



UNIVERSIDAD DE CUENCA

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Identificación de estadios larvarios de *Taenia solium* y *T. asiatica* en muestras de tejidos de cerdos (*Sus scrofa ssp domestica*) mediante LAMP**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista

**Autores:**

Jonnathan Xavier Carpio Sánchez

CI: 0105721344

jonth.carpio@gmail.com

Dorian Javier Coello Miranda

CI: 1400773204

dorian99\_vacas@hotmail.com

**Director:**

Dr. Antonio Javier Vallecillo Maza PhD.

CI: 0151059417

**Cuenca, Ecuador**

22 de octubre del 2021

**RESUMEN:**

El complejo teniasis/cisticercosis es una enfermedad parasitaria zoonótica de distribución mundial, causada por el cestodo *Taenia solium*, *T. saginata* y *T. asiatica*. Las especies que afectan al cerdo y al humano son *T. solium* y *T. asiatica*. El ciclo natural del parásito incluye al cerdo como hospedero intermediario y al humano como hospedero definitivo y/o en algunos casos como hospedador intermediario por contaminación fecal-oral. El Ecuador se considera un país endémico a teniasis humana e hiper-endémico a la Neurocisticercosis. Mientras que, en cerdos, los estudios y las cifras de prevalencia no informan sobre la evolución del número de casos a lo largo del tiempo y faltan estimaciones de la tasa de incidencia de cisticercosis, provocando grandes pérdidas económicas y siendo un grave problema de salud. El objetivo del presente estudio fue identificar estadios larvarios de *T. solium* y *T. asiatica* en muestras de tejidos de cerdos (*Sus scrofa ssp. domestica*) mediante la técnica biomolecular de LAMP; para generar una primera información sobre su uso y viabilidad. Se colectaron un total de 76 muestras de quistes con lesiones en diferentes tejidos del cerdo sugerentes a estadios larvarios de *Taenia spp.* con una mayor ubicación en hígado (52), seguido de músculo masetero (5,) espaldilla (4), lengua (4), bíceps (3), corazón (2), diafragma (2), muslo (2), músculo del cuello (1) e intestino (1). La viabilidad de las muestras (control del proceso) se determinó mediante un ensayo LAMP para *Sus scrofa spp domestica* con un set de cebadores para el gen COXII, mientras que para identificar las muestras de *T. solium* y *T. asiática* se utilizó un ensayo LAMP con un set de cebadores para los genes COXI. Como resultados del total de muestras colectadas, el 36,84% fueron válidas al control del proceso, mientras que para el ensayo LAMP para *T. solium* se obtuvo un 15,79% de muestras positivas; para finalmente tener un total de 10,53% muestras positivas y también válidas al control del proceso, por el contrario, para *T. asiática* todas las muestras resultaron negativas. LAMP es capaz de detectar estadios larvarios positivos a *T. solium* y válidos al control del proceso, como el caso de las muestras de intestino y varios de tejido hepático, los cuales fácilmente podían ser confundidos con *E. granulosus* o *T. hydatigena*. Sin embargo, es evidente que varias de las muestras que coinciden con lesiones características a estadios larvarios de tenia, resultaron negativas al ensayo para *T. solium* y no válidas al control del proceso. Siendo necesario adaptar los ensayos para los reactivos utilizados, mejorar los protocolos en el método de extracción o incluso tener en cuenta la cantidad de tejido porcino que cubre a los quistes y buscar mayor evidencia que pueda sugerir si la viabilidad de estos puede afectar o no en la forma en cómo se logra preservar el ADN.

**Palabras claves: Cisticercosis. Cerdos. Taenidos. Metacestodos. LAMP.**

**ABSTRACT:**

The taeniasis/cysticercosis complex is a worldwide zoonotic parasitic disease caused by the tapeworm *Taenia solium*, *T. saginata* and *T. asiatica*. The species that affect pigs and humans are *T. solium* and *T. asiatica*. The natural cycle of the parasite includes the pig as an intermediate host and the human as the final host and/or in some cases as an intermediate host due to fecal-oral contamination. Ecuador is considered an endemic country to human taeniasis and hyper-endemic to Neurocysticercosis. While in pigs, studies and prevalence figures do not report on the evolution of the number of cases over time and estimates of the incidence rate of cysticercosis are lacking, causing great economic losses and being a serious health problem. The objective of the present study was to identify larval stages of *T. solium* and *T. asiatica* in tissue samples from pigs (*Sus scrofa* ssp. *domestica*) using the LAMP biomolecular technique; to generate a first information on its use and viability. A total of 76 samples of cysts with lesions were collected in different tissues of the pig suspected of larval stages of *Taenia* spp. with a greater location in the liver (52), followed by masseter muscle (5,) shoulder butt (4), tongue (4), biceps (3), heart (2), diaphragm (2), thigh (2), neck muscle (1) and intestine (1). The viability of the samples (process control) was determined by a LAMP assay for *Sus scrofa* spp. *domestica* with a set of primers for the COXII gene, while a LAMP assay was used to identify the samples of *T. solium* and *T. asiatica* with a set of primers for the COXI genes. As a result, it was observed that, of the total samples collected, 36.84% were valid for process control, while for the LAMP test for *T. solium*, 15.79% of positive samples were obtained; to finally have a total of 10.53% positive samples and also valid for process control, on the contrary, for *T. asiatica* all the samples were negative. The LAMP technique is capable of detecting larval stages positive to *T. solium* and valid for the control of the process, such as the case of intestine and various liver tissue samples, which could easily be confused with *E. granulosus* or *T. hydatigena*. However, it is evident that several of the samples that coincide with lesions characteristic of cysticercosis, were negative in the test for *T. solium* and not valid in the control of the process. Being necessary to adapt the tests for the reactives used, improve the protocols in the extraction method or even take into account the amount of porcine tissue that covers the cysts and seek more evidence that may suggest whether or not the viability of these may affect the way in which DNA is preserved.

**Keywords: Cysticercosis. Pigs. Taenidae. Metacestodes. LAMP.**



## ÍNDICE DEL TRABAJO

RESUMEN: .....	1
ABSTRACT: .....	2
ÍNDICE DEL TRABAJO .....	3
ÍNDICE DE TABLAS .....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE ANEXOS.....	7
CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....	8
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL.....	10
AGRADECIMIENTOS.....	12
DEDICATORIA .....	13
1. INTRODUCCIÓN .....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo General.....	16
2.2. Objetivos Específicos .....	16
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	16
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	17
4.1. Producción Porcina en el Ecuador .....	17
4.2. Teniasis/Cisticercosis definición .....	17
4.2.1. Historia de la Cisticercosis/Teniasis.....	18
4.3. Morfología del género Taenia .....	19
4.3.1. <i>Taenia solium</i> .....	19
4.3.2. <i>Taenia asiatica</i> .....	19
4.4. Ciclo evolutivo del género Taenia.....	20
4.4.1. <i>Taenia solium</i> .....	20
4.4.2. <i>Taenia asiática</i> .....	20
4.5. Signología en cerdos.....	21
4.5.1. Alteraciones patológicas.....	21
4.6. Tratamiento y medidas de control .....	21
4.6.1. <i>Vacunación de la población porcina - Vacuna S3Pvac</i> .....	22



4.7. Epidemiología.....	23
4.7.1. Epidemiología en el mundo y América latina .....	23
4.7.2. Antecedentes de cisticercosis y teniosis en Ecuador .....	24
4.8. Métodos de diagnóstico molecular .....	27
4.8.1. Diagnóstico molecular.....	27
4.8.2. Amplificación isotérmica mediada por bucle o lazo (LAMP) .....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
5.1. Área de estudio y Unidad de Análisis .....	32
5.2. Colecta y ubicación en el tejido de los cerdos de los quistes sospechosos a estadios larvarios de <i>Taenia spp.</i> .....	32
5.2.1. Materiales biológicos.....	32
5.2.2. Otros materiales y equipos.....	32
5.2.3. Métodos realizados para la colecta e identificar la ubicación de los quistes en el tejido de los cerdos .....	32
5.3. Conservación, transporte y almacenamiento de las muestras .....	33
5.3.1. Materiales Biológicos. ....	33
5.3.2. Reactivos y soluciones .....	33
5.3.3. Equipos y otros materiales .....	33
5.3.4. Procedimientos para realizar la conservación, transporte, y almacenamiento de las muestras .....	34
5.4. Procesamiento, extracción y purificación de ADN de las muestras.....	34
5.4.1. Materiales Biológicos .....	34
5.4.2. Reactivos y soluciones .....	34
5.4.3. Equipos y otros materiales .....	35
5.4.4. Procedimientos aplicados para el procesamiento, extracción y purificación de ADN de las muestras .....	36
5.5. Amplificación de control de proceso de ADN total de las muestras por medio de la técnica de LAMP.....	37
5.5.1. Materiales biológicos.....	37
5.5.2. Materiales químicos o reactivos .....	37
5.5.3. Materiales de laboratorio y equipos .....	37



5.5.4. Procedimiento de control del proceso de ADN total de las muestras por medio de la técnica de LAMP .....	37
5.6. Detección de ADN genómico de porcino mediante electroforesis en gel de agarosa .....	39
5.6.1. Materiales biológicos.....	39
5.6.2. Materiales químicos y reactivos.....	39
5.6.3. Materiales de laboratorio y equipos .....	39
5.6.4. Procedimiento para la detección de los productos de amplificación del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa .....	40
5.7. Amplificación del ADN de las especies del complejo Teniasis/Cisticercosis mediante el ensayo LAMP .....	41
5.7.1. Materiales biológicos.....	41
5.7.2. Materiales químicos o reactivos .....	41
5.7.3. Materiales de laboratorio y equipos .....	42
5.7.4. Procedimiento de la Amplificación del ADN de las especies del complejo Teniasis/Cisticercosis mediante el ensayo LAMP.....	42
5.8. Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.....	43
5.8.1. Materiales biológicos.....	43
5.8.2. Materiales químicos y reactivos.....	43
5.8.3. Materiales de laboratorio y equipos .....	43
5.8.4. Procedimiento de productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa .....	44
5.9. Análisis de la información.....	44
6. RESULTADOS .....	45
6.1. Viabilidad del ADN total extraído de las muestras sospechosas a cisticercosis, como control del proceso ( <i>Sus scrofa spp domestica</i> ) mediante un ensayo de LAMP ...	45
6.2. Ensayo LAMP para la identificación de ADN genómico de estadios larvarios de dos diferentes tenías ( <i>T. solium</i> y <i>T. asiática</i> ). .....	46
6.3. Localización y frecuencia de los quistes en los diferentes tejidos de cerdos faenados .....	48
7. DISCUSIÓN .....	49
8. CONCLUSIONES .....	54



9. RECOMENDACIONES .....	55
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
11. ANEXOS .....	63

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Epidemiología de la cisticercosis porcina en el Ecuador. ....	26
<b>Tabla 2.</b> Soluciones de oligonucleótidos y diseño de primers/cebadores para ADN de cerdo COXII (Cytochrome C Oxidase Subunit II) .....	37
<b>Tabla 3.</b> Composición de la mezcla de reacción para la amplificación del ensayo LAMP de <i>Sus scrofa spp domestica</i> .....	38
<b>Tabla 4.</b> Soluciones de oligonucleótidos para <i>Taenia asiatica</i> COX1 (Cytochrome C Oxidase Subunit I) .....	41
<b>Tabla 5.</b> Soluciones de oligonucleótidos para <i>Taenia solium</i> COX1 .....	41
<b>Tabla 6.</b> Composición de la mezcla de reacción para la amplificación del ensayo LAMP de <i>T. solium</i> y <i>T. asiatica</i> .....	42

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Taxonomía de <i>Taenia</i> spp .....	19
<b>Figura 2.</b> Distribución de <i>T. solium</i> alrededor del mundo.....	24
<b>Figura 3.</b> Incidencia de teniasis/cisticercosis en Ecuador (1994 hasta 2004) por cada 100 000 habitantes .....	25
<b>Figura 4.</b> Distribución espacial y conglomerados espaciales significativos de casos hospitalizados por NCC en Ecuador.....	25
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática del diseño de cebadores para el ensayo LAMP que muestra la posición de los cebadores para el gen diana .....	28
<b>Figura 6.</b> Principio de la amplificación LAMP en su fase no cíclica.....	29
<b>Figura 7.</b> Principio de la amplificación LAMP en su fase cíclica .....	30
<b>Figura 8.</b> Muestras No válidas y Válidas al ensayo LAMP del control del proceso ( <i>Sus scrofa spp domestica</i> ) de acuerdo a la ubicación de los quistes en el tejido de los cerdos. ....	46
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de muestras positivas y negativas al ensayo LAMP para <i>T. solium</i> y <i>T. asiatica</i> de acuerdo a la ubicación en el tejido de los cerdos y su relación con el ensayo de control del proceso.....	47
<b>Figura 10.</b> Origen geográfico y de tejido de las muestras colectadas. ....	48



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Datos de ubicación geográfica, ubicación en tejido, viabilidad del quiste y resultados a los ensayos LAMP de las muestras colectadas .....	63
<b>Anexo 2.</b> Cantidad de quistes colectados en el tejido de los cerdos de acuerdo a su ubicación geográfica y su relación con los ensayos LAMP para <i>T. solium</i> y el control del proceso .....	65
<b>Anexo 3.</b> Cantidad de muestras colectadas de acuerdo a su ubicación geográfica y ubicación en tejido.....	66
<b>Anexo 4.</b> Muestras positivas/válidas al ensayo LAMP del control del proceso ( <i>Sus scrofa</i> spp domestica) de acuerdo a la ubicación de los quistes en el tejido de los cerdos .....	67
<b>Anexo 5.</b> Muestras positivas al ensayo LAMP para <i>Taenia solium</i> de acuerdo a la ubicación de los quistes en tejido.....	67
<b>Anexo 6.</b> Porcentaje de viabilidad de los quistes colectados y su relación con los ensayos LAMP para el control del proceso ( <i>Sus scrofa</i> spp domestica) y LAMP para <i>Taenia solium</i> .....	68
<b>Anexo 7.</b> Viabilidad de las muestras colectadas con respecto a la ubicación en el tejido de los cerdos y su relación con el ensayo LAMP para el control del proceso.....	68
<b>Anexo 8.</b> Detección en gel de agarosa de los productos LAMP para el ensayo <i>Sus scrofa</i> spp domestica (control del proceso). Control positivo “(+)”, control negativo “(-)”, marcador de peso molecular “M” .....	69
<b>Anexo 9.</b> Detección en gel de agarosa de los productos LAMP para el ensayo <i>Taenia solium</i> . Control positivo “(+)”, control negativo “(-)”, marcador de peso molecular “M” .....	69
<b>Anexo 10.</b> Detección en gel de agarosa de los productos LAMP para el ensayo <i>Taenia asiática</i> . control negativo “(-)”, marcador de peso molecular “M” .....	70
<b>Anexo 11.</b> Inspección de animales en el camal de Paute .....	70
<b>Anexo 12.</b> Inspección de animales en el camal de Macara.....	70
<b>Anexo 13.</b> Colecta de muestras procedentes de tejido hepático .....	71
<b>Anexo 14.</b> Inspección y colecta de muestra de lengua .....	71
<b>Anexo 15.</b> Inspección y colecta de muestras de masetero.....	71
<b>Anexo 16.</b> Inspección y colecta de muestras de espaldilla.....	71
<b>Anexo 17.</b> Extracción de botón de ADN de las muestras colectadas .....	72
<b>Anexo 18.</b> Preparación de Gel de agarosa al 1,6%.....	72
<b>Anexo 19.</b> Medición del buffer de carga ADN 6X para la colocación en la reacción LAMP .....	72
<b>Anexo 20.</b> Cantidad de mezcla a utilizar para la reacción LAMP <i>Sus scrofa</i> .....	72



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio  
Institucional

---

Jonnathan Xavier Carpio Sánchez en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Identificación de estadios larvarios de *Taenia solium* y *T. asiatica* en muestras de tejidos de cerdo (*Sus scrofa spp domestica*) mediante LAMP**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 22 de octubre del 2021

---

Jonnathan Xavier Carpio Sánchez

C.I.: 0105721344



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio  
Institucional

---

Dorian Javier Coello Miranda en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Identificación de estadios larvarios de *Taenia solium* y *T. asiatica* en muestras de tejidos de cerdo (*Sus scrofa spp domestica*) mediante LAMP", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 22 de octubre del 2021

---

Dorian Javier Coello Miranda

C.I: 1400773204



### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Dorian Javier Coello Miranda autor del trabajo de titulación "Identificación de estadios larvarios de *Taenia solium* y *T. asiatica* en muestras de tejidos de cerdo (*Sus scrofa spp domestica*) mediante LAMP", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 22 de octubre de 2021

---

Dorian Javier Coello Miranda

C.I: 1400773204



### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Jonnathan Xavier Carpio Sánchez autor del trabajo de titulación "**Identificación de estadios larvarios de *Taenia solium* y *T. asiatica* en muestras de tejidos de cerdo (*Sus scrofa spp domestica*) mediante LAMP**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 22 de octubre de 2021

Jonnathan Xavier Carpio Sánchez

C.I: 0105721344



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a nuestros padres por ser el pilar fundamental de nuestra vida, por estar ahí en los momentos buenos y malos, siempre con sus palabras de aliento cuando más lo necesitamos. También queremos dejar plasmado un profundo agradecimiento a todos los docentes de la Universidad de Cuenca, a nuestro director del proyecto Dr. Antonio Vallecillo por su guía, conocimientos, apoyo y establecer en nosotros un pensamiento muchos más crítico.

A La Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, por la oportunidad de realizar nuestros estudios de pregrado

Así mismo, deseamos expresar nuestro reconocimiento a todos los servidores y personas de los camales de Paute, Macara y Riobamba, en especial al Dr. Andrés Barzallo, Dr. Edison Merino, y Dr. Brito por todas las atenciones e información brindada a lo largo de esta investigación.

*Jonnathan Xavier, Dorian Javier.*



## DEDICATORIA

Dedico a mis a mis padres Alicia y Vicente, por todo su amor, comprensión, y apoyo en todos estos años, quienes han puesto toda su confianza para lograr un objetivo más en mi vida durante todo el proceso personal y profesional alcanzado. A mi querido hermano Andrés, a mis hermanas: Karina y Alexandra y mis sobrinos Christian y José por haberme acompañado durante todo el proceso personal y profesional alcanzado. Finalmente, a todas las personas, familiares y amigos que me acompañaron en este proceso formativo, aportando oraciones, consejos y conocimientos que me ayudaron a crecer. Gracias por darme la libertad de desenvolverme como ser humano.

***Jonnathan Xavier***

A mi familia. A mis padres Dorian y Guadalupe, por apoyarme en cada momento, con todo el cariño que un hijo espera, con consejos sabios y valiosos, se pudo lograr el objetivo. A mi pareja Betsy, por la confianza, amor, la espera brindada y el apoyo moral que se dio en estos años. A mi hija Berenice, ya que ella es el motor de mi vida y mi motivación. Se la dedico a los docentes y amigos con los que compartí esta etapa de mi vida que fue muy bonita y donde he aprendido mucho, tanto de conocimientos como de la vida

***Dorian Javier***



## 1. INTRODUCCIÓN

La infestación por teniasis/cisticercosis se puede dividir en base al tipo de hospedero en donde se desarrolla el parásito. El cerdo actúa como hospedero intermediario desarrollando los metacestodos, mientras que el humano puede ser un hospedero definitivo, debido a la ingestión de carne de cerdo insuficientemente cocida que contiene la etapa larval del parásito (metacestodo o cisticerco), provocando la teniasis intestinal.

Cabe recalcar que el ser humano también puede actuar como un hospedero intermediario y si bien la infección con estos metacestodos puede ocurrir de diferentes maneras, la más frecuente parece ser la ingestión de alimentos contaminados con huevos de tenia (provenientes de una higiene inadecuada o de frutas y verduras regadas con aguas residuales), pudiendo desarrollar la neurocisticercosis. En cambio, los cerdos, como coprófagos naturales, se infectarán si no están confinados y/o buscan alimento libremente, lo que puede incluir heces humanas cuando existe defecación al aire libre. Por tanto, si las heces salen de un portador con teniasis, el cerdo ingerirá los huevos, que a su vez se convertirán en metacestodos en el tejido de estos, perpetuándose el ciclo de vida del parásito; lo que los convierte en el primer blanco de acción en la cual debe actuar el médico veterinario para su control y erradicación (1–3).

