

UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL

SEDE ATENAS

MEDICINA VETERINARIA CON ÉNFASIS EN BUIATRÍA

ESTIMACIÓN DE LA PREVALENCIA DE PARÁSITOS

**GASTROINTESTINALES EN PERROS Y GATOS CON PROPIETARIO POR
MEDIO DE TÉCNICAS COPROPARASITOLÓGICAS Y CONFIRMACIÓN
MOLECULAR A PATÓGENOS ATÍPICOS EN MUESTRAS REMITIDAS AL
LABORATORIO DIAGNÓSTICO ALBEITAR EN EL PRIMER SEMESTRE DEL
2023**

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA CON ÉNFASIS EN BUIATRÍA**

KRISTEL ASTORGA GARCÍA

ATENAS, COSTA RICA

2024

DECLARACIÓN JURADA

Yo Kristel Astorga García portadora de la cédula de identidad número 1-1538-0402 estudiante de la Universidad Técnica Nacional, UTN en la carrera de Medicina Veterinaria con Énfasis en Buiatría, conocedor (a) de las sanciones legales con que la Ley Penal de la República de Costa Rica castiga el falso testimonio y el delito de perjurio que pueda ocasionarse ante el (la) Director (a) de Carrera y quienes constituyen el Tribunal Examinador de este trabajo de investigación, juro solemnemente que este trabajo de investigación es una obra original respetando las leyes y que ha sido elaborada siguiendo las disposiciones exigidas por la Universidad Técnica Nacional, UTN, así como con los derechos de autor.

En fe de lo anterior, firmamos en la ciudad de Atenas, a los 13 días del mes de setiembre del 2024.

Kristel Astorga García

1-1538-0402

HOJA DE APROBACIÓN

Este Trabajo Final de Graduación fue aprobado por el Tribunal Examinador como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Medicina Veterinaria con Énfasis en Buiatría.

Josué Rivera Castillo
Director de Carrera

PhD. Alicia Rojas Araya
Tutor del TFG

Dra. Irene Alvarado Hidalgo
Co tutor del TFG

Dr. Alberto Solano Barquero
Lector del TFG

Dra. Ana María Bolaños Chaves
Lector del TFG

DEDICATORIA

Primero a Dios por darme la vida, salud y las fuerzas para salir adelante y cumplir mi sueño de ser Médico Veterinaria. Deseo ahora poner mi profesión y conocimiento a disposición de mis pacientes con sabiduría y mucho empeño.

A mi familia por haber creído en mí y darme siempre su apoyo. Principalmente a mi padre Freddy Astorga Castro, que si estuvieras presente estarías sumamente orgulloso de mí y a mi madre Damaris García Meléndez, por ser mi motor e inspiración en los momentos más difíciles, mi compañera en este viaje de desarrollo académico y personal, por ser incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora PhD. Alicia Rojas Araya por acompañarme durante todo este proceso siempre con disposición y paciencia, además por motivarme y transmitirme sus conocimientos.

A mi lector el Dr. Alberto Solano Barquero por sus valiosos aportes, por todos los conocimientos transmitidos y siempre su gran disposición.

Al laboratorio de Helminología, de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, principalmente a su técnico Cristian Fonseca, la estudiante Amanda Conejo y el equipo de TCU, quienes con toda la disposición colaboraron arduamente en el procesamiento de muestras.

A mi Co tutora la Dra. Irene Alvarado Hidalgo por creer en mí, por su positivismo, disposición y consejos desde que se inició este proyecto.

A mi lectora la Dra. Ana María Bolaños Chaves quien siempre vio potencial en mí en el área de laboratorio y me ha ayudado a formar parte de mi conocimiento académico.

Al Dr. Javier Coen Alfaro por abrirme las puertas de su laboratorio y ser un guía muy importante en mi formación laboral y académica. Por haber creído en mí y colaborar con mi crecimiento profesional.

Al laboratorio Diagnóstico Albeitar y todo su equipo de trabajo, compañeros que me vieron crecer y cumplir mi sueño. Además, por su colaboración en el desarrollo de este proyecto.

A mi director de carrera el Dr. Josué Rivera Castillo quien vio siempre mi

potencial y me brindó todo su apoyo incondicional durante toda la carrera.

A mis amigas y hermanas Emerita, Miriam y Vanessa, porque sin el empujón y apoyo de ellas no estaría hoy disfrutando de esta hermosa experiencia.

A mi persona por ser capaz de superar todos los obstáculos sin darme por vencida, por mi perseverancia y arduo esfuerzo, por lograr mi sueño. Y a mis familiares por creer en mí, enseñarme y motivarme a luchar por mis metas.

RESUMEN

La estudiante Kristel Astorga García, realizó un estudio que se tituló “Estimación de la prevalencia de parásitos gastrointestinales en perros y gatos con propietario por medio de técnicas coproparasitológicas y confirmación molecular a patógenos atípicos en muestras remitidas al laboratorio Diagnóstico Albeitar en el primer semestre del 2023”.

Se examinaron 1164 heces, en donde 1044 de los casos corresponden a caninos y 120 a felinos. Las muestras se analizaron por medio de dos técnicas coproparasitológicas (flotación con sulfato de zinc y sedimentación) y se observó que la flotación detectó en mayor proporción cualquier tipo de parasitosis. Se obtuvieron 438 muestras fecales positivas y una prevalencia mayor por parte de los ancylostomatideos (21.3%) en caninos y de *Giardia duodenalis* (12.50%) en felinos. La presencia o ausencia de cualquier parasitosis gastrointestinal se relacionó con respecto a algunas variables (especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal) que permitieron determinar si había relación estadísticamente significativa o no.

Finalmente, los parásitos atípicos fueron detectados únicamente por sedimentación, además fueron analizados molecularmente y se obtuvieron árboles filogenéticos, en donde se determinó que *Spirometra mansoni*, no debe su evolución a una estratificación geográfica, contrario a *Spirocercia lupi* que se genera de evolución en las mismas zonas geográficas.

Palabras claves: Heces, parásitos gastrointestinales, flotación, sedimentación, confirmación molecular.

ABSTRACT

The student Kristel Astorga García conducted a study titled 'Estimation of the prevalence of gastrointestinal parasites in dogs and cats with owners through coproparasitological techniques and molecular confirmation of atypical pathogens in samples sent to the Albeitar Diagnostic Laboratory in the first semester of 2023.'

A total of 1164 fecal samples were analyzed, of which 1,044 cases were from canines and 120 from felines. These samples were analyzed using two coproparasitological techniques (zinc sulfate flotation and sedimentation), and it was observed that flotation detected any type of parasitosis in a higher proportion. Additionally, 438 fecal samples tested positive, with a higher prevalence of hookworms (21.3%) in dogs and *Giardia duodenalis* (12.50%) in cats. The presence or absence of any gastrointestinal parasitosis was related to certain variables (species, sex, geographic location, age group, and fecal consistency), which allowed for the determination of whether there was a statistically significant relationship.

Finally, atypical parasites were detected only with sedimentation, were analyzed molecularly, and phylogenetic trees were obtained. It was determined that *Spirometra mansoni* does not owe its evolution to geographic stratification, unlike *Spirocercia lupi*, which evolves according to the geographic area.

Keywords: Fecal samples, gastrointestinal parasites, flotation, sedimentation, molecular confirmation.

INDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	18
1.1. Problemática.....	19
1.2. Justificación	20
1.3. Antecedentes.....	21
1.4. Objetivos.....	26
1.4.1. Objetivo General	26
1.4.2. Objetivos específicos	26
1.5. Objeto de la investigación e hipótesis	27
1.5.1. Pregunta de investigación	27
CAPÍTULO II. MARCO TEORICO	17
2.1. Parásitos gastrointestinales más frecuentes en perros y gatos.....	17
2.1.1. <i>Ancylostoma</i> spp.	17
2.1.2. <i>Giardia duodenalis</i>	18
2.1.3. <i>Cystoisospora</i> spp.....	18
2.1.4. <i>Toxocara</i> spp.....	19
2.1.5. <i>Dipylidium caninum</i>	20
2.2. Parásitos gastrointestinales menos frecuentes en el diagnóstico coprológico de perros y gatos.....	21
2.2.1. <i>Spirometra mansoni</i>	21
2.2.2. <i>Trichuris vulpis</i>	22
2.2.3. <i>Spirocerca lupi</i>	22
2.3. Parásitos gastrointestinales zoonóticos y sus implicaciones en salud pública	23
2.4. Técnicas de identificación parasitaria	26
2.4.1. Flotación con sulfato de zinc o Técnica de Faust.....	26

	10
2.4.2. Sedimentación.....	26
2.4.3. Análisis molecular de parásitos atípicos.....	27
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	30
3.1. Ubicación.....	30
3.2. Muestra.....	30
3.2.1. Selección de la muestra	31
3.3. Métodos.....	31
3.3.1. Flotación con sulfato de zinc para identificación de parásitos gastrointestinales en perros y gatos.....	31
3.3.2. Sedimentación para identificación de parásitos gastrointestinales en perros y gatos	32
3.3.3. Extracción de ADN de parásitos gastrointestinales atípicos en el diagnóstico laboratorial	33
3.3.4. Detección de parásitos gastrointestinales atípicos en el diagnóstico laboratorial por medio de PCR.....	35
3.3.5. Análisis filogenético de los parásitos atípicos identificados en muestras fecales	36
3.3.6. Protocolo digital para el manejo de muestras y pacientes sospechosos de portar PGI para médicos veterinarios	36
3.4. Descripción de variables.....	38
3.5. Análisis de datos y método estadístico.....	41
3.5.1. Cálculo de proporción de PGI encontrados en relación con el sexo, la consistencia fecal, el grupo etario y el mes analizado	41
3.5.2. Cálculo de proporción de PGI encontrados por medio de flotación con sulfato de Zinc y sedimentación	42
3.5.3. Cálculo de las prevalencias de PGI en las muestras recolectadas y sus límites de confianza del 95%	42
3.5.4. Análisis bivariados para estudiar posibles asociaciones entre los factores de riesgo en relación con la presencia/ausencia de PGI.....	42
3.5.5. Programa estadístico	43
CAPITULO IV. RESULTADOS	45

4.1. Proporción de parásitos gastrointestinales en relación con el sexo, consistencia fecal, grupo etario y mes analizado	46
4.1.1. Proporción de los parásitos gastrointestinales en relación con la variable sexo de perros y gatos en estudio	46
4.1.2. Proporción de los parásitos gastrointestinales en relación con la variable de consistencia fecal de perros y gatos en estudio	47
4.1.3. Proporción de los parásitos gastrointestinales en relación con la variable de grupo etario en perros y gatos en estudio.....	48
4.1.4. Proporción de los parásitos gastrointestinales en relación con la variable de mes analizado.....	48
4.2. Proporción de parásitos gastrointestinales en heces de perros y gatos en relación con la técnica diagnóstica coproparasitológica (flotación con Sulfato de Zinc y sedimentación).....	49
4.3. Prevalencia de parásitos gastrointestinales de caninos y felinos con propietarios y sus límites de confianza del 95%	51
4.4. Asociación de variables dicotómicas (especie, sexo, consistencia fecal y grupo etario) con la presencia/ausencia de parásitos gastrointestinales.....	53
4.4.1. Asociación cualquier parasitosis gastrointestinal (CONP) con respecto a variables dicotómicas de especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal.....	54
4.4.2. Asociación de la presencia de Helminthiasis (CONH) con respecto a variables dicotómicas de especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal.....	55
4.4.2.1. Asociación de la presencia ancylostomatideos con respecto a variables dicotómicas especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal	57
4.4.2.2. Asociación de la presencia <i>Toxocara</i> spp. con respecto a variables dicotómicas de especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal	58
4.4.3. Asociación de la presencia de protozoarios (CONPROT) con respecto a variables dicotómicas de especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal.....	59
4.4.3.1. Asociación de la presencia <i>Giardia duodenalis</i> con respecto a variables dicotómicas especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal	60

4.4.3.2. Asociación de la presencia <i>Cystoisospora</i> spp. con respecto a variables dicotómicas especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal	61
4.5. Análisis molecular y filogenético de los parásitos atípicos encontrados en algunas muestras fecales en estudio.....	62
CAPITULO V. DISCUSIÓN.....	67
5.1. Proporción de PGI de perros y gatos y su relación con la técnica diagnóstica coproparasitológica	67
5.2. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en perros y gatos	67
5.3. Asociación de la presencia o ausencia de parásitos gastrointestinales con respecto a la especie	69
5.4. Asociación de la presencia o ausencia de parásitos gastrointestinales con respecto al sexo.....	71
5.5. Asociación de la presencia o ausencia de parásitos gastrointestinales con respecto al grupo etario	71
5.6. Asociación de la presencia o ausencia de parásitos gastrointestinales con respecto a la ubicación geográfica	72
5.7. Asociación de la presencia o ausencia de parásitos gastrointestinales con respecto a la consistencia fecal	72
5.8. Análisis del estudio filogenético de <i>Spirometra mansoni</i> y <i>Spirocercalupi</i>	74
CAPITULO VI. CONCLUSIONES	76
CAPITULO VII. RECOMENDACIONES.....	77
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
IX. APÉNDICES.....	89

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Parásitos gastrointestinales zoonóticos de perros y gatos y sus manifestaciones clínicas en el ser humano	25
Cuadro 2. Distribución mensual (enero-junio del 2023) de las muestras fecales de perros y gatos.....	31
Cuadro 3. Descripción de variables (dependientes e independientes) y sus respectivas categorías.....	39
Cuadro 4. Edad y grupo etario de 1044 caninos y 120 gatos de un total 1164 animales incluidos en el estudio.	45
Cuadro 5. Prevalencia global de parásitos intestinales en población en estudio con sus límites de confianza (inferior y superior) del 95%.....	52
Cuadro 6. Prevalencia de parásitos intestinales en población canina en estudio con sus límites de confianza (inferior y superior) del 95%.....	52
Cuadro 7. Prevalencia de parásitos intestinales en población felina en estudio con sus límites (inferior y superior) de confianza del 95%.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proporción de parásitos gastrointestinales, en perros y gatos de un total de 1164 muestras, de acuerdo a la ubicación geográfica de procedencia	46
Figura 2. Proporción de parásitos gastrointestinales, en perros y gatos y su asociación con el sexo de cada especie.	47
Figura 3. Proporción de PGI en 395 heces de perros y 43 de gatos y su asociación con la variable de consistencia fecal.	47
Figura 4. Proporción de PGI en 395 heces de perros y 43 de gatos y su asociación con la variable de grupo etario para cada especie.	48
Figura 5. Proporción de PGI en 395 heces de perros y 43 de gatos de enero a junio del 2023	49
Figura 6. Proporción de parásitos gastrointestinales en 395 muestras positivas de perros y 43 de gatos de un total de 1164 muestras y su comparación con respecto a la técnica diagnóstica (Flotación con Sulfato de Zinc y sedimentación) más efectiva.	50
Figura 7. Forest Plot de variable CONP demostrando la asociación de cualquier parasitosis con las variables dicotómicas de especie, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y consistencia fecal.....	55
Figura 8. Forest Plot de variable CONH, demostrando la asociación de cualquier helmintiasis con las variables dicotómicas de especie, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y consistencia fecal.....	56
Figura 9. Forest Plot de variable ancylostomatideos, demostrando la asociación con las variables dicotómicas de especie, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y consistencia fecal.	57
Figura 10. Forest Plot de variable <i>Toxocara</i> spp., demostrando la asociación con las variables dicotómicas de especie, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y consistencia fecal.	58
Figura 11. Forest Plot de variable CONPROT, demostrando la asociación la presencia o ausencia de cualquier protozoario con las variables dicotómicas de especie, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y consistencia fecal.....	60

- Figura 12.** Forest Plot de variable *Giardia duodenalis* demostrando la asociación con las variables dicotómicas de especie, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y consistencia fecal..... 61
- Figura 13.** Forest Plot de variable *Cystoisospora* spp. demostrando la asociación con las variables dicotómicas de especie, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y consistencia fecal..... 62
- Figura 14.** Análisis filogenético de inferencia bayesiana de un fragmento del gen mitocondrial *cox1* de *Spirometra mansonii* cuyas secuencias fueron obtenidas de muestra fecal de un felino y un canino de la provincia de Guanacaste de Costa 64
- Figura 15.** Análisis filogenético de inferencia bayesiana de un fragmento del gen mitocondrial *cox1* de *Spirocercia lupi* cuyas secuencias fueron obtenidas de dos muestras fecales canino de la provincia de San José, Costa Rica. 65

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice 1. Razones de probabilidad (OR) con intervalo de confianza de 95% para determinar el grado de asociación de estas variables con la presencia de PGI	89
Apéndice 2. Protocolo digital para el manejo de muestras y pacientes sospechosos de portar PGI para médicos veterinarios.	90

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
μL	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CIET	Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales
CONH	Con Helmintiasis
CONP	Con cualquier parasitosis
CONPROT	Con protozoarios
COX1	Subunidad 1 del citocromo oxidasa
Faust	Técnica de flotación con sulfato de zinc
g	Gramos
IC	Intervalo de confianza
Kb	Kilobase
L3	Larva en estadio 3
L4	Larva en estadio 4
L5	Larva en estadio 5
MCMC	Markow Chain Monte Carlo
mg	Miligramos
min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetros
ng	Nanogramo
OR	Odds Ratio o razones de posibilidades
pb	Par de bases
PCR	Reacción de polimerasa en cadena
PGI	Parásitos gastrointestinales
r.p.m	Revoluciones por minuto
spp.	Especie
UCR	Universidad de Costa Rica
χ²	Prueba de Chi cuadrado

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones parasitarias en perros y gatos siguen siendo un importante problema de salud animal, tanto en los países desarrollados como aquellos en vías de desarrollo. El diagnóstico de parasitología veterinaria es uno de los componentes clave de la salud de los animales de compañía, pues estos animales pueden servir como hospederos de muchos parásitos gastrointestinales (PGI), algunos de los cuales pueden fácilmente infectar al ser humano, jugando un papel de hospederos intermedios o accidentales (Kostopoulou et al., 2017; Ziam et al., 2022).

Existen diversas variables que pueden verse implicadas en las infecciones por parásitos intestinales, como las características individuales del hospedero, el manejo, los tratamientos profilácticos y las técnicas diagnósticas (Thamer et al., 2022). Debido a esto, surge la necesidad del adecuado diagnóstico por medio de técnicas coproparasitológicas que permitan detectar frecuencias de las principales infecciones parasitarias intestinales que han ido adquiriendo mayor relevancia y que, por ende, ha inducido a efectos negativos directos e indirectos en la salud pública (Dantas et al., 2020).

El actual diagnóstico de parásitos gastrointestinales (PGI) en animales de compañía, requiere de los avances recientes en las tecnologías de diagnóstico, principalmente del análisis molecular. Este llega a complementar el enfoque tradicional de la microscopía para identificar infecciones parasitarias, principalmente de especies atípicas (Dantas et al., 2020; Kostopoulou et al., 2017).

1.1. Problemática

Actualmente, en Costa Rica, existe un vacío de información relacionado con la evidencia de prevalencia y distribución de las principales infecciones parasitarias intestinales en perros y gatos, por ende, no se logra implementar de manera adecuada las medidas profilácticas y terapéuticas contra estos agentes (Sáenz, 2013). Aunado a esto, la sociedad moderna posee un vínculo humano-mascota más estrecho, siendo este un importante problema desde una perspectiva de salud pública (Alves et al., 2018).

De acuerdo con Morelli et al. (2021), la exposición a parasitosis gastrointestinales con potencial zoonótico es mayor, pues alrededor del 50% de las personas en los países desarrollados viven al menos con un perro o gato. Mientras que, en Costa Rica la población de animales de compañía es grande, según estudios realizados por la escuela de estadística de la Universidad de Costa Rica (2014), las mascotas que predominan son los perros, presentes en cerca del 56% de las viviendas del país, mientras el 15% tiene al menos un gato, siendo ambas especies consideradas como “miembros de la familia”.

Por otro lado, según un estudio nacional sobre tenencia de mascotas en Costa Rica, realizado por World Animal Protection (2016), se afirma que la gran mayoría de los dueños no desparasitan a sus mascotas, ni recogen las excretas. Uno de cada diez propietarios reconoce que sus caninos o felinos excretan en la calle y dos de cada diez dicen que estos salen solos a “pasear” durante el día, por lo cual se asume que estos animales también excretan fuera de la casa. Esto demuestra los hábitos inadecuados de algunos dueños con respecto al manejo correcto de las heces. Como consecuencia, aumenta el riesgo de contaminación ambiental y

se intensifica la exposición humana a ciertas zoonosis (Alho et al., 2018; Alves et al., 2018; Kostopoulou et al., 2017).

Asimismo, aunado a la gran problemática que gira en torno a la salud pública, se une el hecho de que a pesar de que los propietarios deben ser responsables de mantener actualizados los protocolos de medicina preventiva de sus animales con el propósito de que las enfermedades parasitarias intestinales sean detectadas oportunamente, no se hace de la manera adecuada. Incluso, en ocasiones los médicos veterinarios omiten la educación sobre la necesidad e importancia de realizar un análisis coprológico (Dolz et al., 2020). En algunas ocasiones, se tiende a realizar exámenes de heces cuando el paciente ya muestra sintomatología o simplemente se decide suministrar desparasitantes sin realizar la identificación del parásito. Como consecuencia, se pueden pasar por alto casos positivos, errando en el tratamiento y siendo un problema por la convivencia estrecha de las personas con mascotas y facilita el desarrollo de resistencia a antiparasitarios (Alho et al., 2018; Alves et al., 2018).

