Coverage

Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download New Select columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Toxocara canis isolate C4 SVVU 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	Toxocara canis	708	708	100%	0.0	100.00%	501	MK728992.1
<input checked="" type="checkbox"/> Toxocara canis isolate C7 SVVU 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	Toxocara canis	708	708	100%	0.0	100.00%	502	MK728991.1
<input checked="" type="checkbox"/> Toxocara canis internal transcribed spacer 2, partial sequence	Toxocara canis	708	708	100%	0.0	100.00%	503	MG214150.1
<input checked="" type="checkbox"/> Toxocara canis genes for 5.8S rRNA, ITS2, partial sequence, clone: N1, N2, N3	Toxocara canis	708	708	100%	0.0	100.00%	420	LC133352.1

Por otro lado, revela que la secuencia de la región del espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosómico (383 pb) de *T. canis*, es una región muy conservada (Figura 6). Como ha sido planteado en otros estudios (64), que la región ITS contiene dos regiones no codificadoras variables que se encuentran dentro de las repeticiones altamente conservadas del ADNr, entre la subunidad pequeña, la región para 5.8S y los genes para ADNr de la subunidad grande. Por ello las regiones del ADNr más comúnmente estudiadas son los tres genes codificantes (18S, 5.8S, y 28S) y los dos espaciadores internos (ITS1 e ITS2) (65).

La amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS2) del ADN ribosómico (ADNr) se realizó utilizando un par de primers específicos para parásitos cestodos, diseñados por investigadores de la Universidad Técnica de Cotopaxi – UTC y la Universidad de las Américas - UDLA.

Resultado que confirma lo planteado por (66), que la secuencia altamente conservada del gen 5.8S, ha sido utilizada como punto de unión de cebadores universales para amplificar las regiones espaciadoras flanqueantes, y el ITS1 e ITS2, que si son de gran utilidad para establecer relaciones filogenéticas.

Figura N° 6 Alineamiento entre secuencias de ITS-2 del ADNr (383 pb) de los aislados *Toxocara canis* y otras secuencias recuperadas del GenBank.

The screenshot shows the 'Alignments' tab in a GenBank interface. It displays a pairwise alignment between a query sequence and a subject sequence. The alignment is perfect, with 100% identity across the entire length of 501 bases. The query sequence is identified as 'Toxocara canis isolate C4 SVVU 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence' with sequence ID MK728992.1. The subject sequence is also identified as 'Toxocara canis isolate C4 SVVU 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence' with sequence ID MK728992.1. The alignment view shows the query and subject sequences with vertical lines indicating the match. The score is 708 bits (383), and the identity is 383/383 (100%).

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

Range 1: 34 to 416

Query	Subject
1 AAATTCGAACGCACATTGCGCCATCGGGTTCATCCCGTTGGCACGCTGGCTGAGGGT 60	34 AAATTCGAACGCACATTGCGCCATCGGGTTCATCCCGTTGGCACGCTGGCTGAGGGT 93
61 CAGTATATTAAGGAGTATGATGGGCGCGCAATTTATGGAATGTGATTAACGCGCAAGGT 120	94 CAGTATATTAAGGAGTATGATGGGCGCGCAATTTATGGAATGTGATTAACGCGCAAGGT 153
121 TGTGGTGCAATTCGGTGAGCTATGCTGGTGTGGTAATGGATATTGTCAATTGTACAGCGT 180	154 TGTGGTGCAATTCGGTGAGCTATGCTGGTGTGGTAATGGATATTGTCAATTGTACAGCGT 213
181 ACCTTGCCCAAGGAAATATTCGCACAAGAAATGGCTGCTTTGCTCGTAAAGAGGCCAAAA 240	214 ACCTTGCCCAAGGAAATATTCGCACAAGAAATGGCTGCTTTGCTCGTAAAGAGGCCAAAA 273
241 TTGGCCATGAGTGTATGTTGCGTTGCTTACGATACGGCCTCCAGCAAAACGTTGTTTATT 300	274 TTGGCCATGAGTGTATGTTGCGTTGCTTACGATACGGCCTCCAGCAAAACGTTGTTTATT 333
301 GTTTGGTTGTGGCAGCATCCAGGTTGGAGGTGGCGTTATCGGTCGCTTGAATGAGGAATG 360	334 GTTTGGTTGTGGCAGCATCCAGGTTGGAGGTGGCGTTATCGGTCGCTTGAATGAGGAATG 393
361 CATGGCGAATGGTTGAAATGAGA 383	394 CATGGCGAATGGTTGAAATGAGA 416