Las especies de este parásito que con mayor frecuencia afectan al cerdo y humano son la *Taenia solium* y *T. asiática* y que de acuerdo a Nkouawa (4), puede existir el riesgo de una infección cruzada en humanos; ya que se especula que existan áreas mucho más amplias en Asia y toda la región del Pacífico donde estas especies de taenidos se encuentren muy representados. En Tokio, Japón, un brote reciente de teniasis humana debido a *T. asiática*, nos lleva a reevaluar el riesgo de infección por *T. solium*. De hecho, en 2013 Galán y Fuentes explican sobre la posibilidad de que *T. asiática* sea una parasitosis cosmopolita igual que *T. solium* y *T. saginata*, pues al ser una especie descubierta a finales del siglo XX, el conocimiento que se tiene sigue en aumento y diversos estudios explican que el proceso evolutivo que ha tenido este parásito es mucho más antiguo, colocando en alrededor de 40,000 años atrás, en donde esta se “separó” como una subespecie de *T. saginata*; a más de que los movimientos migratorios influyen directamente en como una enfermedad se propaga por el mundo. Inclusive, en Asia, se han reportado la presencia de especies híbridas entre *T. asiática* y *T. saginata*, debido a su parecido fenotípico y genotípico (5,6).

Existen pocas herramientas que por sí solas, puedan ser usadas en la detección de la cisticercosis porcina de manera mucho más específica. Los métodos de



diagnóstico existentes (exámenes *ante mortem*, *post mortem*, morfológicos, coprológicos), son métodos directos que no estiman o identifican con un alto grado de sensibilidad la presencia de esta patología en un hato, centros de faenamiento o no son útiles para estudios epidemiológicos (7). Por otro lado, el uso de pruebas indirectas de inmunodiagnóstico, como ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas) IFI (Inmunofluorescencia Indirecta), EIBT (Electro Inmunotransferencia o Wester Blot), etc. miden la “huella” que deja este patógeno en el animal, a través de los anticuerpos que genera el organismo, lo que invisibiliza la detección de un cuadro clínico actual; por otro lado, los métodos indirectos dificultan un monitoreo post-tratamiento, lo que las vuelve pruebas de uso “limitado” (2,8). Todo esto genera graves pérdidas económicas, pues con frecuencia estos animales se encuentran en un estado crónico de la enfermedad, dificultando y encareciendo su tratamiento y comercialización.

Recientemente se han desarrollado varios métodos de detección molecular que utilizan PCR y aunque estas técnicas han demostrado ser altamente sensibles y confiables para la diferenciación de *T. solium* de otras especies de tenia (10), no son fáciles de realizar en los laboratorios de los países en desarrollo, ya que la PCR requiere de un equipo sofisticado, como un termociclador. Además, la *ADN Taq polimerasa* a menudo es inactivada por inhibidores presentes en muestras biológicas, que a veces causan problemas de sensibilidad y reproducibilidad (3,9).

Por tal motivo, la presente investigación aplicó la técnica molecular de amplificación isotérmica mediada en bucle (LAMP), para identificar los estadios larvarios de 2 especies de tenia, con relevancia para la salud pública, (*T. solium* y *T. asiática*) presente en tejidos de cerdos domésticos (*Sus scrofa spp domestica*).

La técnica molecular de LAMP, es un método de amplificación rápido de nucleótidos altamente sensible, específico y simple (12). Además, debido a que la *Bst ADN polimerasa* resiste muchos inhibidores de esta enzima presentes en muestras biológicas; el método LAMP es adecuado para la detección de agentes infecciosos a partir de material clínico como muestras fecales (13). LAMP, es llevado a cabo en condiciones isotérmicas mediante el uso de una simple incubadora, similar a un baño María o un calentador de bloque (8), por lo que está al alcance de laboratorios bien equipados o laboratorios clínicos a pequeña escala.

Por lo tanto, LAMP es una herramienta muy adecuada para el diagnóstico rápido de diversas patologías (14), permitiendo generar una primera información sobre el uso de esta técnica en muestras de campo sospechosas a cisticercosis en los cerdos domésticos de nuestra región, de manera que sirva de base para futuras



investigaciones que permitirán desarrollar métodos de detección apropiados, que constituyan como indicadores de la contaminación ambiental del complejo teniasis/cisticercosis en porcinos y que sirvan para estimar el riesgo de infección humana, para de esta manera evitar la propagación de la enfermedad.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

Identificar estadios larvarios de *Taenia solium* y *Taenia asiática* en muestras de tejidos de cerdos (*Sus scrofa* ssp. *domestica*) mediante la técnica biomolecular de amplificación isotérmica mediada por un bucle o lazo (LAMP).

### 2.2. Objetivos Específicos

Evaluar la viabilidad del ADN total extraído de las muestras de tejido con lesiones/quistes sospechosos a cisticercosis, como control del proceso mediante un ensayo de LAMP.

Implementar un ensayo de LAMP para la identificación de ADN genómico de estadios larvarios de dos diferentes tenias (*T. solium* y *T. asiática*) presentes en muestras de cerdos (*Sus scrofa* ssp. *domestica*).

Evaluar la localización y frecuencia de los quistes que se identifiquen en los diferentes tejidos de cerdos faenados en relación con la especie de tenia identificada.

## 3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La identificación de estadios larvarios de *Taenia solium* y *asiática* en muestras de tejidos de cerdos (*Sus scrofa* ssp. *domestica*) es viable mediante un ensayo de LAMP?



## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Producción Porcina en el Ecuador

De acuerdo a los datos de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) en su documento de mayo del 2020, en el sector agropecuario del Ecuador, a nivel de ganadería existe un mayor predominio del ganado vacuno, seguido del ganado porcino con 1,163 millones de cabezas, seguido del ganado ovino, caballar y mular respectivamente. La población porcina en 2018 era de 1.283 millones de cabezas, lo que para los datos del 2019 representa una caída del 9,35%; y que en 2020 con la actual coyuntura de la COVID-19 se vea mucho más afectada.

Del total del ganado porcino existente, el 44,05% es de raza, el 26,73% mestizo y el 29,22% criollo. Estos datos no especifican la distribución del ganado porcino por regiones y provincias (15).

La producción de cerdos de traspatio en Ecuador es de más de 30 000 Tm/año. El consumo estimado de carne de cerdo en 2010 era de 7,3 kg/persona/año. En el año 2016 la cifra había aumentado a 10 kg/persona/año.

A finales del año 2010 se realizó el primer censo porcino georreferenciado en un trabajo de cooperación entre el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), la Agencia Ecuatoriana para el Aseguramiento de la Calidad (AGROCALIDAD) y la Asociación de Porcicultores del Ecuador (ASPE). Los resultados del censo muestran que actualmente el país cuenta con 1 737 granjas porcinas, con 20 o más animales, o con al menos 5 madres. La Sierra y Costa tienen los porcentajes más altos de granjas y animales, con 79% de granjas registradas y 95% de la población porcina. Los resultados son una media de producción/madres de 16,83. En las granjas técnicas, el promedio es de 22,4 cerdos/madre/año, mientras que en las granjas no técnicas, el nivel promedio es de 9,6 cerdos/madre/año (16).

Algunas de estas cifras deben ser actualizadas, puesto que las autoridades competentes no brindan dicha información o esta es muy difícil de conseguir. Por otro lado, la coyuntura actual que atraviesa el país y la crisis que se está viviendo en el sector por culpa de la pandemia, contrabando, falta de ayuda y protección por parte del estado impiden el crecimiento de la producción porcina.

### 4.2. Teniasis/Cisticercosis definición

La cisticercosis es causada por la infestación de metacéstodos (forma larvaria) de *Taenia solium*, aunque también existen casos reportados por *T. asiática*, afectando al hombre y principalmente al cerdo (17, 18). El hospedador definitivo



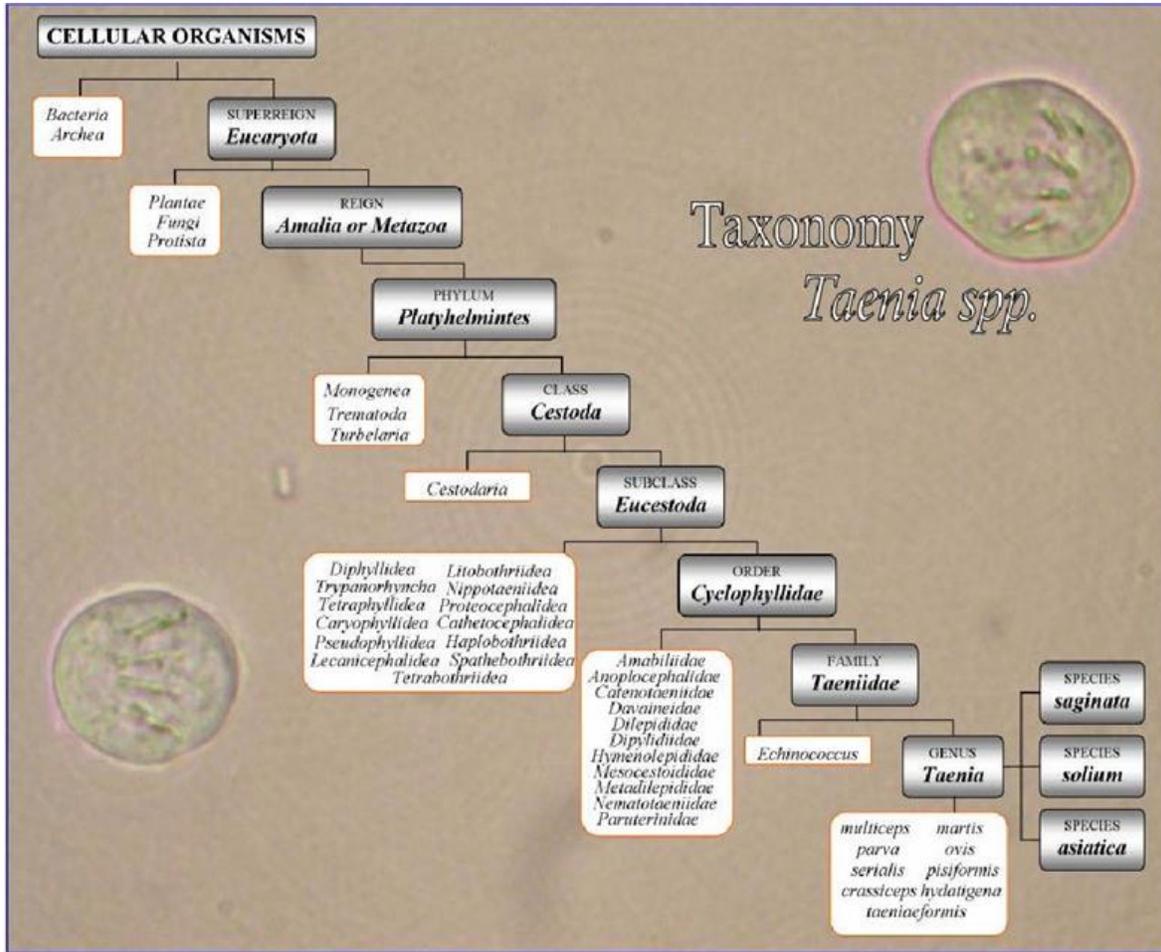
de estos parásitos es el hombre, estas se alojan en el estadio adulto en el intestino delgado del humano. Los hospederos intermediarios naturales de *T. solium* son el cerdo doméstico y el cerdo salvaje, aunque en algunos casos se han encontrado perros, gatos, ovejas, ciervos, camellos. Además, los hospederos intermediarios naturales de *T. saginata* son bovinos de las familias *Bovidae* y también la familia *Cervidae*. Mientras que los huéspedes intermediarios naturales de *T. asiatica* son los porcinos domésticos y silvestres, aunque se piensa que no pueden producir cisticercosis en humanos (cisticercosis viscerotrópica) pero mayores estudios son requeridos (17, 19).

La taxonomía de *Taenia spp.*, acorde a la base de datos de “GenBank” de NBCI, se muestra en la **figura 1** (20).

Teniendo en cuenta que el ser humano puede actuar como hospedero definitivo o huésped intermedio de diversos parásitos de la clase cestoda, a la enfermedad se divide en dos categorías: los producidos por gusanos adultos, en los que los seres humanos actúan como hospederos definitivos y portan los parásitos en su sistema digestivo; y los que se producen en la etapa larvaria, en la que el ser humano es el hospedero intermedio, con una etapa quística en su tejido. Por ello, es necesario aumentar los estudios en la identificación de hospedadores intermediarios (primarios y secundarios) y definitivos, con otros parásitos de la familia *Taeniidae* y la clase *Cestoda* que tengan potencial de confundirse con *Taenia spp* en sus fases larvarias y sean un riesgo para la salud humana.

#### **4.2.1. Historia de la Cisticercosis/Teniasis**

*T. solium* es un cestodo conocido desde las culturas griega y egipcia. Hipócrates, Aristóteles y Teofrasto los llamaron “gusanos planos” por su parecido con las cintas o listones, mientras que los romanos, Celso, Plinio el Viejo y Galeno, los denominaban *Lumbricus latus*, que significa gusano ancho. En el siglo IV A.C., Aristóteles en su tratado de “Historia de los Animales” describe con precisión el estadio larvario del parásito en la lengua y musculatura del cerdo y los compara morfológicamente con el granizo. Al principio de la era cristiana, algunos autores, como Serapio, consideraban que cada proglótide era un gusano diferente y lo llamaban “cucurbitineos”, por su parecido con las semillas de calabaza, Además de que estas semillas fueron uno de los remedios más antiguos contra la teniasis, que se sigue utilizando en la actualidad (21).



**Figura 1.** Taxonomía de *Taenia spp.* Fuente Rodriguez 2007 (20)

### 4.3. Morfología del género *Taenia*

#### 4.3.1. *Taenia solium*

Como otras especies del género *Taenia* (familia *Taeniidae*, orden *Cyclophyllidae*, clase *Cestoda*), son parásitos aplanados, excepcionalmente largos. La *T. solium* normalmente mide entre 1.5 y 5 m de longitud; el escólex posee cuatro ventosas y un rostelo coronado por dos hileras de ganchos. El número de ganchos rostelares puede variar entre 22 y 32, y su tamaño entre 159 y 173 µm. Tanto las ventosas como el róstelo son estructuras de fijación que capacitan a la solitaria para mantenerse anclada en la pared del yeyuno(22). Su forma larvaria se conoce como *Cisticercus cellulosae*.

#### 4.3.2. *Taenia asiatica*

Presenta las mismas características morfológicas que *T. saginata* por lo que se considera como una subespecie de esta, pero su escólex presenta 4 ventosas,



con un rostelo con ganchos muy pequeños o incluso ausentes, aunque a veces puede ser completamente inservibles. Su forma larvaria es el *Cisticercus viscerotropica*.

El gusano adulto es más largo que *T. solium* y suele medir entre 4 y 12 metros, pudiendo llegar a tener hasta 2.000 anillos. Aunque tanto *T. solium* como *T. asiatica* poseen un esfínter vaginal, lo que los diferencia de *T. saginata* en la cual dicho esfínter se encuentra ausente (17).

#### **4.4. Ciclo evolutivo del género Taenia**

##### **4.4.1. *Taenia solium***

El hombre, que es el único hospedador definitivo, adquiere la parasitosis al ingerir la carne de cerdo cruda, curada o poco cocida, infestada con cisticercos (larva infestante). Al llegar al intestino se digiere todo excepto el escólex, que se fija a la mucosa intestinal mediante las ventosas y desarrolla una cadena de proglótides que dará lugar al gusano adulto en dos o tres meses, pudiendo permanecer en el intestino durante años.

La única forma que tiene el céstodo de emitir los huevos es con la defecación, de manera que los anillos grávidos (4 ó 5) son arrastrados pasivamente con las heces y en donde se rompe el útero y se liberan los huevos. El cerdo, debido a sus hábitos coprofágicos, ingiere cientos de estos huevos y se infesta, actuando como hospedador intermediario o al ingerir alimento contaminado (cisticercosis porcina).

Los jugos gástricos del estómago del animal rompen la sustancia cementante (rotura del embrióforo), y en el intestino emerge la oncósfera. La oncósfera tiene vesículas secretoras de sustancias líticas que le ayudan a atravesar la pared intestinal, diseminándose por vía sanguínea; en un estadio de postoncósfera. A través del torrente circulatorio llegará a los órganos internos con mayor irrigación y a los músculos. Una vez allí, pasarán entre 7 y 10 semanas hasta el desarrollo del cisticerco, que es una forma larvaria vesicular con un escólex invaginado, ya provisto de la doble corona de ganchos. Así pues, el ciclo biológico se cerrará tras la ingestión por parte del hombre de carne de cerdo infectado.

##### **4.4.2. *Taenia asiática***

Tiene un ciclo biológico similar al de *T. solium*, con el cerdo como hospedador intermediario, pero con tropismo hepático. En este caso, las proglótides son capaces de abandonar el intestino del hospedador definitivo de forma independiente y espontánea. En este caso en particular se sospecha de que puede existir autoinfección de cisticercosis por cargas elevadas y aumento del peristaltismo (17,19).



#### 4.5. Signología en cerdos

Estudios realizados en áreas endémicas han demostrado que la comercialización de cerdos sacrificados en ferias al aire libre y mataderos clandestinos, ignorando las guías oficiales de mercadeo, son una buena fuente para la adquisición de teniasis. Además, una gran cantidad de cerdos en el área rural, son sacrificados en los domicilios de los mismos productores de traspatio, ya sea para fiestas familiares o de la comunidad, sin inspección sanitaria, propiciando a que continúe el ciclo de la cisticercosis por la falta de control de carne infectada (5,7).

Generalmente la cisticercosis en cerdos es asintomática, en algunos casos se puede apreciar diarrea, inapetencia, vómitos, adelgazamiento, disnea, pérdida de peso, cuando se alojan en la cavidad ocular tiene pérdida parcial de visión. Los cisticercos también pueden alojarse en el cerebro del cerdo manifestando cuadros nerviosos o en la médula espinal provocando distintos grados de incoordinación y hasta parálisis de las extremidades posteriores (12,24).

##### 4.5.1. Alteraciones patológicas.

En los cerdos parasitados con las larvas, cuando éstas se dirigen hacia los músculos y órganos internos (fase de invasión) se observa una ligera inflamación en las paredes del intestino delgado con puntitos rojos en las paredes internas (mucosas). La fase larvaria de la *T. solium* conocida como (*Cysticercus celluloceae*) en el cerdo, empieza por la lengua, paladar, parte interna de corazón (miocardio), músculos maseteros, músculos del diafragma y finalmente en órganos como pulmón e hígado. Los nódulos usualmente observados son blandos, no inflamados y no dolorosos, desapareciendo algunos espontáneamente. Las formas larvarias ya fijadas en los músculos forman una envoltura que asegura su crecimiento (embrión hexacanto); a los 21 días alcanza el tamaño de la cabeza de un alfiler; a los 40 días crece hasta tener 3 mm de diámetro y con una lupa puede distinguirse la cabecilla de lo que va a ser la tenia (escólex); a los tres meses alcanza el tamaño de una semilla de melón, por lo general después de un año muere y se convierte en una esfera de grasa que al apretarla es friable y tiene consistencia arenosa. Al morir el quiste también puede acumular pus y crecer convirtiéndose en un absceso el que puede reventar o seguir aumentando de tamaño (26).

#### 4.6. Tratamiento y medidas de control

El tratamiento habitual para la teniasis humana es una dosis de Praziquantel de 5-10 mg / kg o una dosis de Niclosamida de 2 g, junto a exámenes de heces para su control durante 3 meses. Para tratar los quistes, se pueden usar Praziquantel y Niclosamida en las mismas dosis mencionadas anteriormente, y en ocasiones



puede ser necesaria la cirugía. Mientras que, para la neurocisticercosis, el tratamiento consiste en la extirpación quirúrgica de los quistes, especialmente si se han calcificado en el tejido neuronal. El Praziquantel generalmente se combina con Albendazol y Dexametasona para prevenir convulsiones o crisis epilépticas (12).

En un estudio de 1996 se demostró eficacia del Oxfendazole para curar la cisticercosis porcina con una sola dosis de 30 mg/kg, con lo que se observó la disminución significativa los casos de teniasis (27).

#### **4.6.1. Vacunación de la población porcina - Vacuna S3Pvac**

Desde hace varias décadas, entre 1998 hasta 2012 varios investigadores en México han estado desarrollando una vacuna contra *T. solium* a partir de la aplicación del antígeno del complejo nativo de *Taenia crassiceps*, denominada S3Pvac, integrada por tres péptidos producidos en forma sintética constituidos de 8, 12 y 18 aminoácidos. Es así que en 2004 y 2005 pudieron probar y validar en campo que S3Pvac induce daño a los cisticercos establecidos tempranamente localizados en el músculo esquelético con un 61,1%, en comparación con los cerdos no tratados y una viabilidad significativamente menor de los cisticercos de los músculos esqueléticos de los cerdos tratados con S3Pvac, como lo demuestran las pruebas de evaginación in vitro con 38% y de transformación de la tenia in vivo con 18%. Sin embargo, Aluja en 2011 detalla que S3Pvac no indujo daño a los cisticercos ubicados en el cerebro ni a los de los músculos en infecciones tardías.