1.2. Justificación

Mediante el uso de técnicas coprológicas, como la flotación con sulfato de zinc (Técnica de Faust) y sedimentación, se pretende estimar y actualizar los datos sobre la prevalencia de enteroparásitos en perros y gatos de diferentes zonas de Costa Rica. La información generada le permitirá al veterinario, actuar en la consulta médica con conocimiento y criterio científicamente respaldado, con el fin de brindar estrategias diagnósticas confiables o de llevar a cabo medicina preventiva y generar recomendaciones que puedan evitar enfermedades a corto plazo en estos animales de compañía (Morandi et al., 2019).

Por otro lado, la identificación molecular y el análisis filogenético de PGI infrecuentes, llega a convertirse en una herramienta integral, confirmatoria y que le da mayor valor al diagnóstico. Esto permite clasificar entero parásitos, poco documentados a nivel nacional, de forma rápida y precisa, mejorando el diagnóstico microbiológico y el manejo sanitario del animal (Htun et al., 2021; Johe et al., 2019).

Se pretende también brindar datos fiables que le permitan al campo de medicina humana, reconocer qué tan expuestos podrían estar los costarricenses a las zoonosis causadas por PGI de perros y gatos. Generando así la necesidad de educación continua por parte de médicos y microbiólogos, con el fin de promover el adecuado manejo de las excretas de sus mascotas (Kostopoulou et al., 2017).

Por último, el estimar la prevalencia de parásitos gastrointestinales en ambas especies, se revela la importancia de que médicos veterinarios y propietarios de mascotas conozcan sobre los beneficios de realizar un análisis coproparasitológico, que integre técnicas que permitan el óptimo diagnóstico y, por ende, un adecuada profilaxis o tratamiento.

1.3. Antecedentes

Ferreira et al. (2011), en Portugal, llevaron a cabo un estudio de frecuencias de PGI en 126 muestras fecales de perros y 22 de gatos. Los parásitos fueron identificados por medio de la técnica de Faust. A aquellas muestras que resultaron positivas a *Giardia* spp. se les realizó análisis molecular. El examen microscópico confirmó que *Giardia* spp. fue el parásito más frecuente en la población estudiada (34/148; 23%). Además, el estudio molecular, demostró que el patógeno implicado se categorizó como *Giardia intestinalis*. Este trabajo destaca la importancia de los

parásitos protozoarios en los animales de compañía y la necesidad de profilaxis parasitaria. Además, se resalta el uso del PCR como prueba confirmatoria al análisis coproparasitológico.

Por su lado, Joffe et al. (2011) determinaron la prevalencia de parásitos intestinales en un amplio espectro demográfico de perros y gatos en Canadá. Se evaluaron 619 muestras de perros y 153 de gatos, mediante la técnica de flotación con sulfato de zinc. Los parásitos intestinales más comunes en perros fueron *Giardia* spp. (8.1%) y ascarideos (4.2%). Mientras que el endoparásito felino más común fue el ascarideo (6.5%). Este estudio permitió a los veterinarios una mejor planificación de las estrategias diagnósticas y preventivas con respecto a los parásitos intestinales de los animales de compañía.

Campos et al. (2016), en Brasil, determinaron la prevalencia y los factores de riesgo para la endoparasitosis en 345 muestras fecales de perros y 160 de gatos. Para el diagnóstico, se realizaron las técnicas de flotación centrífuga simple de Willis-Molley y sedimentación. Los datos encontrados en las pruebas se tabularon y analizaron con una prueba de chi-cuadrado, y cálculo de odds ratios (OR). La prevalencia de parásitos fue del 59% para los perros y del 54% para los gatos, siendo el género de *Ancylostoma* spp. el más prevalente. Además, se concluyó que, muchos animales no mostraron enfermedad clínica significativa. Aunado a esto, las regiones tropicales favorecen el desarrollo y mantenimiento de formas de parásitos infecciosos, lo cual se relacionó con la alta prevalencia.

Kostopoulou et al. (2017), en Grecia, examinaron 879 muestras fecales de perros y 264 de gatos, utilizando técnicas de sedimentación y flotación con solución de azúcar saturada. Además, se realizó PCR para evaluar el potencial zoonótico

de las muestras positivas para *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. Se tomaron en cuenta datos de edad, el sexo, la raza, las condiciones de vida, la presencia o ausencia de diarrea y la consistencia fecal, para correlacionar con los resultados. Los datos obtenidos mostraron altos niveles de parasitismo tanto en perros, como en gatos, donde *Giardia* spp. fue el parásito más presente en ambas especies. El estudio enfatiza la necesidad de mejorar esquemas de control antiparasitario adaptados a las necesidades individuales del paciente para salvaguardar la salud animal y pública.

Alves et al. (2018), analizaron en Brasil, muestras fecales de 128 perros y 49 gatos, de diferentes edades y sexo. Se realizaron análisis copromicroscópicos utilizando flotación con sulfato de zinc. Como resultado, se observaron uno o más parásitos intestinales en el 56.2 % (72/128) de las muestras fecales de perros y un 53.0 % (26/49) en las de gatos. Además, mediante extracción y secuenciación de ADN de las muestras de las heces, se logró identificar a *Cryptosporidium canis* en el 66.6% (4/6) y *Cryptosporidium parvum* en el 33.3% (2/6) de las muestras caninas y *Cryptosporidium felis* en el 75% (3/4) y *Cryptosporidium parvum* en el 25%(1/4) en las muestras de gatos. Este estudio demostró niveles significativos de infección parasitaria gastrointestinal en animales de compañía y destacó la presencia de agentes zoonóticos.

Castrillón et al. (2019), en Colombia, examinaron los registros de pruebas fecales 1111 perros y 203 gatos enviados a un laboratorio de diagnóstico en la ciudad de Medellín entre enero y mayo de 2018. Todas las muestras se analizaron con tres pruebas diagnósticas: frotis fecal, flotación con solución saturada de sacarosa y flotación con solución de sulfato de zinc. Se detectaron

organismos parásitos en 464 (41.7%) heces de perros y 96 (47.3%) de gatos, en donde *Giardia intestinalis*, fue el agente mayormente encontrado en ambas especies. Estos autores concluyeron que los estudios futuros deben tener como objetivo la implementación de paneles de diagnóstico integrados con técnicas contemporáneas, como la PCR, para que detecten otros patógenos entéricos poco comunes.

Morandi et al. (2019), en Canadá, realizaron un estudio de 17 años para la determinación de la frecuencia y los factores de riesgo de infecciones endoparasitarias de muestras fecales de 15.016 perros y 2.391 gatos. Se realizaron las técnicas diagnósticas de frotis directo, Baermann y flotación con solución de sulfato de zinc. Además, se evaluaron las asociaciones entre las infecciones por endoparásitos con datos de la edad, el sexo, el origen geográfico y la estacionalidad. Los resultados evidenciaron que el PGI más frecuente fue *Giardia duodenalis* para ambas especies. Los autores concluyeron que, este amplio estudio debe ser considerado como un respaldo científico para que los veterinarios clínicos eduquen mejor a sus clientes sobre la aparición de parásitos y utilicen buenos programas preventivos.

Arruda et al. (2021), en Brasil, obtuvieron muestras fecales del recto de 400 perros y 208 gatos durante el examen clínico. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la frecuencia y los factores de riesgo de parásitos intestinales en perros y gatos atendidos, así como georreferenciar a los animales parasitados. Las muestras fecales se sometieron a sedimentación y flotación con solución de sacarosa. Las frecuencias totales de parásitos intestinales en gatos y perros fueron del 11.3% y 24.5%, respectivamente, siendo los ancylostomatideos los

parásitos más detectados en perros (8.3%) y *Dipylidium caninum* en gatos (12.5%). Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la necesidad de controlar las infecciones parasitarias en perros y gatos domiciliados.

A nivel nacional, Fernández et al. (2008) identificaron, por medio de una encuesta, las prácticas de diagnóstico de los PGI de caninos y felinos en ciertas clínicas de la Gran Área Metropolitana. Los resultados demostraron que el 40% de los clínicos entrevistados utilizan combinación de las técnicas de microscopía directa y flotación, seguida por una asociación de microscopía directa, flotación y sedimentación. Además, se logró determinar que los PGI considerados más prevalentes son: ancylostomatideos, seguido por *Toxocara* sp., *Dipylidium caninum*, *Giardia* sp., coccidios, *Trichuris vulpis*, *Capillaria* sp. y *Strongyloides stercoralis*. Dichos autores concluyeron que se pone en manifiesto las prácticas inadecuadas de diagnóstico y de control de los PGI. Además, señalaron la necesidad de realizar eventos de educación continua sobre este tema de importancia para la salud pública.

Por su parte, el estudio de Fernández (2009), en Costa Rica, realizó un análisis retrospectivo de expedientes que incluían 1286 registros de exámenes coproparasitológicos de perros y gatos. Algunas muestras fueron procesadas por medio de flotación, usada como la técnica de predilección para detección de PGI, y otras con microscopía directa. Los datos fueron analizados con estadística descriptiva por medio del cálculo de frecuencias. Los resultados mostraron una presencia de PGI en caninos en donde los ancylostomatideos fueron los más frecuente. Mientras que, en gatos, *Cystoisospora* spp. se presentó en mayor proporción.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Estimar la prevalencia de parásitos gastrointestinales en perros y gatos con propietario mediante flotación con sulfato de zinc, sedimentación, reacción en cadena de la polimerasa, secuenciación de genes y análisis filogenético a patógenos atípicos en muestras remitidas al laboratorio Diagnóstico Albéitar en el primer semestre del 2023 para su clasificación y determinación de factores asociados.

1.4.2. Objetivos específicos

Determinar la prevalencia de los parásitos gastrointestinales en perros y gatos por medio de flotación con sulfato de zinc y sedimentación para la asociación con las variables de consistencia de las heces, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y mes analizado.

Comprobar la Identificación de huevos de parásitos gastrointestinales atípicos a través de reacción en cadena de la polimerasa, secuenciación de genes y análisis filogenético para el estudio de sus relaciones evolutivas y posterior clasificación biológica.

Demostrar la proporción de las infecciones parasitarias de interés público (zoonosis) en ambas especies mediante la identificación y cálculo de estos parásitos gastrointestinales para el desarrollo de un protocolo de manejo de muestras y pacientes sospechosos de portar estos agentes.

1.5. Objeto de la investigación e hipótesis

1.5.1. Pregunta de investigación

¿Cuál es la prevalencia de parásitos gastrointestinales en perros y gatos detectados mediante flotación con sulfato de zinc y sedimentación y cuáles requieren análisis molecular?

CAPÍTULO II. MARCO TEORICO

2.1. Parásitos gastrointestinales más frecuentes en perros y gatos

Las enfermedades gastrointestinales causadas por parásitos, en ocasiones son diagnosticadas en la rutina clínica, siendo *Ancylostoma* spp., *Giardia duodenalis*, *Cystoisospora* spp., *Toxocara* spp. y *Dipylidium caninum*, los PGI más frecuentes. La aparición de signos clínicos depende de la especie del parásito, la carga parasitaria y algunas parasitosis se encuentran influenciadas por la edad y el estado del sistema inmune del animal. Por lo tanto, estas infecciones podrían ser asintomáticas o progresar con la aparición de trastornos gastrointestinales de moderados a graves, retraso del crecimiento y anorexia o incluso pueden provocar la muerte del paciente (Iturbe et al., 2021; Souza et al., 2023).

2.1.1. *Ancylostoma* spp.

Ancylostoma spp. es un importante nemátodo gastrointestinal de perros y gatos que se localiza en el intestino delgado como sitio de predilección (Zajac et al., 2021). Los ancylostomatideos que infectan a los animales de compañía en América incluyen *Ancylostoma caninum* en perros, *Ancylostoma tubaeforme* en gatos y *Ancylostoma braziliense* en ambos hospederos (Taylor et al., 2015). Este parásito se encuentra con mayor frecuencia en regiones tropicales y subtropicales donde es capaz de sobrevivir ante diversas condiciones ambientales (Montgomery, 2020).

Las larvas ingresan al animal penetrando la piel y son transportadas a través de los vasos sanguíneos al corazón, luego a los pulmones, alvéolos pulmonares,

ascienden por los bronquios hasta la faringe y se tragan, para llegar al intestino delgado, donde residen y maduran en adultos. Los gusanos adultos se adhieren a la pared intestinal debido a que poseen una cápsula bucal grande con dientes marginales afilados, lo que les permite adherirse a la mucosa e ingerir aproximadamente 0.1 mL de sangre diariamente, generando así una anemia ferropriva e hipoproteïnemia en pacientes con gran infestación (Sykes, 2022).

2.1.2. *Giardia duodenalis*

Giardia duodenalis es un protozooario entérico flagelado ubicado en el intestino delgado y es común en perros y gatos. La presentación de la infección se encuentra influenciada por la edad (siendo los cachorros lo más propensos debido al sistema inmune en desarrollo), el estado clínico y el alojamiento (Zajac et al., 2021). Este parásito se logra detectar en dos formas: el trofozoïto (forma activa y móvil, no infectante) y el quiste (forma parasitaria infectante) (Sykes, 2022).

2.1.3. *Cystoisospora* spp.

El género *Cystoisospora* pertenece al Phylum Apicomplexa, por poseer un complejo apical que le permite penetrar la célula hospedadora, considerándose un parásito intracelular obligado (Zajac et al., 2021). Los gatos y los perros se infectan por la ingesta de ooquistes esporulados o de hospedadores paraténicos como roedores, conejos, pájaros y otros animales de presa (Sykes, 2022; Taylor et al., 2015).

Después del desarrollo en el hospedador final, los ooquistes pasan a las heces y experimentan esporulación en el medio ambiente. Sin embargo, no es

considerado como un parásito zoonótico, por lo que este no genera mayor riesgo sanitario a los propietarios (Zajac et al., 2021).

Por su lado, la coccidiosis clínica ocurre con más frecuencia en cachorros, a menudo en asociación con el destete, el cambio de propietario u otros factores de estrés. Los signos incluyen diarrea (con heces pastosas), dolor abdominal, anorexia y pérdida de peso. En casos severos, puede ocurrir diarrea sanguinolenta y anemia. Incluso Dubey y Lindsay (2019), mencionan que, en un estudio realizado en Australia, se determinó que los perros menores de dos años estaban infectados con *Cystoisospora* spp. y el 78% de las muestras positivas pertenecía a cachorros menores de cuatro meses. Por lo que se cree que la fuente de infección más probable en los cachorros son los ooquistes excretados por sus madres. Sin embargo, no se descarta que, en los animales adultos tratados con medicamentos inmunosupresores o con patologías inmunosupresoras, también puedan sufrir de una cistosisporiasis (Murnik et al., 2023; Sykes, 2022).

2.1.4. *Toxocara* spp.

Toxocara spp. es un nematodo gastrointestinal que se ubica en el intestino delgado de perros (*Toxocara canis*) y gatos (*Toxocara cati*). Este parásito se transmite al hospedero a través de numerosas rutas, incluida la ingesta de huevos embrionados del medio ambiente o la ingestión de un hospedero paraténico (Zajac et al., 2021). Sin embargo, las vías de transmisión transplacentaria y transmamaria, son muy comunes, razón por la cual muchos cachorros nacen infectados o se infectan en edad temprana.

La migración de las larvas en el hospedero es compleja y está influenciada

por la edad, la vía de infección y la inmunidad. En mascotas adultas, la enfermedad puede cursar de forma asintomática o el animal podría presentar signos clínicos inespecíficos (Dolz et al., 2020; Murnik et al., 2023; Taylor et al., 2015).

Los huevos eclosionan en el duodeno y la L3 penetra la pared del intestino delgado para entrar en circulación. En aproximadamente 24 horas, las larvas circulantes son transportadas al hígado a través de la vena porta donde salen a través de la vena cava y son llevados a los pulmones. Las larvas salen de la circulación a través de los alvéolos y luego llegan al tracto gastrointestinal. Una vez en el estómago, la L3 muda a L4 y, posteriormente, ocurre otra muda a la L5, etapa que se produce en el intestino delgado (Sykes, 2022).

En perros y gatos, la enfermedad puede cursar con una infección latente con larvas que se enquistan en varios tejidos o una infección patente donde se da la deposición de huevos no embrionados en las heces, los cuales se vuelven infectantes en 9-15 días, incluso podría mantenerse viables en el suelo por diversos días (Dolz et al., 2020).

2.1.5. *Dipylidium caninum*

Dipylidium caninum es una tenía común de perros y gatos, de cualquier edad, que se ubica predilectamente en el intestino delgado. El hospedero intermediario suele ser las etapas larvales de la pulga del perro o gato (*Ctenocephalides* spp.) y ocasionalmente *Trichodectes canis* (el piojo del perro) (Pandey et al., 2022).

La mayoría de las infecciones por *Dipylidium caninum* son asintomáticas (Ünal, y Gokpinar, 2020). Sin embargo, las mascotas pueden exhibir un comportamiento para aliviar el prurito anal (como raspar la región anal a través

de superficies). En otras ocasiones, pueden ocurrir trastornos gastrointestinales leves (Pandey et., 2022). La característica más llamativa en animales son los segmentos de tenia en el área perianal o en las heces observado por los propietarios.

2.2. Parásitos gastrointestinales menos frecuentes en el diagnóstico coprológico de perros y gatos

Existen PGI menos comunes en el diagnóstico laboratorial, esto podría generarse debido a que no se usan las técnicas diagnósticas adecuadas para su identificación, que no se posea habilidad para su detección microscópica y que son parásitos con un ciclo que ocurre con menor frecuencia (Iturbe et al., 2021). Algunos de estos patógenos son: *Spirometra mansoni*, *Trichuris vulpis* y *Spirocerca lupi*.

2.2.1. *Spirometra mansoni*

Spirometra mansoni es un cestodo del intestino delgado de felinos y cánidos. Los datos epidemiológicos han demostrado que el consumo de carnes exóticas por parte de humanos y animales es la principal forma de contagio (Zajac et al., 2021). Los gatos, como especie a la que se suele permitir la libertad y que tienen la costumbre de cazar pequeños anfibios y reptiles, son los más propensos a ser el reservorio y dispersor de este patógeno. Sin embargo, tanto felinos, como caninos, generalmente son asintomáticos, pero pueden presentar pérdida de peso progresiva, anemia severa y engrosamiento de la pared intestinal (Badri et al., 2022; Taylor et al., 2015).

2.2.2. *Trichuris vulpis*

Trichuris vulpis es un nematodo, cuyas larvas entran en la mucosa a través de las criptas de Lieberkühn donde permanecen bien enrollados durante 6 a 15 días. Luego empiezan a generar una destrucción menor de las células del tejido del hospedero y las larvas entran al lumen, donde viajan al ciego o colon y entran a la mucosa (Sykes, 2022). Por lo que la infección por tricocéfalos puede generar diarrea, inapetencia o anorexia, deshidratación, pérdida de peso y debilidad (Bowman et al., 2013).

Con lo que respecta a implicaciones en salud pública, se ha propuesto la transmisión zoonótica de *T. vulpis* con informes que indican una incidencia que oscila entre <0.2% y >7% con infecciones principalmente en niños. Sin embargo, se requiere de mayor estudio para corroborar y sustentar el potencial zoonótico (Sykes, 2022).

2.2.3. *Spirocerca lupi*

De acuerdo con Rojas et al. (2020), *Spirocerca lupi* es un nematodo que causa en perros una enfermedad llamada espirocercosis. Esta infección se obtiene por la ingesta de escarabajos coprófagos y suele asociarse con nódulos esofágicos e infecciones secundarias. Este PGI se encuentra ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales cálidas (Giannelli et al., 2014). Diferentes estudios indican que la edad de los perros no es un factor asociado a la infección con *S. lupi*. Sin embargo, Rodríguez et al. (2019), mencionan en su estudio que los perros positivos a *S. lupi*, fueron perros adultos o geriátricos con edades de 4 a 12 años.

Spirocerca lupi en forma de L3, se alberga en la mucosa gástrica del perro

para posteriormente penetrar la pared del intestino y de esa forma lograr una migración a las arterias gástricas, generando vómito e irritación (Taylor et al., 2015). El último sitio donde se ubica *S. lupi* como adulto, es en el esófago, pero podría generar una migración aberrante en la cavidad torácica, sistema nervioso, tejidos subcutáneos o tracto urinario (Giannelli et al., 2014; Rojas et al., 2020). Sin embargo, este parásito no representa riesgo para la salud pública, ya que no se cataloga como una zoonosis (Taylor et al., 2015).

2.3. Parásitos gastrointestinales zoonóticos y sus implicaciones en salud pública

El perro y gato juegan un papel importante en la transmisión de parásitos zoonóticamente importantes, ya que las excreciones fecales albergan diversas etapas infecciosas de PGI que logran resistir a diversos ambientes y temperaturas. Además, el tráfico vehicular, así como el viento, la adherencia de heces a calzado o plantillas de otros animales, entre otros factores pueden ayudar a propagar los patógenos presentes en dichas muestras, contaminando más suelos, fuentes de agua y de alimentos (Kuzi et al., 2020). Además, el contacto cercano de los humanos con caninos y felinos no tratados, más la ausencia de prácticas adecuadas de desparasitación y las condiciones climáticas favorables, son de los factores que permiten supervivencia de las etapas infecciosas (Ezema et al., 2019; Khan et al., 2019).

