

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Diseño, desarrollo y estandarización de un protocolo de PCR múltiplex con microsatélites (STRs), para la caracterización molecular de *Ascaris* spp. en parásitos adultos aislados de cerdos.

Proyecto de investigación

Francisco David Yanqui-Rivera

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 08 de diciembre de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Diseño, desarrollo y estandarización de un protocolo de PCR múltiplex con microsatélites (STRs), para la caracterización molecular de *Ascaris* spp. en parásitos adultos aislados de cerdos.

Francisco David Yanqui-Rivera

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata Mena, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 08 de diciembre de 2017

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Francisco David Yanqui Rivera

Código: 00103504

Cédula de Identidad: 0603448523

Lugar y fecha: Quito, 08 de diciembre de 2017

DEDICATORIA

A mis abuelos: Mamiadeli, Mamabishita, Papijuani y Papaniquito, esto es para ustedes.

A Sole y Bobby, mis compañeros de aventuras siempre.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación es el resultado de la colaboración de un sinnúmero de personas que ayudaron al desarrollo no sólo de este proyecto ahora materializado, sino también a mi crecimiento académico y personal. Muchas gracias a todos y todas que fueron parte de este proceso.

Quiero agradecer a la USFQ por las tantas oportunidades que me ha brindado. A los profesores que contribuyeron en este primer paso de mi carrera científica, especialmente a: María de Lourdes Torres, Pauli Andrade, Venancio Arahana, Gabriel Trueba y Miguel Méndez. Asimismo, agradezco muy especialmente a mi tutora, Sonia Zapata, por todas sus enseñanzas y sobre todo la paciencia durante todo el proceso. A Germán Burgos por todos sus conocimientos y por inculcar en mí el gusto por la biología forense. A los miembros de mi comité por su valioso tiempo y recomendaciones. A César Paz-y-Miño por su buena disposición para el desarrollo del proyecto. Muchas gracias por el apoyo brindado al Instituto de Microbiología USFQ, el Instituto de Investigaciones de la Universidad de las Américas y a COCSA - Escuela de Veterinaria USFQ. Un agradecimiento especial a Finn y Jake, y a mis amigos biotecnólogos USFQ/UDLA.

Finalmente quisiera agradecer a mi familia, quienes son los mayores auspiciantes de mi carrera científica. Gracias Sole esto no lo hubiera acabado sin ti.

RESUMEN

Según la organización mundial de la salud, las infecciones intestinales causadas por parásitos son consideradas un problema de salud pública. Las helmintiasis causadas por *Ascaris* spp. y *Trichuris trichiura* tienen la mayor prevalencia en el mundo. Se estima que *Ascaris lumbricoides* afecta alrededor del 14.6% de la población del planeta (1221 millones de infecciones en humanos cada año). En Ecuador existen pocos estudios sobre la incidencia de *Ascaris lumbricoides*, se conoce que esta parasitosis intestinal afecta especialmente a la población infantil de niveles socioeconómicos bajos quienes pueden desencadenar problemas intestinales y respiratorios graves. Recientemente, se ha propuesto que *Ascaris lumbricoides* y *Ascaris suum* podrían ser una misma especie. Por ende, la exposición descuidada y prolongada de humanos en zonas de cría intensiva porcina, podría ser fundamental para la persistencia de éstos parásitos implicando la ocurrencia de una enfermedad zoonótica desatendida. Con el fin de estudiar la variabilidad genética del parásito en Ecuador y tener una idea más clara de su relación con el ser humano; el presente trabajo describe el desarrollo y estandarización de un método de identificación, basada en la PCR Multiplex para 14 regiones de microsatélites de *Ascaris* spp. en parásitos adultos aislados de cerdos. Se recolectaron parásitos adultos en cerdos, la extracción de ADN se realizó por el método de Fenol-cloroformo, se estandarizaron las condiciones para 2 reacciones de PCR multiplex (7 loci c/u), y se resolvieron por electroforesis capilar. El tamaño de amplificado en cada locus fue validado por secuenciación Sanger. Además, se propone la designación alélica en alelos homocigotos y la reestructuración de unidades de repetición en regiones de microsatélites para *Ascaris* spp. Finalmente, este trabajo representa un estudio piloto para el estudio de *Ascaris* spp. provenientes de animales, con fines de identificación molecular y de análisis de genética poblacional; con miras a entender el potencial de transmisión zoonótica de este parásito en comunidades rurales del Ecuador.