Manoutcharian en 2004 y Morales en 2008, desarrollaron una segunda versión recombinante de la Vacuna anti-cisticercosis S3Pvac y posteriormente renombrada como S3Pvac-phage. La cual, en un estudio de campo demostró tener una eficacia del 70%, reduciendo significativamente el número de cerdos infectados y también significativamente la carga de parásitos en el momento de la necropsia. Además, Morales en 2011 demostró que S3Pvac-phage no solo redujo la cisticercosis porcina adquirida de forma natural, sino también la hidatidosis, causada por *Echinococcus granulosus*, en los mismos cerdos.

Es así que debido a la efectividad y los bajos costos de producción de la vacuna S3Pvac, en varios municipios del centro de México se ha iniciado el uso de la vacuna del fago S3Pvac en un programa para prevenir la transmisión de *T. solium*, aplicando alrededor de 10 000 dosis de S3Pvac-phago a cerdos rurales del Estados de Guerrero y Oaxaca, México.



Cabe señalar que actualmente se está buscando la forma de aumentar la eficacia de la vacuna de SP3vac-phago administrada por vía parenteral, por lo que Betancout en 2012 ha comenzado a probar la vacuna oral S3Pvac-papaya en cerdos rurales en condiciones de campo para obtener una visión realista de su aplicabilidad. Este es un paso necesario para reemplazar las versiones parenterales menos viables desde el punto de vista logístico y más costosas de la vacuna S3Pvac-phago (28).

#### **4.7. Epidemiología**

Se ha demostrado que en cisticercosis porcina a mayor edad, mayor tasa de metacéstodos, con un pico máximo a los 11 meses consecuencia de la mayor exposición al parásito, aunque se ha demostrado que a partir de los dos meses ya se encuentran metacéstodos en hígado, y de los cuatro a seis meses de edad, en músculo (29).

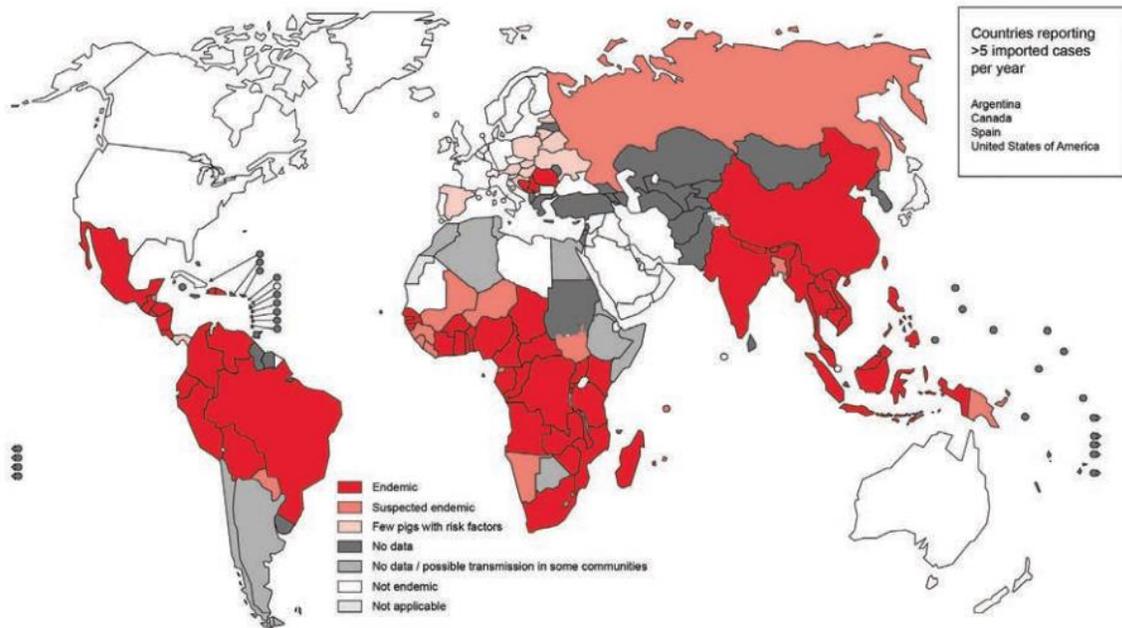
La teniosis/cisticercosis puede representar el parámetro más descriptivo, de todas las patologías humanas, para medir el grado de desarrollo de una comunidad. Su presencia es índice confiable de subdesarrollo sociocultural y deficiente infraestructura higiénico-sanitaria y educativa.

Se considera que alrededor del mundo existen entre 10 000 000 a 50 000 000 de personas infectadas con teniosis intestinal por *T. solium* (**Figura 2**) y más de 50 millones de cerdos y de 5 a 6 millones de humanos tienen cisticercosis con aproximadamente 50 000 muriendo cada año debido a neurocisticercosis (20).

##### **4.7.1. Epidemiología en el mundo y América latina**

La epidemiología de *T. solium* y cisticercosis humana se debe considerar como el complejo teniosis/cisticercosis, en el cual hay que tener en cuenta tres aspectos:

- a. Los factores que permiten la infección de cerdos a partir de personas infectadas con tenia adulta.
- b. Las condiciones para la adquisición de la tenia intestinal en el hombre al ingerir carne de cerdo con cisticercos.
- c. Situaciones determinantes para que el hombre ingiera huevos del parásito a partir de su propia tenia o de las que albergan otras personas (31).



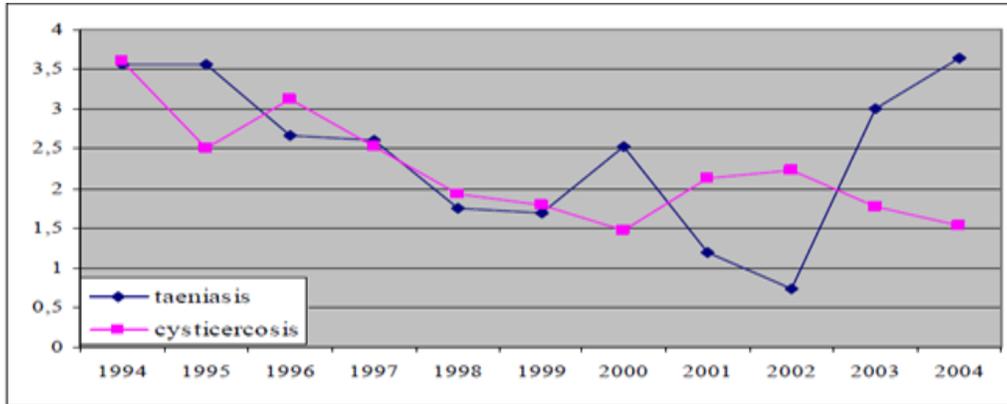
**Figura 2.** Distribución de *T. solium* alrededor del mundo. Fuente de WHO, 2016 (30).

La neurocisticercosis se está extendiendo a nivel mundial debido al aumento de la migración, la inmigración, el turismo y la globalización. (32). En Brasil, Colombia, Ecuador y Perú se considera a la neurocisticercosis (NCC) como causa importante de epilepsia de inicio tardío, por lo que se sospecha que esta enfermedad podría estar siendo subdiagnosticada (33).

#### 4.7.2. Antecedentes de cisticercosis y teniosis en Ecuador

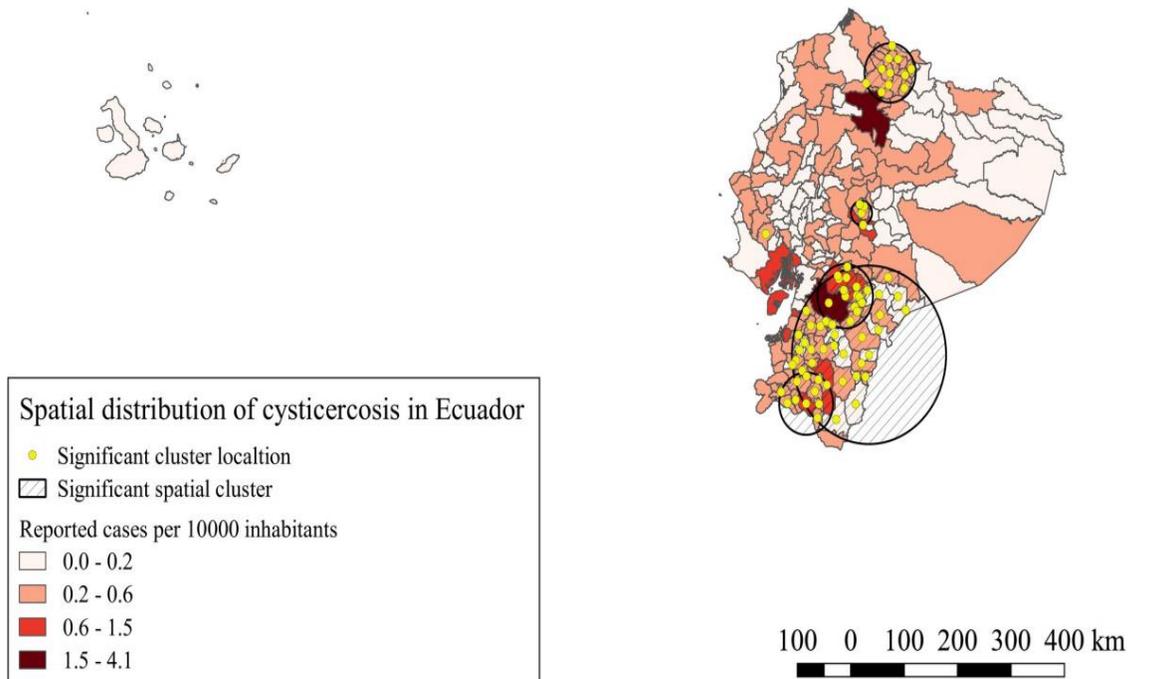
En Latinoamérica debido a la pobreza, estructuras sanitarias inadecuadas y/o deficientes esta enfermedad todavía prevalece. Ecuador es considerado un país endémico a cisticercosis (**Figura 3**), la tasa de incidencia anual de cisticercosis en el año 2007 fue de 1,32 que corresponden a 179 casos reportados en las unidades de salud.

Investigaciones realizadas por Rodríguez (20) en el mismo año refieren una incidencia baja y moderada de teniosis/cisticercosis en provincias de la Sierra, como Bolívar, Sucumbíos e Imbabura. Mientras que en la región costa, específicamente en la provincia de Manabí, hubieron resultados relativamente altos (34–36).



**Figura 3.** Incidencia de teniasis/cisticercosis en Ecuador (1994 hasta 2004) por cada 100 000 habitantes. Fuente: Benitez,2007 (20).

Un estudio publicado por Coral en el 2020 (37) detalla que el Ecuador es un país andino latinoamericano hiperendémico de NCC, y los estudios sero-epidemiológicos realizados en Ecuador informaron infecciones activas en humanos con prevalencias de antígenos circulantes de *T. solium* que variaban del 0,94% [IC del 95%: 0,38–1,93] al 4,99% (IC del 95%: 4,36–5,69), mientras que la exposición al parásito ha sido informada con seroprevalencias de anticuerpos dirigidos a *T. solium* en su fase larvaria, varían de 25,3% (IC 95% 22,08-28,17) a 40% (IC 95% 30,33-50,23).



**Figura 4.** Distribución espacial y conglomerados espaciales significativos de casos hospitalizados por NCC en Ecuador. Fuente: Corral, 2020 (37)

Coral y sus colaboradores estimaron la carga de NCC en Ecuador utilizando bases de datos oficiales a nivel nacional del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) para el período de 2013 a 2017 y evaluaron los conglomerados espaciales de cuatro trastornos neurológicos asociados con NCC. Durante el período 2013-2017, hubo un total de 1874 casos hospitalizados de NCC, es decir una tasa de incidencia anual de 0,230 casos de NCC por cada 10 000 habitantes. Identificando siete agrupaciones espaciales significativas ( $p < 0,0001$ ).

El iRR (ratio de tasa de incidencia) de NCC de estos conglomerados varió de 2,10 a 5,15 en comparación con las áreas fuera de los conglomerados. Estos conglomerados están ubicados principalmente en las provincias del norte y sur de la Sierra de Ecuador junto con una provincia del sureste de la Amazonia. Otros pequeños conglomerados se ubicaron en el centro de las tierras altas y un solo conglomerado de cantón ubicado en la costa, como se muestra en la **figura 4**.

Cabe decir que estas cifras son para humanos, mientras que los datos para cisticercosis porcina, son escasos; en la **tabla 1** se observa una recopilación realizada por Zhunio en el 2015 (38) de diversos estudios sobre la presencia de esta parasitosis en el país, las cuales al tratarse de un complejo teniasis/cisticercosis, la mayoría de las veces van ligadas a estudios en humanos

**Tabla 1.** Epidemiología de la cisticercosis porcina en el Ecuador. Fuente: Zhunio, 2015 (38)

Año	Prevalencia	Lugar	Método	Autor
1999	2.34	Loja	Inspección	Carvajal y Cueva,(1998)
1999	0.38	Ibarra	Inspección	Ron,(1999)
1999	12.1	Ibarra	Ag-ELISA	Ron,(1999)
2001	11.04	Loja	AG-ELISA	Ordoñez y Valarezo,(2001)
2001	2.08	Loja	Inspección	Ordoñez y Valarezo,(2001)
2001	0	Portoviejo	Inspección	Gallardo y Castro,(2001)
2001	2.12	Portoviejo	Ag-ELISA	Gallardo y Castro,(2001)
2002	0	Ambato	Inspección	Galecio,(2002)
2002	12.5	Ambato	Inspección de lengua	Galecio,(2002)
2006	3.56	Zapotillo	Inspección	Rodríguez-Hidalgo, (2006)
2006	74	Zapotillo	EITB	Rodríguez-Hidalgo, (2006)



#### **4.8. Métodos de diagnóstico**

Existen diversos métodos de diagnóstico que pueden ser usados para detección de la cisticercosis, estos se los puede dividir en 2 grupos: directos e indirectos. Generalmente, tanto los métodos directos como indirectos van ligados, pues por sí solos poseen varias limitaciones que impiden la detección de la cisticercosis de una manera mucho más específica. Es así que:

Los métodos directos o convencionales, como los exámenes *ante y post mortem*, morfológicos, coprológicos, etc. No miden con un alto grado de sensibilidad la presencia de esta patología ya sea en un hato, centros de faenamiento o no son útiles para estudios epidemiológicos (6)

Los métodos indirectos, como ELISA; IFI, EIBT, etc. Miden la “huella” que deja este patógeno (anticuerpos); invisibiliza la detección de un cuadro clínico actual. Poseen una limitada detección de especies de tenia y dificultan el monitoreo post-tratamiento (2,8)

Recientemente se utilizan los métodos moleculares, los cuales, en conjunto con los 2 anteriores métodos de diagnóstico, nos permiten mejorar de manera exponencial nuestra comprensión tanto de esta como de otras patologías

##### **4.8.1. Diagnóstico molecular**

El avance en el desarrollo de las técnicas de biología molecular y la introducción de la amplificación de ácidos nucleicos (AN) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha tenido y tienen un gran impacto en el desarrollo y aplicaciones en la biología molecular y el diagnóstico médico. Los métodos de amplificación tienen diferentes requerimientos para iniciar la síntesis de ADN. La PCR involucra la desnaturalización de la doble cadena de ADN, y ciclos de desnaturalización-amplificación, además que este método requiere de equipos sofisticados como un termociclador, así como de métodos elaborados para amplificar las secuencias blanco. Una de las estrategias para resolver estas limitaciones, ha sido el desarrollo de nuevas técnicas de amplificación isotérmica para la detección de AN (39).

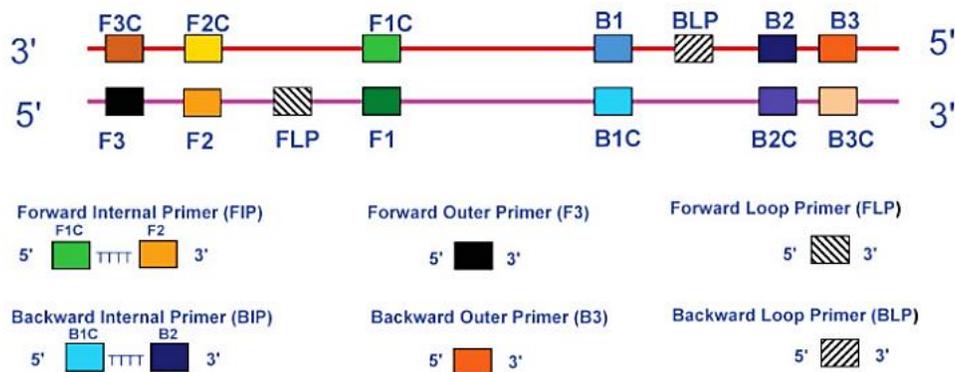
La mayoría de estos métodos de amplificación isotérmica tiene una sensibilidad alta para la detección de ADN. Las diferentes técnicas de amplificación isotérmica se han expandido para detectar un amplio espectro de blancos que incluyen no sólo ADN y ARN, sino también proteínas, células, pequeñas moléculas e iones(8).

#### 4.8.2. Amplificación isotérmica mediada por bucle o lazo (LAMP)

La técnica de LAMP fue desarrollada en el 2000 por Notomi y colaboradores con el fin de tener un método alternativo a la PCR, buscando que este fuera específico, sensible y que pudiera ser utilizada fuera de los laboratorios de diagnóstico y en los sitios de atención primaria, en donde los sistemas de detección sean rápidos, sensibles y precisos para emitir un diagnóstico (4). La reacción de LAMP, tiene un amplio rango de aplicaciones, incluyendo las pruebas de detección en puntos de atención, pruebas genéticas en lugares de bajos recursos, pruebas rápidas de productos alimenticios y muestras medioambientales.

La amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP) mediada por bucle utiliza la *Bst* ADN polimerasa, la cual es una enzima con actividad desplazante de cadena, para amplificar el ADN diana con alta especificidad, eficiencia y velocidad en condiciones isotérmicas constantes (60°C-65°C) (40).

El principio fundamental de esta técnica es la amplificación del templado original (ADN molde), para producir una gran cantidad de productos de amplificación de ADN que contienen una secuencia mutuamente complementaria y alternada de una estructura repetida (secuencia diana) (13,41). Para realizar la reacción LAMP, se necesitan de 4 a 6 cebadores (6 en caso de una RT-LAMP). Dos cebadores externos F3 y B3 y dos cebadores internos FIP (F1C, F2) y BIP (B1C, B2). Los cebadores internos se denominan Forward Inner Primer (FIP) y Backward Inner Primer (BIP) en donde cada uno contiene dos secuencias diferentes, correspondientes a las secuencias sentido y anti sentido del ADN diana, uno para cebar en la primera etapa y el otro para auto cebarse en etapas posteriores, lo que ayuda a formar el bucle o loop (42).

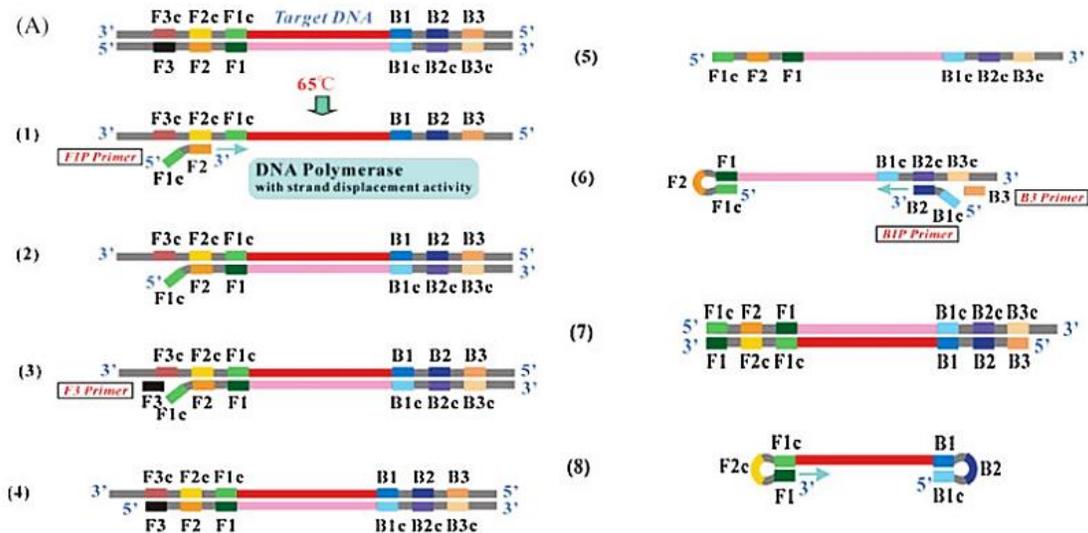


**Figura 5.** Representación esquemática del diseño de cebadores para el ensayo LAMP que muestra la posición de los cebadores para el gen diana Fuente: Parida, 2008 (42)

Las secuencias (generalmente de 23-24 nucleótidos) en ambos extremos de la región a amplificar el ADN diana se denominan, F2C y B2, respectivamente. Las dos secuencias internas a 40 nucleótidos de los extremos F2C y B2 se denominan F1C y B1 (generalmente de 23-24 nucleótidos), y las dos secuencias externas a extremos F2C y B2 (17-21 nucleótidos) se llama F3C y B3 (**ver figura 5**).