Por lo tanto, resulta fácil que el ser humano, y principalmente aquellos individuos con un sistema inmune poco desarrollado o comprometido como niños pequeños, ancianos y personas con enfermedades inmunodepresoras, puedan infectarse a través de vía oral-fecal, contacto con la piel, entre otros. Por

consecuencia, estas enfermedades generan manifestaciones clínicas que van desde leves dolores estomacales, hasta migraciones de larvas a nivel ocular o neuronal, produciendo así pérdidas directas e indirectas a la salud. Esto enfatiza la necesidad de una mejor estrategia de control sobre PGI, adaptada a las necesidades individuales de los animales, con el fin de proteger la salud animal y pública (Ezema et al., 2019).

A continuación, se evidencia los parásitos en estudio con potencial zoonótico, así como sus implicaciones en la salud humana (Cuadro 1).

Cuadro 1.

Parásitos gastrointestinales zoonóticos de perros y gatos y sus manifestaciones clínicas en el ser humano

Parásito	Vía de transmisión	Enfermedad	Manifestación clínica
<i>Ancylostoma</i> spp.	Cutánea	Larva migrans cutánea	Reacción inflamatoria, eritematosa y con prurito
<i>Giardia duodenalis</i>	Fecal/oral	Giardiasis	Diarrea aguda, líquida con muco, fétida con abundante dolor abdominal. Mala absorción
<i>Toxocara</i> spp.	Fecal/oral	Larva migrans visceral, ocular, neural	La clínica dependerá del órgano afectado
<i>Dipylidium caninum</i>	Ingesta de pulga (<i>Ctenocephalides</i> spp) infectada	Dipilidiasis	Asintomáticos. Eliminación de proglótides móviles
<i>Spirometra mansoni</i>	Ingesta de hospederos intermedios infectados o agua contaminada	Esparganosis	La clínica dependerá del órgano afectado

Fuente: Propia, adaptado de Bowman et al., 2013; Bradbury y Hobbs 2020; Dolz et al., 2020; Horton et al., 2019; Lima et al., 2020; Montgomery, 2020; Rodríguez et al., 2021; Sykes, 2022; Taylor et al., 2015; Zajac et al., 2021.

2.4. Técnicas de identificación parasitaria

2.4.1. Flotación con sulfato de zinc o Técnica de Faust

La utilización del término flotación con Sulfato de Zinc o también conocida como técnica de Faust, se usó por primera vez en 1928, cuando Faust y sus colaboradores, describieron que gracias a esta técnica se podía recuperar la mayoría de los quistes de protozoarios y huevos livianos (Dib et al., 2019).

Debido a lo mencionado anteriormente, la flotación con sulfato de zinc se ha considerado como la técnica más recomendable para la identificación de los quistes de protozoarios. Esto debido a que la densidad (1.18 g/mL) de este reactivo es relativamente baja en comparación con la de otros tipos de soluciones, tales como: solución de nitrato de sodio (densidad: 1.2 g/mL) o nitrato de sodio saturado (densidad: 1.33 g/mL), cloruro de sodio saturado (densidad: 1.2 g/mL) o solución de sulfato de magnesio (densidad: 1.32 g/mL) y la solución de sacarosa (Sheather) (densidad: 1.2 – 1.25 g/mL) (Soares et al., 2020; Zajac et al., 2021).

Sin embargo, al ser un reactivo que permite la detección de huevecillos livianos, se recomienda la integración con otra técnica coparásitológica que permita el obtener formas parasitarias de mayor peso y tamaño, como el caso de la sedimentación. Además, el sulfato de zinc no se recomienda para la detección de huevecillos operculados, porque el fluido ingresa al huevecillo y lo sedimenta (Rodríguez et al., 2023; Soares et al., 2020).

2.4.2. Sedimentación

La sedimentación es una técnica que se usa para la detección de helmintos con huevos más pesados (tremátodos, cestodos e incluso algunos nematodos),

cuyos huevos no flotan fácilmente en soluciones de flotación comunes. Esto debido a que las formas parasitarias son recuperadas directamente del sedimento que fue previamente filtrado. Cabe mencionar que la sedimentación no solo aumenta el número de parásitos en el sedimento, sino también los desenmascaran, haciéndolos más visibles mediante la eliminación de desechos orgánicos e inorgánicos (Sykes, 2022; Zajac et al., 2021).

2.4.3. Análisis molecular de parásitos atípicos

Los métodos de diagnósticos coprológicos estándar, actualmente en uso para la identificación de infecciones por PGI en perros y gatos, se basan en el análisis morfológico de las etapas inmaduras y adultas de los parásitos (Tull et al., 2022; Villamiza et al., 2019). Sin embargo, el análisis molecular se convierte en una herramienta integral y confirmatoria. Debido a que la identificación precisa de las especies es necesaria para un diagnóstico adecuado, no solo para la diferenciación de especies sino también para conocer su frecuencia en un sitio (Robleto et al., 2023; Villamiza et al., 2019).

2.4.3.1. Extracción de ADN y PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Las técnicas de base molecular como la extracción de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han sido la nueva frontera, pues permite resultados más precisos en comparación con la técnica de microscopía (Villamiza et al., 2019).

En la extracción de ADN se debe asegurar una lisis mecánica estimulada por calor (95°C) y movimiento, esto con el fin de romper o destruir las células y la materia fecal (Kim et al., 2019). Posteriormente, gracias a la proteinasa K, se favorece una lisis química de las células, ya que dicha enzima digiere y degrada

las proteínas, permitiendo de una mejor manera la salida del material genético. Una vez que el ADN sale de las células, dicho material se adhiere a una columna, la cual mediante concentraciones de sal y las condiciones de pH optimizadas en el lisado, aseguran que los restos de proteínas digeridas y otras impurezas que pueden inhibir la PCR y otras reacciones enzimáticas posteriores, no se retengan (QIAamp® Fast DNA Stool, 2020).

Con lo que respecta al PCR, su principio radica en generar decenas de miles de millones de copias de un fragmento específico de interés de ADN para su posterior amplificación. Para lograr la amplificación de la secuencia de nucleótidos del extracto de ADN, es esencial tener al menos un par de oligonucleótidos (primers). Estos oligonucleótidos, que servirán como cebadores para la replicación, se sintetizan químicamente y deben tener la mejor complementariedad posible con ambos extremos de la secuencia de interés que se desea amplificar (Gupta, 2019). Uno de los cebadores está diseñado para reconocer de forma complementaria una secuencia del fragmento 5' - 3' de ADN de interés y el otro va siempre por complementariedad (Kadri, 2019; Macpherson et al.,2023). El producto de una PCR se puede detectar y analizar mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Así, los productos son instantáneamente visibles por transluminación ultravioleta (Gupta, 2019; Kadri, 2019).

2.4.3.2. Análisis filogenético

La filogenia molecular se utiliza para estudiar las relaciones entre individuos de un grupo taxonómico. De esta manera, se logra inferir la historia evolutiva y establecer los patrones evolutivos de las especies en forma de un árbol. Esto

puede realizarse con las secuencias de ADN, modelos de sustitución de nucleótidos y métodos de construcción de árboles adecuados (Challa y Neelapu, 2019; Fisher et al., 2022).

Un árbol filogenético cuenta con un ancestro común, el cual se ubica en la base del mismo. Por otro lado, las uniones entre ramificaciones, conocidas como nodos, representan uniones de un ancestro, mientras que, las especies finales (organismos de la actualidad) son las que se ubican en los extremos superiores de las ramificaciones. Además, las líneas horizontales indican el tiempo de existencia de una especie, mientras que las líneas verticales, indican la distancia genética entre un individuo y un ancestro (Campbell et al., 2019; Subbotin, 2021).

En lo que respecta al presente estudio, la clasificación y análisis filogenético de los parásitos poco comunes, se hará por medio del método de inferencia Bayesiana, permitiendo calcular la probabilidad que tiene un individuo para relacionarse adecuadamente con un grupo taxonómico y su modelo evolutivo (Subbotin, 2021). Esta inferencia se puede determinar por medio del Teorema de Bayes, el cual, mediante programas computarizados, analiza varios árboles relacionados y para cada uno de ellos evalúa las combinaciones de longitudes de ramas (tiempo que vivió la especie) (Blair y Ané, 2020; Challa y Neelapu, 2019).

Por otro lado, este tipo de estudio filogenético utiliza un algoritmo estadístico conocido como MCMC (Markov Chain Monte Carlo), el cual realiza iteraciones de las ramificaciones hasta obtener una topología parsimoniosa y de esta forma se establece un nuevo árbol que demostrará la clasificación biológica del parásito en estudio (Blair y Ané, 2020; Challa y Neelapu, 2019; Fisher et al., 2022).

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Ubicación

Esta investigación se desarrolló con muestras fecales remitidas a las 3 sedes (Sabana, San Pedro de Montes de Oca y Belén de Heredia) del laboratorio Diagnóstico Albeitar. Las flotaciones con sulfato de zinc fueron procesadas en la respectiva sede donde se enviaron las heces, mientras que las sedimentaciones se llevaron a cabo tanto en la sede de Mata Redonda, San José, como en el laboratorio de Helmintología, de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

El análisis molecular de parásitos atípicos se efectuó tanto, en el laboratorio de Helmintología, como en el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) de la Universidad de Costa Rica. Estos lugares brindaron el equipo necesario y las herramientas que se requirieron para realizar esta investigación.

3.2. Muestra

La muestra constó de un total de 1164 muestras fecales independientes, en donde 1044 de los casos corresponden a caninos y 120 a felinos. Se recolectaron deposiciones fecales de la primera semana de cada mes, abarcando el periodo de enero a junio del 2023. Dichas muestras provinieron de distintas zonas del país.

Las muestras de heces constaron de un volumen mínimo de 4 gramos (g), tanto para felinos como para caninos. Estas se recibieron en el laboratorio en envases herméticos o en bolsas tipo Ziploc®, luego fueron debidamente identificadas con un código único. Por último, se almacenaron a una temperatura

aproximada de 3 °C.

Los datos de cada paciente se obtuvieron de las hojas de solicitud y del sistema de registro Laboratus® usado en laboratorio Diagnóstico Albeitar y posteriormente se recopilaron los resultados en una hoja de cálculo en Excel™.

3.2.1. Selección de la muestra

Las muestras en estudio fueron seleccionadas durante la primera semana de cada mes, de enero a junio del 2023. Estas representaron entre un 25% a 32% del total de muestras recolectadas por mes. La clasificación según su distribución mensual se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2.

Distribución mensual (enero-junio del 2023) de las muestras fecales de perros y gatos

Mes	Cantidad de muestras por especie	
	Perros	Gatos
Enero	165	21
Febrero	177	19
Marzo	181	28
Abril	183	17
Mayo	174	15
Junio	164	20
Total	1044	120

Fuente: Propia

3.3. Métodos

3.3.1. Flotación con sulfato de zinc para identificación de parásitos gastrointestinales en perros y gatos

Se preparó una zona de trabajo en donde se dispusieron los materiales necesarios, además, se identificó el tubo cónico de 10 mL o tubo de ensayo plástico en donde se procesó la muestra. Seguidamente, se mezcló con una

paleta o cucharilla, de 2 a 5 g de materia fecal con 20 mL de agua en un beaker plástico. Dicha mezcla se filtró a través de un tamiz, se vertió en un tubo cónico de 10 mL (tubos de ensayo plásticos), luego se centrifugó durante 3 minutos entre 7000-8000 r.p.m (Saleh et al 2019; Taylor et al., 2016).

Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso de lavado y centrifugación con agua una vez más. Después del último lavado, se homogenizó y centrifugó el sedimento con 2-3 mL de solución de Sulfato de Zinc (densidad: 1.18 g/mL). Luego se procedió a colocar el tubo cónico con la solución en la gradilla y se dejó en reposo durante cuarenta minutos (es sumamente importante evitar el movimiento del tubo durante el proceso de flotación ya que los huevecillos tenderán a regresar al fondo de la solución) (Sobotyk et al., 2021; Taylor et al., 2016).

Una vez pasado el tiempo requerido para la flotación, con el asa bacteriológica (previamente esterilizada) se extrajeron 2 gotas de la película superficial de la solución y se colocaron en un extremo de la laminilla portaobjetos previamente identificada. Seguidamente, se añadió y mezcló homogéneamente una gota de lugol a la solución colocada en el portaobjetos. Por último, se cubrió la preparación con un cubreobjetos. Dichas muestras se observaron al microscopio, inicialmente en el objetivo de 100x y posteriormente en el de 400x, para una observación más detallada y minuciosa (Rodríguez et al., 2020; Taylor et al., 2016).

3.3.2. Sedimentación para identificación de parásitos gastrointestinales en perros y gatos

Primeramente, se identificaron los tubos de ensayo de 50 mL en donde se

sedimentaron las muestras. Seguidamente, se mezclaron con una paleta, de 2 a 5 g de materia fecal con 45 mL de agua en un beaker plástico, se maceró la materia fecal sin dejar grumos. El material obtenido se filtró por medio de un tamiz de 100 micrómetros pasándose al tubo cónico de 50 mL (Palmer y Lyon, 2013).

Posteriormente, se dejó sedimentar la mezcla por 20 minutos, pasado el tiempo, se decantó el sobrenadante y se obtuvo el sedimento para ser analizado (Taylor et al., 2016).

Una vez que se obtuvo el sedimento, se tomó una gota del mismo y se colocó en un portaobjetos, se le añadió una gota de solución salina y se colocó un cubreobjetos rectangular de 20 mm x 40 mm (este facilita que el material pueda dispersarse y que la materia vegetal interfiera lo menos posible con la visión de los PGI) (Palmer y Lyon, 2013; Taylor et al., 2016). Dichas muestras se observaron al microscopio, inicialmente en el objetivo de 100x y, posteriormente, en el de 400x, para una observación más detallada y minuciosa.

3.3.3. Extracción de ADN de parásitos gastrointestinales atípicos en el diagnóstico laboratorial

De acuerdo con el manual QIAamp® Fast DNA Stool (2020), la extracción de ADN de parásitos gastrointestinales atípicos en el diagnóstico laboratorial se realizó por medio del QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit, con la siguiente técnica:

- Se rotularon las muestras que fueron sometidas a extracción de ADN. Además, se limpió constantemente la zona de trabajo con alcohol al 70%, con el fin de evitar contaminación en el material genético. Luego se tomó y pesó 0.2 g de heces en un tubo de microcentrífuga de 2 mL.
- Se agregó 1 mL del tampón InhibitEX (favoreciendo la lisis química)

a la muestra y luego se colocó en el Vortex por 1 minuto hasta que se logró una completa homogenización de la misma. Posteriormente, se colocó el Eppendorf a un termomezclador a una temperatura de 95°C a 300 rpm por 15 minutos y se mezcló con el vortex cada 5 minutos. Después se agregaron 5 beads de vidrio por muestra para luego colocarse en el Vortex por 10 minutos, este proceso favoreció la lisis mecánica. Seguido, se puso la muestra en la microcentrífuga por 1 minuto a velocidad máxima, con el fin de destruir las partículas densas.

- Se pipeteó 15 μ L de proteinasa K en un tubo de microcentrífuga nuevo de 1,5 mL y añadió 200 μ L del sobrenadante.
- Se le añadió 200 μ L de tampón AL y se agitó en el vórtex durante 15 segundos. Después se incubó la muestra a 70°C durante 10 minutos, una vez pasado el tiempo se procedió a una centrifugación rápida para eliminar las gotas del interior de la tapa del tubo. Posteriormente, se agregó 200 μ L de lisado a la columna de centrifugación QIAamp. Además, se colocó la columna de centrifugación QIAamp en un nuevo tubo de 2 mL y se desechó el que contenía el filtrado.
- Se abrió con cuidado la columna de centrifugación QIAamp para agregar 500 μ L de tampón AW1 y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. Luego se colocó la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de recolección nuevo de 2 mL y se descartó el tubo que contenía el filtrado. Este proceso se repitió, pero con 500 μ L de tampón AW2.
- Finalmente, se transfirió la columna de centrifugación QIAamp a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL nuevo y se pipetearon 200 μ L de tampón

ATE directamente en la membrana QIAamp. Esto se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente para luego centrifugar a máxima velocidad durante 1 min para eluir el ADN. Cabe señalar que, la concentración de ADN suele ser de 50 a 250 ng/ μ L. El ADN eluido tiene una longitud de hasta 20 kb y es adecuado para uso directo en PCR y otras reacciones enzimáticas. Finalmente se conservó el ADN purificado a una temperatura de entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.4. Detección de parásitos gastrointestinales atípicos en el diagnóstico laboratorial por medio de PCR

De acuerdo con Rojas et al. (2023), el protocolo con el que se realizaron los PCRs y la secuenciación fue el siguiente:

Posterior a la elución del ADN, un fragmento de aproximadamente 650 pb de la subunidad 1 del citocromo oxidasa (*cox1*) se amplificó utilizando los primeros JB4.5 (TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG) y JB3 (TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT) mediante desnaturalización a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, 35 ciclos de amplificación a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, seguido de un paso final de amplificación a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% y se secuenciaron utilizando la química de secuenciación de Sanger del ciclo terminador BigDye (Macrogen, Corea del Sur). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos GenBank. La asignación de las especies se realizó cuando se obtuvo más del 97% de identidad.

3.3.5. Análisis filogenético de los parásitos atípicos identificados en muestras fecales

De acuerdo con Rojas et al. (2023), el análisis filogenético de PGI infrecuentes, se hizo de la siguiente manera:

Las secuencias de especies de parásitos gastrointestinales se encontraron disponibles en GenBank, éstas se recuperaron y alinearon en MEGA7 con el algoritmo MUSCLE. El modelo de sustitución de nucleótidos se calculó en MEGA7 usando los Criterios de Inferencia Bayesianos. Luego, se reconstruyó un árbol filogenético de inferencia bayesiana utilizando el paquete Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees (BEAST). Primero se cargaron las secuencias en BEAUTi para generar el archivo .xml con 10^7 Cadenas de Markov Montecarlo (MCMC), una frecuencia de muestreo de cada 10^3 árboles generados y una longitud de quemado de 10^2 estados. La convergencia de las cadenas se verificó mediante Tracer 1.6.0 con valores superiores a 300 muestras efectivas. Los árboles generados se combinaron con TreeAnotator 1.8.4 y se visualizaron con FigTree 1.4.3. Las distancias p de nucleótidos se calcularon en MEGA7 utilizando el mejor modelo de sustitución de nucleótidos calculado en el mismo software.

3.3.6. Protocolo digital para el manejo de muestras y pacientes sospechosos de portar PGI para médicos veterinarios

Este protocolo digital para médicos veterinarios sobre el manejo de muestras y pacientes sospechosos ante PGI, fue diseñado por medio de la herramienta Canva® y se distribuyó vía correo electrónico y redes sociales (Apéndice 2 y 3).

Este documento digital proporcionará un protocolo de pautas y recomendaciones para los médicos veterinarios sobre cómo realizar una adecuada toma y manejo de las excretas de perros y gatos, así como una guía sobre el uso adecuado de técnicas coproparasitológicas para un óptimo diagnóstico. De igual manera, permitirá inculcar la aplicación de medidas profilácticas para mantener la salud gastrointestinal del animal o para actuar ante casos positivos.

El manual indicó un resumen de las frecuencias de los PGI en ambas especies. Para ilustrar dicho dato, se utilizaron tablas, gráficos y fotografías. Estos recursos visuales permitieron a los veterinarios entender de manera clara y concisa la incidencia de los parásitos en las diferentes regiones del país y en diferentes momentos del año. Así como la presencia o ausencia de los mismos en relación con la consistencia de las heces, sexo y grupo etario. Posteriormente, se diseñó un protocolo que muestra la adecuada toma y manejo de heces, con el fin de obtener muestras significativas y diagnósticas. Este apartado muestra por cuántos días y como debe realizarse la recolección de las deposiciones, los implementos óptimos para hacerlo y la temperatura ideal de almacenamiento, ya sea para análisis a nivel de clínica o para envío a laboratorio de diagnóstico. Cabe mencionar que, esta sección le permite al clínico realizar capacitación a los propietarios sobre cómo sería la muestra óptima que deben recolectar en los hogares.

Por otro lado, se muestra una sección donde se evidencie la importancia del uso de las distintas técnicas diagnósticas y de cómo estas deben integrarse, con el objetivo de no limitarse a los exámenes rutinarios, básicos o individuales con el fin de evitar conducir a resultados falsos negativos. Es sumamente importante

recalcar que este apartado, es un espacio informativo por medio de tablas y fotografías, sobre cómo los diferentes métodos coproparasitológicos son esenciales para la determinación de determinados PGI. Además, se brindó información sobre el análisis molecular y como este llegó a ser una herramienta que fortalece de manera más confiable el diagnóstico de dichos agentes.

Asimismo, por medio de cuadros e imágenes informativas, se brindó un protocolo de medidas profilácticas tanto para mantener a las mascotas libres de PGI como para el adecuado abordaje de aquellas que se encuentran positivas ante los mismos. Esto mediante aspectos como exámenes coproparasitológicos de control, higiene del entorno, recolección y desecho de excretas, protocolos de desparasitación, entre otros.

En resumen, este manual es una herramienta de alto valor para que los veterinarios puedan ampliar sus conocimientos sobre los parásitos gastrointestinales y tomar decisiones informadas en el diagnóstico y tratamiento de estas infecciones. Finalmente, la combinación de información textual y recursos visuales permite una comprensión más completa e integral.