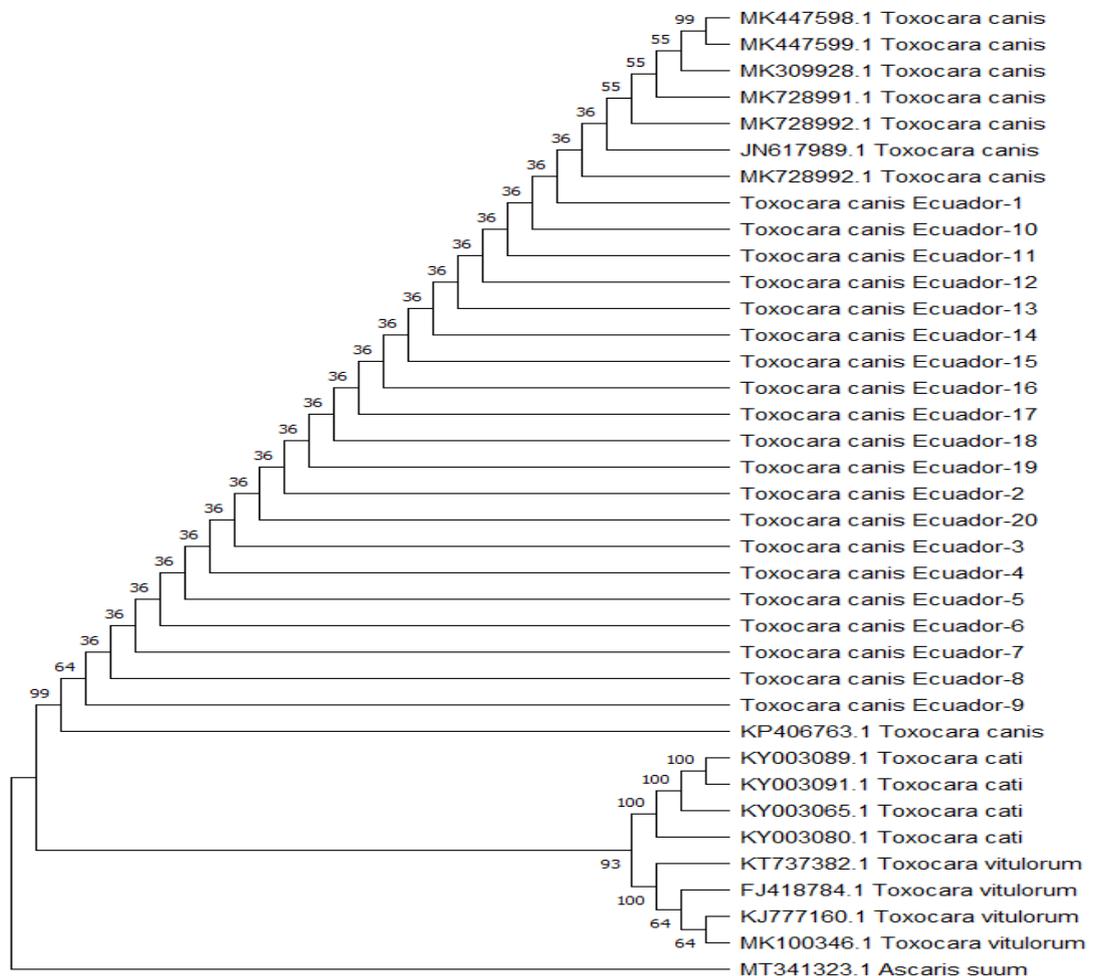
9.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El árbol filogenético basado en secuencias ITS-2 (Figura 7), muestra la formación de dos agrupamientos principales, el primero de ellos para las secuencias de *Toxocara canis* de aislamientos en caninos del cantón Salcedo junto a la secuencia de referencia de *T. canis* reportadas por varios autores (55,56,58), confirmando la identidad de los

aislados estudiados, como pertenecientes al género *Toxocara*, particularmente la especie *Toxocara canis*.

Las secuencias de *Toxocara cati* (67) y de *Toxocara vitulorum* (60) se muestran distantes formando grupos independientes, lo cual corrobora la identificación del *T. canis*.

Figura N° 7 Árbol de relaciones filogenéticas según el algoritmo Neighbor-Joining, basado en las secuencias de ITS-2 del ADNr (383 pb) de los aislados *Toxocara canis* y otras secuencias recuperadas del GenBank. Los valores de Bootstrap para 1000 réplicas se muestran para cada agrupamiento.



La secuencia de *Ascaris suum* MT341323 (61) se emplea taxón externo al grupo de estudio.

Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Audu, Z (67) quien al realizar la caracterización molecular y el análisis filogenético de especies de *Toxocara*

en perros, bovinos y búfalos en Egipto, concluyó que el gen ITS-2 es una buena herramienta sensible para la identificación de gusanos adultos de *Toxocara* spp. Diferenciando al *T. vitulorum* del *T. canis* en su estudio.

En relación a este criterio otros autores demostraron que el ADN ribosómico (ADNr) es un marcador valioso, empleado frecuentemente para conseguir la identificación de parásitos de especies en *Toxocara* y *Toxascaris* (14,55).

10. IMPACTOS

- **Sociales**

El impacto social es positivo porque se puede evitar enfermedades en los propietarios y en las mascotas, cuidando y previniendo la salud, es importante informar cronogramas de desparasitación, higiene en el lugar que habita la mascota.

- **Ambientales**

El impacto es indirecto no es consecuencia directa de las acciones humanas, sino de los productos o desechos que esta investigación va a generar como los envases donde se van a llevar las muestras al laboratorio, desechos de alcohol al 70 % a las aguas residuales.

El *Toxocara canis* es un problema de salud pública cuando los huevos son esparcidos a través de las heces del canino en el medio ambiente, infectando a los animales del alrededor y a las personas, continuando con el ciclo biológico.

- **Técnicos**

A través de los exámenes coproparasitarios que se realizó, se puede observar la carga parasitaria que presenta las mascotas.

- **Económicos**

El impacto es positivo, la eliminación de este parásito no es costoso existen buenos desparasitantes a precios económicos, los propietarios invierten en su calidad de vida.

11. CONCLUSIONES

- ✓ Las muestras aisladas de los caninos fueron identificadas con un 100% como *Toxocara canis*, después de su comparación con BLAST.
- ✓ Mediante los exámenes coproparasitarios se obtuvo como resultado que 20 caninos de los 106 muestreados estaban parasitados con *toxocara canis*.
- ✓ La secuenciación del gen ITS-2 del ADN ribosómico mostró ser una herramienta eficaz en la identificación de *Toxocara canis* de aislamientos en caninos del cantón Salcedo, permitiendo esclarecer su epidemiología y caracterización genética.