La amplificación se lleva a cabo en dos fases: una No cíclica y otra Cíclica.

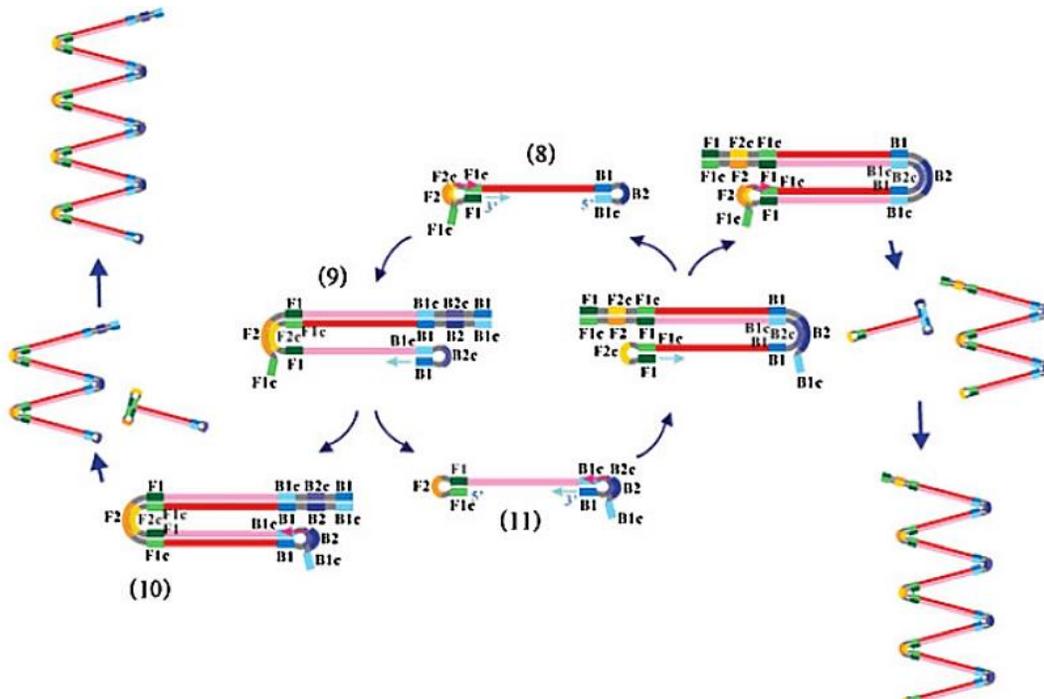
**Fase no cíclica:** Los cebadores inician su acción en dirección 5'→3', el primer cebador que interactúa con el ADN diana es FIP, que se une a su secuencia complementaria F2C, comenzando así a sintetizar dicha hebra complementaria. El siguiente cebador con el que interactúa es F3, que conecta con la región complementaria F3C. La *Bst* ADN polimerasa tiene una cierta cualidad, pues también actúa como una helicasa para abrir y cerrar la doble hebra, lo que permite que F3 continúen avanzando, mientras que en la primera hebra donde se unió FIP, forma un bucle al unirse F1C a su hebra complementaria (39). Por el otro extremo tanto BIP como B3 siguen los mismos pasos, hasta formar una hebra de doble cadena con el ADN diana, provocando que por complementariedad sus extremos formen un loop o bucle; esta **hebra en bucle de doble cadena** es la que servirá para la posterior amplificación de DNA, dando paso a la fase cíclica (**ver figura 6**).



**Figura 6.** Principio de la amplificación LAMP en su fase no cíclica. Fuente: Parida, 2008 (42)

**Fase cíclica:** Con el producto de la fase no cíclica (la hebra en bucle de doble cadena), los cebadores FIP interactúan nuevamente, donde la región F2 se une a la región F2C de su hebra complementaria, provocando nuevamente la hibridación; mientras que por el otro extremo la secuencia B2 de BIP se une a su región B2C complementaria, aquí cabe recalcar que de esta manera se obtienen 2 secuencias amplificadas del ADN diana, donde la primera es una copia de la hebra en bucle de doble cadena original, obtenida durante la fase no cíclica, mientras que la segunda contiene una nueva hebra en bucle que es dos veces más larga, la cual termina siendo una copia de la secuencia del ADN diana y que se encuentran unidas.

Aquí la *Bst* ADN polimerasa junto con los cebadores se une a estas dos cadenas, para nuevamente separar sus hebras, volverlas a unir y amplificarlas, obteniendo copias dobles, triples, cuádruples, etc. del ADN diana que se encuentran unidas entre sí (**ver figura 7**). Como resultado de este proceso, se forman estructuras similares a coliflor, con múltiples bucles de varios tamaños que consisten en repeticiones alternativamente invertidas de la secuencia diana en la misma hebra. La reacción cíclica continúa provocando la acumulación de  $10^9$  copias del objetivo en menos de una hora (42).



**Figura 7.** Principio de la amplificación LAMP en su fase cíclica. Fuente: Parida, 2008 (41)



En 2009 Nkouawa junto a sus colaboradores desarrollaron y evaluaron un ensayo de LAMP para el diagnóstico diferencial de infecciones con especies de *Taenia* con secuencias de Cisteína peptidasa de catepsina L (CLP) y Subunidad citocromo c oxidasa 1 (COX1). Los sets de cebadores para el “COX1” podían diferenciar entre 3 especies de tenia (*T. solium*, *saginata*, *asiática*), mientras que los sets de cebadores para “CPL” podían diferenciar *T. solium* de *T. saginata* / *T. asiática*. En este estudio ellos pudieron demostrar la alta especificidad de la prueba al usarlo en muestras ya conocidas de proglótidos (n = 100) y cisticercos (n = 68), así como una sensibilidad similar a la de los métodos de PCR (4)

Cabe señalar que con los cebadores “CLP”, no pudieron diferenciar entre las especies de *T. saginata* y *T. asiática*. Dadas las similitudes entre las secuencias genéticas que existen entre estas dos especies, por lo que los cebadores COX1 parecían ser lo más adecuados para diferenciar entre las 3 especies de tenia, aunque es necesario mayores experimentos que permitan determinar la especificidad del ensayo.

En 2016, Domínguez y sus colaboradores replicaron y optimizaron el protocolo de LAMP, desarrollado por Nkouawa usando los cebadores COX1, en donde sus mejores resultados, para las 3 especies de tenia, fueron al cambiar el Buffer de reacción y la *Bst ADN polimerasa*, la sensibilidad de su ensayo fue de 2pg/ul, la cual no pudo ser comparada con los resultados de Nkouawa, pues estos se expresaban en cantidad de huevos por materia fecal, mientras que en su especificidad, al comparar la prueba con muestras de otros parásitos, no obtuvieron ninguna reacción cruzada. Por otro lado también desarrollaron los primers específicos para *T. hidatygena* (propia de perros) con un resultado positivo al aplicar el ensayo de LAMP en su detección (12).



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se indican los materiales y los métodos que se usaron y aplicaron en cada una de las actividades planificadas:

### 5.1. Área de estudio y Unidad de Análisis

Se tomaron un total de 76 muestras *post-mortem* de cerdos sin distinción de raza, sexo, edad o lugar de procedencia, que posean lesiones sospechosas a estadios larvarios de *Taenia spp* (quistes) provenientes de las diferentes zonas ganaderas de sectores rurales y/o camales municipales de las Provincias de Azuay cantón Paute, Loja cantón Macará y Chimborazo cantón Riobamba

### 5.2. Colecta y ubicación en el tejido de los cerdos de los quistes sospechosos a estadios larvarios de *Taenia spp*.

#### 5.2.1. Materiales biológicos

Muestras de lesiones sospechosas a estadios larvarios de *Taenia spp*. (cisticercosis) ubicadas en los tejidos de los cerdos

#### 5.2.2. Otros materiales y equipos

Overol

Guantes de látex descartables

Mascarillas

Cofias

Marcador rotulador de muestras

Tabla de manejo para la identificación de muestras

Tijeras

Gel refrigerante

Cooler

#### 5.2.3. Métodos realizados para la colecta e identificar la ubicación de los quistes en el tejido de los cerdos

Paso 1. La ubicación de los quistes en el tejido de los cerdos se realizó de manera visual, anotando en la hoja de ficha de manejo (**Ver Anexo 1.**) si estos se encontraron a nivel de lengua, hígado, músculos y demás órganos y vísceras de los porcinos inspeccionados en los diferentes centros de faenamiento junto con el código respectivo para cada muestra que permita su correcta identificación.



Paso 2. Se determinó la viabilidad del quiste y nos basamos en la clasificación propuesta en 1994 por Carpio y sus colaboradores(43), identificando las siguientes categorías: 1) Activo, cuando el parásito está vivo. 2) Transicional, si está en la fase degenerativa. 3) Inactivo, si hay evidencia de su muerte (calcificado). Anotándose en la tabla de manejo con el código respectivo para cada muestra.

### **5.3. Conservación, transporte y almacenamiento de las muestras.**

#### **5.3.1. Materiales Biológicos.**

Muestras de quistes sospechosas a estadios larvarios de *Taenia spp.* a nivel de tejidos de los cerdos.

#### **5.3.2. Reactivos y soluciones**

Solución de conservación (Solución al 80% de Etanol, con 10 mM de Tris-HCl (Sigma, Cat. No.: T4661), pH 8.0; 1 mM de EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS) y 2.5 % de Glicerol (Sigma, Cat. No.:G5516)).

Solución TE 10:1 100X (Solución de 1 M de Tris-HCl, pH 8.0 y 100 mM de EDTA).

Solución a 2 M de Tris-HCl, pH 8.0.

Solución a 500 mM de EDTA, pH 8.0.

#### **5.3.3. Equipos y otros materiales**

Platina de calentamiento con agitación magnética.

Potenciómetro (pHmetro).

Set de micropipetas (1 ml, 200  $\mu$ l, 50  $\mu$ l y 20  $\mu$ l con puntas estériles).

Autoclave.

Equipo de filtración ( $\varnothing$  0.22  $\mu$ m).

Probetas y recipientes para soluciones.

Recipientes para las muestras (Tubos Falcon de 15 ml).

Kit de disección.

Guantes.

Solución desinfectante (Etanol al 70%).

Caja térmica para el transporte de muestras.



Ficha de manejo para colección de muestras.

#### **5.3.4. Procedimientos para realizar la conservación, transporte, y almacenamiento de las muestras**

Paso 1. Se preparó la solución de conservación requerida siguiendo las concentraciones pertinentes para Solución al 80% de Etanol, con 10 mM de Tris-HCl (Sigma, Cat. No.: T4661), pH 8.0; 1 mM de EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS) y 2.5 % de Glicerol (Sigma, Cat. No.:G5516).

Paso 2. Se colocó en los recipientes para las muestras 8 ml de la solución de conservación de la muestra.

Paso 3. Se tomaron las muestras sugestivas a cisticercosis, de acuerdo a la normativa del manejo respetuoso de los animales y así como también tomando las seguridades del caso para la viabilidad de las muestras en este estudio (Sección 5.2.3.).

Paso 4. Para la colecta se tomaron una cantidad máxima de tejido de la lesión no mayor a la necesaria para llegar a tener un volumen de 10 ml (Marcado en el recipiente el volumen de 10 ml).

Paso 5. Se identificaron el o los recipientes y se colectaron los datos necesarios para llenar el formulario para la colecta de las muestras (Sección 5.2.3.).

Paso 6. Para el transporte de las muestras se procedió a colocar los recipientes en un cooler, evitando que se vuelquen y se generen derrames.

Paso 7. Para el almacenamiento de las muestras, se colocaron los recipientes en refrigeración (4 °C). Con este procedimiento se pueden mantener viables las muestras por un periodo de 6 a 8 meses para la obtención del material genético.

#### **5.4. Procesamiento, extracción y purificación de ADN de las muestras**

##### **5.4.1. Materiales Biológicos**

Muestras sospechosas a cisticercosis mantenidas en la solución de conservación a 4°C

##### **5.4.2. Reactivos y soluciones**

Solución de lisis (Solución con 10 mM de Tris-HCl, pH 7.4 y 0.5 % de SDS (Sigma, Cat. No.: 71725). La solución ya preparada se almacenó a temperatura ambiente protegida de la luz solar directa.

Solución de proteinasa K (Solución con 5 mg/ml de Proteinasa K (Sigma, Cat. No: P2308) en 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM de EDTA y 50% de Glicerol). La



solución ya preparada se fraccionó en alícuotas de 500 µl y se almacenó a -20° C, protegidas de la luz.

Solución de Fenol/Cloroformo/A. Isoamílico 25:24:1 (Sigma, Cat. No: 77619). De igual manera esta solución se almacenó en refrigeración y protegido de la luz.

Solución de Etanol al 100 % (Sigma, Cat. No: E7023). Almacenada en refrigeración y protegido de la luz.

Solución de Etanol al 70 % (Solución al 70 % de Etanol en agua). Almacenada en refrigeración y protegido de la luz.

Solución TAE 10:1 1X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM de EDTA).

Agarosa (Invitrogen, Cat. No. 16500-100).

Solución buffer TAE 1X (Solución de 40 mM Tris-acetato, pH ≈ 8.0 y 1 mM EDTA).

Solución de Bromuro de Etidio (Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E7637).

Solución Buffer de carga para ADN 6X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 60 mM de EDTA. 0.03 % de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03 % de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60 % de Glicerol

Marcador de peso molecular para ADN (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

#### **5.4.3. Equipos y otros materiales**

Set de micropipetas (1 ml, 200 µl, 50 µl y 20 µl con puntas estériles).

Vortex.

Centrifuga refrigerada.

Fuente de poder.

Cámara de electroforesis horizontal.

Balanza analítica (Mantener calibrada).

Transiluminador UV.

Fotodocumentador UV-impresora.



#### **5.4.4. Procedimientos aplicados para el procesamiento, extracción y purificación de ADN de las muestras**

Paso 1. Se tomó una porción aproximada de 100 mg de la muestra de tejido colectado con quistes y sospechosa a cisticercosis mantenidas previamente en la Solución de conservación a 4 °C.

Paso 2. Se colocó la muestra de tejido sobre una porción de papel absorbente estéril para que se elimine la mayor cantidad de la Solución de conservación.

Paso 3. Se colocó la muestra de tejido en un tubo Eppendorf de 2.0 ml y se adicionó 400 µl de la Solución de lisis y 100 µl de la solución de *Proteinasa K* (5 mg/ml).

Paso 4. Las muestras se incubaron a 56 °C en baño María durante toda la noche (12 a 14 h).

Paso 5. Una vez concluido el proceso de digestión, se adicionaron 500 µl de la solución de fenol/cloroformo/ácido isoamílico 25:24:1 y se mezcló vigorosamente con el vortex durante 20 a 30 s.

Paso 6. La suspensión obtenida se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min a 4 °C. Una vez concluida la centrifugación se colectó el sobrenadante ( $\pm$  400 µl) y se procedió a colocarlo en un tubo eppendorf (1.5 ml) nuevo.

Paso 7. A la muestra colectada se le adicionó 2.4 volúmenes de Etanol al 100% (1 ml) y se mezcló invirtiendo el tubo por 8 a 10 veces.

Paso 8. La mezcla se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min a 4 °C. Una vez concluida la centrifugación se eliminó la solución de forma cuidadosa para no perder la pastilla del ADN precipitado. Se adicionaron 500 µl de la solución de etanol al 70%, y se repitió el proceso de centrifugación y eliminación completa de la solución de etanol al 70%.

Paso 9. La pastilla obtenida se secó a temperatura ambiente, protegida de la luz y el polvo. Y posteriormente se re-suspendió en 50 µl de la *solución buffer TE 10:1 1X, pH 8.0*.

Paso 10. Las muestras de ADN total obtenidas se almacenaron a -20 °C hasta que se empleen en los procesos de amplificación por medio del ensayo de LAMP (44), el cual se lo realizó por 3 ocasiones a cada muestra, la primera como un control del proceso en donde luego se realizó un nuevo ensayo LAMP pero con los primers o cebadores para cada especie de *Taenia*.



## 5.5. Amplificación de control de proceso de ADN total de las muestras por medio de la técnica de LAMP

### 5.5.1. Materiales biológicos.

Muestras de ADN total puro, extraído de las muestras de tejidos de las lesiones de los animales afectados con aparente cisticercosis porcina.

### 5.5.2. Materiales químicos o reactivos

Agua grado biología molecular (Sigma, No. cat.: W4502).

Buffer de amplificación 10X (20 mM de Tris-HCl, pH 8.8; 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 10 mM de KCl; 2 mM de MgSO<sub>4</sub> y 0.1% de Triton X-100) y enzima Bsm ADN polimerasa (Thermo scientific, No. cat.: EP0691).

Solución de Betaína 4 M (Sigma, No. cat.: 61962-50G).

Solución de dNTP's a 10 mM de cada uno (c/u) (Thermo Scientific, Cat. no.: R0191).

**Tabla 2.** Soluciones de oligonucleótidos y diseño de primers/cebadores para ADN de cerdo COXII (Cytochrome C Oxidase Subunit II)

Oligonucleótidos y cebadores para ADN de <i>Sus scrofa</i> spp domestica COXII	
FIP (F1c + F2)	AGGGATGGGACGGCTCATGACAATCGAGTTGTTCTACCA
BIP (B1c + B2)	ACAGATGCTATCCCAGGACGATCTGAGCACTGTCCGTAA
F3	AGACTATGAAGACCTCACCTT
B3	AGTGCTGACTAGCTTCTCA
LB	CTCTAATATCCACACGACCTGG
LF	GCAGTACGTCTTCAGAGGATAC

Las secuencias de oligonucleótidos y diseños de los primers son los obtenidos y descritos por Cho, A; Dong, H y Cho, S en el 2014 (45).

### 5.5.3. Materiales de laboratorio y equipos

Termociclador y/o baño María

Tubos de PCR

Set de micropipetas (1 ml, 200 µl y 20 µl con puntas estériles)

### 5.5.4. Procedimiento de control del proceso de ADN total de las muestras por medio de la técnica de LAMP

Paso 1. Se realizó una premezcla para el ensayo de amplificación LAMP para detección de ADN de cerdo con todos los reactivos antes descritos (Sección 5.5.2) con el volumen requerido para el número de muestras a analizar (12.1 µl de



volumen final por reacción), el cual permitió validar las muestras con el ADN extraído en el paso anterior (sección 5.4)

Paso 2. La premezcla preparada se llevó al vortex por 4 a 6 s, y se colecta por centrifugación a 14.000 x g durante 15 a 20 s.

Paso 3. Se marcó los tubos ependorf (200 µl) y se les colocó 10,1 µl de la premezcla y se les adicióno 2 µl de la muestra de ADN total correspondiente.

En la **tabla 3** se puede visualizar la composición de la mezcla de reacción para la amplificación del ensayo LAMP de *Sus scrofa spp domestica*

**Tabla 3.** Composición de la mezcla de reacción para la amplificación del ensayo LAMP de *Sus scrofa spp. doméstica*

Componentes	Concentración	Volumen
H2O		1,75ul
Buffer de amplificación 10x		1,25ul
Solución de dNTPs	0,7mM	0,875ul
Betaina	800mM	5ul
FIP	1,4mM	0,4ul
BIP	1,4mM	0,4ul
F3	0,2mM	0,2ul
B3	0,2mM	0,2ul
<i>Bsm</i> DNA polimerasa	0,32U/ul	0,5ul
Muestra de ADN		2ul
<b>Total.</b>		<b>12,1ul</b>

Paso 4. Los tubos con las reacciones de la premezcla y el ADN extraído (12,1 µl) se colocó en el termociclador para la incubación de esta premezcla con el fin de que suceda la desnaturalización del ADN total y el alineamiento de los oligonucleótidos a la secuencia diana del ADN porcino a amplificar. Con una temperatura inicial de 96°C por 5 minutos para la desnaturalización de hebras de ADN



Paso 5. Culminada este tiempo incubación, se sacó los tubos ependorf con las reacciones del termociclador y se añadió 0,32 U/μl de la enzima *Bsm ADN polimerasa* para que se suceda la amplificación del material genético

Paso 6. Posteriormente se sometió esta mezcla nuevamente en el termociclador a una temperatura de 63°C por 1 hora para su templado y/o alineamiento y para finalmente utilizar una temperatura de 80°C por 10 minutos para la inactivación de la mezcla de reacción

Paso 7. Una vez que se realizaron los ensayos de amplificación con el control de proceso (Detección de ADN genómico de porcino) se evaluó la presencia e integridad del material genético purificado mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1,5% con Bromuro de Etidio, a 80 voltios (V) por 45 minutos (min) (Ver Sección 5.6).