3.4. Descripción de variables

Se construyeron categorías múltiples para las diferentes variables para analizar cómo se distribuye la proporción de los PGI en relación con las mismas. Las variables se observan en el cuadro 3.

Cuadro 3.

Descripción de variables (dependientes e independientes) y sus respectivas categorías

Variable	Explicación de la variable	Tipo de variable	Categorías
CONP	Cualquier PGI	Respuesta, Categórica, Dependiente	0: Ausencia, 1: Presencia
CONH	Helmintiasis	Respuesta, Categórica, Dependiente	0: Ausencia, 1: Presencia
CONPROT	Protozoarios	Respuesta, Categórica, Dependiente	0: Ausencia, 1: Presencia
Ancylostomatídeos	Parásito helminto	Respuesta, Categórica, Dependiente	0: Ausencia, 1: Presencia
<i>Giardia duodenalis</i>	Parásito protozoario	Respuesta, Categórica, Dependiente	0: Ausencia, 1: Presencia
<i>Cystoisospora</i> spp.	Parásito protozoario	Respuesta, Categórica, Dependiente	0: Ausencia, 1: Presencia
<i>Toxocara</i> spp.	Parásito helminto	Respuesta, Categórica, Dependiente	0: Ausencia, 1: Presencia
Consistencia fecal	Consistencia de heces de perros y gatos	Categórica, Independiente	1: Formadas, 2: pastosas, 3: muco, 4: líquidas
Sexo	Sexo de felinos y caninos	Categórica, Independiente	1: Macho, 2: hembra
Grupo etario de perros	Edades de perros	Categórica, Independiente	1: Cachorro < 12 meses, 2: ≥ Adultos 12 - < 8 años, 3: Geriátricos ≥ 8 años
Grupo etario de gatos	Edades de gatos	Categórica, Independiente	1: Cachorro < 12 meses, 2: ≥ Adultos 12- < 8 años, 3: Geriátricos ≥ 8 años
Ubicación geográfica	7 provincias de Costa Rica	Categórica, Independiente	Por provincia, 7 categorías: 1: San José, 2: Alajuela, 3: Cartago, 4: Heredia, 5: Guanacaste, 6: Puntarenas, 7: Limón
Mes	Primeros 6 meses del año	Categórica, Independiente	1: Enero, 2: Febrero. 3: Marzo. 4: Abril, 5: Mayo, 6: Junio

Fuente: Propia

Debido a que *Trichuris vulpis*, *Dipylidium caninum*, *Spirocerca lupi* y *Spirometra mansoni* se encontraron en una muy escasa frecuencia en las muestras fecales, no pudieron ser utilizadas para los análisis estadísticos que tenían por objetivo investigar las asociaciones con las variables independientes.

3.5. Análisis de datos y método estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de la información sobre presencia y ausencia de PGI en las muestras analizadas. Se calcularon prevalencias de PGI en perros y gatos con propietario y se estudió su relación con algunos factores (consistencia de las heces, sexo, edad, ubicación geográfica y mes analizado) usando datos de presencia o ausencia de parásitos. Se utilizaron técnicas estadísticas usuales para analizar datos tipo conteos y frecuencias en datos categóricos. Las variables respuesta a analizar por posibles asociaciones con las variables independientes son: CONP (Con cualquier parasitosis), CONH (con Helmintiasis), CONPROT (Con protozoarios), ancylostomatideos, *Giardia duodenalis*, *Cystoisospora* spp., *Toxocara* spp.

3.5.1. Cálculo de proporción de PGI encontrados en relación con el sexo, la consistencia fecal, el grupo etario y el mes analizado

Se conoció la cantidad de parásitos gastrointestinales hallados en relación con la especie, sexo, consistencia fecal, grupo etario y mes analizado. Esto mediante el cálculo de proporción de cada variable registrada en la base de datos de Excel™. Se crearon tablas y gráficos que permitieron visualizar cada una de las proporciones. Se analizó si había diferencias significativas en la positividad por parásitos gastrointestinales según especie, sexo, consistencia fecal, grupo

etario y mes analizado, utilizando pruebas de Chi-cuadrado o Test Exacto de Fisher en caso de no cumplirse los supuestos para la prueba de Chi-cuadrado.

3.5.2. Cálculo de proporción de PGI encontrados por medio de flotación con sulfato de Zinc y sedimentación

De cada muestra fecal se extrajeron dos submuestras que se analizaron independientemente, una mediante la técnica de Flotación y otra mediante la técnica de Sedimentación, en búsqueda de PGI. Los resultados de ambas técnicas se analizaron mediante el test de McNemar para comparar ambas técnicas coproparasitológicas en relación con las variables de respuesta y determinó si había diferencias significativas entre las técnicas en su capacidad para hallar positividad por parásitos.

3.5.3. Cálculo de las prevalencias de PGI en las muestras recolectadas y sus límites de confianza del 95%

Se calculó la prevalencia, global y por especie animal, de cada uno de los parásitos encontrados, esto debido que se conocía el N total de muestras (1164) y la cantidad de heces que estaban positivas en caninos (395/438) y en felinos (43/438).

Para determinar el intervalo de confianza para el cálculo de cada prevalencia, se especificó un alfa de 0.05, lo cual significa que el intervalo de confianza es del 95% ($1 - \alpha$), donde la verdadera razón de probabilidades de la población general está dentro del rango de dicho intervalo.

3.5.4. Análisis bivariados para estudiar posibles asociaciones entre los factores de riesgo en relación con la presencia/ausencia de PGI

Se crearon “variables dummy” dicotómicas de aquellas que tenían más de

dos categorías y se hicieron varios arreglos de estas. Esto se realizó con base en la distribución de frecuencias observadas de cada variable, con el fin de llevar a cabo el cálculo de razones de probabilidad (OR) con intervalo de confianza de 95% para determinar el grado de asociación de estas variables con la presencia de PGI. En el caso de arreglos de variables en que había mucha disparidad entre las frecuencias dentro de las categorías de la variable independiente, se realizó la técnica de Bootstrap con 1000 iteraciones para compensar por las diferencias en dichas frecuencias y obtener cálculos más adecuados de las asociaciones. Finalmente, realizó la prueba de Chi cuadrado o Test exacto de Fisher para determinar la significancia de esas asociaciones. Mediante esta primera etapa se descartaron variables que no tuvieran asociaciones significativas o cercanas a las significativas usando el criterio de $p > 0.25$.

Posteriormente, se ajustaron los OR (Odds Ratio o razones de posibilidades) mediante un análisis de regresión logística de aquellas variables que mostraron diferencias significativas o estaban cerca de la significancia. Se realizó un procedimiento stepwise hacia adelante mediante el cual se determinó cual era el mejor modelo de regresión (utilizando el criterio AIC y el pseudo R^2) para cada variable de respuesta y, por tanto, los conjuntos de variables más relevantes para explicar la variabilidad en las variables de respuesta. Finalmente, los resultados de los OR ajustados se graficaron como gráficos Forest plot.

3.5.5. Programa estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico R mediante la aplicación R-Studio®, utilizando los paquetes “tidyverse”, “car” y “stats” para los análisis principales y otros paquetes que fueron necesarios para el

modelaje mediante regresión logística.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

De enero a junio del 2023 se examinaron un total de 1164 muestras fecales (1044 de perros y 120 de gatos con propietario) que procedían de las siete provincias de Costa Rica. Un total de 438 muestras estaban al menos positivas a un parásito intestinal, recalando que, se detectó en mayor proporción muestras positivas a ancylostomatideos en todas las provincias del país excepto en Limón, donde no se obtuvieron casos positivos a PGI (Figura 1).

Donde se obtuvo mayor cantidad de hembras y animales adultos predominando en la población en estudio (Cuadro 4).

Cuadro 4.

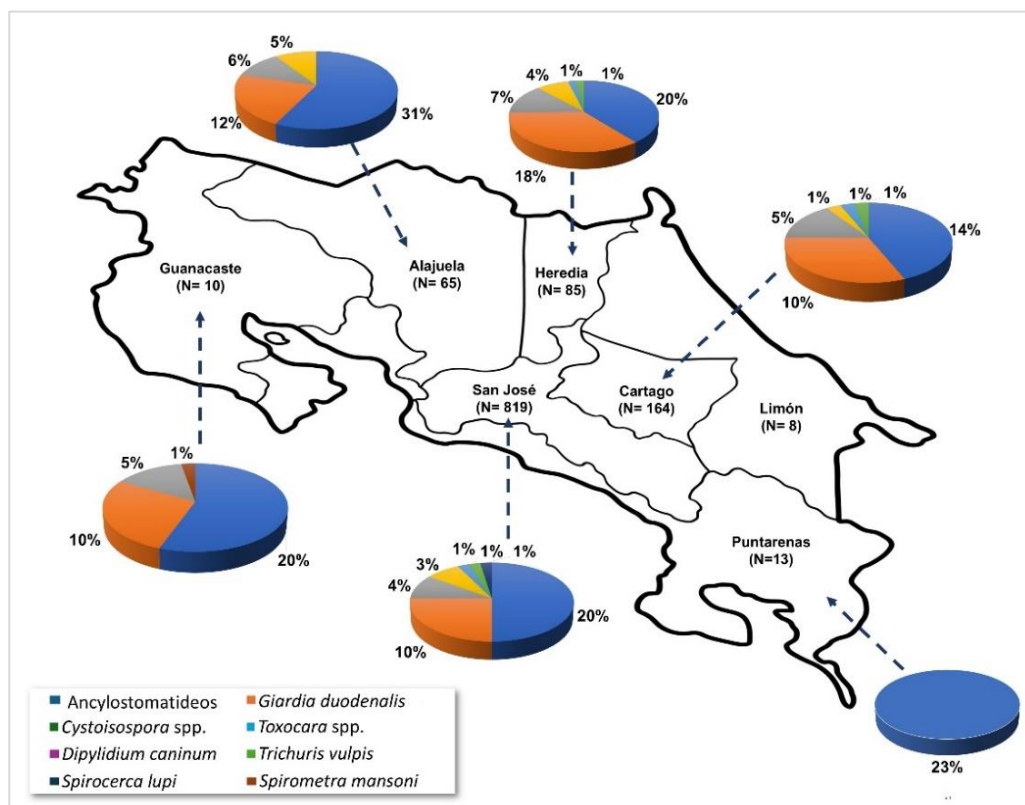
Edad y grupo etario de 1044 caninos y 120 gatos de un total 1164 animales incluidos en el estudio.

Especie	n	Grupo etario			Sexo	
		Cachorro	Adulto	Geriátrico	Macho	Hembra
Canino	1044	233	598	213	486	558
Felino	120	53	50	17	58	62
Total	1164	286 /1164	648/1164	230/1164	544/1164	620/1164

Fuente: Propia

Figura 1.

Proporción de parásitos gastrointestinales, en perros y gatos de un total de 1164 muestras, de acuerdo a la ubicación geográfica de procedencia



Nota: N = Total de muestra por provincia

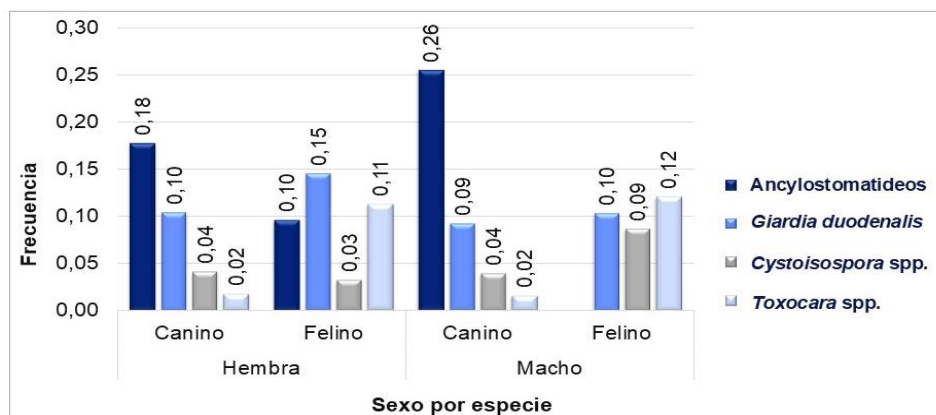
4.1. Proporción de parásitos gastrointestinales en relación con el sexo, consistencia fecal, grupo etario y mes analizado

4.1.1. Proporción de los parásitos gastrointestinales en relación con la variable sexo de perros y gatos en estudio.

Se observó mayor proporción de ancylostomideos en muestras de caninos (tanto machos y hembras). Mientras que en felinos hembras se encontró *Giardia duodenalis* en mayor proporción y en los felinos machos hubo mayor frecuencia de *Toxocara* spp. (Figura 2).

Figura 2.

Proporción de parásitos gastrointestinales, en perros y gatos y su asociación con el sexo de cada especie.

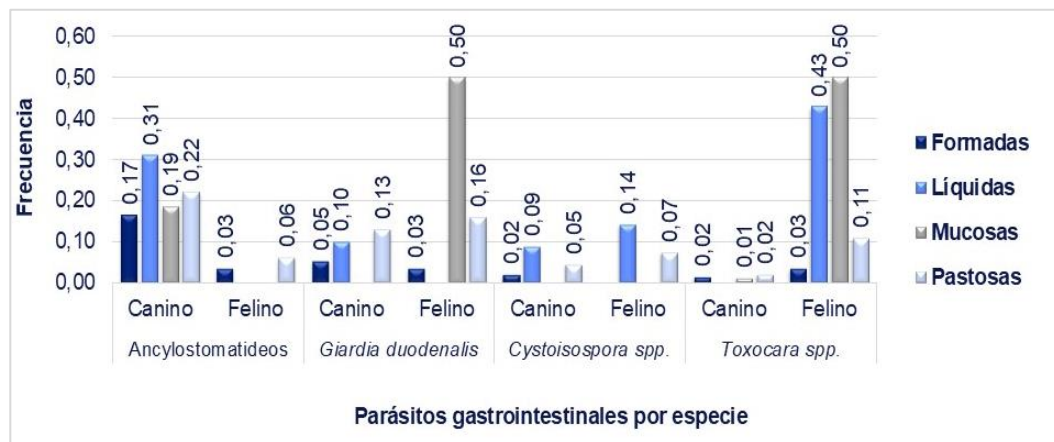


4.1.2. Proporción de los parásitos gastrointestinales en relación con la variable de consistencia fecal de perros y gatos en estudio

En perros la consistencia que se relacionó en mayor proporción con positividad a PGI fueron las heces líquidas. Por su lado, la consistencia mucosa fue la que se presentó más en heces positivas de gatos (Figura 3).

Figura 3.

Proporción de PGI en 395 heces de perros y 43 de gatos y su asociación con la variable de consistencia fecal.

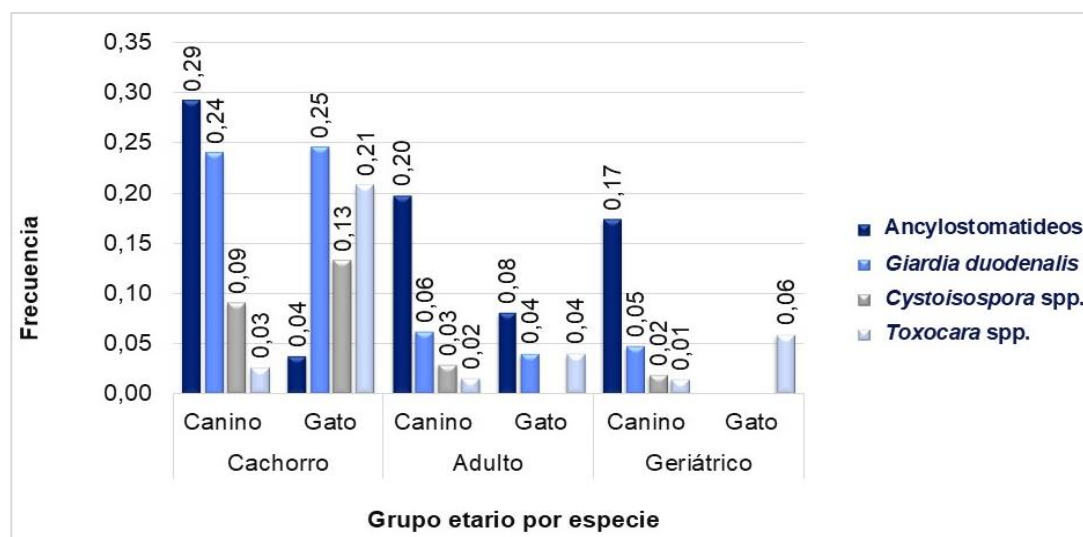


4.1.3. Proporción de los parásitos gastrointestinales en relación con la variable de grupo etario en perros y gatos en estudio

Se encontró que perros y gatos cachorros (45,63%) se infectaron significativamente con más frecuencia que los animales más viejos, siendo los ancylostomatideos el grupo parasitario en mayor proporción (22,03%) (Figura 4).

Figura 4.

Proporción de PGI en 395 heces de perros y 43 de gatos y su asociación con la variable de grupo etario para cada especie.



4.1.4. Proporción de los parásitos gastrointestinales en relación con la variable de mes analizado

En el caso de los caninos, se determinó que el grupo de los ancylostomatideos fue el que estuvo más frecuente durante los seis meses en estudio, manteniéndose en cantidades proporcionales durante los primeros cuatro meses del año y disminuyendo su proporción en mayo y junio. *Giardia duodenalis* mantuvo un comportamiento similar a los ancylostomatideos, mientras que *Toxocara spp.* y *Cystoisospora spp.* se mantuvieron en proporciones

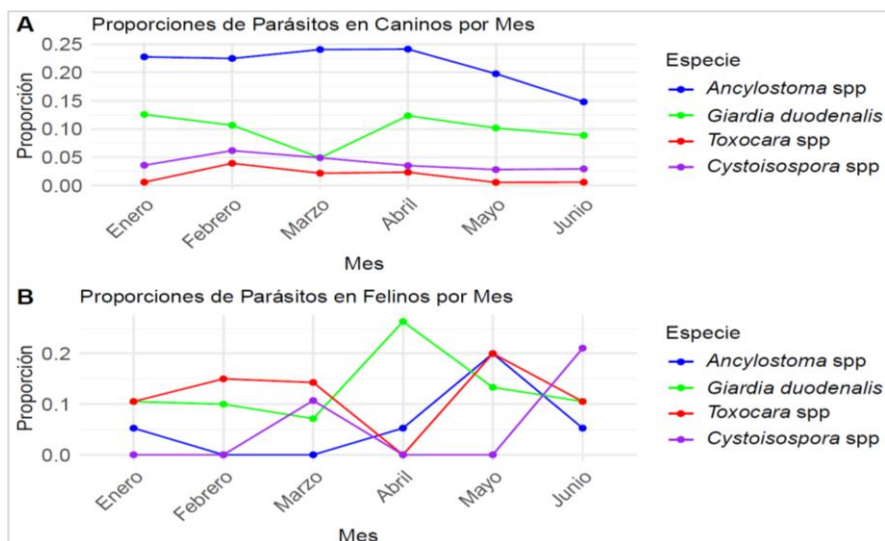
similares durante los seis meses (Figura 5).

Para los felinos, durante los primeros tres meses de estudio, *Giardia duodenalis* y *Toxocara* spp. se mantuvieron en proporciones similares y en abril y mayo tuvieron un incremento en la positividad de estos para posteriormente empezar a disminuir en junio. Por su lado, *Cystoisospora* spp. y los ancylostomatideos se encontraron en proporciones bajas, incluso nulas, de enero a abril y presentaron incrementos entre mayo y junio (Figura 5).

Sin embargo, en ambas especies, las diferencias presentadas en las frecuencias por cada mes fueron no significativas.

Figura 5.

Proporción de PGI en 395 heces de perros y 43 de gatos de enero a junio del 2023



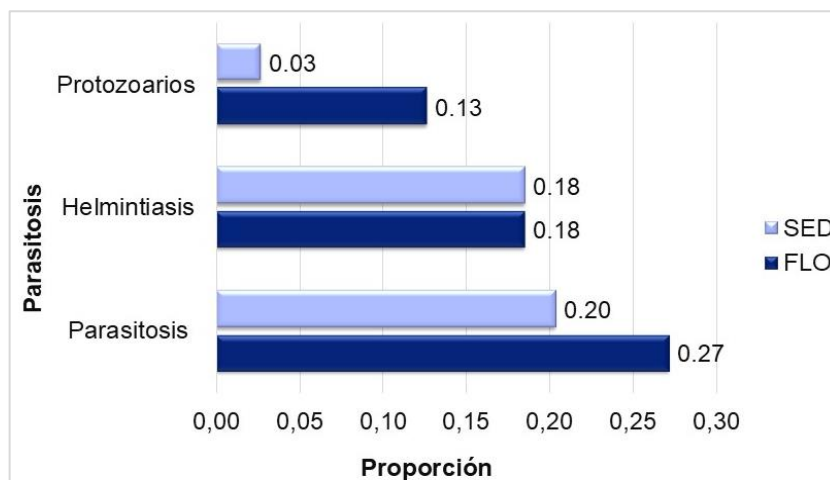
4.2. Proporción de parásitos gastrointestinales en heces de perros y gatos en relación con la técnica diagnóstica coproparasitológica (flotación con Sulfato de Zinc y sedimentación)

En el procesamiento de las muestras se utilizaron dos técnicas diagnósticas

diferentes, la flotación con Sulfato de Zinc y la sedimentación, lo que aumentó la sensibilidad de los resultados y la alta positividad. Se determinó una diferencia significativa entre pruebas diagnósticas ($\chi^2 = 30.26$ / valor $p < 0.0001$), en donde la flotación con Sulfato de Zinc, versus la sedimentación, detectó en mayor proporción cualquier tipo de parasitosis ($\chi^2 = 30.26$ / valor $p < 0.0001$) y los protozoarios ($\chi^2 = 89.35$ / valor $p < 0.0001$). Por su lado, para la detección de helmintiasis no hubo diferencias significativas entre las técnicas de flotación y sedimentación ($\chi^2 = 0.0096$ / valor $p = 0.92$), siendo la flotación y sedimentación igual de útiles para el diagnóstico de este grupo parasitario (Figura 6). No obstante, *S. lupi*, *S. mansoni* o *D. caninum* fueron diagnosticados únicamente con la técnica de sedimentación.