12. RECOMENDACIONES

- Es muy necesario que a los habitantes del cantón Salcedo se les imparta charlas educativas para que estén informados de todo lo referente a las afecciones por *Toxocara canis* en sus mascotas.
- Realizar nuevos estudios en otras zonas rurales y urbanas del país para que el sistema epidemiológico siga perfeccionándose
- Realizar campañas para controlar y prevenir las infecciones de *Toxocara canis* en las mascotas del cantón Salcedo.
- Hablar con los presidentes de cada barrio o sector para poder realizar la desparasitación de una manera más fácil y organizada.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Mattos GT, Dos Santos PC, Telmo PDL, Berne MEA, Scaini CJ. Human toxocariasis: Prevalence and factors associated with biosafety in research laboratories. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2016;95(6):1428–31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5154462/pdf/tropmed-95-1428.pdf>
2. Öge H, Öge S, Özbakiş-Beceriklisoy G. Detection and identification of *Toxocara canis* in infected dogs using PCR. *Helminthol*. 2019 Jun 1;56(2):118–23.
3. Dr. Catherine Shaffer PD, Reviewed by Susha Cheriyaedath MS. Toxocariasis: Fondo, tipos, diagnosis,. 2021;1–11. Available from: [https://www.news-medical.net/health/Toxocariasis-Background-Types-Diagnosis-Treatment-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Toxocariasis-Background-Types-Diagnosis-Treatment-(Spanish).aspx)
4. Oguz B, Ozdal N, Serdar Deger M. Genetic analysis of *Toxocara* spp. in stray cats and dogs in Van province, Eastern Turkey. *J Vet Res* [Internet]. 2018;62(3):291–
5. Available from: https://www.researchgate.net/publication/328589194_Genetic_Analysis_of_Toxicara_Spp_in_Stray_Cats_and_Dogs_in_Van_Province_Eastern_Turkey/link/5bd8564892851c6b2799fac4/download
5. Bolo D. Nematodos Parasitos Comunes. 2021;1–32. Available from: <https://es.scribd.com/document/454101548/Nematodos-parasitos-comunes>
6. Alicia RG. Generalidades y Clasificación . Orden Rhabditida. :1–11.
7. Kaminsky RG De, Sc. Parasitología clínica. 2011;1:108. Available from: <http://www.bvs.hn/Honduras/Parasitologia/V.Parasitologia-Clinica-10-16.pdf>
8. Espinoza Y. Toxocariosis humana: ¿problema de salud pública? 2009;70(4). Available from: <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=1483>
9. Moreno AG. Apuntes de Zoología – Ana G. Moreno Nematodos 1. :1–2. Available from: <https://www.ucm.es/data/cont/docs/465-2013-08-22-D5NEMATODOS.pdf>
10. Bióloga RS. Morfología de los nematodos , principales órganos y sistemas Morfología de los nematodos y Estructuras externas. 2021;1–8. Available from:

<https://invertebrados.paradise-sphinx.com/nematodos/morfologia-de-los-nematodos.htm>

11. Aiello SE, Mays A. Toxocariasis Toxocariasis. 2005;1–7. Available from: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/toxocariasis-es.pdf>
12. Jose P. Áscaris lumbricoides. 2001;21–33. Available from: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/hinojosa_s_le/capitulo4.pdf
13. Glickmad T. ASCARIDOS DE PERROS Y GATOS : UN PROBLEMA DE SALUD PUBLICA Y DE MEDICINA VETERINARIA Peter M . Schantz '. 1983;94(6). Available from: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/16908/v94n6p571.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
14. Öge H, Öge S. Detection and identification of Toxocara canis in infected dogs using PCR. 2019;118–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6799566/pdf/helm-56-118.pdf>
15. Fumadó V. Parásitos intestinales. 2021;(1):58–65. Available from: <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2015-01/parasitos-intestinales/>
16. Victoria POM. Universidad Tecnica de Cotopaxi. 2019;75. Available from: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/5973/6/PC-000754.pdf>
17. Leal R, Schmitt F, Elisabeth M, Berne A, Costa LF, Avila D, et al. Molecular & Biochemical Parasitology Proteomic analysis of Toxocara canis excretory and secretory (TES) proteins. Mol Biochem Parasitol [Internet]. 2017;211:39–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.09.002>
18. Revista R, Veterinaria E De, Científica SDI, Pedro M V, Fé D, Blanca M V, et al. ISSN 1695-7504 Toxocara canis y Síndrome Larva Migrans Visceralis (Toxocara canis and Syndrome Larva Migrans Visceralis). 2006;
19. Rodriguez MAD. Importancia Zoonotica del Toxocara Canis. 2018;62. Available from: <http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/Cp.pdf>
20. Parasitologia L de especialistas en. Parasitosis de los carnívoros. :1–5. Available from:

https://www2.ulpgc.es/hege/almacen/download/42/42602/ascaridiosis_en_pequenos_animales.pdf

21. Ester N, Mónica S, Domingo R, Radman NE, Archelli SM, Burgos L, et al. *Toxocara canis* en caninos. 2006; Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/535/53540107.pdf>
22. Rina Girard de Kaminsky MS. *Parasitología Clínica* [Internet]. Universidad Nacional Autónoma de Honduras; 2011. p. 108. Available from: <http://www.bvs.hn/Honduras/Parasitologia/V.Parasitologia-Clinica-10-16.pdf>
23. Humana YRDET, Kaminsky R, Groothousen CM, Zúniga AM, Contreras M, Ferrera AM, et al. INFECCIÓN POR TOXOCARA CANIS EN PERROS. 2014;82(2). Available from: <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2014/pdf/Vol82-2-2014-3.pdf>
24. Pearson PRD. Ascariosis (ascariasis). 2021;6–7. Available from: <https://www.msmanuals.com/es-ec/hogar/infecciones/infecciones-parasitarias-nematodos-lombrices/ascariosis-ascariasis>
25. Manuel Cárdenas R, Amanda Chávez V, Eva Casas A. Efectividad del fenbendazol y praziquantel para el control en dosis única de nemátodos y céstodes en perros. *Rev Investig Vet del Peru* [Internet]. 2006;17(1):20–5. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v17n1/a04v17n1.pdf>
26. Excipiente AP. BIOZOO - Génesis. Available from: <https://biozoo.com.mx/assets/fichas/Génesis-tabletas-México.pdf>
27. Znso D, Mgso D. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO A PARTIR DE MUESTRAS FECALES (II). (Ii):22–4. Available from: [http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/29/cys_29_22-24_Diagnostico_parasitologico_partir_muestras_fecales_\(II\).pdf](http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/29/cys_29_22-24_Diagnostico_parasitologico_partir_muestras_fecales_(II).pdf)
28. Fernandez N. Examen Coprológico. 2015;62. Available from: <http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/Cp.pdf>
29. Wladimir MPE. “Estudio comparativo de dos pruebas de concentración en heces para diagnóstico de Giardiasis: por método de Sedimentación de Ritchie y por método de Flotación de Faust, frente a Coproparasitario simple en la Clínica el Batán del Pozo, en el periodo Noviem. 2016;70. Available from:

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9932/1/T-UCE-0006-113.pdf>

30. Romero MRV. PARASITOLOGIA EN VETERINARIA [Internet]. 2015. 126 p. Available from: <file:///C:/Users/TECNOMANIA/Downloads/Dialnet-ParasitologiaEnElLaboratorio-581324.pdf>
31. Gabrie JA, Rueda MM, Canales M, Sánchez A. Utilidad del método Kato-Katz para diagnóstico de Uncinaria stenocephala : experiencia en una zona rural de Honduras , 2011. 2012;80(3):96–101. Available from: <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2012/pdf/Vol80-3-2012-4.pdf>
32. Dr. Álvaro Vidal Rivadeneyra. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE ELECTROFORESIS PARA PROTEÍNAS Y ADN. 2003;69. Available from: https://bvs.ins.gob.pe/insprint/SALUD_PUBLICA/NOR_TEC/38.pdf
33. Rina Girard de Kaminsky M. metodos para laboratorio PARASITOLOGIA. In 2018. p. 124. Available from: <http://www.bvs.hn/Honduras/pdf/ManualParasitologia2007.pdf>
34. PhD. BMJF. BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA MOLECULAR BIOLOGY IN CLINICAL DIAGNOSIS. Rev Clínica Las Condes [Internet]. 2015;26(6):788–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.11.007>
35. Merchán MA, Inés M, Caycedo T, Katherine A, Torres D. EPIDEMIOLOGICAL AND HEALTH SCIENCES REVIEW ARTICLE Molecular biology techniques for research development . A literature review Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación . Revisión de la literatura. 2017;1100–11. Available from: http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v16n5/en_rhcm12517.pdf
36. Garza-ramos U, C M, Silva-sánchez J. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. 2009;51(1):439–46. Available from: <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v51s3/a09v51s3.pdf>
37. Maria Fabian de Estrada. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE. Lima [Internet]. 2014;104. Available from: https://bvs.ins.gob.pe/insprint/SALUD_PUBLICA/NOR_TEC/2014/serie_normas_tecnicas_nro_37.pdf

38. Zambrano A. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). 2012;4. Available from: <https://www.ugr.es/~mgarrido/PCR.htm>
39. Fuentes A. APLICACIÓN DE LA PCR: :1–8. Available from: <http://fciencias.ugr.es/practicadocentes/wp-content/uploads/guiones/aplicacionDeLaPCR.pdf>
40. Ap Biology. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 2021;1–16. Available from: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
41. Khan Academy. Resumen de la transcripción. 2021;1–10. Available from: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/transcription-and-rna-processing/a/overview-of-transcription>
42. Buchner E, Chargaff E, Watson JD, Harry F, Crick C, Meselson M, et al. Notas Taq polimerasa: De los geiseres a la ciencia. 2014;18:52–7. Available from: https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas54/T54_2Notas2-Taq polimerasa - De los geisers a la ciencia.pdf
43. Mojica L. La prueba técnica ADN en los procesos sobre filiación TM. 2004;5(1):250–65. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/esju/v5n1/v5n1a08.pdf>
44. Rodrigo Montes. Factores que determinan la estructura del dna. 2021;1–7. Available from: <http://www.ehu.eus/biomoleculas/an/an42.htm>
45. Díaz AS, Rentería LF. PCR : reacción en cadena. 2014;(January). Available from: https://www.researchgate.net/publication/266856169_PCR_reaccion_en_cadena_de_la_polimerasa
46. Banks K, Smith M, Pcr. El Blog de Genotipia. 2021;1–13. Available from: <https://genotipia.com/pcr/>
47. Laura Patricia Alejos Velázquez 1, María del Consuelo Aragón Martínez, 2 3, Romero AC. Extracción y purificación de ADN [Internet]. 2004. 274 p. Available from: https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF7595

05257D4900580FE6/\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcología.pdf

48. Pcr L, Mullis KB, Smith M, Pcr L. El Blog de Genotipia. 2021;1–13.
49. De: A, Laboratory TVBI. Primers Eleccion. (4). Available from: <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/identificacion/2.htm>
50. Giorgio L en GEM. Introducción al diseño de primers. 1983;1–12. Available from: <http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/claroline/backends/download.php?url=L0Z1bmRhbWVudG9zX3Rl83JpY29zX2RlX2xhX3JlYWNjafNuLnBkZg%3D%3D&cidReset=true&cidReq=BIOINFO#:~:text=-Diseño de los oligonucleótidos iniciadores,más importantes de la PCR.&text=I>
51. Jiménez CB. Helicasa : características , estructuras y funciones Características. 2021;1–6. Available from: <https://www.lifeder.com/helicasa/>
52. Fernando LAL. El papel de la ADN ligasa en la replicación del ADN1. Fernando LAL. El papel de la ADN ligasa en la replicación del ADN. 2019;8–9. Available from: <https://www.labxchange.org/library/pathway/lx-pathway:613ef48f-f29c-40c8-9e76-6fc1991b634d/items/lx-pb:613ef>. 2019;8–9. Available from: [https://www.labxchange.org/library/pathway/lx-pathway:613ef48f-f29c-40c8-9e76-6fc1991b634d:lx_simulation:bea440fd?source=%2Flibrary%2Fclusters%2Flx-cluster%3Aabe-espanol](https://www.labxchange.org/library/pathway/lx-pathway:613ef48f-f29c-40c8-9e76-6fc1991b634d/items/lx-pb:613ef48f-f29c-40c8-9e76-6fc1991b634d:lx_simulation:bea440fd?source=%2Flibrary%2Fclusters%2Flx-cluster%3Aabe-espanol)
53. Perdomo A. Topoisomerasas : características , funciones , tipos e inhibidores. 2021;1–10. Available from: <https://www.lifeder.com/topoisomerasas/>
54. Stecher1§ G, Koichiro Tamura, Kumar and S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. :1–7. Available from: <https://par.nsf.gov/servlets/purl/10174933>
55. He X, Lv M, Lin GLYR. (Nematoda : Ascarididae) de la provincia de Guangdong , China subtropical. 2021;1–8.
56. Sheng Z, Chang Q, Tian S, Lou Y, Zheng X, Zhao Q. Characterization of *Toxascaris leonina* and *Tococara canis* from cougar (*Panthera leo*) and common wolf (*Canis lupus*) by nuclear ribosomal DNA sequences of internal transcribed spacers.