Palabras clave: *Ascaris* spp. Epidemiología molecular, PCR Multiplex, Electroforesis Capilar, microsatélites (STRs), perfil genético.

ABSTRACT

Intestinal infections caused by parasites are considered a public health problem according to the World Health Organization. Helminthiases caused by *Ascaris* spp. and *Trichuris trichiura* have the highest prevalence in the world. It is estimated that *Ascaris lumbricoides* affects around 14.6% of the planet's population (1221 million infections in humans each year). In Ecuador there are few studies on the incidence of *Ascaris lumbricoides* and it is known that this intestinal parasitosis affects especially the child population of low socioeconomic levels who can trigger serious intestinal and respiratory problems. Recently, it has been proposed that *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* could be the same species. Therefore, the neglected and prolonged exposure of humans in areas of intensive swine breeding could be fundamental for the persistence of these parasites involving the occurrence of an unattended zoonotic disease. In order to study the genetic variability of the parasite in Ecuador and have a clearer idea of its relationship with humans, the present work describes the development and standardization of a method based on a multiplex PCR for 14 microsatellite regions of *Ascaris* spp. in adult parasites isolated from pigs. Adult parasites were collected from pigs, DNA extraction was performed by the phenol-chloroform method, conditions for 2 multiplex PCR reactions were standardized (7 loci each), and detected by capillary electrophoresis. The size of the amplified STR in each locus was validated by Sanger sequencing. Additionally, it is proposed an allelic designation in homozygous alleles and a more detailed analysis for repeat units in *Ascaris* spp. microsatellite regions. Finally, this work represents a pilot study for *Ascaris* spp. in molecular identification and analysis of population genetics with a view to understanding the potential of zoonotic transmission of this parasite in rural communities of Ecuador.

Keywords: *Ascaris* spp. Molecular Epidemiology, Multiplex PCR, Capillary Electrophoresis, microsatellites (STRs), genetic profile.

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Antecedentes.....	13
1.2. Características generales y patogenicidad de <i>Ascaris</i> spp.	14
1.3. Epidemiología y modo de transmisión de <i>Ascaris</i> spp.....	15
1.4. Importancia de estudios epidemiológicos en <i>Ascaris</i> spp.	16
1.5. Técnicas moleculares para la detección de microsatélites STRs.....	16
1.6. Enfoque de la genotipificación de microsatélites en una PCR multiplex para <i>Ascaris</i> spp.....	18
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo General.....	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. AREA DE ESTUDIO	20
5. MATERIALES	21
5.1. Recolección de muestras de heces de cerdos en Otón de Velez-Yaruquí	21
5.2 Exámenes coproparasitarios	21
5.3. Recolección de parásitos adultos de <i>Ascaris</i> spp.	21
5.4. Estandarización de extracción de ADN con el método Fenol-Cloroformo-alcohol Isoamílico en parásitos adultos de <i>Ascaris</i> spp.	22
5.5. Diseño in silico de dos multiplex para 14 STRs de <i>Ascaris</i> spp.	22
5.6 Desarrollo y estandarización de la multiplex PCR, secuenciación y verificación	22
6. MÉTODOS	23
6.1. Recolección de muestras de heces de cerdos en Otón de Velez-Yaruquí	24
6.2. Identificación de muestras positivas para la infección de <i>Ascaris</i> ssp. mediante exámenes coproparasitarios.....	24
6.3. Recolección de parásitos adultos de <i>Ascaris</i> spp. en cerdos infectados.....	24
6.4. Estandarización de protocolo de extracción de ADN en parásitos adultos de <i>Ascaris</i> spp.....	25
6.4.1. Disección del parásito.....	25
6.4.2. Extracción de ADN con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico	26
6.5. Diseño de dos sets de primers para <i>Ascaris</i> spp.	26
6.6 Reacciones de la PCR.....	28
6.7. Electroforesis capilar	29