Figura 6.

Proporción de parásitos gastrointestinales en 395 muestras positivas de perros y 43 de gatos de un total de 1164 muestras y su comparación con respecto a la técnica diagnóstica (Flotación con Sulfato de Zinc y sedimentación) más efectiva.



Nota: SED = Sedimentación, FLOT= Flotación con Sulfato de Zinc

Por otro lado, con el objetivo de conocer y comparar más a detalle, se logró determinar las proporciones de los diferentes PGI en estudio, comparándolos igualmente con las dos técnicas coprológicas antes mencionadas. Por lo que se logró identificar una diferencia significativa entre ambas técnicas para la detección de *Giardia duodenalis* ($\chi^2 = 104.21$ / valor $p < 0.0001$) donde la flotación con Sulfato de Zinc favorece la obtención de dicho parásito, mientras que la sedimentación es la mejor técnica para detectar *Toxocara* spp. ($\chi^2 = 6.05$ / valor $p = 0.013$) y los parásitos poco frecuentes como: *Trichuris vulpis*, *Dipylidium caninum*, *Spirocerca lupi* y *Spirometra mansoni*. Finalmente, para *Cystoisospora* spp. ($\chi^2 = 2.13$ / valor $p = 0,14$) y los ancylostomatideos ($\chi^2 = 0,0$ / valor $p = 1,0$) ambos métodos coprológicos son igual de efectivos. Sin embargo, es importante mencionar que, en el presente estudio, la gran mayoría de datos de helmintiasis eran por ancylostomatideos así que ese resultado está influido por ese hecho.

4.3. Prevalencia de parásitos gastrointestinales de caninos y felinos con propietarios y sus límites de confianza del 95%

Se detectó una prevalencia global, de parásitos gastrointestinales, del 37.63% (438/1164), siendo los ancylostomatideos los más prevalentes, seguido por *Giardia duodenalis*, *Cystoisospora* spp., *Toxocara* spp., *Trichuris vulpis*, *Dipylidium caninum*, *Spirocerca lupi* y, por último, *Spirometra mansoni* (Cuadro 5).

Cuadro 5.

Prevalencia global de parásitos intestinales en población en estudio con sus límites de confianza (inferior y superior) del 95%

Parásito gastrointestinal	Prevalencia (%)	IC Inferior (%)	IC Superior (%)
ancylostomatideos	19.67	17.49	22.06
<i>Giardia duodenalis</i>	10.14	8.53	12.00
<i>Cystoisospora</i> spp.	4.21	3.20	5.52
<i>Toxocara</i> spp.	2.75	1.95	3.86
<i>Trichuris vulpis</i>	0.34	0.13	0.88
<i>Dipylidium caninum</i>	0.26	0.90	0.76
<i>Spirocerca lupi</i>	0.17	0.05	0.62
<i>Spirometra mansoni</i>	0.09	0.02	0.49

Nota: IC Inferior = Intervalo de confianza inferior, IC Superior = Intervalo de confianza superior.

Fuente: Propia

De las muestras de caninos, el 37.83% (395/1044) estaban positivas y se evidenció que el PGI que se mostró en mayor proporción fueron los ancylostomatideos, seguido por *Giardia duodenalis*, *Cystoisospora* spp., *Toxocara* spp., *Trichuris vulpis*, *Dipylidium caninum* y *Spirocerca lupi* (Cuadro 6).

Cuadro 6.

Prevalencia de parásitos intestinales en población canina en estudio con sus límites de confianza (inferior y superior) del 95%

Parásito gastrointestinal	Prevalencia (%)	IC Inferior (%)	IC Superior (%)
ancylostomatideos	21.3	18.98	23.95
<i>Giardia duodenalis</i>	9.87	8.20	11.82
<i>Cystoisospora</i> spp.	4.02	2.99	5.39
<i>Toxocara</i> spp.	1.72	1.09	2.71
<i>Trichuris vulpis</i>	0.38	0.15	0.98
<i>Dipylidium caninum</i>	0.29	0.10	0.84
<i>Spirocerca lupi</i>	0.19	0.05	0.70
<i>Spirometra mansoni</i>	0.00	0.00	0.37

Fuente: Propia

Por su lado, los felinos, presentaron un 35.83% (43/120) de las heces positivas. El PGI que se mostró en mayor proporción fue *Giardia duodenalis*, seguido por *Toxocara* spp., *Cystoisospora* spp., ancylostomatideos y *Spirometra mansoni* (Cuadro 7).

Cuadro 7.

Prevalencia de parásitos intestinales en población felina en estudio con sus límites (inferior y superior) de confianza del 95%

Parásito gastrointestinal	Prevalencia (%)	IC Inferior (%)	IC Superior (%)
<i>Giardia duodenalis</i>	12.50	7.72	19.60
<i>Toxocara</i> spp.	11.67	7.08	18.63
<i>Cystoisospora</i> spp.	5.83	2.85	11.55
ancylostomatideos	5.00	23.10	10.48
<i>Spirometra mansoni</i>	0.83	0.15	4.75
<i>Trichuris vulpis</i>	0.00	0.00	3.10
<i>Dipylidium caninum</i>	0.00	0.00	3.10
<i>Spirocerca lupi</i>	0.00	0.00	3.10

Fuente: Propia

4.4. Asociación de variables dicotómicas (especie, sexo, consistencia fecal y grupo etario) con la presencia/ausencia de parásitos gastrointestinales

Es importante mencionar que, mediante el cálculo de OR no ajustados (Apéndice 1), se identifica que, factores como mes y ubicación geográfica tienen muy poca relevancia. Sin embargo, la ubicación geográfica tiene algunos datos cerca de la significancia por eso se incluyó en la revisión de regresión logística, pero el mes no fue una variable significativa para ninguna de las variables de respuesta, por lo que se decidió excluirla de los modelos de regresión. Los resultados del análisis stepwise hacia adelante, permitieron determinar que el

mejor modelo posible de regresión para la mayoría de las variables respuesta era el que incluyó las variables especie, sexo, consistencia (con todas sus categorías), ubicación geográfica con dos categorías (Central y Otros), y grupo etario con dos categorías (Cachorros y no Cachorros). En el caso de la variable respuesta positividad por *Toxocara* spp., el mejor modelo era el que contenía las variables especie, sexo, grupo etario con dos categorías (Cachorro, No cachorro), ubicación geográfica con dos categorías (Central y Otros), y Consistencia con dos categorías (Formadas y No Formadas), un modelo un poco más simplificado.

4.4.1. Asociación cualquier parasitosis gastrointestinal (CONP) con respecto a variables dicotómicas de especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal

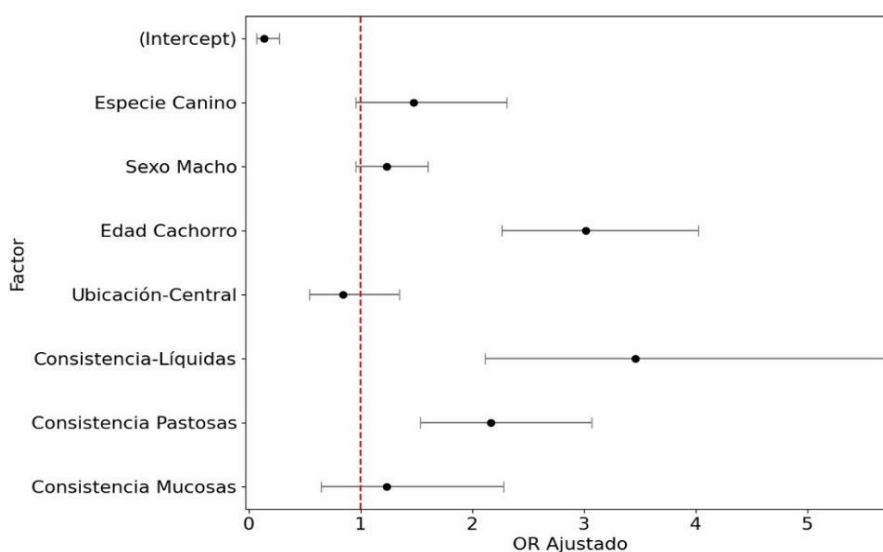
Los caninos mostraron una tendencia a presentar mayor positividad por cualquier parásito gastrointestinal en comparación con los felinos, aunque este hallazgo no es estadísticamente significativo. De la misma manera pasa con los machos, pues presentan mayor probabilidad de padecer cualquier parasitosis, versus las hembras, pero se determinó que dicha variable no es significativa.

Por otro lado, en lo que respecta al grupo etario de los cachorros, se tiene que sus heces poseen una probabilidad significativamente mayor de ser positivas a cualquier PGI, en comparación con los adultos y geriátricos. Para la ubicación geográfica se obtuvo un resultado que no demostró significancia con respecto a la presencia o ausencia de cualquier tipo de PGI. Y, por último, para las consistencias fecales líquidas y pastosas, se tiene una probabilidad significativamente mayor de ser positivas a cualquier PGI en comparación a las

formadas, sin embargo, la consistencia mucosa presentó una probabilidad de ser positiva a cualquier parásito, pero esto no es un resultado estadísticamente significativo (Figura 7).

Figura 7.

Forest Plot de variable CONP demostrando la asociación de cualquier parasitosis con las variables dicotómicas de especie, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y consistencia fecal.



4.4.2. Asociación de la presencia de Helmintiasis (CONH) con respecto a variables dicotómicas de especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal

En este caso los caninos tienen una probabilidad significativamente mayor de presentar alguna helmintiasis en comparación con los felinos. Además, los machos, aunque poseen menor variabilidad, tienden a tener un valor significativo y más probabilidad a padecer alguna helmintiasis a diferencia de los gatos. Por su lado, los cachorros tienen casi dos veces probabilidad de tener helmintiasis a

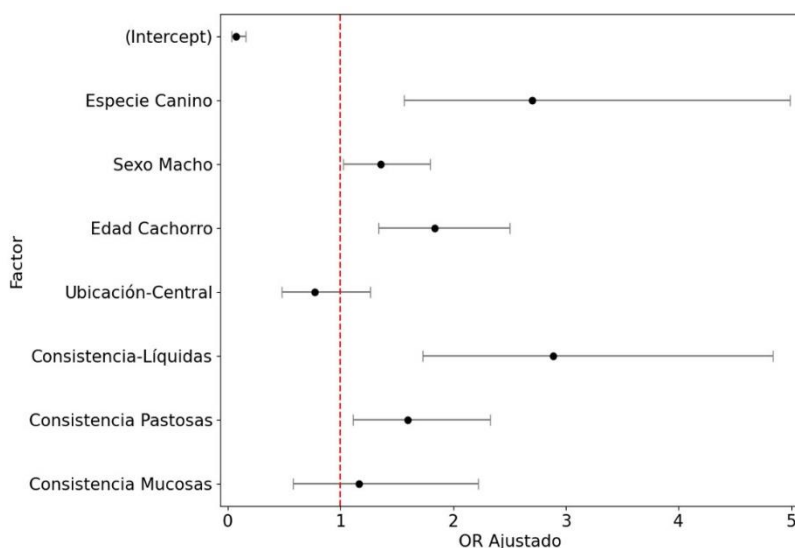
diferencia de los adultos y geriátricos. Para la ubicación geográfica se obtuvo un resultado que no demostró significancia con respecto a la presencia o ausencia de cualquier helminto (Figura 8).

Las consistencias fecales líquidas y pastosas presentan una probabilidad estadísticamente mayor de estar positivas a helmintos con respecto a las formadas. Sin embargo, las mucosas, no presentaron un valor estadísticamente significativo (Figura 8).

Además, con el fin de conocer más a detalle la asociación de las helmintiasis con respecto a las variables dicotómicas, se detallarán los hallazgos obtenidos en las dos especies de helmintos que estuvieron en mayor proporción en este estudio (ancylostomatideos y *Toxocara* spp.).

Figura 8.

Forest Plot de variable CONH, demostrando la asociación de cualquier helmintiasis con las variables dicotómicas de especie, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y consistencia fecal.

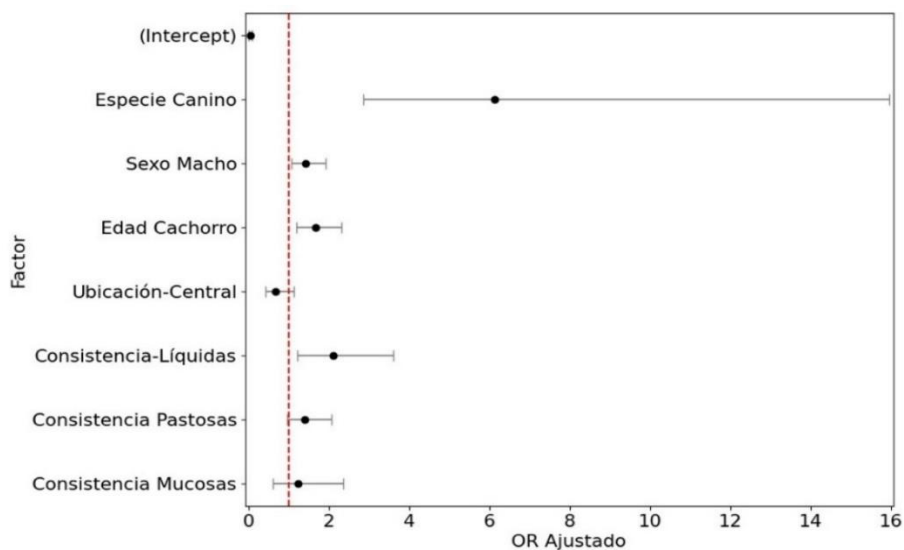


4.4.2.1. Asociación de la presencia ancylostomatideos con respecto a variables dicotómicas especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal

En lo que respecta a la especie y el sexo, los perros y los machos (caninos y felinos) tienen una probabilidad significativamente mayor de ser diagnosticados con ancylostomatideos con respecto a los gatos y hembras. Por su lado, los cachorros tienen casi dos veces más probabilidad de tener ancylostomatideos con respecto los adultos y geriátricos. Para la ubicación geográfica no se obtuvo un resultado estadísticamente significativo. En relación con las consistencias fecales, solo se vio que, las consistencias líquidas demostraron tener una relación significativa con respecto a la presencia de ancylostomatideos (Figura 9).

Figura 9.

Forest Plot de variable ancylostomatideos, demostrando la asociación con las variables dicotómicas de especie, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y consistencia fecal.

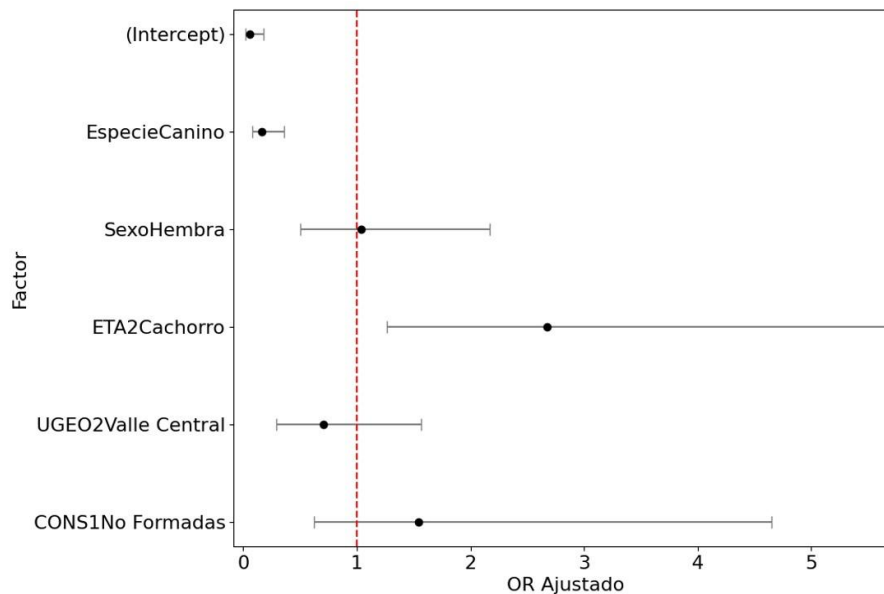


4.4.2.2. Asociación de la presencia *Toxocara* spp. con respecto a variables dicotómicas de especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal

En el caso de *Toxocara* spp. se tiene una probabilidad estadística significativamente mayor de encontrarse en heces de felinos en comparación con los caninos. Con la variable de sexo esta no es una variable significativa en cuanto a la presencia de dicho parásito. Con respecto al grupo etario, los cachorros tienen casi tres veces más probabilidad de infectarse con *Toxocara* spp. a diferencia de los adultos y geriátricos. Para la ubicación geográfica no se obtuvo un resultado estadísticamente significativo. Por último, las consistencias fecales no formadas en este caso, no presentan una relación estadísticamente significativa con respecto a la presencia o ausencia de *Toxocara* spp. (Figura 10).

Figura 10.

Forest Plot de variable Toxocara spp., demostrando la asociación con las variables dicotómicas de especie, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y consistencia fecal.



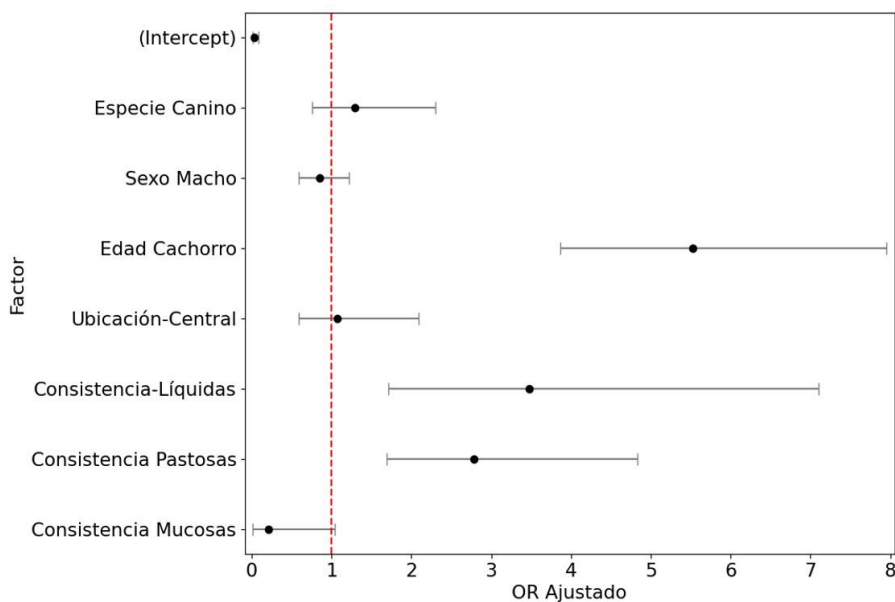
4.4.3. Asociación de la presencia de protozoarios (CONPROT) con respecto a variables dicotómicas de especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal

Se determinó que no hay una diferencia significativa para la presencia de protozoarios en relación con la especie. De igual forma, no hubo mayor significancia en la probabilidad de tener protozoarios entre macho y hembra. Sin embargo, se observó que la población adulta y geriátrica tienen menor probabilidad de tener protozoarios en comparación con los cachorros, los cuales tienen casi 6 veces más probabilidad de infectarse con este parásito. Para la ubicación geográfica no se obtuvo un resultado estadísticamente significativo. Con lo que respecta a la consistencia fecal, se demostró que las muestras pastosas y líquidas, si tienen una probabilidad altamente significativa de presentar protozoarios, versus las heces con una consistencia formada (Figura 11).

Con el fin de conocer más a detalle la asociación de las infecciones con protozoarios y su relación con las variables dicotómicas, se detallarán los hallazgos obtenidos en las dos especies de protozoarios que se presentaron con más frecuencia en este estudio (*Giardia duodenalis* y *Cystoisospora* spp.).

Figura 11.

Forest Plot de variable CONPROT, demostrando la asociación la presencia o ausencia de cualquier protozooario con las variables dicotómicas de especie, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y consistencia fecal.