## **5.6. Detección de ADN genómico de porcino mediante electroforesis en gel de agarosa**

### **5.6.1. Materiales biológicos**

Productos amplificados de ADN genómico porcino mediante el ensayo de LAMP

### **5.6.2. Materiales químicos y reactivos**

Agarosa (Invitrogen, Cat. no.: 16500-500)

Solución buffer TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA, pH 8.0) (Sigma, Cat.no.: T4661, A6283, EDS, S8045)

Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml (Sigma, Cat. no.: E7637)

Solución Buffer de carga 6X para ADN (60 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 6 mM de EDTA, pH 8.0, 0.3% de Azul de bromofenol, 0.3% de Xilencianol y 30 % de Glicerol) (Sigma, Cat.no.: T4661, 320331, EDS, S8045, B8026, X1426, G5516)

Solución con el marcador de peso molecular de ADN (Invitrogen, Cat no: 15628050)

### **5.6.3. Materiales de laboratorio y equipos**

Micropipetas (10, 100 y 1000 μl)

Puntas para las micropipetas

Microtubos Eppendorf de diferentes volúmenes

Tubos de PCR



Vortex

Cámara de electroforesis horizontal

Horno de microondas

Balanza analítica

Potenciómetro (pHmetro)

Transiluminador

Fotodocumentador

Computadora de escritorio

#### **5.6.4. Procedimiento para la detección de los productos de amplificación del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa**

Paso 1. Se pesaron 1,35 g de agarosa y se les adicionó a un matraz Erlenmeyer con 90 ml de solución *buffer TAE 1X*, la agarosa se disolvió por calor con ayuda de un horno de microondas.

Paso 2. Una vez disuelta completamente la agarosa en la solución TAE se dejó enfriar y se adicionaron 3  $\mu$ l de una solución de *Bromuro de etidio a 10 mg/ml*. Se mezcló completamente, y la mezcla se vació en el molde para el gel y se colocaron inmediatamente dos peines para formar dos filas de pozos.

Paso 3. Una vez gelificada la solución de agarosa, el gel se colocó en la cámara de electroforesis horizontal y se adicionó la cantidad de solución *buffer TAE 1X* necesaria para cubrir completamente el gel.

Paso 4. Posteriormente se cargaron los 15  $\mu$ l (12,5  $\mu$ l de la reacción de LAMP más 3  $\mu$ l de la solución *buffer de carga para ADN 6X* de cada una de las muestras en cada pocillo del gel, y en uno de los pocillos de cada fila se colocó 5  $\mu$ l del marcador de peso molecular de ADN (500 ng totales).

Paso 5. Concluido el cargado de las muestras y el marcador de peso, se colocó la tapa de la cámara de electroforesis y se conectó a la corriente eléctrica a un voltaje de 80 por 45 min.

Paso 6. Una vez separada o resueltos los productos de LAMP, se visualizaron en el transiluminador y con ayuda del fotodocumentador se tomó una imagen del mismo.



Paso 7. Se consideró como una amplificación positiva la observación de un patrón de bandas, indicativo para la presencia de una adecuada amplificación de productos del ensayo de LAMP para el ADN porcino (46).

## 5.7. Amplificación del ADN de las especies del complejo Teniasis/Cisticercosis mediante el ensayo LAMP

### 5.7.1. Materiales biológicos

ADN total extraído de las muestras de tejido sospechosos a cisticercosis.

### 5.7.2. Materiales químicos o reactivos

Agua grado biología molecular (Sigma, No. cat.: W4502).

Buffer de amplificación 10X (20 mM de Tris-HCl, pH 8.8; 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 10 mM de KCl; 2 mM de MgSO<sub>4</sub> y 0.1% de Triton X-100) y enzima Bsm ADN polimerasa (Thermo scientific, No. cat.: EP0691).

Solución de Betaína 4 M (Sigma, No. cat.: 61962-50G). No aplicada, se suprimió su uso

Solución de dNTP's a 10 mM de cada uno (c/u) (Thermo Scientific, Cat. no.: R0191).

A continuación, se describen la serie de primers usados para cada especie de tenia:

**Tabla 4.** Soluciones de oligonucleótidos para *Taenia asiatica* COX1 (Cytochrome C Oxidase Subunit I)

Cebadores y oligonucleótidos para <i>T. asiática</i> COX1	
FIP	AGGCAAGTTTAAATCAGATAACCCATTTTGATAGGTGGTTTTGGTAA
BIP	GTGGTTGTTGATTCCCTTCAATAGTTTAAAGCGGATAAAAAGTTCAC
F3	GATTTTCTTTTTTTTGATGCCCA
B3	TTGAAAATAATGACGACGACA

**Tabla 5.** Soluciones de oligonucleótidos para *Taenia solium* COX1

Cebadores y oligonucleótidos para <i>T. solium</i> COX1	
FIP	CAACCATGCACTTAAAGCATTCAAATCCATTGATAAGAGGATTATCGG
BIP	GGATGTGTTTAGGCGCTGGTACAACGAAGATGATAAAGGTG
F3	CCTATTTTAATTGGAGGTTTTGG
B3	CTACCCCACTTCCTCTTGA



Las secuencias de oligonucleótidos y diseños de los primers son los obtenidos y descritos por Nkouawa y colaboradores en el 2009 (4)

### 5.7.3. Materiales de laboratorio y equipos

Termociclador y/o baño María

Tubos de PCR

Set de micropipetas (1 ml, 200  $\mu$ l y 20  $\mu$ l con puntas estériles)

### 5.7.4. Procedimiento de la Amplificación del ADN de las especies del complejo Teniasis/Cisticercosis mediante el ensayo LAMP

Paso 1. Previo a realizar el ensayo de amplificación LAMP, se procedió a realizar un control de proceso, esto con el objetivo de validar que el protocolo de extracción de ADN de las muestras fue adecuado, ver sección 5.5 y 5.6.

Paso 2. Posteriormente se realizó una premezcla para el ensayo de amplificación LAMP para detección de ADN de las especies de tenia con todos los reactivos antes descritos, uno para cada especie de tenia (Sección 5.7.2.)

**Tabla 6.** Composición de la mezcla de reacción para la amplificación del ensayo LAMP de *T. solium* y *T. asiatica*

Componentes	Concentración	Volumen
H2O		5,275ul
Buffer de amplificación 10x		1,25ul
Solución de dNTPs	0.7mM	0,875ul
Betaina		
FIP	1,4mM	0,4ul
BIP	1,4mM	0,4ul
F3	0,2mM	0,2ul
B3	0,2mM	0,2ul
<i>Bsm</i> DNA polimerasa	0,32U/ul	0,5ul
Muestra de ADN		2ul
<b>Total.</b>		<b>12,1ul</b>



El resto del procedimiento para la técnica de LAMP es el mismo que se realizó en el control del proceso con el uso de los cebadores específicos para cada una de las 2 especies de tenia (sección 5.5.4.), con la diferencia que para el ensayo LAMP de *Taenia solium* y *T. asiática* se suprimió, en la premezcla de reacción, el uso de la betaína, con lo que se obtuvo mejores productos de amplificación con respecto al protocolo inicial que si usaba una concentración de betaína de 0,8M.

En la **tabla 6** se puede observar la composición de la mezcla para la reacción de LAMP de *T. solium* y *T. asiática*.

## **5.8. Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio**

### **5.8.1. Materiales biológicos**

Productos amplificados mediante el ensayo de LAMP

### **5.8.2. Materiales químicos y reactivos**

Agarosa (Invitrogen, Cat. no.: 16500-500)

Solución buffer TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA, pH 8.0) (Sigma, Cat.no.: T4661, A6283, EDS, S8045)

Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml (Sigma, Cat. no.: E7637)

Solución Buffer de carga 6X para ADN (60 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 6 mM de EDTA, pH 8.0, 0.3% de Azul de bromofenol, 0.3% de Xilencianol y 30 % de Glicerol) (Sigma, Cat.no.: T4661, 320331, EDS, S8045, B8026, X1426, G5516)

Solución con el marcador de peso molecular de ADN (Invitrogen, Cat no: 15628050).

### **5.8.3. Materiales de laboratorio y equipos**

Micropipetas (10, 100 y 1000 µl)

Puntas para las micropipetas

Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes

Tubos de PCR

Vortex

Cámara de electroforesis horizontal

Horno de microondas



Balanza analítica

Potenciómetro (pHmetro)

Transiluminador

Fotodocumentador

Computadora de escritorio

#### **5.8.4. Procedimiento de productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa**

Para la detección de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa del ensayo LAMP para cada especie de tenia, se utilizó el mismo procedimiento descrito en la sección 5.6.4 (control del proceso); difiriendo en la concentración del gel, en este caso al 1,6% con un voltaje de 100 V por un tiempo de 2 horas.

#### **5.9. Análisis de la información.**

Para evaluar los resultados conseguidos con la técnica de LAMP a las muestras colectadas, el análisis estadístico descriptivo lo consideramos adecuado para el ensayo que describe los tipos de cisticercos, evidenciando el comportamiento de los datos generados, se estimó la proporción de muestras positivas y negativas definidas con el ensayo de LAMP para cada especie de tenia. Así como la implantación de estadística descriptiva para la ubicación de los quistes en el tejido de los cerdos y su procedencia geográfica.



## 6. RESULTADOS

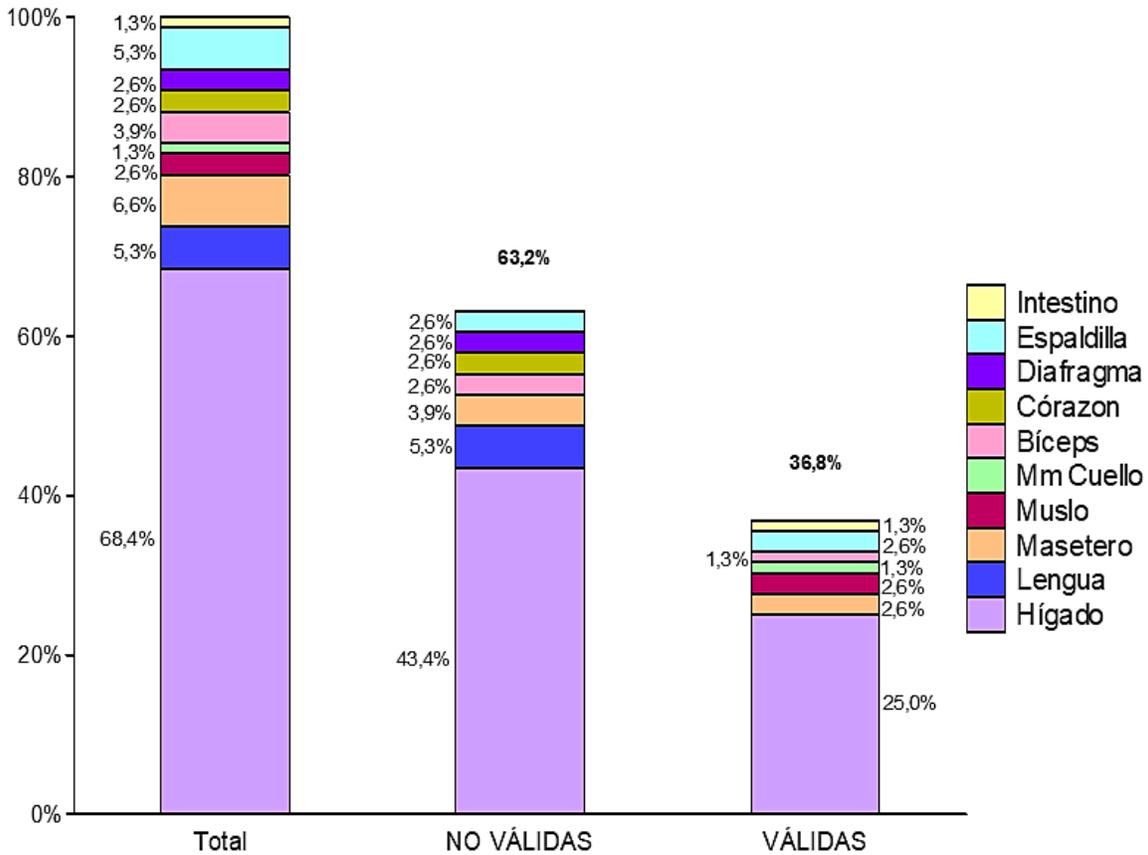
Las muestras fueron recolectadas en los cantones Paute, Riobamba y Macará, de las provincias de Azuay, Chimborazo y Loja respectivamente, con un total de 76 quistes en 38 animales, los cuales cumplían con los criterios morfológicos para ser catalogados como sospechosos a la fase larvaria de *Taenia spp* y por ende para su posterior procesamiento en la técnica LAMP, las características que presentaban estas muestras como la ubicación geográfica, ubicación en tejido, viabilidad del quiste (referente a si el parásito se encuentra vivo, en proceso de degeneración o calcificado/muerto) y resultados a los ensayos LAMP se pueden visualizar en el **anexo 1**.

### 6.1. Viabilidad del ADN total extraído de las muestras sospechosas a cisticercosis, como control del proceso (*Sus scrofa spp domestica*) mediante un ensayo de LAMP

Para el procesamiento, extracción y conservación del ADN de las muestras, se utilizó el protocolo probado por Sigüencia (43), mientras que para comprobar el funcionamiento del método LAMP para la amplificación del ADN de las diferentes especies de tenia (*T. solium* y *T. asiatica*), así como del ADN del cerdo (*Sus scrofa spp domestica* como control del proceso), se utilizaron los componentes y condiciones descritas por Abril y Sigüenza (45), a los que se les realizó los ajustes necesarios para tener una reacción adecuada

Como se puede observar en la **figura 8** del total de muestras procesadas, 36,84% (28) resultaron positivas para el ensayo LAMP *Sus scrofa spp domestica*, o lo que es lo mismo, son válidas al control del proceso.

De todas las muestras colectadas en lengua, corazón y diafragma todas resultaron no válidas/negativas al control del proceso con 5,26% (4) 2,63% (2) y 2,63% (2) respectivamente; al contrario de todas las muestras colectadas en intestino, muslo y músculo interno del cuello, las cuales fueron positivas/válidas al control del proceso con 1,32% (1), 2,63% (2) 1,32% (1) respectivamente. Además del 36,84% (28) muestras válidas/positivas al control del proceso, la mayor ubicación se observó en hígado con un 25% (19) del total recolectadas.



**Figura 8.** Muestras No válidas y Válidas al ensayo LAMP del control del proceso (*Sus scrofa spp domestica*) de acuerdo a la ubicación de los quistes en el tejido de los cerdos.

**6.2. Ensayo LAMP para la identificación de ADN genómico de estadios larvarios de dos diferentes tenías (*T. solium* y *T. asiática*).**

Del total de muestras procesadas para el ensayo LAMP de *T. solium*, el 15,79% (12) resultaron positivas, mientras que el 84,21% (64) negativas. Por otro lado, para el ensayo LAMP de *T. asiática*, todas las muestras colectadas resultaron negativas.

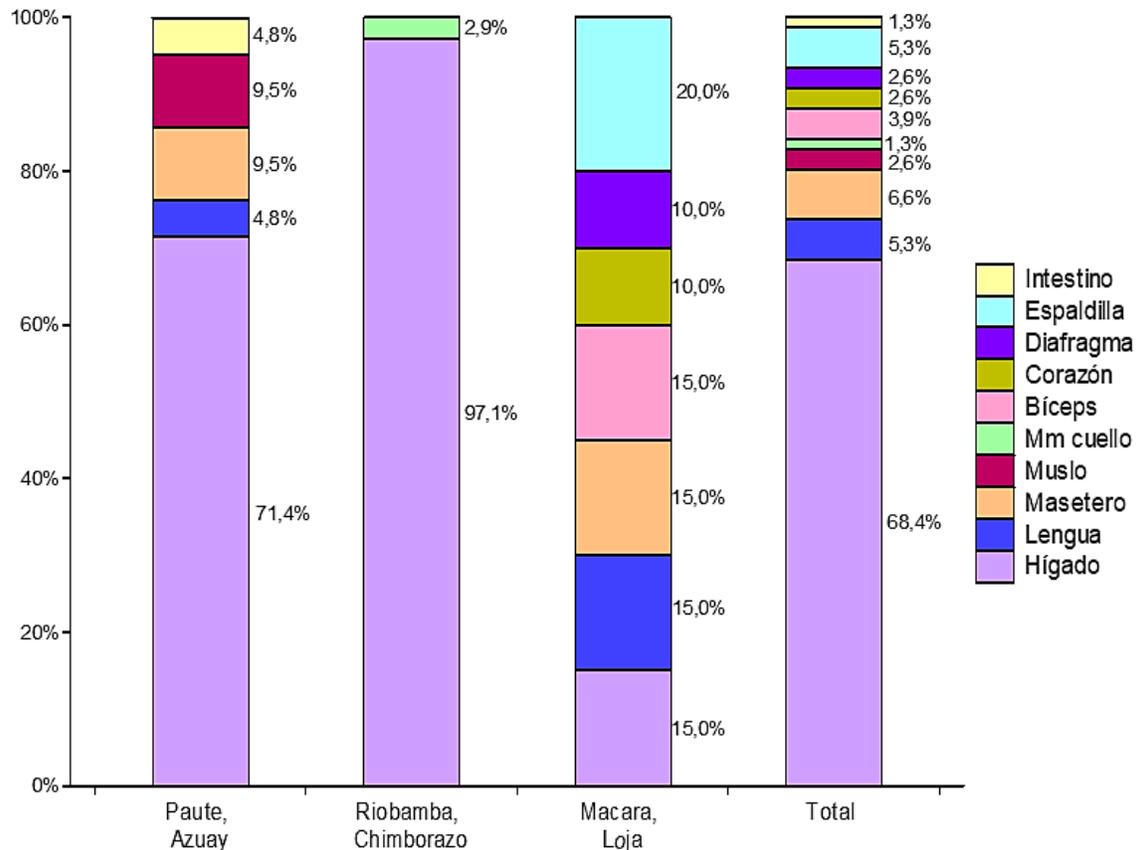
En la **figura 9** podemos observar que para *T. solium* del total de muestras colectadas en diafragma, corazón, y lengua con 2,63%, 2,63% y 5,26% respectivamente, todas resultaron negativas para este ensayo y no válidas al control del proceso. Por otra parte, la muestra colectada de intestino (1,32%) resultó positiva al ensayo LAMP y válida al control del proceso.



### 6.3. Localización y frecuencia de los quistes en los diferentes tejidos de cerdos faenados

El total de quistes colectados con posible cisticercosis provinieron de los cantones de Riobamba, Paute y Macará con 35 (46,05%), 21 (27,63%) y 20 (26,32%) muestras respectivamente.

En la **figura 10** se destaca que del total de las muestras recolectadas en Riobamba, 34 (97,1%) fueron colectadas en hígado, de las cuales 4 (11,42%) dieron positivas a *T. solium* y válidas al control del proceso y 3 (8,57%) dieron positivo a *T. solium* pero no válidas al control del proceso. De las muestras colectadas en Paute 4 (19,04%) resultaron positivas a *T. solium* y válidas al control del proceso, de las cuales 2 (9,52%) se ubicaron en hígado, 1 (4,76%) en masetero y 1 (4,76%) en intestino. De las muestras colectadas en Macará 1 (5%) resultó positiva a *T. solium* y no válida al control del proceso la cual se ubicó en músculo masetero (**ver anexo 2**).



**Figura 10.** Origen geográfico y de tejido de las muestras colectadas.



## 7. DISCUSIÓN

Las muestras recolectadas provienen de los cantones de Paute, Riobamba y Macará. Es de considerar que en la mayoría de centros de faenamiento ingresan animales de cantones y provincias aledañas, donde varios autores (20, 38, 47, 48) desde 1998 hasta 2015 han revelado la presencia de teniasis/cisticercosis en animales y humanos en ciudades como son Ambato, Quito, Ibarra y Portoviejo, así como Huaquillas, Limones, Cuenca, etc (20, 46).

Se ha podido evidenciar en el actual estudio la presencia de muestras positivas al ensayo LAMP para *T. solium* en el cantón Macará; tal como lo especifican diversos estudios serológicos de anticuerpos y antígenos de Coral en 2015, Pizarro en 2014 y Caraguay en 2012 (49–51), en parroquias y sectores específicos de la provincia de Loja; en el cantón Espindola en las parroquias Santa Teresita, Bella Vista y Amaluza, así como en los cantones Macará, Paltas y Céllica (52).

Como señala Rodríguez en 2007 (20), usualmente la cisticercosis tiene una mayor afinidad por tejido muscular: en bíceps, cuello, masetero, muslo y lengua. En menor grado en corazón, pulmón, hígado, intestino, diafragma y cerebro. Corral en 2015 (49) concuerda con lo descrito por Rodríguez, pero señala que el diagnóstico puede ser omitido en la inspección *post-mortem* en animales con baja carga parasitaria. Mientras que Eom en 2020 (53) expresa que los metacestodos de *T. asiática*, poseen tropismo por el tejido hepático.