- 2012;6(14):3545–9. Available from: <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/7CEA1C725260>
57. Grau-pujol B, Cuamba I, Jairoce C, Cossa A, Silva J Da, Sacoor C, et al. Molecular Detection of Soil-Transmitted Helminths and Enteric Protozoa Infection in Children and Its Association with Household Water and Sanitation in Manhiça District . 2021; Available from: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/7/838/pdf>
58. Arellano DMEL, Quintanilla DREL, Marcelino DLA, Ramos DJJZ, Ordaz DJAC, Casas DRMS, et al. Memorias del Veterinaria Conferencias Magistrales Simposios Trabajos libres. 2019; Available from: http://ampave.org/Memorias/Memorias AMPAVE_2019.pdf
59. Woodhall DM, Eberhard ML PMN. Toxocariasis. 2016;1–14. Available from: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/toxocariasis.pdf>
60. Wickramasinghe S 1 , Yatawara L , Rajapakse RP AT. Toxocara canis y Toxocara vitulorum : caracterización discriminación y análisis filogenético basado e genes mitocondriales (ATP sintasa subunidad 6 y 12S) y ribosomales nucleares Referencias Datos. 2021;1–2. Available from: <https://europepmc.org/article/med/19221796>
61. Karadjian G, Kaestner C, Laboutière L, Adicéam E, Wagner T. Una estrategia de morfología-PCR en dos pasos para la identificación de larvas de nematodos recuperadas de los músculos después de la digestión artificial en la inspección de la carne . 2021;(Cdc):1–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32979104/>
62. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C TK. MEGA X: análisis de genética evolutiva molecular en plataformas informáticas. 2018;35(6):1547–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29722887/>
63. Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies : An Approach Using the Bootstrap. 2009;39(4):783–91. Available from: <http://biostat.jhsph.edu/~jleek/teaching/2011/754/reading/felsenstein.pdf>
64. GARDES M, BRUNS TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol Ecol. 1993;2(2):113–8.

65. Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH. Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol Bioinforma*. 2008;2008(4):193–201.
66. White T, Bruns T, Lee S, Taylor J, Innis M, Gelfand D, et al. " Amplificación y secuenciación directa de genes de ARN ribosómico fúngico para filogenia ", en *Contenido similar*. 2021;6–7. Available from: <https://www.scienceopen.com/document?vid=f4505cd7-6ec2-43f4-b1d4-ddee592ba145>
67. Audu Z, Abalaka SE. *Toxocara vitulorum* intestinal impaction in male White Fulani calves: a case report from Nigeria. *J Parasit Dis [Internet]*. 2019;43(4):597–600. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01133-3>

14. BIBLIOGRAFÍA IMÁGENES

1. Parise M. CDC - DPDx - Toxocariasis [Internet]. Cdc.gov. 2019 [cited 6 July 2021]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/toxocariasis/index.html>
2. Rus M. Estudio de los elementos parasitarios presentes en heces de carnívoros domésticos en la ciudad de Jaén [Internet]. Tauja.ujaen.es. 2015 [cited 6 July 2021]. Available from: http://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/563/1/TFG_RusRusMar%C3%ADaCatalina.pdf

15. ANEXOS

Anexo N° 1 Hoja de vida estudiante 1

HOJA DE VIDA			
DATOS PERSONALES:			
APELLIDOS:	Antamba Yépez		
NOMBRES:	Marco Andrés		
CEDULA:	100373514-7		
FECHA DE NACIMIENTO:	02/Abril/1995		
EDAD:	26 años		
TIPO DE SANGRE:	O+		
GÉNERO	Masculino		
ESTADO CIVIL:	Soltero		
CARGAS FAMILIARES:	Ninguna		
NACIONALIDAD:	Ecuatoriano		
DOMICILIO ACTUAL:	Otavalo/Av. Abdón Calderón 7-09		
TELÉFONO CELULAR:	0999209003		
CORREO ELECTRONICO:	marco.antamba5147@utc.edu.ec		
ESTUDIOS REALIZADOS			
Primaria:	Unidad Educativa “10 de agosto”		
Secundaria:	Unidad Educativa Otavalo		
Superior:	Universidad Técnica de Cotopaxi (en proceso)		
REFERENCIAS PERSONALES			
Myriam Yépez	Parentesco:	Madre	0994092451
Marco Antamba	Parentesco:	Padre	0993948664

Anexo N° 2 Hoja de vida del estudiante 2

HOJA DE VIDA			
DATOS PERSONALES:			
APELLIDOS:	Milán Chariguaman		
NOMBRES:	Mayra Jessenia		
CEDULA:	172637917-3		
FECHA DE NACIMIENTO:	03/Agosto/1997		
EDAD:	24 años		
TIPO DE SANGRE:	O+		
GÉNERO	Femenino		
ESTADO CIVIL:	Casada		
CARGAS FAMILIARES:	1 hijo		
NACIONALIDAD:	Ecuatoriana		
DOMICILIO ACTUAL:	Quito/Ecuador del futuro/Mz E/lote 15		
TELÉFONO CELULAR:	0939549597		
CORREO ELECTRONICO:	mayra.milan9173@utc.edu.ec mayrajm1997@hotmail.com		
ESTUDIOS REALIZADOS			
Primaria:	Unidad Educativa “Pedro Vicente Maldonado”		
	Unidad Educativa Bilingüe “New Life”		
Secundaria:	Unidad Educativa Municipal “Julio. E. Moreno”		
Superior:	Universidad Técnica de Cotopaxi (en proceso)		
REFERENCIAS PERSONALES			
Alberto Guzmán	Parentesco:	Esposo	0991221182
Marlene Chariguaman	Parentesco:	Tía	0986990707