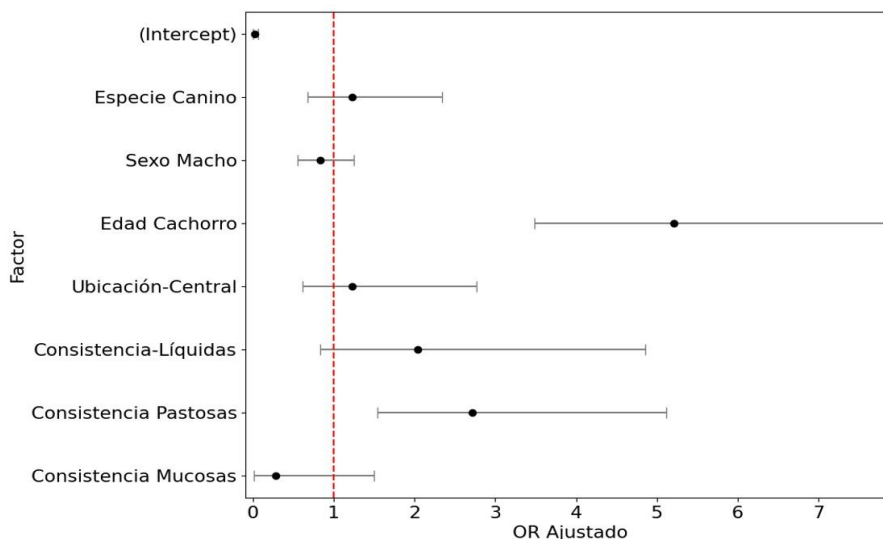
4.4.3.1. Asociación de la presencia *Giardia duodenalis* con respecto a variables dicotómicas especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal

Se determinó que, no hay una diferencia significativa para la presencia de *Giardia duodenalis* en relación con la especie. De igual forma, no hubo mayor significancia en la probabilidad de tener este parásito entre macho y hembra. Sin embargo, se observó que los cachorros tienen cinco veces más probabilidad de mostrar heces con este parásito, a diferencia de los adultos y geriátricos. Para la ubicación geográfica no se obtuvo un resultado estadísticamente significativo. Con lo que respecta a la consistencia fecal, se demostró que las muestras pastosas, tienen tres veces más probabilidad de *Giardia duodenalis*, versus las

heces con una consistencia formada (Figura 12).

Figura 12.

Forest Plot de variable Giardia duodenalis demostrando la asociación con las variables dicotómicas de especie, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y consistencia fecal.

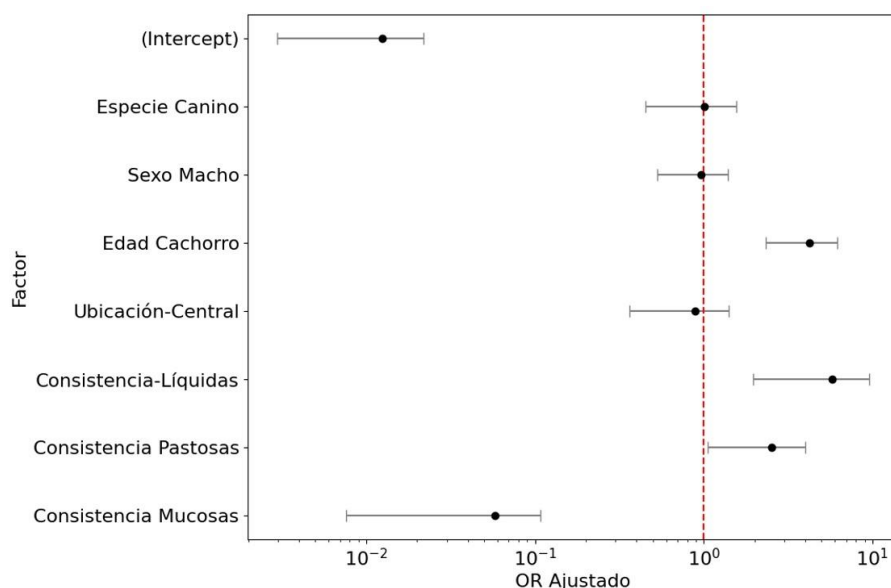


4.4.3.2. Asociación de la presencia *Cystoisospora* spp. con respecto a variables dicotómicas especie, sexo, ubicación geográfica, grupo etario y consistencia fecal

Se determinó que, no hay una diferencia significativa para la presencia de *Cystoisospora* spp. en relación con la especie, sexo y ubicación geográfica. Sin embargo, el ser cachorro implica una probabilidad estadísticamente significativa de presentar heces con este parásito, en comparación con los adultos y geriátricos. Las muestras pastosas y líquidas, si tienen una probabilidad significativa de presentar *Cystoisospora* spp., versus las heces con una consistencia formada (Figura 13).

Figura 13.

Forest Plot de variable *Cystoisospora* spp. demostrando la asociación con las variables dicotómicas de especie, sexo, grupo etario, ubicación geográfica y consistencia fecal.



4.5. Análisis molecular y filogenético de los parásitos atípicos encontrados en algunas muestras fecales en estudio

Se determinó que existen parásitos gastrointestinales que son encontrados en menor proporción durante los análisis coprológicos rutinarios, tales como *Trichuris vulpis*, *Spirometra mansoni* y *Spirocercas lupi*. Los cuales requieren de un estudio filogenético para conocer a detalle su diversidad genética y posible relación con su ubicación geográfica.

En este caso se obtuvieron cuatro muestras con *Trichuris vulpis*, dos positivas a *Spirometra mansoni* y dos con *Spirocercas lupi*. A estas heces, se les realizó la extracción del ADN de dichos parásitos, luego la reacción en cadena de la polimerasa, amplificación y la secuenciación para posteriormente hacer los

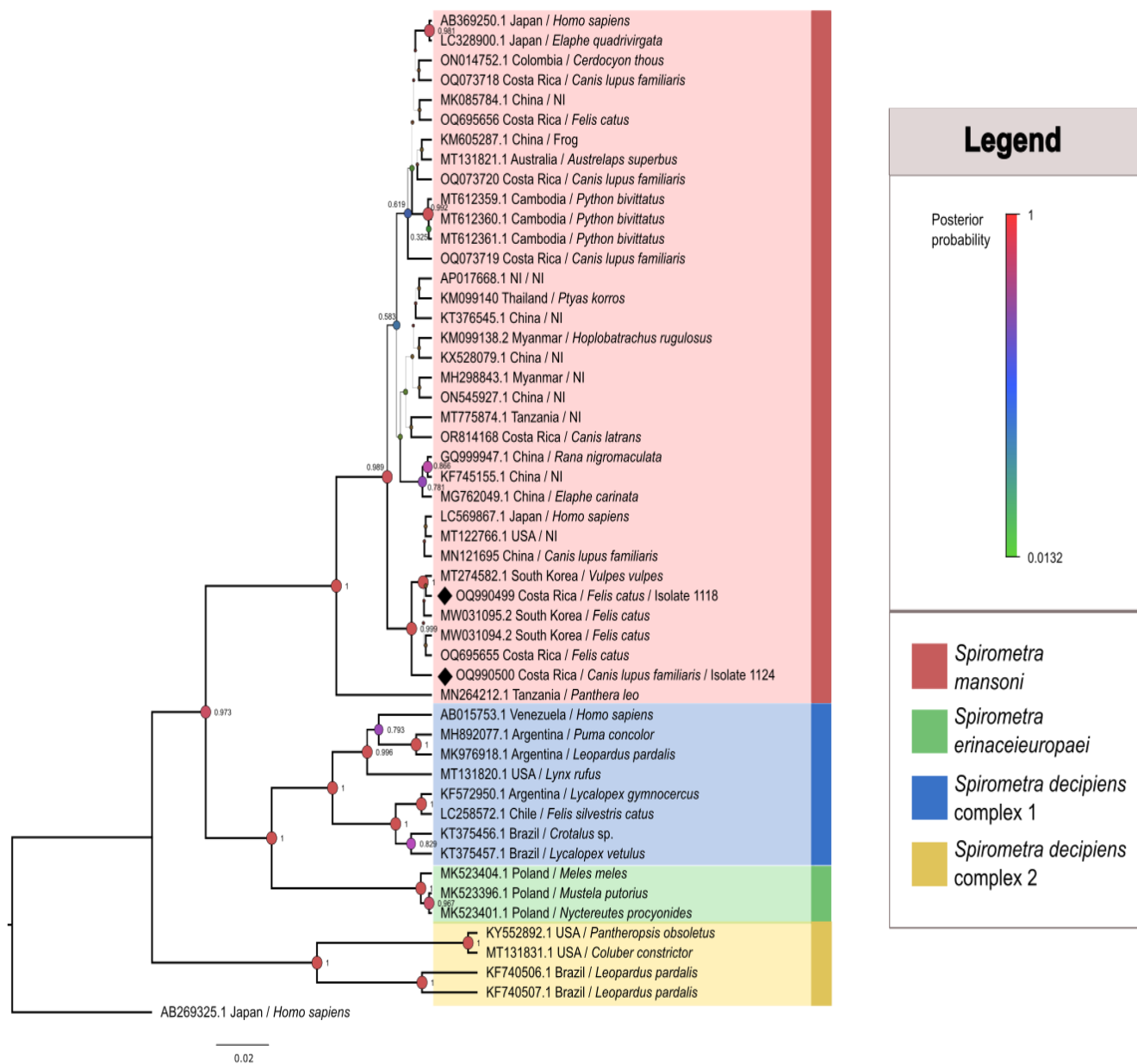
árboles filogenéticos. Sin embargo, para las muestras de *Trichuris vulpis*, no se logró obtener la amplificación de ADN, posiblemente debido a una baja concentración del mismo.

fragmentación del ADN, incluso por interferencia de inhibidores que poseen las heces, por lo que esta fue una de las limitantes en este proyecto. Cabe agregar que, las secuencias se alinearon junto con la de otras especies *Spirometra mansoni* y *Spirocerca lupi*, recuperadas de la base de datos Genbank utilizando el algoritmo MUSCLE, para obtener el porcentaje de identidad y el porcentaje de cobertura.

Con respecto a *Spirometra mansoni*, las muestras provenían de un canino y un felino de la provincia de Guanacaste. En el árbol filogenético se identificó que sus secuencias se alineaban con otras que provienen de diferentes ubicaciones geográficas que se mezclaban entre sí (Camboya, China, Japón, Corea del Sur). Las secuencias derivadas de este estudio se encuentran identificadas con un rombo en color negro en el árbol filogenético en la figura 14. Esto demuestra que la variabilidad genética es alta y sin correlaciones evidentes con los factores ambientales, ubicación geográfica o los hospederos (Figura 14). Por lo que la forma en que este parásito se podría estar diversificando no está dictada a una estratificación geográfica sino a algún factor que permita que todo sea muy homogéneo genéticamente.

Figura 14.

Análisis filogenético de inferencia bayesiana de un fragmento del gen mitocondrial cox1 de Spirometra mansoni cuyas secuencias fueron obtenidas de muestra fecal de un felino y un canino de la provincia de Guanacaste de Costa Rica.

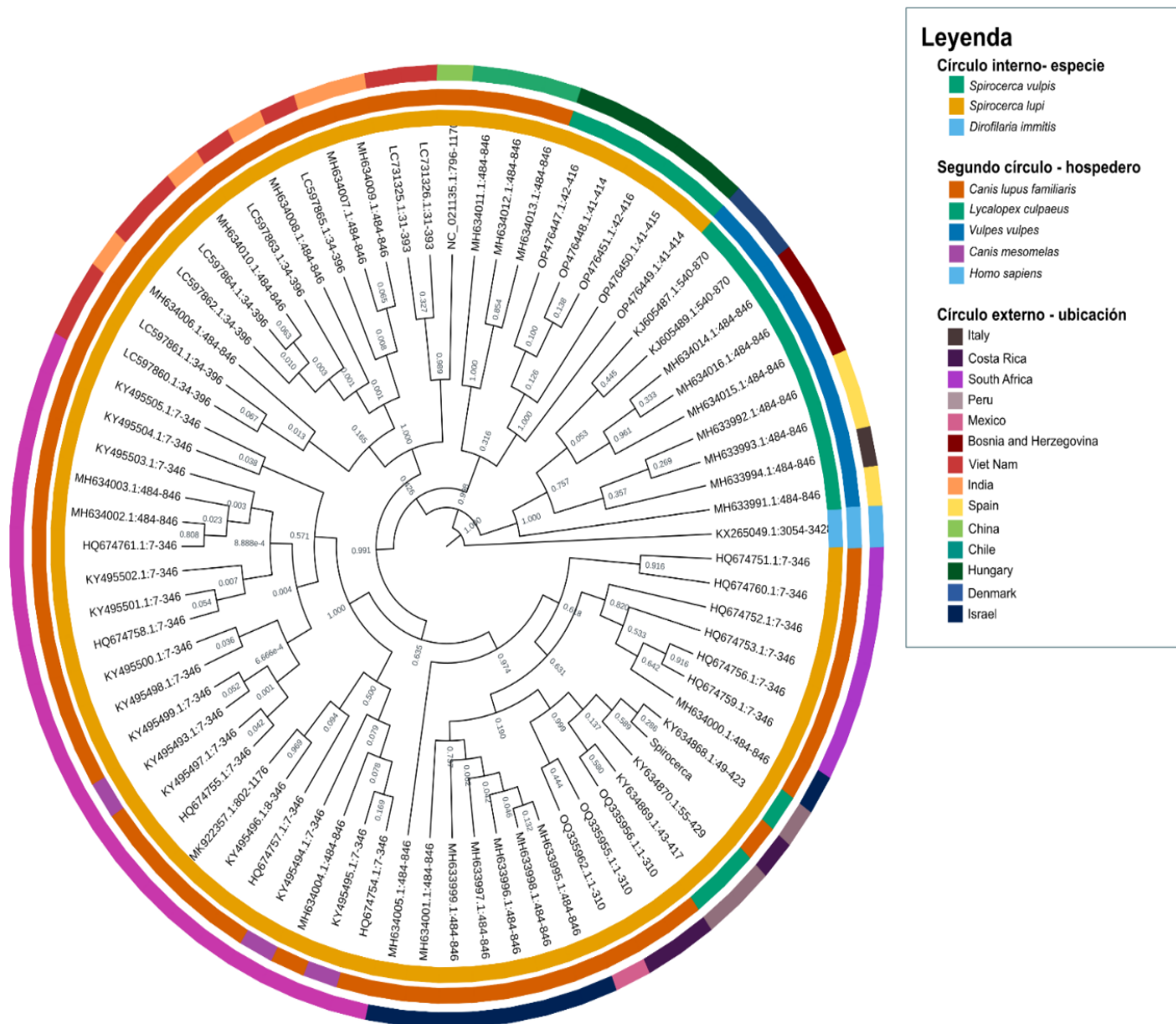


Nota: Las secuencias obtenidas en el presente estudio se indican con rombos negros.

Por otro lado, las muestras positivas a *Spirocerca lupi* provenían de dos caninos de la provincia de San José. Las secuencias derivadas de muestras costarricenses se agruparon junto a especímenes de América, Israel, Sudáfrica e India. Además, se observó que las secuencias de Costa Rica tenían mayor relación con las de América (México, Estados Unidos y Perú). Asimismo, la distancia y cierta diferencia entre nucleótidos con respecto a las demás secuencias, evidenció que la diversidad genética de este parásito se genera de evolución en las mismas zonas geográficas, produciéndose así un tipo de especiación alopátrica (Figura 15).

Figura 15.

Análisis filogenético de inferencia bayesiana de un fragmento del gen mitocondrial cox1 de Spirocerca lupi cuyas secuencias fueron obtenidas de dos muestras fecales canino de la provincia de San José, Costa Rica.



CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

5.1. Proporción de PGI de perros y gatos y su relación con la técnica diagnóstica coproparasitológica

La flotación con Sulfato de Zinc o también conocida como técnica de Faust, es una técnica que se ha conocido como favorable para la recuperación de huevos livianos, larvas de helmintos y algunos quistes de protozoarios, esto debido a que la densidad (1.18 g/m) de este reactivo es relativamente baja, permitiendo que las formas parasitarias presentes, no colapsen fácilmente. Además, los quistes de *Giardia* spp. colapsan rápidamente en la mayoría de las soluciones de flotación; sin embargo, el Sulfato de Zinc no causa destrucción en dichas estructuras y permite que se reconozcan fácilmente (Zajac et al., 2021). Incluso, se ha demostrado que la flotación con sulfato de zinc tiene una sensibilidad superior al 72%, siendo esta técnica considerada el estándar de oro para el diagnóstico de *Giardia* en perros y gatos.

Con lo que respecta a la sedimentación, aunque permitió la identificación de diversos parásitos, esta sigue siendo una técnica de preferencia para la recuperación de tenias y nematodos cuyos huevos no flotan fácilmente en soluciones de flotación comunes (Inácio et al., 2022).

5.2. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en perros y gatos

Es importante mencionar que la mayor prevalencia de casos con ancylostomatideos, coinciden con estudios a nivel nacional (Fernández et al., 2008; Castro, 2009; Sáenz, 2013) (82%, 55% y 33.6%, respectivamente). De acuerdo con Montgomery (2020), el alto porcentaje de positividad a este parásito

ha sido atribuido a que las larvas permanecen infectivas en el suelo en condiciones ambientales favorables (zonas cálidas, húmedas y sombrías) esperando infectar a un hospedero. Esta infección puede ser por vía cutánea o por ingesta, por lo tanto, es de fácil contagio en animales que pasean en calles o centros recreativos. Esta alta prevalencia crea un problema de salud pública debido a que se trata de una zoonosis que causa larvas migrans cutánea en humanos, donde la infección puede ocurrir a través del contacto directo con heces que contienen la forma infectiva en el ambiente, como en parques públicos, lotes baldíos y areneros, entre otros sitios (Silva et al., 2023).

Con lo que respecta a *Giardia duodenalis*, *Cystoisospora* spp. y *Toxocara* spp., estos fueron de los parásitos más prevalentes después de los ancylostomatídeos. Lo cual se relaciona con hallazgos a nivel nacional donde estos parásitos tienden a mostrarse con alta prevalencia (Alemán, 2011; Castro, 2009; Fernández et al., 2008; Sáenz, 2013). Esto podría estar relacionado con la resistencia de estos en el medio ambiente, temperatura y suelos, permitiendo que su distribución sea más rápida y efectiva.

De igual manera, se hallaron parásitos, con muy baja prevalencia, en algunas de las muestras. Tal es el caso de *Dypilidium caninum*, *Spirometra mansoni* y *Spirocerca lupi*. Esto puede deberse al factor común que tienen los animales en estudio, pues son gatos y perros con propietario, por ende, existe la posibilidad de que los ciclos biológicos de estos parásitos puedan darse a menor escala. En el caso de *Dypilidium caninum*, este es un parásito que requiere en su ciclo biológico a las etapas larvales de la pulga del perro o gato (*Ctenocephalides*

spp.) y ocasionalmente *Trichodectes canis* (el piojo del perro), por lo que si los animales en estudio al vivir dentro de sus hogares, tienen la posibilidad de recibir desparasitaciones externas con frecuencia, se disminuye el riesgo de la parasitosis (Pandey et al., 2022). Con respecto a *Spirometra mansoni* para cumplir el ciclo biológico requiere de la caza de pequeños anfibios y reptiles, por lo que perros y gatos con hogar tienden a disminuir el contacto con este tipo de presas, por ende, este parásito no se lograría hallar con frecuencia en este tipo de población (Zajac et al., 2021). Por último, *Spirocerca lupi* requiere que el perro ingiera directamente las heces con el escarabajo pelotero u hospederos paraténicos que ingieran dichos escarabajos (Giannelli et al., 2014; Rojas et al., 2020). Por ende, los perros al vivir dentro de un hogar disminuyen el contacto con la fuente infectiva.

5.3. Asociación de la presencia o ausencia de parásitos gastrointestinales con respecto a la especie

Se determinó que los caninos tienen mayor probabilidad, en comparación con los felinos, de presentar cualquier helmintiasis y más en el caso de los ancylostomatideos. Esto podría relacionarse con el comportamiento de exploración de los perros, ya que estos durante los paseos tienden a correr y caminar en diversos sitios donde podría encontrarse las larvas infectivas (las cuales suelen resistir en diversos ambientes y temperaturas) y penetrar a nivel de piel. Además, los caninos tienden olfatear o ingerir objetos, agua e incluso, heces contaminadas, incrementando el riesgo de adquirir dicho parásito (Silva et al., 2023; Šmigová et al., 2021).

Por otro lado, se pudo observar que, los felinos tienen una probabilidad altamente significativa de presentar heces positivas a *Toxocara* spp. en comparación con los caninos. Esto puede deberse al comportamiento de caza que tienen los felinos, debido a que pueden infectarse del parásito por medio de la ingesta de larvas dentro de hospederos paraténicos, por ejemplo, los roedores (Rostami et al., 2020). De igual manera, los gatos pueden contribuir con un papel importante en la dispersión y la contaminación del medio ambiente con huevos embrionados de *Toxocara* spp. Debido que se ha demostrado que aproximadamente el 21% de los espacios públicos (parques, areneros, playas, entre otros sitios donde los felinos tienden a enterrar o cubrir sus heces) a nivel mundial están contaminados con huevos de *Toxocara* spp. En América Latina, se estima que la prevalencia de *Toxocara* spp. en los parques públicos es del 50%, lo que significa que puede considerarse una vía de transmisión para otros gatos e incrementar el riesgo de zoonosis (Iturbe et al., 2021; Nunez et al., 2024).

Con respecto a los protozoarios (*Giardia duodenalis* y *Cystoisospora* spp.) no hay una diferencia significativa para la presencia de estos en relación con la especie, ya que se ha observado una alta adaptabilidad de ellos, permitiéndoles infectar distintas especies sin una predilección marcada (Arruda et al., 2021). Además, este grupo parasitario, tiene la capacidad de sobrevivir y reproducirse en los intestinos de diversos mamíferos (Mendoza y Otranto, 2023).