En el presente estudio se recolectó muestras de varios de estos tejidos, algunas de ellas siendo negativas a los ensayos LAMP para *Sus scrofa*, *T. solium* y *T. asiática*, con una gran cantidad de quistes colectados de hígado. La presencia de muestras positivas en este estudio para *T. solium*, es un claro indicativo de la utilidad que tiene la técnica molecular LAMP en la identificación de este tipos de parásitos, ya que estas muestras positivas con ubicación de las lesiones en el tejido hepático de los cerdos, macroscópicamente podrían ser fácilmente confundidas con equinococosis o quiste hidatídico; hecho muy importante debido a que sería otra forma de transmisión para el humano, si no se tiene cuidado y no se decomisan los tejidos infectados en los centros de faenamiento (54). Ito en el 2015 (55) ratifica lo antes dicho pues refiere a casos en humanos de infecciones cruzadas con 2 o más cestodos, mientras que Villalobos en 2008 (56) con diferentes métodos de biología molecular (PCR y PCR multiplex), lograron identificar no solo las tenias sino otras especies de cestodos que previamente fueron diagnosticados con *T. hydatigena*, *E. granulosos* y otras parasitosis que presentan lesiones quísticas. Lo cual, también explica, porque el 84,21% de las



muestras resultaron negativas al ensayo LAMP para *T. solium*, mientras que del 15,79% de muestras positivas a este ensayo el 11,84% se ubican en hígado.

La viabilidad de los quistes parece estar relacionado en los resultados obtenidos con los ensayos LAMP, pues Almeida en 2005 (32), observó el fallo en la detección de un caso de neurocisticercosis, al utilizar un ensayo PCR en líquido céfaloraquídeo (LCR) de un paciente previamente diagnosticado por resonancia magnética y anticuerpos en LCR contra tenia. Señalan que este paciente fue el único caso que presentó una intensa reacción meníngea y múltiples quistes calcificados parenquimatosos. En el presente trabajo la mayoría de quistes que no tuvieron una reacción positiva al ensayo LAMP tanto como para el control del proceso como para los ensayos con las tenias se encontraban en fase inactiva y/o calcificada, como fue el caso de las muestras colectadas en lengua, corazón y diafragma y que resultaron no válidas al control del proceso (**ver anexo 6 y 7**).

Si bien Almeida no expresa una razón del por qué ocurre esto; Flisser y Correa (57) especifican que cuando el parásito empieza a involucionar se desarrolla una respuesta inflamatoria granulomatosa circundante. Esta respuesta inflamatoria puede influir en cómo se conserva y expresa el ADN de las tenias en los quistes calcificados, pues al ser una respuesta compleja con diversos componentes moleculares que se liberan para su eliminación, dentro y fuera del quiste (como diversas interleucinas, citoquinas, TNF $\alpha$ , células plasmáticas, linfocitos, eosinófilos y macrófagos, que engulle el parásito remanente, dejando finalmente granuloma con la posterior cicatriz calcificada), pueden provocar que estos metacestodos no contengan la cantidad suficiente de ADN para ser expresada en un ensayo molecular.

En este sentido, si bien la respuesta inflamatoria parece influir en cómo se conserva el ADN de las muestras, tampoco debemos ignorar que las muestras con el ensayo LAMP para *Sus scrofa* / control del proceso, que no dieron un resultado positivo, sea consecuencia de la poca o escasa cantidad de tejido de cerdo que cubre a los quistes, como fue el caso de las muestras provenientes de Macará, donde solo 4 (5,26%) muestras dieron positivas en este ensayo. Sin dejar de lado que el adecuado transporte, manejo, procesamiento, extracción y purificación de la muestra influye en el rendimiento del ensayo LAMP.

Es necesario contar con información sobre la cantidad apropiada de tejido que debe utilizarse, pues al ser un procedimiento crítico, una disgregación rápida y completa es esencial para asegurar la obtención de ADN y evitar su degradación. Si se excede la cantidad recomendada se puede sobresaturar el sistema, con lo que se afecta el rendimiento y aumentan las impurezas del extracto, de manera



que es aconsejable realizar experimentos preliminares con distintas cantidades de material inicial para determinar cuál es la cantidad apropiada a utilizar (58). Por otro lado, existen diversos métodos de extracción de ADN para parásitos que producen lesiones quísticas, los cuales pueden ser una alternativa a utilizar en futuras investigaciones, uno de ellos es la trituración, que se logra mediante el uso de mortero de tejido para preparar un material de la muestra emulsionado listo para la extracción de ADNmt (54, 59, 60).

En los estudios de Nkouawa en 2009, 2010, 2012 y 2016 (4, 8, 62, 63) utilizan varios ensayos LAMP con muestras de proglótidos y heces previamente diagnosticados como *Taenia spp.* En 2009 (4) desarrollaron un ensayo LAMP con genes de CLP (Cathepsin L-like Cysteine Peptidase) y COX1 (Cytochrome C Oxidase Subunit 1) junto con 0.8 M de Betaína y una temperatura de templado a 63 °C para el diagnóstico de estos parásitos. En el presente estudio se utilizaron los cebadores COX1, se suprimió el uso de la Betaína y se utilizó una temperatura de templado de 60 °C. En 2010 Nkouawa (8) al comparar una PCR múltiple con un ensayo LAMP para 3 especies de tenias, detallan que debido a la tolerancia de la *Bst ADN polimerasa* a los inhibidores, a diferencia de la *Taq ADN polimerasa*, LAMP parece ser el método estándar de oro para detectar patógenos en muestras fecales. En esta investigación, la enzima utilizada fue la *Bsm ADN polimerasa Large Fragment* y las muestras provenientes de quistes en tejidos de cerdos.

El estudio de Domínguez en 2016 (12), también realiza variaciones con respecto al ensayo descrito por Nkouawa, cambiando la enzima utilizada de una *Bst DNA polimerasa Large Fragment* por la *Bst DNA polimerasa 2.0 WarmStart*; y el buffer de reacción de la *ThermoPol Reaction Buffer* por el *Isothermal Amplification Buffer* y sin afectar la concentración de Betaína de 0.8M y la concentración de MgSO<sub>4</sub> (Sulfato de magnesio), incrementando de esta manera el rendimiento del ensayo para las especies de tenia. En el presente estudio es de hacer notar que el buffer utilizado fue un *Buffer de amplificación 10X*, adecuado para la enzima *Bsm ADN polimerasa* mientras que no se utilizó el MgSO<sub>4</sub>.

Se considera que la Betaína en concentraciones de 0.8 a 1.6M mejoran el rendimiento de la amplificación de ADN, por reducir estructuras secundarias que se forman en zonas ricas de Guanina (G) y Citosina (C) y que impiden el acceso de la polimerasa a la hebra de ADN, aumentando la especificidad. Por otro lado, altas concentraciones de este reactivo bajan la especificidad, no permiten la unión de la enzima a la cadena de ADN al impedir todo tipo de estructuras secundarias. Mientras que en la práctica diversos autores consideran que su uso no muestra una diferencia significativa en la especificidad de los ensayos (12, 64).



Los buffers de reacción para LAMP como PCR contienen iones Potasio y Magnesio que afectan a la temperatura media de hibridación (TM) del AN de doble cadena y debería ser tenido en consideración cuando se calcula la TM para el desarrollo de cebadores, los cuales también cumplen un rol importante en la amplificación y expresión de los ensayos LAMP. Para una amplificación óptima, los cebadores que se utilizan deberían tener TM's similares (64), de manera que esto cebadores puedan ser considerados como de buena calidad.

Por otro lado, en 2012, Nkouawa (62) utilizó su técnica LAMP para aplicarlo en un estudio de campo, para identificar las especies de tenia humana en comunidades tibetanas de Sichuan, China a partir de muestras de heces. El ADN del parásito se extrajo incubando porciones de proglótide en NaOH 0,05 N durante 30 min en un termo que contenía el agua a 100 °C. La reacción LAMP se evaluó a simple vista sin electroforesis basándose en la turbidez de la mezcla de reacción. De 51 proglótides recuperadas de 35 portadores; 9, 1 y 41 muestras se identificaron como *T. solium*, *T. asiatica* y *T. saginata*, respectivamente. Como se puede evidenciar las características altamente deseables de LAMP incluyen alta sensibilidad y especificidad con tiempos de reacción rápidos y también hay evidencia de que la amplificación de LAMP ocurrirá en presencia de los inhibidores de PCR (como los que existen en muestras fecales), permitiendo procedimientos de extracción de ADN menos estrictos (65), pero teniendo en cuenta que deben ser específicos para estos tipos de parásito que producen lesiones quística.

No hemos podido encontrar estudios o investigaciones que evidencien la presencia de *T. asiatica* en América, pues estos estudios utilizan ya sea métodos indirectos que no permitan identificar *T. asiatica* o se enfocan solo en las otras 2 especies de tenia (*T. solium* o *T. saginata*) (2, 7, 9, 20, 21, 27, 33, 37, 47, 48, 50, 52), además que varios autores consideran que *T. asiatica* es una especie endémica, limitada a los países asiáticos, como Taiwán, Corea, China, Tibet, Japón India, etc (53, 66, 67). Por lo que la ausencia de muestras positivas de esta especie de parásito en este estudio es un indicio de que posiblemente esta especie no se encuentra presente en la región, aunque su ausencia no necesariamente es indicativo de que no esté presente en el continente, pues Galán en 2013 (5) explica que dado el proceso evolutivo que ha tenido *T. asiatica*, colocando en alrededor de 40.000 años atrás, "separándose" como una subespecie de *T. saginata* y a más de como los movimientos migratorios influyen directamente en la propagación de una enfermedad por el mundo. Así mismo Okamoto en el 2010 (17) detalla la presencia de especies híbridas entre cruces naturales de *T. saginata* y *T. asiatica*. Por lo que se considera que es necesario



seguir aplicando estas técnicas moleculares en la búsqueda de *T. asiatica* sin descuidarse de su posible presencia en el continente americano o europeo.

Es importante hacer notar que los ensayos utilizados en este estudio no son fieles a los usados por Nkouawa o Domínguez, ya que ellos en primer lugar, usan la enzima *Bst* ADN polimerasa mientras que esta investigación usa la *Bsm* ADN polimerasa, la cual, si bien funcionalmente son similares, tienen una estructura química diferente, y que necesariamente obliga a adaptar los ensayos para este reactivo con los cambios anteriormente detallados. En segundo lugar, al no tener de antemano muestras que se incluyan como un control positivo de ADN para *Sus scrofa spp domestica* (control del proceso), *T. solium* y *T. asiática*, las muestras recolectadas deben pasar por este conjunto de pasos complejos en repetidas veces y que, en este estudio, en algunas muestras, se llegaron a replicar los ensayos hasta en 3 ocasiones; para de esta manera, conseguir lo mejor que se pueda, la extracción de un ADN libre de endonucleasas, proteínas o fenoles.

Entre otras enfermedades se encontró diversos tipos de neumonías, enfermedades bacterianas como erisipela y patologías parasitarias como áscaris y una gran cantidad de casos de equinocosis, sobre todo en Riobamba y Paute. Caraguay y Maza en el 2012 (51) al identificar huevos de tenia en las heces de los habitantes del cantón Espindola de la provincia de Loja, observaron una alta presencia de huevos de áscaris en su población, indicativo de las inadecuadas prácticas sanitarias que se tiene en la crianza de cerdos y del desconocimiento de la población para prevenir la presencia de estas patologías. Es decir, que un cerdo con cisticercosis, probablemente tenga una, dos o más patologías concomitantes; muchas de las cuales se pueden controlar con un adecuado manejo.

Este trabajo nos permite dar un primer paso en la optimización y validación de estos ensayos moleculares para futuras investigaciones en parásitos que producen lesiones quísticas en los tejidos (66). Tal es el caso de *Equinococcus granulosus*, una enfermedad poco diagnosticada en el país. Pero como hemos visto, parece estar muy presente en la región andina y en la producción porcina del país. Es urgente determinar los genotipos presentes y cuáles de ellos son los que pueden afectar al humano y tener en cuenta el rol que cumplen los perros ferales en su diseminación.



## 8. CONCLUSIONES

Como resultado de esta investigación se concluye que, del total de muestras colectadas, el 36,84% fueron válidas al control del proceso a diferencia del alto porcentaje que resultaron no válidas (63,16%). Siendo necesario mejorar estos protocolos ya sea en el método de extracción, en la calidad del ADN que se obtiene de las muestras o incluso tener en cuenta la cantidad de tejido porcino que cubre a los quistes.

En el caso de las muestras ubicadas en lengua, corazón y diafragma podemos visualizar que todas resultaron no válidas y se encontraban en fase inactiva o calcificada; a comparación de las que si fueron válidas como son las de intestino, muslo y músculo esternotiroideo, las cuales se encontraban en fase activa por lo que es necesario buscar mayor evidencia que pueda sugerir si la viabilidad de los quistes (referente a si se encuentra en fase activa, transicional o inactiva) puede afectar o no en la forma en como estas muestras logran preservar el ADN.

Se evidenció que técnica LAMP es capaz de detectar muestras positivas a *T. solium* y que a su vez fueron válidas al control del proceso con un 10,53% del total de muestras colectadas, como el caso del quiste recolectado en intestino y varios de tejido hepático, los cuales fácilmente podían ser confundidos con *E. granuloso* u otras diferentes especies de cestodos.

Es evidente que, en el tejido de los cerdos, varias de las muestras que coinciden con lesiones características a la cisticercosis, resultaron negativas al ensayo para *T. solium* y no válidas al control del proceso. Siendo necesario adaptar los ensayos para los reactivos utilizados, como es el caso del uso de la enzima *Bsm* ADN polimerasa, el buffer de amplificación, las TM's de los AN y los cebadores o incluso la adición del MgSO<sub>4</sub>.



## 9. RECOMENDACIONES

Se debería comparar las técnicas aquí propuestas con otros métodos de extracción y purificación de ADN, e inclusive es necesario realizar estudios comparativos con otras técnicas moleculares como puede ser una PCR.

Utilizar un mayor número de muestras para estudios epidemiológicos en humanos y animales, pues al tratarse de un complejo teniasis/cisticercosis es necesario realizar un enfoque que abarque a los dos hospederos en el ciclo del parásito que permita entender mejor la dinámica de transmisión de la parasitosis.

Debemos considerar que generalmente los animales infestados con cisticercosis suelen presentar dos o más patologías concomitantes, debido a la falta de medidas de manejo, lo que al momento de la inspección por parte del veterinario pueden distraer y ocultar la presencia de este parásito, generando una posible fuente de contaminación y diseminación al humano. Por lo que es necesario una inspección más rigurosa en áreas y sectores endémicos a esta parasitosis.

La elevada presencia de casos observados de *E. granulosus*, sugiere que es necesario implementar estudios sobre su prevalencia en la producción porcícola de nuestro país y entender su forma de diseminación en la región, además de determinar los genotipos que se encuentran presentes, para lo cual las técnicas moleculares son la mejor herramienta disponible.



## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sing A. Zoonoses—infections affecting humans and animals: Focus on public health aspects. *Zoonoses-Infections Affect Humans Anim Focus Public Heal Asp.* 2015;(December):1–1143.
2. Sarti E, Schantz PM, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez IO, Lopez AS, et al. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;46(6):677–85.
3. Lescano AG, García HH, Gilman RH, Guezala MC, Tsang VCW, Gavidia CM, et al. Swine cysticercosis hotspots surrounding *Taenia solium* tapeworm carriers. *Am J Trop Med Hyg.* febrero de 2007;76(2):376–83.
4. Nkouawa A, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Ito A. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. *J Clin Microbiol.* 2009;47(1):168–74.
5. Galán-Puchades MT, Fuentes M V. *Taenia asiatica*: The most neglected human taenia and the possibility of cysticercosis. Vol. 51, *Korean Journal of Parasitology.* 2013. p. 51–4.
6. Ale A, Victor B, Praet N, Gabriël S, Speybroeck N, Dorny P, et al. Epidemiology and genetic diversity of *Taenia asiatica*: A systematic review. *Parasites and Vectors.* 2014;7(1).
7. Sagastume MC. Determinación de la Presencia de *Cysticercus cellulosae* en carne de cerdo adobada que se expende en el mercado Municipal de Chimaltenango [Internet]. Universidad De San Carlos De Guatemala; 2017. Disponible en: [http://www.repositorio.usac.edu.gt/7263/1/Tesis Med.Vet.Cecilia Sgastume.pdf](http://www.repositorio.usac.edu.gt/7263/1/Tesis%20Med.Vet.Cecilia%20Sgastume.pdf)
8. Nkouawa A, Sako Y, Li T, Chen X, Wandra T, Swastika IK, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method using fecal specimens for differential detection of *Taenia* species from humans. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3350–2.
9. Watanabe RA. Estudio de la cisticercosis porcina en el Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.
10. Yanagida T, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Ito A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium* in Japan. *Parasites and Vectors.* 2012;5(1):5-18.
11. Verweij JJ, Rune Stensvold C. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(2):371–418.
12. Domínguez M de L. Diseño y puesta a punto de un método LAMP (Loop-



- mediated isothermal amplification) para el diagnóstico de enfermedades producidas por cestodos [Internet]. [Salamanca]: Universidad de Salamanca; 2016 [citado el 11 de junio de 2020]. Disponible en: [https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/131526/TG\\_MegidoDomínguezL.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/131526/TG_MegidoDomínguezL.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
13. Sako Y, Nkouawa A, Yanagida T, Ito A. Loop-mediated isothermal amplification method for a differential identification of human taenia tapeworms. *Methods Mol Biol.* 2013;1039:109–20.
  14. Patricia Garrido. Técnica De Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle o Lamp. Ventajas En El Diagnóstico Sanitario. Ecuador es Calidad-Rev Científica Ecuatoriana. 2016;3(1):11–4.
  15. ESPAC. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2019 [Internet]. 2020 may [citado el 15 de septiembre de 2020]. Disponible en: [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac-2019/Presentacion de los principales resultados ESPAC 2019.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2019/Presentacion_de_los_principales_resultados_ESPAC_2019.pdf)
  16. 3tres3. FAO: revisión del mercado mundial de carne en 2019 [Internet]. 2019 [citado el 21 de octubre de 2020]. Disponible en: [https://www.3tres3.com/ultima-hora/fao-revision-del-mercado-mundial-de-carne-en-2019\\_44265/](https://www.3tres3.com/ultima-hora/fao-revision-del-mercado-mundial-de-carne-en-2019_44265/)
  17. Okamoto M, Nakao M, Blair D, Anantaphruti MT, Waikagul J, Ito A. Evidence of hybridization between *Taenia saginata* and *Taenia asiatica*. *Parasitol Int.* marzo de 2010;59(1):70–4.
  18. Cordero del Campillo M. Parasitología veterinaria. McGraw-Hill, Interamericana de España; 2001.
  19. Suja MS, Mahadevan A, Madhusudana SN, Vijayasarathy SK, Shankar SK. Cerebral cysticercosis mimicking rabies in a dog. Vol. 153, *Veterinary Record.* British Veterinary Association; 2003. p. 304–5.
  20. Rodríguez-Hidalgo R. The taeniasis-cysticercosis complex in Latin America: morphology, clinical importance, diagnosis, epidemiology and control. En: *The epidemiology of Taenia spp and cysticercosis in Ecuador.* Primera. Quito; 2007. p. 14–24.
  21. Flisser A, Gyorkos TW. Contribution of immunodiagnostic tests to epidemiological/intervention studies of cysticercosis/taeniosis in México. Vol. 29, *Parasite Immunology.* 2007. p. 637–49.
  22. Larralde C, Aluja AS de. Cisticercosis : guía para profesionales de la salud. Secretaría de Salud; 2006.