Anexo N° 3 Hoja de vida Tutora

TUTOR DE TITULACION

Datos informativos personal docente

APELLIDOS: Toro Molina

NOMBRES: Blanca Mercedes

ESTADO CIVIL: Soltera

CÉDULA DE CIUDADANÍA: 0501720999

LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO: Latacunga, 20 de noviembre de 1970

DIRECCIÓN DOMICILIARIA: Latacunga, La Estación, Gral. Julio Andrade y Marco A. Subía

TELÉFONO CONVENCIONAL: 032800638

TELÉFONO CELULAR: 0995272516

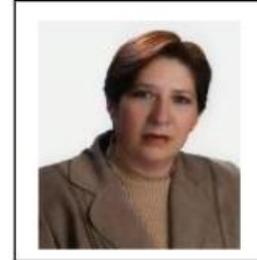
CORREO ELECTRÓNICO: blanca.toro@utc.edu.ec

bmtmmercedestoro@yahoo.com

EN CASO DE EMERGENCIA CONTACTARSE CON: Mónica Toro (0998102630)

ESTUDIOS REALIZADOS Y TÍTULOS OBTENIDOS

NIVEL	TÍTULO OBTENIDO	FECHA DE REGISTRO	CÓDIGO DEL REGISTRO
TERCER	Doctora en Medicina Veterinaria y Zootecnia	4 octubre/2002	1006-02-283706
CUARTO	Magister en Clínica y Cirugía canina	28/agosto/2014	1018-14-86050818
	Diplomado en Didáctica de la Educación Superior	06 diciembre 2012	1020-12-86029975
	Magister en Gestión de la Producción	1 octubre/2007	1020-07-667220
	Diplomado superior en Medicina y manejo de urgencias de pequeñas Especies	22septiembre/2005	1005-05-610370
	Diplomado Superior en anestesiología y cirugía en perros y gatos.	28 Abril/2004	1005-04-498652



Anexo N° 4 Recolección de Muestras

N	Nombre del canino	Sexo	Edad	Lugar donde duerme la mascota	Desparasitación	Parasitado	Fecha de recolección de la muestra	Fecha de desparasitación	Fecha de recolección del parásito
1	Paco	M	4 años	Terreno	Si	No	15/03/2021	16/03/2021	-----
2	Francisca	H	6 años	Casa	No	No	15/03/2021	16/03/2021	-----
3	Beili	M	1 año	Terraza	No	No	15/03/2021	16/03/2021	-----
4	Balto	M	9 mes	Terreno	No	No	15/03/2021	16/03/2021	-----
5	Dogui	M	5 años	Terreno	Si	No	15/03/2021	16/03/2021	-----
6	Titi	H	7 años	Casa	No	No	15/03/2021	16/03/2021	-----
7	Jonas	M	2 meses	Casa	No	No	15/03/2021	16/03/2021	-----
8	Solovino	M	1 mes	Terreno	No	Si	15/03/2021	16/03/2021	17/03/2021
9	Roki	M	6 meses	Terraza	No	No	15/03/2021	16/03/2021	-----
10	Pinky	H	1 año	Terreno	No	No	15/03/2021	16/03/2021	-----
11	Cloy	H	11 meses	Terreno	Si	No	16/03/2021	17/03/2021	-----
12	Morita	H	2 años	casa	No	No	16/03/2021	17/03/2021	-----
13	Luzma	H	1 año	casa	No	No	16/03/2021	17/03/2021	-----
14	Nachito	M	3 meses	casa	No	Si	16/03/2021	17/03/2021	18/03/2021
15	Negro	M	1 mes	Terreno	No	Si	16/03/2021	17/03/2021	18/03/2021

N	Nombre del canino	Sexo	Edad	Lugar donde duerme la mascota	Desparasitación	Parasitado	Fecha recolección de muestra	Fecha de la desparasitación	Fecha de recolección del parásito
16	Ratita	H	3 meses	Casa	Si	No	16/03/2021	17/03/2021	-----
17	Joli	M	9 meses	Terraza	No	No	16/03/2021	17/03/2021	-----
18	Coki	H	6 meses	Casa	No	No	16/03/2021	17/03/2021	-----
19	Negra	H	3 meses	Terreno	No	Si	16/03/2021	17/03/2021	18/03/2021
20	Tarzán	M	11 meses	Terreno	Si	No	16/03/2021	17/03/2021	-----
21	Monito	M	7 meses	Casa	No	No	17/03/2021	18/03/2021	-----
22	Oso	M	1 año	Terraza	Si	No	17/03/2021	18/03/2021	-----
23	Max	M	6 años	Casa	No	No	17/03/2021	18/03/2021	-----
24	Sony	M	1 mes	Terreno	No	Si	17/03/2021	18/03/2021	19/02/2021
25	Ema	H	6 meses	Casa	No	No	17/03/2021	18/03/2021	-----
26	Once	M	3 meses	Terreno	No	Si	17/03/2021	18/03/2021	19/03/2021
27	Chispita	H	4 meses	Casa	No	No	17/03/2021	18/03/2021	-----
28	Balu	M	8 meses	Casa	No	No	17/03/2021	18/03/2021	-----
29	Nala	H	2 años	Casa	No	No	17/03/2021	18/03/2021	-----
30	Bixer	M	2 meses	Casa	No	No	17/03/2021	18/03/2021	-----