5.4. Asociación de la presencia o ausencia de parásitos gastrointestinales con respecto al sexo

Se observó en ambas especies que los machos tienen mayor predisposición a infectarse de cualquier parásito gastrointestinal en comparación con las hembras, incluso se observó que estos tienen mayor probabilidad de tener ancylostomatídeos. Lo cual podría estar relacionado con que los machos tienden a mostrar comportamientos más activos y de dominancia, tal es caso del marcaje de territorio o búsqueda de la hembra en época de apareamiento, por lo que este comportamiento incrementa la exposición del animal en ambientes contaminados con las diferentes formas infectivas de los PGI (Jovanovic et al., 2024; Traub et al., 2021).

5.5. Asociación de la presencia o ausencia de parásitos gastrointestinales con respecto al grupo etario

Se logró determinar que el grupo etario con mayor probabilidad de contraer cualquier tipo de parásito gastrointestinal son los cachorros, tanto felinos como caninos, en comparación con la población adulta y geriátrica. La razón detrás de este hallazgo está en que el sistema inmunológico de los cachorros se está desarrollando y aún no pueden generar suficiente inmunidad, por lo que, si los cachorros vienen de criaderos contaminados con PGI o son expuestos al ambiente externo a edad muy temprana, es muy probable que adquieran una infección parasitaria (Murnik et al., 2023). Otra posibilidad de transmisión de parásitos gastrointestinales, está la transmisión vertical, donde las hembras puedan infectar a sus cachorros dentro del útero o a través de la leche (Šmigová

et al., 2021).

Tal es el caso de *Toxocara* spp. donde la transmisión vertical ocurre cuando las larvas somáticas se reactivan durante el tercer trimestre de la gestación, invadiendo el saco gestacional e infectando a los embriones en desarrollo. Este tipo de transmisión continúa después del parto, ya que las larvas pueden transmitirse por vía lactogénica a las crías recién nacidas (Lukashev et al., 2020; Schwartz et al., 2022).

En el caso de *Ancylostoma caninum*, algunas larvas se detienen en los tejidos y sirven como fuente de infección para las crías a través de rutas transmamarias y posiblemente transplacentarias, siendo los neonatos y cachorros la población más predispuesta a este parásito (Hawdon y Wise, 2021).

5.6. Asociación de la presencia o ausencia de parásitos gastrointestinales con respecto a la ubicación geográfica

Para este estudio la ubicación geográfica no fue una variable que generara datos relevantes en cuanto asociación de presencia o ausencia de parásitos. Aunque los resultados estuvieron cerca de la significancia, se determinó que se requiere de conocer de puntos geográficos más exactos de procedencia de las muestras fecales, esto con el fin de relacionar la positividad y prevalencia con cada provincia y zona determinada.

5.7. Asociación de la presencia o ausencia de parásitos gastrointestinales con respecto a la consistencia fecal

Las consistencias fecales anormales (pastosas, líquidas y mucosas) tuvieron asociación, unas con mayor o menor rango, con la presencia de las parasitosis

en estudio. Excepto para *Toxocara* spp. que no tuvo asociación significativa con alguna de las consistencias fecales mencionadas. Sin embargo, esto pudo estar influenciado porque *Toxocara* spp. fue el PGI que tuvo menos muestras positivas de las variables respuesta, por lo que se ocuparía más muestreo de heces positivas a este parásito y compararlas con estas variables para dilucidar mejor el efecto posible.

Las heces deberían tener una consistencia formada, mostrando que la materia fecal está siendo movilizadada adecuadamente por el intestino e indicando una adecuada absorción de líquido y nutrientes, además es un indicativo de menos irritación en este órgano, Cuando hay una alteración de la consistencia fecal puede deberse a diversos aspectos, entre los que destaca la irritación e inflamación de la mucosa intestinal, provocando un incremento de la secreción de muco, generando afecciones en la absorción de agua a nivel de intestino, lo que desencadena en heces pastosas, líquidas o con muco (Murnik et al., 2023; Suchodolski, 2022) .

Tal es el caso de los ancylostomatídeos, los cuales se adhieren a la pared del intestino rompiendo la homeostasis y generando los desbalances antes mencionados, incluso en este caso las deposiciones pueden ser líquidas y sanguinolentas debido a las microhemorragias que este parásito provoca (Sykes, 2022; Zajac et al., 2021). En el caso de *Giardia duodenalis*, causa interrupción de las uniones estrechas de los enterocitos, por ende, se da malabsorción intestinal e hipersecreción lo que se asocia con el desarrollo de diarrea pastosa y mal oliente (Sykes, 2022). En lo que respecta a *Cystoisospora* spp., este parásito

se encuentra en el revestimiento de células epiteliales las vellosidades del intestino delgado, colon y ciego, por lo que en infecciones graves hay retraso en el crecimiento de esas microvellosidades y, además, se genera una reducción en la absorción de líquido, esto conlleva a la diarrea líquida o pastosa (Murnik et al., 2023; Sykes, 2022).

5.8. Análisis del estudio filogenético de *Spirometra mansoni* y *Spirocerca lupi*

En general, se observó que *Spirometra mansoni* alberga una alta diversidad genética y muy poca influencia de la ubicación geográfica. Esto podría relacionarse con la gran variabilidad de hospederos que involucra el ciclo de vida, pues los segundos hospederos intermediarios o paraténicos son muchos vertebrados silvestres y domesticados, incluidos anfibios, reptiles, aves y mamíferos, mientras que los hospederos definitivos son los carnívoros salvajes y domesticados, esto facilita una mezcla genética entre poblaciones de *Spirometra mansoni* (Kuchta et al., 2024; Xu et al., 2022).

Además, dicho hallazgo coincide con el estudio de Alvarado et al., (2024), donde de igual forma se identificó que *Spirometra mansoni* posee alta diversidad genética, debido a que se estudiaron siete casos autóctonos de Costa Rica, y se demostró, por medio de análisis filogenético, que las secuencias de las diferentes ubicaciones geográficas se mezclaban entre sí sin ningún signo de agrupación, según la región geográfica o el hospedero.

En lo que respecta a *Spirocerca lupi*, la diversidad genética en las mismas zonas geográficas puede relacionarse con factores como la fragmentación del

hábitat, donde se favorezca el ciclo biológico del parásito, permitiendo que este se adapte al medio y las diferentes condiciones medio ambientales, generando así un tipo de especiación alopátrica (Rojas et al., 2020). Cabe agregar que, *Spirocerca lupi* requiere de los escarabajos peloteros como hospedero intermediario; sin embargo, poco se habla de las condiciones ambientales y de suelo que estos requieren para su desarrollo. Este impacto puede contribuir a la especiación alopátrica dentro de una misma región geográfica (Ramírez., et al., 2016).

Los hallazgos coinciden con el estudio de Alfaro et al., (2023) donde se obtuvo que las secuencias de *Spirocerca lupi* se relacionan en mayor medida con secuencias de América, mostrando así la relación genética con respecto a la ubicación geográfica

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

En este estudio se analizaron 1044 muestras fecales de perros y 120 de gatos que provenían de las siete provincias de Costa Rica. Confirmándose que los ancylostomatideos es el grupo con mayor prevalencia.

Se determinó que la técnica de flotación con sulfato de zinc permite la detección de la mayoría de parasitosis gastrointestinales analizadas. Sin embargo, es importante complementar el diagnóstico coproparasitológico con la técnica de sedimentación, ya que esta fue la ideal para la detección de parásitos pesados y atípicos (*Trichuris vulpis*, *Dipylidium caninum*, *Spirocerca lupi* y *Spirometra mansoni*).

Tres de los parásitos (ancylostomatideos, *Giardia duodenalis* y *Toxocara* spp.) que se presentaron con mayor frecuencia, representan un riesgo para la salud pública debido a su potencial zoonótico. Esto deja ver la necesidad de dar a conocer las medidas de prevención y control, tanto a nivel veterinario como en humanos, para reducir el riesgo de transmisión zoonótica.

La presencia o ausencia de parásitos gastrointestinales asociado a factores de riesgo como la especie, sexo, grupo etario y la consistencia fecal, han generado datos valiosos sobre la probabilidad de las infecciones parasitarias en ambas especies.

El estudio molecular y filogenético de *Spirometra mansoni* y *Spirocerca lupi* proporcionó datos importantes sobre relaciones evolutivas y geográficas de ambos parásitos, dando a conocer importantes implicaciones para su control y prevención.

CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

Al ser los ancylostomatideos el grupo parasitario con mayor prevalencia en esta investigación, los estudios a futuro deberían ir dirigidos a la descripción molecular de este grupo parasitario, además de dar a conocer los posibles genes que facilitan la resistencia a anti-helmínticos. Este conocimiento favorecerá al sector veterinario a ejercer el adecuado control de este parásito y así evitar la propagación de la zoonosis.

Ampliar el estudio de prevalencia de PGI que involucre los doce meses del año. Esto permitiría generar información relevante sobre posibles tendencias y comportamientos de los PGI de forma anual.

Realizar estudios adicionales donde se logre hacer muestreos más sistemáticos en las zonas lejanas del Valle Central, con el fin de reconocer si hay una correlación significativa de cada PGI con respecto al punto de referencia exacto, pues actualmente hay una faltante de información relacionada con este tema.

Desarrollar investigaciones posteriores sobre *Spirometra mansoni* y *Spirocerca lupi*, dirigidas en los huéspedes paraténicos e intermedios, ya que esto podría brindar información sobre las posibles variaciones genéticas e influencia geográfica observadas en el análisis filogenético

Fomentar la educación sobre parasitosis gastrointestinales, proyectada a propietarios de mascotas, médicos veterinarios y al sector salud en general, ya que la concientización y la educación en estos grupos es clave para generar un impacto significativo en la salud animal y pública, debido a las implicaciones zoonóticas de estos PGI.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alemán Laporte, J. M. (2011). Prevalencia de parásitos gastrointestinales en siete refugios de perros abandonados del Valle Central, Costa Rica. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Costa Rica]. Repositorio Académico Institucional de la Universidad Nacional de Costa Rica.
- Alfaro-Segura, P., Robleto-Quesada, J., Montenegro-Hidalgo, V. M., Molina-Mora, J. A., Baneth, G., Verocai, G. G., ... & Rojas, A. (2023). Elucidating Spirocerca lupi spread in the Americas by using phylogenetic and phylogeographic analyses. *Frontiers in Parasitology*, 2, 1249593. doi.org/10.3389/fpara.2023.1249593
- Alho, A. M., Lima, C., Colella, V., Madeira de Carvalho, L., Otranto, D., & Cardoso, L. (2018). Awareness of zoonotic diseases and parasite control practices: a survey of dog and cat owners in Qatar. *Parasites & Vectors*, 11(1). doi:10.1186/s13071-018-2720-0.
- Alvarado-Hidalgo, I., Campos-Camacho, J., Arguedas-Morales, Y., Romero-Vega, L. M., Alfaro-Alarcón, A., Anchia-Ureña, G., ... & Rojas, A. (2024). Molecular, morphological and histopathological evidence of Spirometra mansoni in wild and domestic animals from Costa Rica. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 51, 101030. doi.org/10.1016/j.vprsr.2024.101030
- Alves, M. E. M., Martins, F. D. C., Bräunig, P., Pivoto, F. L., Sangioni, L. A., & Vogel, F. S. F. (2018). Molecular detection of Cryptosporidium spp. and the occurrence of intestinal parasites in fecal samples of naturally infected dogs and cats. *Parasitology Research*, 117(9):3033-3038. doi:10.1007/s00436-018-5986-4
- Arruda, I. F., Ramos, R. C. F., Barbosa, A. da S., Abboud, L. C. de S., dos Reis, I.C., Millar, P. R., & Amendoeira, M. R. R. (2021). Intestinal parasites and risk factors in dogs and cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 24(7) 100552. doi: 10.1016/j.vprsr.2021.100552.

- Badri, M., Olfatifar, M., KarimiPourSaryazdi, A., Zaki, L., Madeira de Carvalho, L. M., Fasihi Harandi, M., ... & Vafae Eslahi, A. (2022). The global prevalence of Spirometra parasites in snakes, frogs, dogs, and cats: A systematic review and meta-analysis. *Veterinary Medicine and Science*, 8(6), 2785-2805. <https://doi.org/10.1002/vms3.932>
- Blair, C., & Ané, C. (2020). Phylogenetic trees and networks can serve as powerful and complementary approaches for analysis of genomic data. *Systematic Biology*, 69(3), 593-601. doi.org/10.1093/sysbio/syz056
- Bowman, D. D. (2013). *Georgis' Parasitology for Veterinarians-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Bradbury RS, Hobbs CV (2020). Capítulo dieciséis: Toxocara seroprevalencia en los Estados Unidos y su impacto para los individuos y la sociedad. *Advances in parasitology*. Academic Press, 109(2), 317-339. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.035>
- Campbell, F., Cori, A., Ferguson, N., & Jombart, T. (2019). Bayesian inference of transmission chains using timing of symptoms, pathogen genomes and contact data. *PLoS computational biology*, 15(3), e1006930. doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006930
- Campos, D. R., Oliveira, L. C., de Siqueira, D. F., Perin, L. R., Campos, N. C., Aptekmann, K. P., & Martins, I. V. F. (2016). Prevalence and risk factors associated with endoparasitosis of dogs and cats in Espírito Santo, Brazil. *Acta Parasitologica*, 61(3). 544-548. doi:10.1515/ap-2016-0072
- Castro, C. (2009). Evaluación de la contaminación por parásitos gastrointestinales de caninos en dieciocho playas del Pacífico Central de Costa Rica. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Costa Rica]. Repositorio Académico Institucional de la Universidad Nacional de Costa Rica. <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/12986>
- Challa, S., & Neelapu, N. R. R. (2019). Phylogenetic trees: applications, construction, and assessment. *Essentials of Bioinformatics, Volume*

III: In Silico Life Sciences: Agriculture, 167-192.

- Dantas-Torres, F., Ketzis, J., Mihalca, A. D., Baneth, G., Otranto, D., Tort, G. P., Traub, R. J. (2020). TroCCAP recommendations for the diagnosis, prevention and treatment of parasitic infections in dogs and cats in the tropics. *Veterinary Parasitology*, 283 109167. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109167
- Dib, L. V., Palmer, J. P. S., de Lima, C. D. S. C. C., Ramos, R. C. F., Bastos, O. M. P., Uchôa, C. M. A., ... & Barbosa, A. D. S. (2019). Comparison of four parasitological techniques for laboratory diagnosis of eggs from *Spirometra* spp. in wild mammal fecal samples. *Acta Parasitologica*, 64, 942-949. doi.org/10.2478/s11686-019-00120-1 doi.org/10.1007/s11259-021-09804-4
- Dolz, G., Guzmán-Gómez, N., Bermúdez-Salas, F. R., Schmidt, L. J., Bonilla, M. C., & Urbina-Villalobos, A. (2020). *Detección de anticuerpos anti-Toxocara spp. en caninos de una comunidad periurbana de la provincia de Heredia, Costa Rica*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Costa Rica]. Repositorio Académico Institucional de la Universidad Nacional de Costa Rica. <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/17732>
- Dubey, J. P., & Lindsay, D. S. (2019). Coccidiosis in dogs—100 years of progress. *Veterinary parasitology*, 266, 34-55. doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.12.004
- Ezema, K. U., Malgwi, S. A., Zango, M. K., Kyari, F., Tukur, S. M., Mohammed, A., & Kayeri, B. K. (2019). Gastrointestinal parasites of dogs (*Canis familiaris*) in Maiduguri, Borno State, Northeastern Nigeria: Risk factors and zoonotic implications for human health. *Veterinary World*, 12(7), 1150. 10.14202/vetworld.2019.1150-1153
- Fernández Anchía, L. (2009). *Diagnóstico de parásitos gastrointestinales en caninos y felinos: estudio retrospectivo en dos laboratorios veterinarios*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Costa

Rica]. Repositorio Académico Institucional de la Universidad Nacional de Costa Rica.

<https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/17732>

- Fernández, D., J. Oliveira, S. Calderón, y, J. Romero. (2008). Prácticas de diagnóstico y control de parásitos de caninos y felinos en 50 clínicas veterinarias del área metropolitana de Costa Rica. *Revista Ciencias Veterinarias*, 26 (2): 51-71.
- Ferreira, F. S., Pereira-Baltasar, P., Parreira, R., Padre, L., Vilhena, M., Távora Tavira, L., Centeno-Lima, S. (2011). Intestinal parasites in dogs and cats from the district of Évora, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 179(1-3), 242– 245. doi:10.1016/j.vetpar.2011.02.003
- Fisher, A. A., Hassler, G. W., Ji, X., Baele, G., Suchard, M. A. y Lemey, P. (2022). Filogenética bayesiana escalable. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 377 (1861), 20210242. doi.org/10.1098/rstb.2021.0242
- Giannelli, A., Baldassarre, V., Ramos, R. A., Lia, R. P., Furlanello, T., Trotta, M., ... & Otranto, D. (2014). Spirocerca lupi infection in a dog from southern Italy: an “old fashioned” disease?. *Parasitology research*, 113, 2391-2394.
- Gupta, N. (2019). DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of cytology*, 36(2), 116-117.
- Hawdon, J. M., & Wise, K. A. (2021). Ancylostoma caninum and other canine hookworms. *Dog parasites endangering human health*, 147-193.
- Horton, B., Bridle, H., Alexander, C. L., & Katzer, F. (2019). *Giardia duodenalis* in the UK: current knowledge of risk factors and public health implications. *Parasitology*, 146(4), 413-424. doi:10.1017/S0031182018001683
- Htun, L. L., Rein, S. T., Win, S. Y., Soe, N. C., Thein, S. S., Khaing, Y., & Bawm, S. (2021). Occurrence of gastrointestinal helminths and the first molecular detection of *Ancylostoma ceylanicum*, *Trichuris trichiura*, and *Trichuris vulpis* in dogs in Myanmar. *Parasitology Research*,

- 120(10), 3619-3624. doi.org/10.1007/s00436-021-07290-w
- Inácio, S. V., Gomes, J. F., Falcão, A. X., Da Silva, D. R. R., Nagata, W. B., Dos Santos, B. M., ... & Bresciani, K. D. S. (2022). TF-Test techniques for the laboratory diagnosis of gastrointestinal parasites of humans and animals. *Veterinaria Italiana*, 58(2).
<https://doi.org/10.12834/VetIt.2040.10928.1>
- Iturbe Cossío, T. L., Montes Luna, A. D., Ruiz Mejia, M., Flores Ortega, A., Heredia Cárdenas, R., & Romero Núñez, C. (2021). Risk factors associated with cat parasites in a feline medical center. *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*, 7(2), doi: 20551169211033183. doi.org/10.1177/20551169211033
- Joffe, D., Van Niekerk, D., Gagné, F., Gilleard, J., Kutz, S., & Lobingier, R. (2011). The prevalence of intestinal parasites in dogs and cats in Calgary, Alberta. *The Canadian Veterinary Journal*, 52(12), 1323.
- Johe, J. (2019). Giardia is the most prevalent parasitic infection in dogs and cats with diarrhea in the city of Medellín, Colombia. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 18, 100335. doi: 10.1016/j.vprsr.2019.100335
- Jovanovic, N. M., Bisenic, O., Nenadovic, K., Bogunovic, D., Rajkovic, M., Maletic, M., ... & Ilic, T. (2024). Gastrointestinal parasites in owned dogs in Serbia: Prevalence and risk factors. *Animals*, 14(10), 1463. doi.org/10.3390/ani14101463
- Kadri, K. (2019). Polymerase chain reaction (PCR): Principle and applications. *Synthetic Biology-New Interdisciplinary Science*, 1-17.
- Khan, W., Nisa, N. N., Ullah, S., Ahmad, S., Mehmood, S. A., Khan, M., ... & Anwar, K. (2019). Gastrointestinal helminths in dog feces surrounding suburban areas of Lower Dir district, Pakistan: A public health threat. *Brazilian Journal of Biology*, 80, 511-517.
<https://doi.org/10.1590/1519-6984.211956>
- Kim, H. Y., Lee, H., Lee, S. H., Seo, M. G., Yi, S., Kim, J. W., ... & Kwak, D. (2019). Multilocus genotyping and risk factor analysis of Giardia

- duodenalis in dogs in Korea. *Acta tropica*, 199, 105113.
doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105113
- Kostopoulou, D., Claerebout, E., Arvanitis, D., Ligda, P., Voutzourakis, N., Casaert, S., & Sotiraki, S. (2017). Abundance, zoonotic potential and risk factors of intestinal parasitism amongst dog and cat populations: The scenario of Crete, Greece. *Parasites & vectors*, 10(43), 1-12.
doi.org/10.1186/s13071-017-1989-8
- Kuchta, R., Phillips, A. J., & Scholz, T. (2024). Diversity and biology of *Spirometra* tapeworms (Cestoda: Diphyllbothriidea), zoonotic parasites of wildlife: a review. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 100947. doi.org/10.1016/j.ijppaw.2024.100947
- Kuzi, S., Argentaro, S. E., & Baneth, G. (2020). Prevalence of *Giardia duodenalis* infection, co-morbidities and associated risk factors in dogs admitted to a veterinary teaching hospital in Israel. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 68, 101401.
https://doi.org/10.4314/nvj.v40i3.5
- Lima, V. F., Melo, H. M., de Sousa, S. X., da Silva Brandão, T., & de Melo Vaz, A. F. (2020). *Spirometra mansonoides* from a domestic cat in northeastern Brazil: case report. *Acta Veterinaria Brasilica*, 14(3).
doi.org/10.21708/avb.2020.14.3.9389
- Lukashev, A. N., Ruzina, M. N., & Akhmadishina, L. V. (2020). Prevalencia de *Toxocara* en perros, gatos y el medio ambiente en Rusia. *Avances en Parasitología*, 109, 801-817.
- Macpherson, M. L., Zendejas-Heredia, P. A., Sylvester, W., Gasser, R. B., Traub, R. J., Colella, V., & Macpherson, C. N. (2023). Zoonotic helminths of dogs and risk factors associated with polyparasitism in Grenada, West Indies. *Parasitology*, 1-6.
- Mendoza Roldan, J. A., & Otranto, D. (2023). Zoonotic parasites associated with predation by dogs and cats. *Parasites & Vectors*, 16(1), 55.
- Montgomery, S. P. (2020). Cutaneous larva migrans. In *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (pp. 898-900). Elsevier.