23. León N, Padilla C, Pajuelo M, Sheen P, Zimic M. Cisteínoproteasas catepsinas L de *Taenia solium*: rol biológico en la infección y potencial uso para el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014;30(3).
24. Meza A, Aguilar F. Teniasis humana. *Rev Mex Patol Clin*. 2002;49(2):92–9.
25. De Aluja AS, Suárez-Marín R, Sciutto-Conde E, Morales-Soto J, Martínez-Maya JJ, Villalobos N. Evaluación del impacto de un programa de control de la teniasis-cisticercosis (*Taenia solium*). *Salud Publica Mex*. 2014;56(3):259–65.
26. Frontera Carrion EM, Perez Martin JE, Alcaide Alonso M, Reina D. Patología parasitaria porcina en imagenes. *Servet*; 2009.
27. Garcia HH, Gonzalez AE, Rodriguez S, Gonzalvez G, Llanos-Zavalaga fernando, Tsang VC, et al. Epidemiology and Control of Cysticercosis in Peru. Vol. 27, *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2010.
28. Sciutto E, Fragoso G, Hernández M, Rosas G, Martínez JJ, Fleury A, et al. Development of the S3Pvac Vaccine Against Porcine *Taenia solium* Cysticercosis: A Historical Review. *JSTOR* [Internet]. el 1 de agosto de 2013 [citado el 8 de septiembre de 2021];99(4):686–92. Disponible en: <https://bioone.org/journals/journal-of-parasitology/volume-99/issue-4/GE-3102.1/Development-of-the-S3Pvac-Vaccine-Against-Porcine-Taenia-solium-Cysticercosis/10.1645/GE-3102.1.full>
29. Sarti E. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. Vol. 39, *Salud Publica de Mexico*. Instituto Nacional de Salud Publica; 1997. p. 225–31.
30. WHO. *Taenia solium* Taeniasis/Cysticercosis diagnostic tools report of a Stakeholder Meeting [Internet]. 2015 dic [citado el 11 de junio de 2020]. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/206543/9789241510516\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/206543/9789241510516_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
31. Martinez N. Caracterización de Marcadores Moleculares para la Detección de Ténidos de Interés Humano y Veterinario [Internet]. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 2008 [citado el 8 de abril de 2020]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/8210/1/T30583.pdf>
32. Almeida CR, Ojopi EP, Nunes CM, Machado LR, Takayanagui OM, Livramento JA, et al. *Taenia solium* DNA is present in the cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients and can be used for diagnosis. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. agosto de 2006;256(5):307–10.
33. Erazo CRME. Analisis espacio temporal de la frecuencia de NCC y epilepsia en Ecuador mediante el estudio de bases de Datos de morbimortalidad en la



- última década. [Internet]. Universidad de las Americas; 2017. Disponible en: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/8125/1/UDLA-EC-TMVZ-2017-33.pdf>
34. Amanda V, Rosas U. Human Cysticercosis in Ecuador. Rev Kill Salud y Bienestar [Internet]. 2018 [citado el 19 de diciembre de 2019];2(2):35–42. Disponible en: [https://doi.org/10.26871/killkana\\_salud.v2i2.269](https://doi.org/10.26871/killkana_salud.v2i2.269)
  35. Brutto O, Arroyo G, Gonzales A, Zambrano M, Garcia H. Estudio Poblacional de prevalencia de cisticercosis porcina en Atahualpa, Ecuador. Metodología y Definiciones Operacionales. 2017;17–22.
  36. Alhambra C, Paz Miño C, Genética Jaime Guevara Aguirre M, de reproducción diabetólogo Eduardo Arízaga B, Neurólogo Marcelo Cruz Utreras M, Oswaldo Báez Tobar N, et al. La lucha contra la cisticercosis cerebral: un capítulo importante de la historia de la medicina del Ecuador. en: historia de las ciencias en Ecuador [Internet]. Quito; 2015 [citado el 19 de diciembre de 2019]. p. 79–85. Disponible en: [www.academianacionaldehistoria.org.ec](http://www.academianacionaldehistoria.org.ec)
  37. Coral-Almeida M, Henriquez-Trujillo AR, Asanza S, Erazo C, Paucar M, Calvopiña M. Assessing the burden and spatial distribution of *Taenia solium* human neurocysticercosis in Ecuador (2013–2017). PLoS Negl Trop Dis [Internet]. el 1 de junio de 2020 [citado el 31 de agosto de 2021];14(6):e0008384. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0008384>
  38. Zhunio MI. Índice de prevalencia de cisticercosis en cerdos faenados en el camal municipal del cantón pasaje provincia de El Oro [Internet]. [Machala]: Universidad Técnica de Machala; 2015 [citado el 26 de mayo de 2020]. Disponible en: [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1549/7/CD552\\_TESIS.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1549/7/CD552_TESIS.pdf)
  39. Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C. Isothermal amplification of nucleic acids. Vol. 115, Chemical Reviews. American Chemical Society; 2015. p. 12491–545.
  40. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. Vol. 15, Journal of Infection and Chemotherapy. Springer Japan; 2009. p. 62–9.
  41. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes. 2002;16(3):223–9.
  42. Parida MM, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PVL, Morita K. Loop mediated



- isothermal amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. Vol. 18, Reviews in Medical Virology. 2008. p. 407–21.
43. Carpio A, Placencia M, Santillán F, Escobar A. A proposal for classification of neurocysticercosis. *Can J Neurol Sci / J Can des Sci Neurol*. 1994;21(1):43–7.
  44. Sigüencia LE. Detección y genotipiación molecular del virus de papiloma bovino en lesiones de animales afectados por papilomatosis cutánea [Internet]. [Cuenca]: Universidad de Cuenca; 2017 [citado el 5 de marzo de 2020]. Disponible en: [http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/28127/1/tesis\\_Lennin\\_Enrique\\_Siguencia.pdf](http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/28127/1/tesis_Lennin_Enrique_Siguencia.pdf)
  45. Cho AR, Dong HJ, Cho S. Meat species identification using loop-mediated isothermal amplification assay targeting species-specific mitochondrial DNA. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 2014;34(6):799–807.
  46. Abril ME, Sigüenza NM. Evaluación de la aplicación de dos ensayos moleculares (PCR y LAMP) para la identificación de material genético de *Neospora caninum* en sangre de *Canis lupus familiaris* (perro) [Internet]. [Cuenca]: Universidad de Cuenca; 2019 [citado el 5 de marzo de 2020]. Disponible en: [http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/31739/1/Trabajo\\_de\\_titulación.pdf](http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/31739/1/Trabajo_de_titulación.pdf)
  47. Palomino J. Prevalencia de cisticercosis porcina por inspección en el camal municipal del cantón Huaquilla provincia de El Oro [Internet]. Universidad Técnica de Machala; 2014. Disponible en: [http://186.3.32.121/bitstream/48000/1471/7/CD535\\_TESIS.pdf](http://186.3.32.121/bitstream/48000/1471/7/CD535_TESIS.pdf)
  48. Rodríguez-Hidalgo R, Geysen D, Benitez-Ortiz W, Dorny P, Saa L, Brandt J. Improved PCR-RFLP assay for the detection and differentiation between *Taenia solium* and *Taenia saginata* in faecal samples. *Res Gate* [Internet]. 2015;(June):18. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/278966245\\_Improved\\_PCR-RFLP\\_assay\\_for\\_the\\_detection\\_and\\_differentiation\\_between\\_Taenia\\_solium\\_and\\_Taenia\\_saginata\\_in\\_faecal\\_samples](https://www.researchgate.net/publication/278966245_Improved_PCR-RFLP_assay_for_the_detection_and_differentiation_between_Taenia_solium_and_Taenia_saginata_in_faecal_samples)
  49. Coral Almeida M. Epidemiological transmission patterns of *Taenia solium* cysticercosis in endemic areas: The case of Ecuador [Internet]. Univeriteit Ghent; 2015. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Epidemiological-transmission-patterns-of-Taenia-in-Almeida/b65a5c4a4fd225ba75291890655d518e9e747b3a>



50. Pizarro R. Determinación de seroprevalencia de cisticercosis humana en la parroquia Santa Terisita del cantón Espindola provincia de Loja [Internet]. [Loja]: Universidad Técnica Particular de Loja; 2014 [citado el 13 de junio de 2021]. Disponible en: [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/10738/1/Pizarro Vuela Rosa Victoria.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/10738/1/Pizarro%20Vuela%20Rosa%20Victoria.pdf)
51. Caraguay D, Maza M. Determinación de Prevalencia de Teniosis y Cisticercosis (*Taenia* spp) en las parroquias Amaluza y Bellavista del Cantón Espindola Provincia de Loja [Internet]. Universidad Técnica Particular de Loja; 2012. Disponible en: [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/2856/3/Caraguay Cuenca Diana Noemí.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/2856/3/Caraguay%20Cuenca%20Diana%20Noem%C3%AD.pdf)
52. Pinta KV. Identificación de *Taenia* spp mediante el análisis coproparasitario y Elisa en los habitantes del barrio San Vicente del Río de la parroquia Lourdes del cantón Paltas. [Internet]. [Loja]: Universidad Nacional de Loja; 2013 [citado el 15 de julio de 2021]. Disponible en: [https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17808/1/identificación de taenia spp mediante el análisis coproparasitario y elisa en los habitantes del barrio san vicente del río de la parroquia lourdes del cantón paltas.pdf](https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17808/1/identificaci%C3%B3n%20de%20taenia%20spp%20mediante%20el%20an%C3%A1lisis%20coproparasitario%20y%20elisa%20en%20los%20habitantes%20del%20barrio%20san%20vicente%20del%20r%C3%ADo%20de%20la%20parroquia%20lourdes%20del%20cant%C3%B3n%20paltas.pdf)
53. Eom KS, Rim HJ, Jeon HK. *Taenia asiatica*: Historical overview of taeniasis and cysticercosis with molecular characterization. En: Advances in Parasitology. Academic Press; 2020. p. 133–73.
54. Torres F, Burgos A, Vasco L. Hidatidosis porcina en el matadero municipal de Puyo. Ecuador es Calidad [Internet]. el 4 de septiembre de 2018 [citado el 15 de julio de 2021];5(1). Disponible en: <https://revistaecuadorestcalidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorestcalidad/index.php/revista/article/view/36>
55. Ito A, Yanagida T, Nakao M. Recent advances and perspectives in molecular epidemiology of *Taenia solium* cysticercosis. Infect Genet Evol [Internet]. el 1 de junio de 2016 [citado el 20 de julio de 2021];40:357–67. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26112071/>
56. Martínez Villalobos A. Caracterización de marcadores moleculares para la detección de ténidos de interés humano y veterinario [Internet]. Universidad Complutense de Madrid. Universidad Complutense de Madrid; 2008. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/8210/1/T30583.pdf>
57. Flisser A, Correa D, Evans C. *Taenia Solium* Cysticercosis: from basic to clinical science - [Internet]. Primera. Snigh G, Prabhakar S, editores. Vol. 1. Punjab: CABI; 2002 [citado el 17 de junio de 2021]. 15–35 p. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=ICAd10-uTtQC&pg=PA1&hl=es&source=gbs\\_toc\\_r&cad=3#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=ICAd10-uTtQC&pg=PA1&hl=es&source=gbs_toc_r&cad=3#v=onepage&q&f=false)



58. Burbano Rosero EM, Caetano de Almeida B, Otero Ramírez ID, Álvarez SL. Manual de biología molecular. Nariño: Universidad de Nariño; 2017. 85 p.
59. Barazesh A, Sarkari B, Ebrahimi S, Hami M. DNA extraction from hydatid cyst protoscolices: Comparison of five different methods. Vet World. febrero de 2018;11:231–4.
60. Muhaidi MJ, Al BN, Hasani HH, Dagash MT. DNA extraction by different methods from hydatid cyst from Iraqi's patients. J Pharm Sci Res. diciembre de 2018;10(12):3384–7.
61. Almeida CR, Ojopi EP, Nunes CM, Machado LR, Takayanagui OM, Livramento JA, et al. *Taenia solium* DNA is present in the cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients and can be used for diagnosis. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 2006;256(5):307–10.
62. Nkouawa A, Sako Y, Li T, Chen X, Nakao M, Yanagida T, et al. A loop-mediated isothermal amplification method for a differential identification of *Taenia* tapeworms from human: Application to a field survey. Parasitol Int. el 1 de diciembre de 2012;61(4):723–5.
63. Nkouawa A, Sako Y, Okamoto M, Ito A. Simple identification of human taenia species by multiplex loop-mediated isothermal amplification in combination with dot enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg. el 1 de junio de 2016;94(6):1318–23.
64. Stephenson FH. Polymerase Chain Reaction (PCR). En: Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory. Segunda. Barcelona: Elsevier; 2012. p. 165–209.
65. Hardinge P, Murray JAH. Reduced False Positives and Improved Reporting of Loop-Mediated Isothermal Amplification using Quenched Fluorescent Primers. Sci Rep. el 1 de diciembre de 2019;9(1).
66. Waema MW, Misinzo G, Kagira JM, Agola EL, Ngowi HA. DNA-Detection Based Diagnostics for *Taenia solium* Cysticercosis in Porcine. Vol. 2020, Journal of Parasitology Research. 2020.
67. Ito A, Li T, Wandra T, Dekumyoy P, Yanagida T, Okamoto M, et al. Taeniasis and cysticercosis in Asia: A review with emphasis on molecular approaches and local lifestyles. Vol. 198, Acta Tropica. Elsevier B.V.; 2019.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Datos de ubicación geográfica, ubicación en tejido, viabilidad del quiste y resultados a los ensayos LAMP de las muestras colectadas

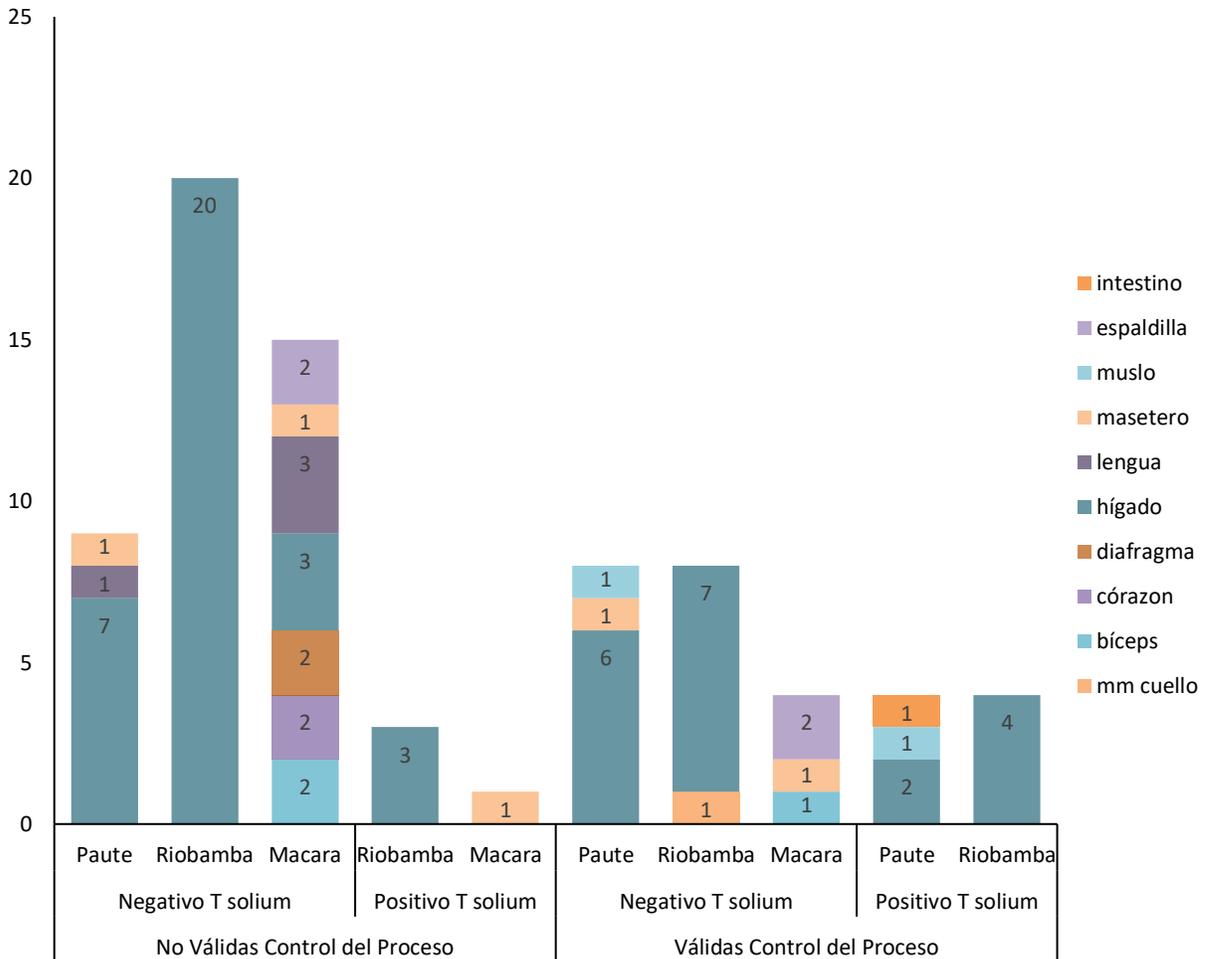
Nro tubo eppendorf	Código animal	Ubicación geográfica	Ubicación tejido	Viabilidad Quiste	Grado de infestación*	LAMP Sus scrofa	LAMP T solium	LAMP T asiatica
1	CM01	Macara, Loja	bíceps	inactivos	masivo	Positivo	Negativo	Negativo
2			espaldilla	inactivos	masivo	Positivo	Negativo	Negativo
3			espaldilla	inactivos	masivo	Positivo	Negativo	Negativo
4			córazon	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
5			lengua	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
6			diafragma	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
7			bíceps	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
8			bíceps	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
9			hígado	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
10			diafragma	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
11			hígado	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
12			lengua	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
13			masetero	inactivos	masivo	Positivo	Negativo	Negativo
14			lengua	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
15	CM02	Macara, Loja	masetero	inactivos	masivo	Negativo	Positivo	Negativo
16			espaldilla	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
17			córazon	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
18			masetero	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
19			espaldilla	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
20			hígado	inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
21	CR72	Riobamba, Chimborazo	mm cuello	activos	moderado	Positivo	Negativo	Negativo
22	CR34	Riobamba, Chimborazo	hígado	inactivos	bajo	Negativo	Negativo	Negativo
23	CR35			inactivos	bajo	Negativo	Negativo	Negativo
24	CR36			inactivos	bajo	Negativo	Negativo	Negativo
25	CR43	Riobamba, Chimborazo	hígado	inactivos	moderado	Negativo	Negativo	Negativo
26	CR44			inactivos	moderado	Negativo	Negativo	Negativo
27	CR45			inactivos	moderado	Negativo	Negativo	Negativo
28	CR46			inactivos	moderado	Negativo	Negativo	Negativo
29	CR50	Riobamba, Chimborazo	hígado	transicional	moderado	Negativo	Negativo	Negativo
30				activos	moderado	Positivo	Positivo	Negativo
31				transicional	moderado	Positivo	Negativo	Negativo
32				transicional	moderado	Negativo	Positivo	Negativo
33				activos	moderado	Positivo	Negativo	Negativo
34				activos	moderado	Negativo	Negativo	Negativo
35				activos	moderado	Negativo	Negativo	Negativo
36	CR64	Riobamba, Chimborazo	hígado	inactivos	moderado	Negativo	Negativo	Negativo
37	CR65			inactivos	moderado	Negativo	Negativo	Negativo
38	CR66			inactivos	moderado	Negativo	Negativo	Negativo
39	CR67			inactivos	moderado	Negativo	Negativo	Negativo
40	CR68			inactivos	moderado	Positivo	Negativo	Negativo
41	CR73	Riobamba, Chimborazo	hígado	inactivos	bajo	Positivo	Negativo	Negativo
42	CR74			inactivos	bajo	Negativo	Negativo	Negativo
43	CR75			inactivos	bajo	Positivo	Negativo	Negativo



44	CR76			inactivos	bajo	MUESTRA INVALIDA		
45	CR77			inactivos	bajo	MUESTRA INVALIDA		
46	CR78			inactivos	bajo	MUESTRA INVALIDA		
47	CR79			inactivos	bajo	Negativo	Positivo	Negativo
48	CR80			inactivos	bajo	Negativo	Negativo	Negativo
49	CP36	Paute, Azuay	masetero	transicional	bajo	Negativo	Negativo	Negativo
50				transicional	bajo	Positivo	Negativo	Negativo
51	CP35	Paute, Azuay	muslo	activos	bajo	Positivo	Positivo	Negativo
52				activos	bajo	Positivo	Negativo	Negativo
53	CP02	Paute, Azuay	intestino	activos	leve	Positivo	Positivo	Negativo
54	CR118	Riobamba, Chimborazo	hígado	activos	grave	Negativo	Negativo	Negativo
55				activos	grave	Positivo	Positivo	Negativo
56				activos	grave	Positivo	Positivo	Negativo
57	CP27	Paute, Azuay	hígado	transicional	masivo	Positivo	Positivo	Negativo
58				activos	masivo	Positivo	Negativo	Negativo
59				activos	masivo	Positivo	Positivo	Negativo
60				transicional	masivo	Positivo	Negativo	Negativo
61	CP22	Paute, Azuay	hígado	inactivos	masivo	Positivo	Negativo	Negativo
62				inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
63				inactivos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
64	CP33	Paute, Azuay	hígado	inactivos	bajo	Positivo	Negativo	Negativo
65	CR119	Riobamba, Chimborazo	hígado	inactivos	bajo	Negativo	Negativo	Negativo
66				inactivos	bajo	Negativo	Negativo	Negativo
67	CR120	Riobamba, Chimborazo	hígado	activos	masivo	Positivo	Negativo	Negativo
68				activos	masivo	Positivo	Negativo	Negativo
69	CP28	Paute, Azuay	hígado	inactivos	bajo	Negativo	Negativo	Negativo
70	CP26	Paute, Azuay	hígado	activos	bajo	Negativo	Negativo	Negativo
71	CP25	Paute, Azuay	hígado	activos	bajo	Positivo	Negativo	Negativo
72				activos	bajo	Negativo	Negativo	Negativo
73	CP23	Paute, Azuay	hígado	transicional	bajo	Positivo	Negativo	Negativo
74				transicional	bajo	Negativo	Negativo	Negativo
75				transicional	bajo	Negativo	Negativo	Negativo
76				transicional	bajo	MUESTRA INVALIDA		
77	CR123	Riobamba, Chimborazo	hígado	activos	masivo	Negativo	Negativo	Negativo
78	CR124			activos	masivo	Positivo	Positivo	Negativo
79	CR125			transicional	masivo	Negativo	Positivo	Negativo
80	CP29	Paute, Azuay	lengua	inactivos	leve	Negativo	Negativo	Negativo
81	CP06	Paute, Azuay	lengua	inactivos	leve	MUESTRA PERDIDA		
82	CP07	Paute, Azuay	pericardio	activos	bajo	MUESTRA PERDIDA		
83	CP13	Paute, Azuay	lengua	activos	bajo	MUESTRA PERDIDA		
84	CP30	Paute, Azuay	corazón	transicional	leve	MUESTRA PERDIDA		