N	Nombre del canino	Sexo	Edad	Lugar donde duerme la mascota	Desparasitación	Parasitado	Fecha de recolección de la muestra	Fecha de desparasitación	Fecha de recolección del parásito
31	Brenda	H	6 años		No	No	22/03/2021	23/03/2021	-----
32	Rio	M	2 meses	Terreno	No	Si	22/03/2021	23/03/2021	24/03/2021
33	Rumi	M	2 meses	Casa	Si	No	22/03/2021	23/03/2021	-----
34	Suri	M	2 meses	Terraza	Si	No	22/03/2021	23/03/2021	-----
35	Tita	H	2 meses	Terraza	No	si	22/03/2021	23/03/2021	24/03/2021
36	Blanco	H	6 meses	Casa	No	No	22/03/2021	23/03/2021	-----
37	Beatriz	M	9 meses	Casa	No	No	22/03/2021	23/03/2021	-----
38	Shikan	M	5 años	Casa	No	No	22/03/2021	23/03/2021	-----
39	Max	M	1 año	Casa	No	No	22/03/2021	23/03/2021	-----
40	Bujía	M	1 año	Casa	No	No	22/03/2021	23/03/2021	-----
41	Rey	M	3 meses	Casa	No	No	23/03/2021	24/03/2021	-----
45	Líder	M	4 meses	Terreno	No	No	23/03/2021	24/03/2021	-----
43	Firulais	M	1 mes	Terreno	No	Si	23/03/2021	24/03/2021	25/03/2021
44	Pimpa	H	9 meses	Terreno	No	No	23/03/2021	24/03/2021	-----
45	Kim Kong	M	1 mes	Terreno	Si	No	23/03/2021	24/03/2021	-----

N	Nombre del canino	Sexo	Edad	Lugar donde duerme la mascota	Desparasitación	Parasitado	Fecha de recolección de la muestra	Fecha de desparasitación	Fecha de recolección del parásito
46	Pandora	H	4 años	Terreno	No	No	29/03/2021	30/03/2021	-----
47	Nieve	H	6 meses	Casa	No	No	29/03/2021	30/03/2021	-----
48	Sofia	H	6 mese	Casa	Si	No	29/03/2021	30/03/2021	-----
49	Pulgas	M	5 años	Terreno	No	No	29/03/2021	30/03/2021	-----
50	Lobo	M	2 años	Casa	No	No	29/03/2021	30/03/2021	-----
51	Pitufina	H	8 meses	Terreno	Si	No	29/03/2021	30/03/2021	-----
52	Paco	H	2 meses	Casa	No	Si	29/03/2021	30/03/2021	31/03/2021
53	Kiko	M	2 meses	Casa	No	Si	29/03/2021	30/03/2021	31/03/2021
54	Loba	H	7 meses	Terreno	No	Si	29/03/2021	30/03/2021	31/03/2021
55	Blanco	M	8 meses	Terraza	Si	No	29/03/2021	30/03/2021	-----
56	Spanki	M	4 meses	Casa	Si	No	05/04//2021	06/04//2021	-----
57	Caramelo	M	1 mes	Terreno	No	Si	05/04//2021	06/04//2021	07/04/2021
58	Rayo	M	1 año	Terraza	No	No	05/04//2021	06/04//2021	-----
59	Luna	H	2 años	Casa	No	No	05/04//2021	06/04//2021	-----
60	Nena	H	9 meses	Terraza	Si	No	05/04//2021	06/04//2021	-----

N	Nombre del canino	Sexo	Edad	Lugar donde duerme la mascota	Desparasitación	Parasitado	Fecha de recolección de la muestra	Fecha de desparasitación	Fecha de recolección del parásito
61	Oso	M	2 años	Terraza	No	No	05/04//2021	06/04//2021	-----
62	Kitty	H	3 años	Casa	No	No	05/04//2021	06/04//2021	-----
63	Pitufo	M	9 años	Terreno	No	No	05/04//2021	06/04//2021	-----
64	Coketa	H	2 meses	Casa	No	Si	05/04//2021	06/04//2021	07/04/2021
65	Balto	M	5 años	Casa	No	No	05/04//2021	06/04//2021	-----
66	Oso	M	4 meses	Terraza	No	Si	12/04/2021	13/04/2021	14/04/2021
67	Asla	H	4 meses	Casa	Si	Si	12/04/2021	13/04/2021	14/04/2021
68	Francisco	M	7 meses	Terraza	No	No	12/04/2021	13/04/2021	-----
69	Memo	M	5 años	Casa	Si	No	12/04/2021	13/04/2021	-----
70	Dulce María	H	4 años	Casa	No	No	12/04/2021	13/04/2021	-----
72	Mordelón	M	8 años	Casa	No	No	12/04/2021	13/04/2021	-----
73	Pulguita	M	5 meses	Terreno	No	No	12/04/2021	13/04/2021	-----
74	Pancha	H	5 años	Casa	No	No	12/04/2021	13/04/2021	-----
75	Daniela	H	4 años	Casa	No	No	12/04/2021	13/04/2021	-----
76	Bruno	M	7 meses	Casa	Si	No	12/04/2021	13/04/2021	-----

N	Nombre del canino	Sexo	Edad	Lugar donde duerme la mascota	Desparasitación	Parasitado	Fecha de recolección la muestra	de	Fecha de desparasitación	de	Fecha de recolección del parásito
77	Frutilla	H	2 meses	Casa	No	Si	19/04/2021		20/04/2021		21/04/2021
78	Lili	H	1 año	Terreno	Si	No	19/04/2021		20/04/2021		-----
79	Max	M	9 meses	Terreno	Si	No	19/04/2021		20/04/2021		-----
80	Niño	M	4 meses	Terreno	No	No	19/04/2021		20/04/2021		-----
81	Dok	M	2 meses	Terreno	No	Si	19/04/2021		20/04/2021		21/04/2021
82	Batman	M	8 meses	Terraza	Si	No	19/04/2021		20/04/2021		-----
83	Princesa	H	3 años	Terreno	No	No	19/04/2021		20/04/2021		-----
84	Príncipe	M	5 meses	Terraza	No	Si	19/04/2021		20/04/2021		21/04/2021
85	Osito	M	1 meses	Terreno	No	Si	19/04/2021		20/04/2021		21/04/2021
86	Chiki	H	6 meses	Terreno	Si	No	28/04/2021		29/04/2021		-----
87	Alana	H	2 años	Casa	Si	No	28/04/2021		29/04/2021		-----
88	Newton	M	4 meses	Casa	No	No	28/04/2021		29/04/2021		-----
89	Gabo	M	7 meses	Terreno	No	No	28/04/2021		29/04/2021		-----
90	Rey Cabezas	M	9 meses	Casa	No	No	28/04/2021		29/04/2021		-----
91	Zoe	H	11 meses	Terraza	No	No	28/04/2021		29/04/2021		-----