- Morandi, B., Greenwood, S. J., Conboy, G. A., Galuppi, R., Poglayen, G., & VanLeeuwen, J. A. (2019). Endoparasites in dogs and cats diagnosed at the Veterinary Teaching Hospital (VTH) of the University of Prince Edward Island between 2000 and 2017. A large-scale retrospective study. *Preventive Veterinary Medicine*, *175*(20), 104878. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104
- Morelli, S., Diakou, A., Di Cesare, A., Colombo, M., & Traversa, D. (2021). Canine and feline parasitology: analogies, differences, and relevance for human health. *Clinical microbiology reviews*, *34*(4), e00266-20. doi.org/10.1128/CMR.00266-20
- Murnik, L. C., Dauschies, A., & Delling, C. (2023). Gastrointestinal parasites in young dogs and risk factors associated with infection. *Parasitology Research*, *122*(2), 585-596. doi.org/10.1007/s00436-022-07760-9
- Nunez, C. R., Contreras, L. M., Cardenas, R. H., Ortega, A. F., & Gomez, L. G. B. (2024). Toxocara s pp. Prevalence and risk factors in cats from Mexico. *Res J. Vet. Pract*, *12*(2), 25-31.
- Palmer, D., & Lyon, J. (2013). Detection of Trematode eggs and Eimeria leuckarti–Sedimentation method (FEST)– Faecal samples. *Department of Agriculture and Food of Western Australia*, *26*, 1-10.
- Pandey, R. P., Raj, V. S., Singh, R. K., & Mohaptara, T. M. (2022). Dipylidiasis. In *Textbook of Parasitic Zoonoses* (pp. 377-383). Singapore: Springer Nature Singapore. doi.org/10.1007/978
- Robleto-Quesada, J., Benavides, G., Solano-Barquero, A., Montenegro, V., Eriksson, C. E., Allen, J., ... & Rojas, A. (2023). Metabarcoding Versus Parasite-Specific Real-Time PCRs in the Detection of Nematodes of Veterinary Importance. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4493751>
- Rodríguez R. I., Cordero, L. G., Trinidad-Martínez, I., & Ojeda-Chi, M. M. (2019). *Spirocerc* *lupi* en perros de Yucatán, México: Reporte de caso y estudio retrospectivo. *Revista MVZ Córdoba*, *24*(1), 7145-7150. doi.org/10.21897/rmvz.1253
- Rodríguez, A. J., González, N., Montes, M. C., Fernández, L., Bonilla, D. K.,

- Azeñas, J. M., ... & Suárez, J. A. (2021). Cutaneous larva migrans. *Current Tropical Medicine Reports*, 8, 190-203. doi.org/10.1007/s40475-021-00239-0
- Rodríguez, J. Y., Cummings, K. J., Hodo, C. L., & Hamer, S. A. (2023). A repeated cross-sectional study of intestinal parasites in Texas shelter dogs using fecal flotation and saline sedimentation. *Parasitology research*, 122(1), 237-243. doi.org/10.1007/s00436-022-07722-1
- Rojas, A., Dvir, E., & Baneth, G. (2020). Insights on *Spirocerca lupi*, the carcinogenic dog nematode. *Trends in parasitology*, 36(1), 52-63. doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.004
- Rojas, A., Dvir, E., & Baneth, G. (2020). Insights on *Spirocerca lupi*, the carcinogenic dog nematode. *Trends in parasitology*, 36(1), 52-63. doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.004
- Rojas-Sánchez, E., Umaña-Blanco, F., Jiménez-Rocha, A., Vega-Benavides, K., Medaglia, A., Solano-Barquero, A., ... & Jiménez, M. (2023). Cryptic diversity in a gastrointestinal acanthocephalan of New World primates from Costa Rica. *Scientific Reports*, 13(1), 2402. doi.org/10.1038/s41598-023-28585-1
- Rostami, A., Sepidarkish, M., Ma, G., Wang, T., Ebrahimi, M., Fakhri, Y., ... y Gasser, R. B. (2020). Prevalencia mundial de infección por *Toxocara* en gatos. *Avances en Parasitología*, 109, 615-639.
- Sáenz Ugalde, C. (2013). *Parásitos gastrointestinales con carácter zoonótico y evaluación de algunos parámetros del estado de salud en perros de áreas recreativas de Costa Rica*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Costa Rica]. Repositorio Académico Institucional de la Universidad Nacional de Costa Rica. <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/12937>
- Saleh, M. N., Heptinstall, J. R., Johnson, E. M., Ballweber, L. R., Lindsay, D. S., Werre, S., ... & Zajac, A. M. (2019). Comparison of diagnostic techniques for detection of *Giardia duodenalis* in dogs and cats. *Journal of veterinary internal medicine*, 33(3), 1272-1277.

doi.org/10.1111/jvim.15491

- Schwartz, R., Bidaisee, S., Fields, P. J., Macpherson, M. L., & Macpherson, C. N. (2022). The epidemiology and control of *Toxocara canis* in puppies. *Parasite Epidemiology and Control*, 16, e00232. doi.org/10.1016/j.parepi. 2021.e00232
- Silva, W. I., Lima, E. F., Silva, J. O., Alves, M. D. M., Alves, C. L. P., Silva, A. L. P., ... & Vilela, V. L. R. (2023). Endoparasites in domestic cats (*Felis catus*) in the semi-arid region of Northeast Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 32, e012123. doi.org/10.1590/S1984-29612023065
- Šmigová, J., Papajová, I., Šoltys, J., Pipiková, J., Šmiga, Ľ., Šnábel, V., ... & Takáč, L. (2021). The Prevalence of Endoparasites in Slovakian Household Dogs and Cats. doi.org/10.21203/rs.3.rs-280776/v1
- Soares, F. A., Benitez, A. D. N., Santos, B. M. D., Loiola, S. H. N., Rosa, S. L., Nagata, W. B., ... & Gomes, J. F. (2020). A historical review of the techniques of recovery of parasites for their detection in human stools. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53. doi.org/10.1590/0037-8682-0535-2019
- Sobotyk, C., Upton, K. E., Lejeune, M., Nolan, T. J., Marsh, A. E., Herrin, B. H., & Verocai, G. G. (2021). Retrospective study of canine endoparasites diagnosed by fecal flotation methods analyzed across veterinary parasitology diagnostic laboratories, United States, 2018. *Parasites & Vectors*, 14(1), 439. doi.org/10.1186/s13071-021-04960-7
- Souza, J. B. B., de Assis Silva, Z. M., Alves-Ribeiro, B. S., de Sá Moraes, I., Alves-Sobrinho, A. V., Saturnino, K. C., ... & de Souza Ramos, D. G. (2023). Risk factors associated with intestinal parasites found in fecal samples from dogs and cats. doi: 10.20944/preprints202306.1462.v1
- Subbotin, S. A. (2021). Phylogenetic analysis of DNA sequence data. In *Techniques for work with plant and soil nematodes* (pp. 265-282). Wallingford UK: CABI. doi.org/10.1079/9781786391759.0015
- Suchodolski, J. S. (2022). Analysis of the gut microbiome in dogs and

cats. *Veterinary Clinical Pathology*, 50, 6-1

- Sykes, J. E. (2022). *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
https://www.google.co.cr/books/edition/Greene_s_Infectious_Diseases_of_the_Dog/Tyl3EAAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=1&dq=Greene%27s+Infectious+Diseases+of+the+Dog+and+Cat-E-Book.&printsec=frontcover
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2015). *Veterinary parasitology*. John Wiley & Sons.
https://www.google.co.cr/books/edition/Veterinary_Parasitology/mi2kBgAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=1&dq=Veterinary+parasitology.+John+Wiley+%26+Sons.&printsec=frontcover
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2016). *Veterinary parasitology*. (Fourth Edition). John Wiley & Sons.
- Thamer, N., Al-Idreesi, S., & Farhood, N. (2022). Detection Of Gastrointestinal Parasites of Cats and Dogs in Basrah Province. *Basrah Journal of Veterinary Research*, 21(1), 67-74. doi 10.23975/bjvetr.2022.177426
- Traub, R. J., Zendejas-Heredia, P. A., Massetti, L., & Colella, V. (2021). Zoonotic hookworms of dogs and cats—lessons from the past to inform current knowledge and future directions of research. *International Journal for Parasitology*, 51(13-14), 1233-1241. doi.org/10.1111/vcp.13031
- Tull, A., Valdmann, H., Rannap, R., Kaasiku, T., Tammeleht, E., & Saarma, U. (2022). Free-ranging rural dogs are highly infected with helminths, contaminating environment nine times more than urban dogs. *Journal of Helminthology*, 96, e19. doi:10.1017/S0022149X22000116
- Ünal, G. G., & Gokpinar, S. (2020). Prevalence of intestinal parasites in dogs and its importance in terms of public health. *International Journal of Veterinary and Animal Research (IJVAR)*, 3(3), 64-68.

- Villamizar, X., Higuera, A., Herrera, G., Vasquez-A, L. R., Buitron, L., Muñoz, L. M., ... & Ramírez, J. D. (2019). Molecular and descriptive epidemiology of intestinal protozoan parasites of children and their pets in Cauca, Colombia: a cross-sectional study. *BMC infectious diseases*, *19*(1), 1-11.
- World Animal Protection (2016). Estudio Nacional sobre la tenencia de perros en Costa Rica. Recuperado de <https://issuu.com/wspalatam/docs/estudioperros-web-singles>.
- Xu, F. F., Chen, W. Q., Liu, W., Liu, S. S., Wang, Y. X., Chen, J., ... & Zhang, X. (2022). Genetic structure of *Spirometra mansoni* (Cestoda: Diphylobothriidae) populations in China revealed by a Target SSR-seq method. *Parasites & Vectors*, *15*(1), 485.
- Zajac, A. M., Conboy, G. A., Little, S. E., & Reichard, M. V. (2021). *Veterinary clinical parasitology*. John Wiley & Sons.
- Ziam, H., Kelanemer, R., Belala, R., Medrouh, B., Khater, H. F., Djerbal, M., & Kernif, T. (2022). Prevalence and risk factors associated with gastrointestinal parasites of pet dogs in North-Central Algeria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *86*, 101817.
doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101817

IX. APÉNDICES

Apéndice 1.

Razones de probabilidad (OR) con intervalo de confianza de 95% para determinar el grado de asociación de estas variables con la presencia de PGI

Parásito	Variable independiente	OR	IC inferior	IC Superior	Valor P	Test	Significancia
CONP	Especie	1.08	0.72	1.63	7.78e-01	χ^2	no
	Sexo	0.78	0.61	0.99	5.46e-02	χ^2	si
	Consistencia	2.24	1.61	3.09	1.03e-06	χ^2	si
	Grupo etario	2.92	2.21	3.85	1.45e-14	χ^2	si
	Ubicación geográfica	1.28	0.83	1.97	3.16e-01	χ^2	no
CONH	Mes	0.92	0.72	1.17	5.48e-01	χ^2	no
	Especie	2.24	1.28	3.92	0.0054	χ^2	si
	Sexo	0.71	0.54	0.93	0.0160	χ^2	si
	Consistencia	1.73	1.22	2.46	0.0028	χ^2	si
	Grupo etario	1.68	1.24	2.27	0.0008	χ^2	si
CONPROT	Ubicación geográfica	1.34	0.84	2.14	0.2657	χ^2	no
	Mes	0.85	0.65	1.12	0.2957	χ^2	no
	Especie	0.79	0.47	1.32	4.53	χ^2	No
	Sexo	1.09	0.78	1.53	6.50e-01	χ^2	no
	Consistencia	2.63	1.60	4.33	1.30e-04	χ^2	si
Ancylostomatideos	Grupo etario	5.56	3.93	7.87	7.78e-25	χ^2	si
	Ubicación geográfica	1.05	0.58	1.90	9.86e-01	χ^2	no
	Mes	1.00	0.72	1.40	1.00e+00	χ^2	no
	Especie	5.16	2.24	11.88	3.35e-04	χ^2	si
	Sexo	0.69	0.52	0.92	1.49e-02	χ^2	si
Toxocara spp.	Consistencia	1.49	1.04	2.15	3.78e-02	χ^2	si
	Grupo etario	1.46	1.06	2.02	2.34e-02	χ^2	si
	Ubicación geográfica	1.49	0.92	2.41	1.32e-01	χ^2	no
	Mes	0.88	0.66	1.17	4.22e-01	χ^2	no
	Especie	0.13	0.06	0.27	6.99e-07	χ^2	si
Cystoisospora spp.	Sexo	0.99	0.49	2.01	1.00e+00	χ^2	no
	Consistencia	1.71	0.65	4.48	3.73e-01	χ^2	no
	Grupo etario	3.64	1.79	7.38	3.22e-04	χ^2	si
	Ubicación geográfica	1.16	0.35	3.87	7.43e-01	χ^2	no
	Mes	0.54	0.26	1.28	1.37e-01	χ^2	no
Giardia duodenalis	Especie	0.54	0.26	1.23	1.37e-01	χ^2	No
	Sexo	0.68	0.30	1.54	4.87e-01	χ^2	no
	Consistencia	2.84	1.11	7.23	3.47e-02	χ^2	si
	Grupo etario	4.43	2.47	7.93	1.59e-07	χ^2	si
	Ubicación geográfica	1.28	0.49	3.30	5.93e-01	Fisher's Exact	no
Giardia duodenalis	Mes	0.71	0.39	1.27	3.13e-01	χ^2	no
	Especie	0.76	0.43	1.37	4.56e-01	χ^2	no
	Sexo	1.17	0.80	1.71	4.77E-01	χ^2	no
	Consistencia	2.49	1.40	4.44	1.95e-03	χ^2	si
	Grupo etario	5.38	3.62	7.99	5.02e-019	χ^2	si
Giardia duodenalis	Ubicación geográfica	0.91	0.45	1.86	9.34e-01	χ^2	no
	Mes	1.22	0.83	1.79	3.49e-01	χ^2	no

Nota: OR: Razones de probabilidad, IC: Intervalo de confianza, χ^2 = Prueba de Chi cuadrado


Fuente: Propia.

Apéndice 2.

Protocolo digital para el manejo de muestras y pacientes sospechosos de portar PGI para médicos veterinarios.

PROTOCOLO DE MANEJO


DE MUESTRAS FECALES Y PACIENTES SOSPECHOSOS A PARÁSITOS GASTROINTESTINALES (PGI)



1


EN COSTA RICA

Se ha realizado un estudio de seroprevalencia en perros y gatos de 2023 donde se reportaron un total de 104 muestras fecales (50 de perros y 54 de gatos con sospecha) que presentaron la infección por PGI. Un total de 62 fueron establos de muestra positiva a un parásito intestinal reconocido, los demás se envían a grandes centros de diagnóstico, en todos los casos se reportó la presencia de un parásito, donde no se obtuvieron casos positivos, entre:



2

PREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO DE PGI EN PERROS Y GATOS



3

Ancylostomidos

Factores de riesgo:

- No hay una diferencia significativa entre la prevalencia de Ancylostomidos en perros y gatos.
- El ser macho influye en la prevalencia de Ancylostomidos en perros y gatos.
- Los machos tienen una mayor prevalencia de Ancylostomidos en perros y gatos.
- No hay una diferencia significativa en la prevalencia de Ancylostomidos en perros y gatos.

Factores de riesgo:

- No hay una diferencia significativa en la prevalencia de Ancylostomidos en perros y gatos.
- El ser macho influye en la prevalencia de Ancylostomidos en perros y gatos.
- Los machos tienen una mayor prevalencia de Ancylostomidos en perros y gatos.
- No hay una diferencia significativa en la prevalencia de Ancylostomidos en perros y gatos.

4


Cystospora spp.

Factores de riesgo:

- No hay una diferencia significativa entre la prevalencia de Cystospora spp. en perros y gatos.
- El ser macho influye en la prevalencia de Cystospora spp. en perros y gatos.
- Los machos tienen una mayor prevalencia de Cystospora spp. en perros y gatos.
- No hay una diferencia significativa en la prevalencia de Cystospora spp. en perros y gatos.

5

¿CÓMO LLEGAR A UN ÓPTIMO DIAGNÓSTICO?



6

MUESTRA ADECUADA

- Utilizar recipientes limpios y herméticos para evitar contaminación de la muestra.
- Identificar correctamente la muestra (nombre del paciente y fecha de toma de muestra), en caso de ser una muestra fecal, se debe colocar un frasco de refrigeración.
- Almacenar a temperatura de 4°C (no más de 3 días).

MUESTRA INADECUADA


- Muestra sucia (menor de 5 g) no permite realizar todos los análisis de forma adecuada.
- Muestra en papel o plástico hace que la muestra fecal sea oxidada y la muestra no representativa.
- Muestra vieja (más de 3 días) con dificultades para identificar los parásitos intestinales no son diagnósticos.

7

TIPOS DE ANÁLISIS COPROPARASITOLÓGICOS

Flotación con sulfato de zinc

Immunofluorescencia



8

COMPLEMENTANDO EL DIAGNÓSTICO

Análisis molecular de parásitos atípicos


- Es posible realizar la secuenciación de un fragmento genético y compararlo con la base de datos de secuencias de los parásitos atípicos, no solo para la identificación de especies de los parásitos atípicos, sino para la identificación de especies de los parásitos atípicos.
- En el presente estudio se observaron dos especies de parásitos atípicos, *S. lupi* y *S. mansoni*, que se han reportado en perros y gatos.

S. lupi

S. mansoni

9

MANEJO DE PACIENTES CON PGI



10

BRINDAR TRATAMIENTO ANTIPARASITARIO

Criterio médico

Dosificación adecuada

Tipo de antiparasitario

Examen de control

11

EXAMEN DE HECEAS A LOS EXAMENES ANUALES DEL HOGAR

Conciencia fecales

Signos

Buen manejo de muestra

12

CONTROL AMBIENTAL

Retirar las heces

En sitios públicos

Zonas de juego de niños

Control de plagas

Crear programas de control

13

EXAMENES DE CONTROL

Verificación

Diferentes exámenes

Uso adecuado de fármaco

14

**CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA USO Y MANEJO DE LOS TRABAJOS FINALES
DE GRADUACIÓN UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL**

Atenas, 6 de setiembre, 2024

Señores/as

Vicerrectoría de Investigación y transferencia. Sistema Integrado de Bibliotecas y Recursos Digitales

Estimados señores/as:

Yo Kristel Astorga García portador (a) de la cédula de identidad número 115380402. En mi calidad de autor (a) del trabajo de graduación titulada:

“Estimación de la prevalencia de parásitos gastrointestinales en perros y gatos con propietario por medio de técnicas coproparasitológicas y confirmación molecular a patógenos atípicos en muestras remitidas al laboratorio Diagnóstico Albeitar en el primer semestre del 2023”. El cual se presenta bajo la modalidad de, marque una opción de tesis de Graduación

Presentado en la fecha 13/9/2024, autorizo a la Universidad Técnica Nacional, sede Atenas, para que mi trabajo pueda ser manejado de la siguiente manera:

Ver CAPÍTULO V, DISPOSICIONES, FINALES. Artículo 43. RTFG.	
Marque con una X o un ✓	
Conservación y diseminación en las bibliotecas de la Universidad	Si
Almacenado en el Repositorio institucional.	Si
Divulgado en el Repositorio institucional.	Si
Divulgación del resumen en el Repositorio UTN con una cantidad de 200 a 500 palabras (Describe en forma breve el contenido del documento)	Si
Consulta electrónica con texto protegido	Si
Descarga electrónica del documento en texto completo protegido	Si
Inclusión en bases de datos y sitios web que se encuentren en convenio con la Universidad Técnica Nacional contando con las mismas condiciones y limitaciones aquí establecidas.	Si

Por otra parte, declaro que el trabajo que aquí presento es de plena autoría, es un esfuerzo realizado de forma personal, académica e intelectual con plenos elementos de originalidad y creatividad. Garantizo que no contiene citas, ni transcripciones de forma indebida que puedan devenir en plagio, pues se ha utilizado la normativa vigente de la American Psychological Association (APA) última edición en español. Las citas y transcripciones utilizadas se realizan en el marco de respeto a las obras de terceros. La responsabilidad directa en el diseño y presentación son de competencia exclusiva, por tanto, eximo de toda responsabilidad a la Universidad Técnica Nacional. Consciente de que las autorizaciones no reprimen mis derechos patrimoniales como autor del trabajo. Confío en la que Universidad Técnica Nacional respete y haga respetar mis derechos de propiedad intelectual.

Firma del estudiante  _____

Número de identificación: 1-15380402

Fecha: 6 de setiembre, 2024