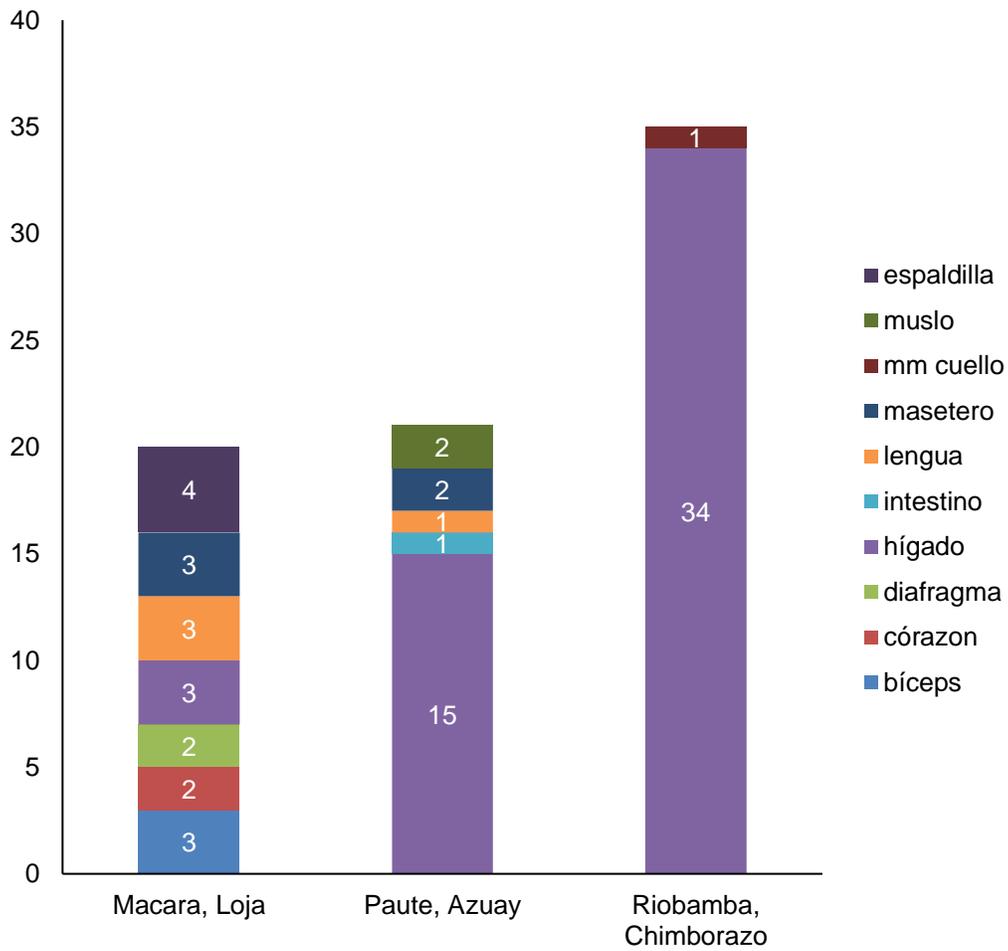
\*Grado de infestación. Infestación leve: 1 a 5 quistes. Infestación baja: 6 a 10 quistes. Infestación moderada: 11 a 15. Infestación masiva: > 20 quistes

**Anexo 2.** Cantidad de quistes colectados en el tejido de los cerdos de acuerdo a su ubicación geográfica y su relación con los ensayos LAMP para *T. solium* y el control del proceso

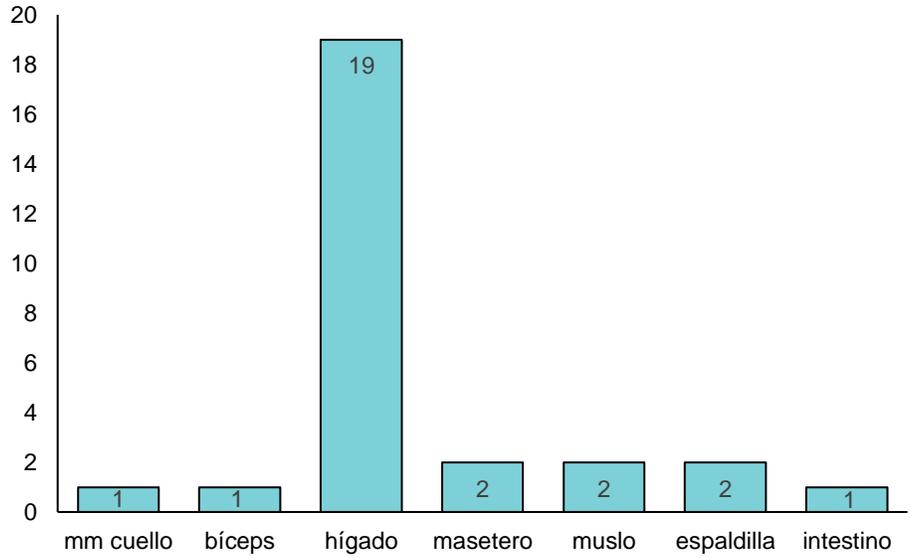




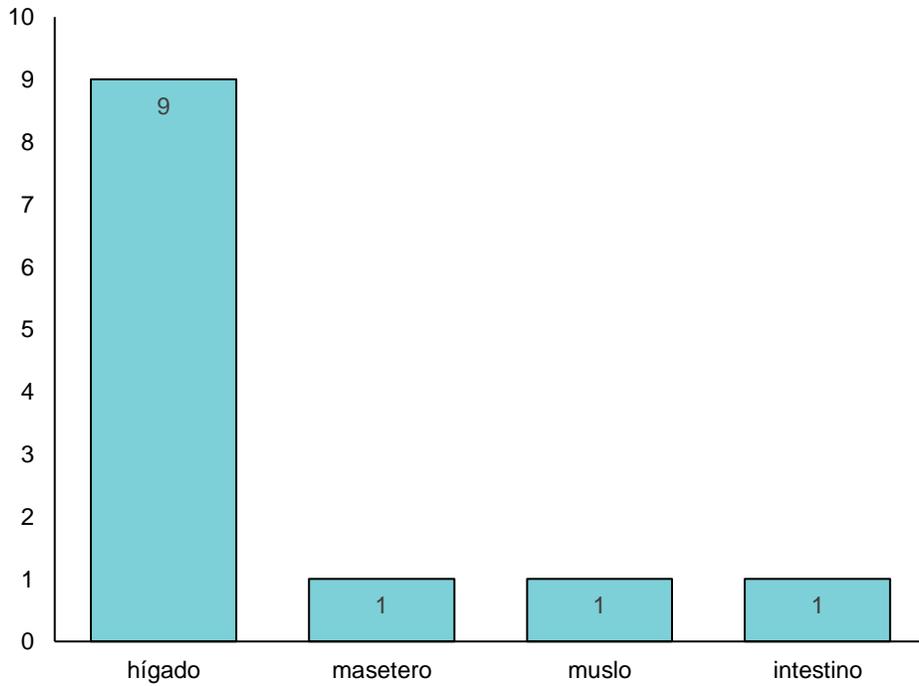
**Anexo 3.** Cantidad de muestras colectadas de acuerdo a su ubicación geográfica y ubicación en tejido



**Anexo 4.** Muestras positivas/válidas al ensayo LAMP del control del proceso (*Sus scrofa spp domestica*) de acuerdo a la ubicación de los quistes en el tejido de los cerdos



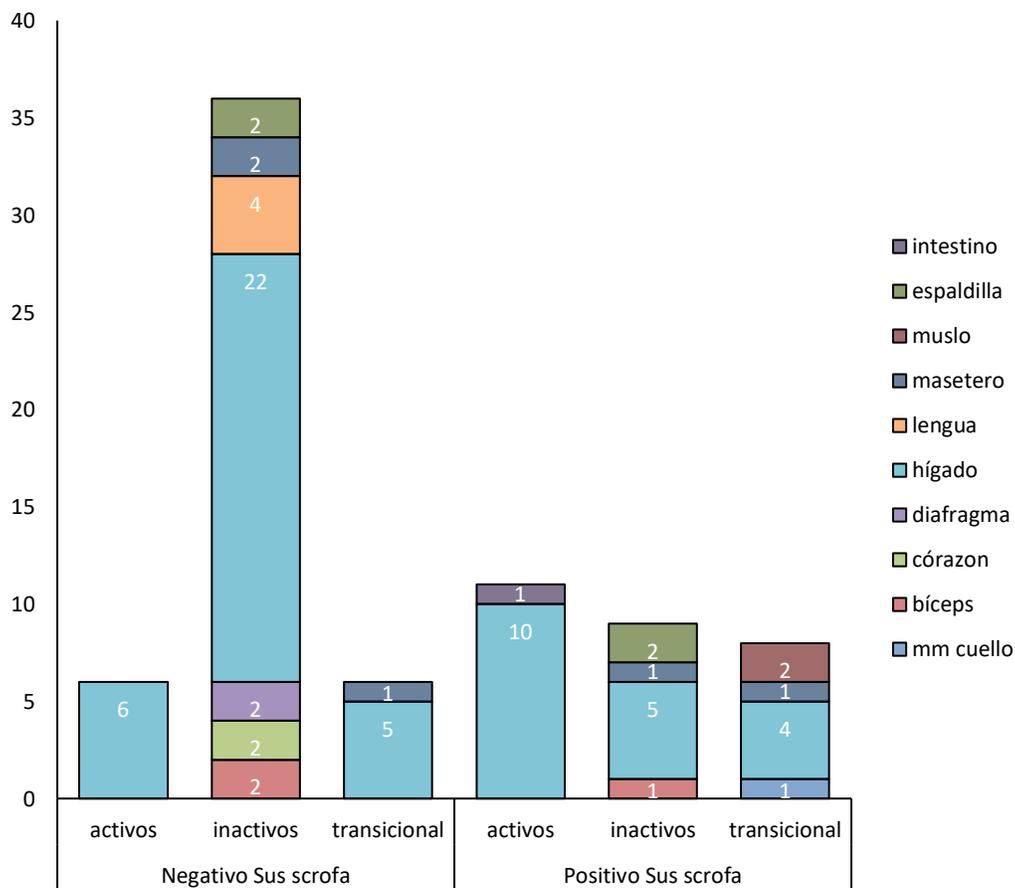
**Anexo 5.** Muestras positivas al ensayo LAMP para *Taenia solium* de acuerdo a la ubicación de los quistes en tejido



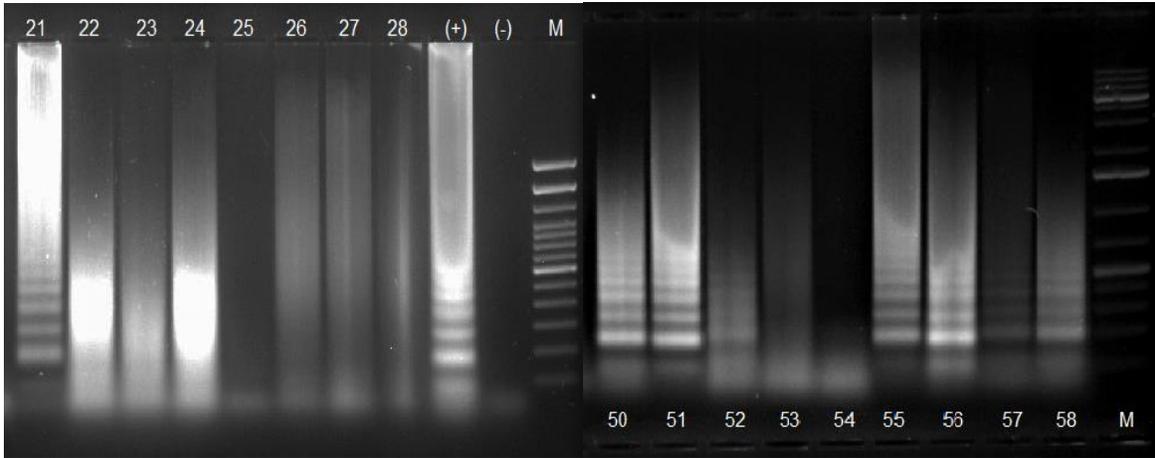
**Anexo 6. Porcentaje de viabilidad de los quistes colectados y su relación con los ensayos LAMP para el control del proceso (*Sus scrofa* spp *domestica*) y LAMP para *Taenia solium***

	Activos	Inactivos	Transicional	Total general
<b>Negativo <i>Sus scrofa</i></b>	<b>7,89%</b>	<b>47,37%</b>	<b>7,89%</b>	<b>63,16%</b>
Negativo <i>T solium</i>	7,89%	44,74%	5,26%	57,89%
Positivo <i>T solium</i>	0,00%	2,63%	2,63%	5,26%
<b>Positivo <i>Sus scrofa</i></b>	<b>14,47%</b>	<b>11,84%</b>	<b>10,53%</b>	<b>36,84%</b>
Negativo <i>T solium</i>	6,58%	11,84%	7,89%	26,32%
Positivo <i>T solium</i>	7,89%	0,00%	2,63%	10,53%
<b>Total general</b>	<b>22,37%</b>	<b>59,21%</b>	<b>18,42%</b>	<b>100,00%</b>

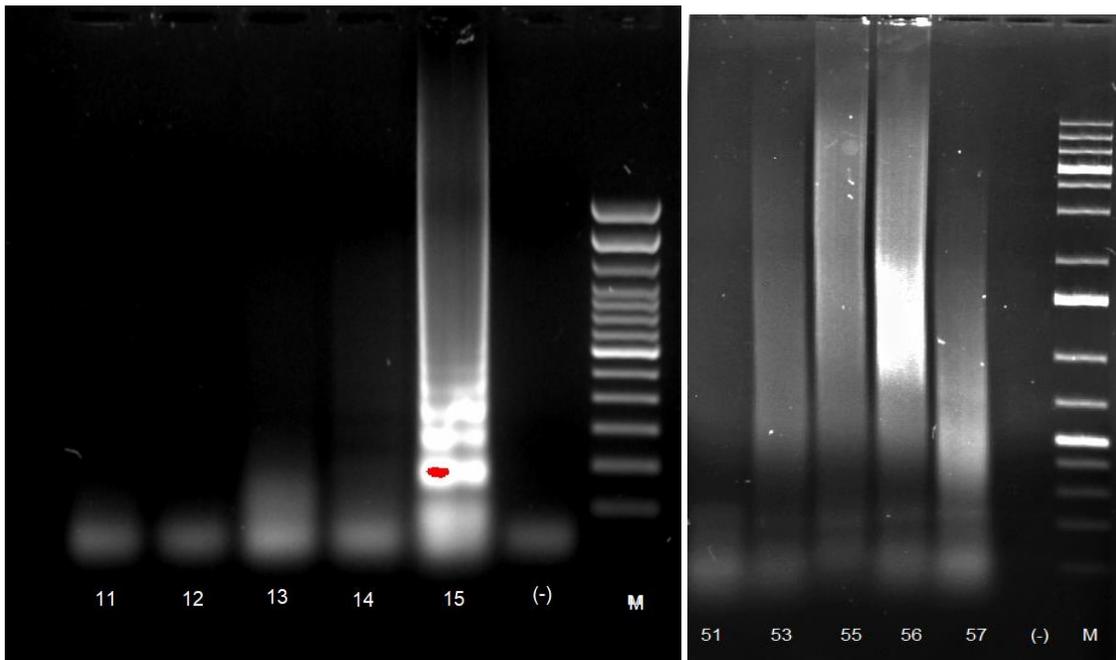
**Anexo 7. Viabilidad de las muestras colectadas con respecto a la ubicación en el tejido de los cerdos y su relación con el ensayo LAMP para el control del proceso**



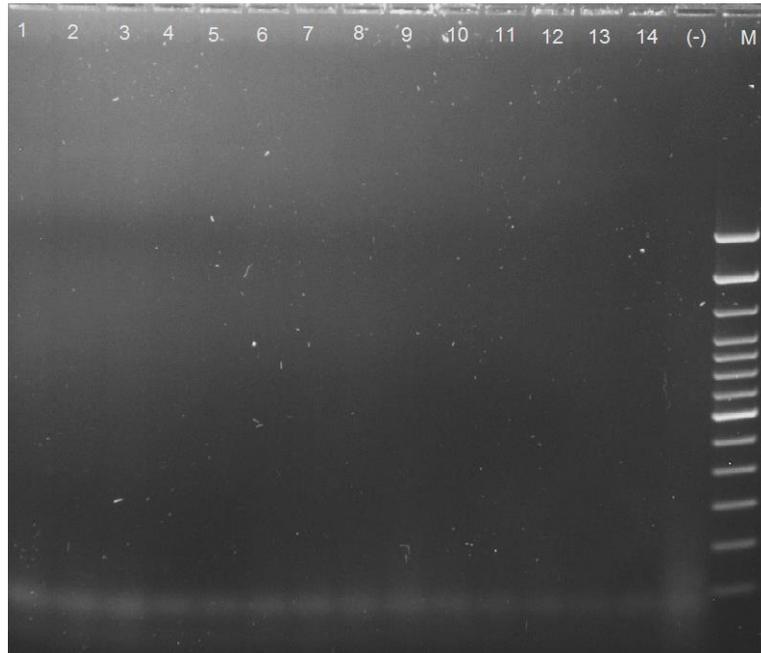
**Anexo 8.** Detección en gel de agarosa de los productos LAMP para el ensayo *Sus scrofa spp domestica* (control del proceso). Control positivo “(+)”, control negativo “(-)”, marcador de peso molecular “M”



**Anexo 9.** Detección en gel de agarosa de los productos LAMP para el ensayo *Taenia solium*. Control positivo “(+)”, control negativo “(-)”, marcador de peso molecular “M”



**Anexo 10. Detección en gel de agarosa de los productos LAMP para el ensayo *Taenia asiática*. control negativo “(-)”, marcador de peso molecular “M”**



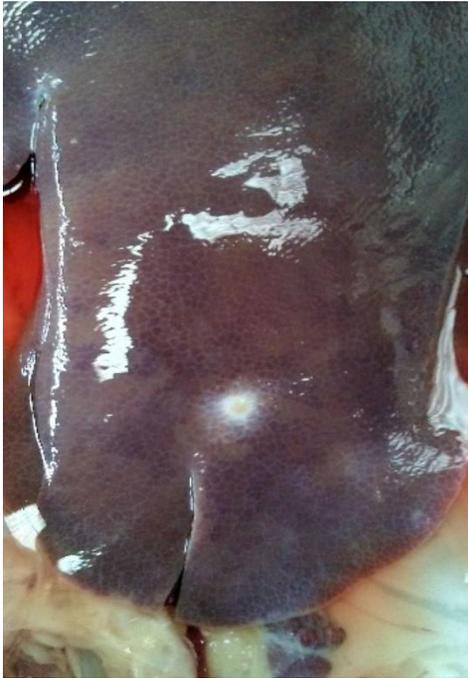
**Anexo 11. Inspección de animales en el camal de Paute**



**Anexo 12. Inspección de animales en el camal de Macara**



**Anexo 13.** *Colecta de muestras procedentes de tejido hepático*



**Anexo 14.** *Inspección y colecta de muestra de lengua*



**Anexo 15.** *Inspección y colecta de muestras de masetero*



**Anexo 16.** *Inspección y colecta de muestras de espaldilla*



**Anexo 17.** Extracción de botón de ADN de las muestras colectadas



**Anexo 19.** Medición del buffer de carga ADN 6X para la colocación en la reacción LAMP



**Anexo 20.** Cantidad de mezcla a utilizar para la reacción LAMP Sus scrofa

**Anexo 18.** Preparación de Gel de agarosa al 1,6%