N	Nombre del canino	Sexo	Edad	Lugar donde duerme la mascota	Desparasitación	Parasitado	Fecha de recolección de la muestra	Fecha de desparasitación	Fecha de recolección del parásito
92	Thiago	M	5 meses	Terreno	Si	No	03/05/2021	04/05/2021	-----
93	Chiripa	H	4 meses	Terreno	No	No	03/05/2021	04/05/2021	-----
94	Agust	M	1 año	Casa	No	No	03/05/2021	04/05/2021	-----
95	Teo	M	2 meses	Terraza	No	Si	03/05/2021	04/05/2021	05/05/2021
96	Hachi	M	2 meses	Terraza	No	Si	03/05/2021	04/05/2021	05/05/2021
97	Scooby	M	3 meses	Terraza	Si	No	03/05/2021	04/05/2021	-----
98	Toby	M	4 meses	Terreno	Si	No	03/05/2021	04/05/2021	-----
99	Lucas	M	1 mes	Terreno	No	Si	03/05/2021	04/05/2021	05/05/2021
100	Chispa	H	6 meses	Terreno	No	No	03/05/2021	04/05/2021	-----
101	Odie	M	2 meses	Terreno	No	No	03/05/2021	04/05/2021	-----
102	Mil	H	4 años	Terreno	No	No	03/05/2021	04/05/2021	-----
103	Alf	M	2 años	Terreno	No	No	03/05/2021	04/05/2021	-----
104	Ken	M	9 meses	Casa	No	No	03/05/2021	04/05/2021	-----
105	Luke	M	3 meses	Terreno	No	Si	03/05/2021	04/05/2021	05/05/2021
106	Gordo	M	1 mes	Casa	Si	No	03/05/2021	04/05/2021	-----

Anexo N° 5 Desparasitación en diferentes barrios de Salcedo

Figura N° 8 Barrio San Marcos



Figura N° 9 Rumipamba de Nabas



Figura N° 10 Barrio San Isidro



Figura N° 11 Barrio Económico



Figura N° 12 Expulsión del parásito adulto *Toxocara canis*.

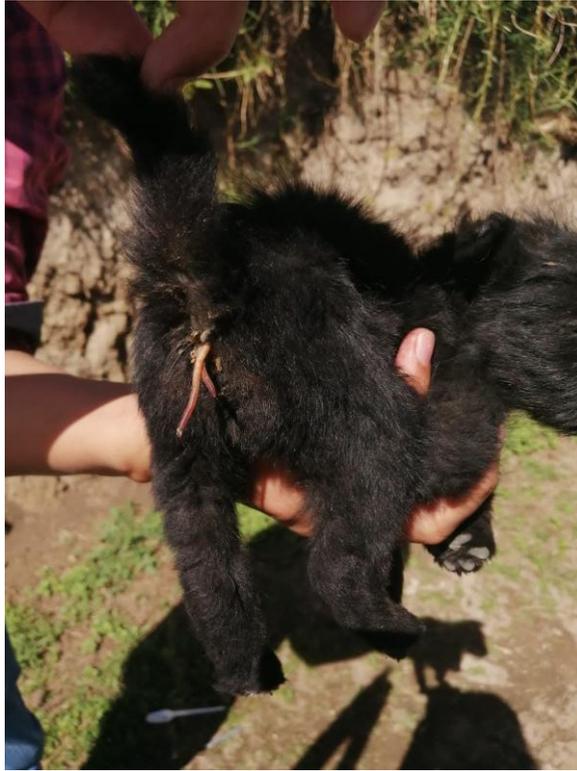
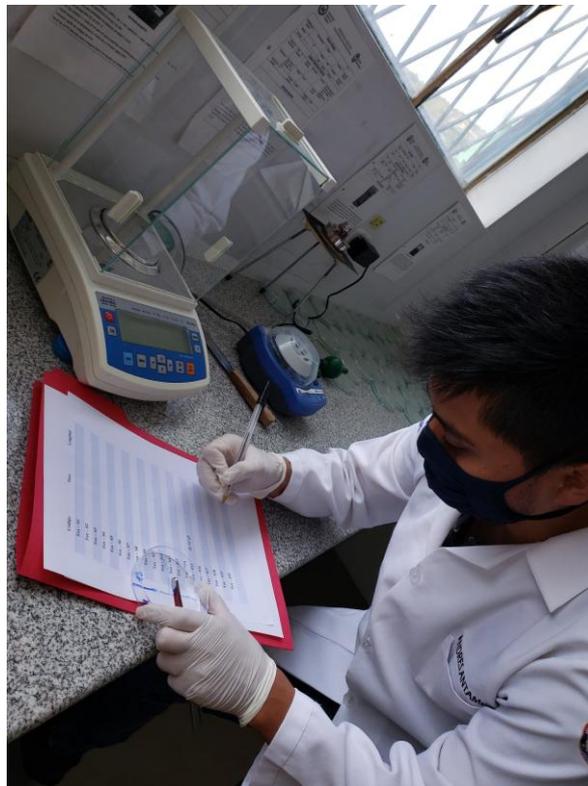


Figura N° 13 Toma de pesos



Anexo N° 6 Aval del Traductor

CENTRO
DE IDIOMAS

AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que:

La traducción del resumen al idioma Inglés del proyecto de investigación cuyo título versa: “**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL ADN EN TOXOCARA CANIS EN CANINOS EN SALCEDO**” presentado por: **Marco Andrés Antamba Yépez y Mayra Jessenia Milán Chariguaman**, egresados de la Carrera de: **Medicina Veterinaria**, perteneciente a la **Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales**, lo realizaron bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo a los peticionarios hacer uso del presente aval para los fines académicos legales.

Latacunga, agosto del 2021

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, reading 'Erika Borja', written over a dashed horizontal line.

Msc. Borja Salazar Erika Cecilia

**DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS-
UTC**

CC: 0502161094



Firmado electrónicamente por:

MARCO PAUL
BELTRAN
SEMBLANTES



CENTRO
DE IDIOMAS