6.8. Ajuste de <i>bins</i> (rangos alélicos) de 2 set de primers (2 miniplex) para la epidemiología molecular de <i>Ascaris</i> spp.	30
6.9. Verificación de la estructura y número de repetición en los diferentes microsatélites por secuenciación Sanger.....	30
7. RESULTADOS	31
7.1. Recolección de muestras de heces de cerdos en Otón de Velez-Yaruquí	31
7.2. Recolección de parásitos adultos de <i>Ascaris</i> spp. en cerdos infectados.....	32
7.3. Estandarización de extracción de ADN en parásitos adultos de <i>Ascaris</i> spp.	32
7.4. Diseño de dos sets de primers (dos miniplex) para <i>Ascaris</i> spp.....	33
7.5. Optimización de dos sets de primers (2 miniplex) para <i>Ascaris</i> spp.	33
7.6. Verificación de la estructura y número de repetición en los diferentes microsatélites por secuenciación Sanger.....	34
8. DISCUSIÓN	35
9. CONCLUSIONES	42
10. RECOMENDACIONES	43
11. BIBLIOGRAFÍA	44
12. TABLAS	51
13. FIGURAS	65
14. ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas de las muestras de heces tomadas en este estudio en Otón de Vélez-Yaruquies.....	51
Tabla 2. Resultados de los exámenes coproparasitarios para <i>Ascaris</i> spp. en muestras de heces de cerdos..	52
Tabla 3. Información de los parámetros utilizados para la selección de los primers de microsatélites de <i>Ascaris</i> spp.....	54
Tabla 4. Secuencias de 16 primers de microsatélites para <i>Ascaris</i> spp. utilizados en este estudio.....	55
Tabla 5. Rango alélicos reportados en la literatura actual.	56
Tabla 6. Concentraciones finales para cada master mix en la miniplex 1 y 2.....	57
Tabla 7.- Perfil térmico para la PCR Multiplex en <i>Ascaris</i> spp.	58
Tabla 8. Secuencias de primers de STRs modificadas para secuenciación Sanger.....	58
Tabla 9. Descripción de alelos observados por secuenciación Sanger en productos de la PCR en microsatélites (designación alélica, estructura y tipo de repetición)	59
Tabla 10. Descripción de mutaciones puntuales en alelos observados de loci amplificados en microsatélites de <i>Ascaris</i> spp.....	61
Tabla 11. Número de alelos efectivos y diferentes valores de heterocigocidad de los loci analizados.	63
Tabla 12. Frecuencias alélicas por cada locus analizados en las población de cerdo.....	63
Tabla 13. Posiciones de alelos en cada locus de los 14 marcadores STRs.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la comunidad Otón de Vélez- Yaruquíes con los muestreados.....	66
Figura 2. Micrografía de luz de huevos de <i>Ascaris</i> spp. para resultados identificados como positivos en coproparasitarios	67
Figura 3. Mapa de diseño para 2 reacciones multiplex PCR.....	68
Figura 4. Perfiles alélicos de amplificaciones individuales de cada locus para la miniplex1 con diferentes muestras de ADN en electroforesis capilar.....	69
Figura 5. Perfiles alélicos de amplificaciones individuales de cada locus para la miniplex 2 con diferentes muestras de ADN en electroforesis capilar.....	70
Figura 6. Amplificación de perfiles alélicos individuales de cada locus de la miniplex1 y 2 con diferentes muestras de ADN revelados en gel de agarosa.....	71
FIGURA 7. Distribución de transiciones y transversiones entre mutaciones puntuales de las regiones amplificadas de los microsatélites.	71

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXOS 1. Habitat de cerdos criollos en Otón de Vélez- Yaruquí	72
ANEXOS 2. Área de faenamiento de vísceras en la Empresa Pública Metropolitano de Rastros Quito (CamalSur-Quito).	73

1. INTRODUCCIÓN

Los nematodos constituyen uno de los grupos más grandes en el reino Metazoa con una amplia distribución prácticamente en todos los hábitats. Representan el 80% de todos los animales individuales en la Tierra y su diversidad y presencia en diferentes niveles tróficos presentan un papel importante en muchos ecosistemas (Holterman et al, 2006). Dentro del filo nematoda, en el orden Ascaridida y familia Ascaridadae se encuentra el género *Ascaris* (Linnaeus, 1758), el mismo que abarca una serie de parásitos que infectan a seres humanos y animales. La ascariasis es una infección causada por el parásito *Ascaris* spp. Aunque la mayoría de las infecciones son asintomáticas, en muchos casos las personas sufren de morbilidad crónica con la mayor carga sobre los niños de 5 a 15 años (Bethony et al., 2006)

Varios estudios epidemiológicos han analizado y comparado las similitudes y diferencias entre las especies de *Áscaris* más comunes: *Ascaris lumbricoides* y *Ascaris suum*, aislados de seres humanos y cerdos respectivamente. Se han empleado varios métodos de estudio que analizan y comparan su composición genética mediante marcadores moleculares como: marcadores regiones del ITS (Cavallero, Snabel, Pacella, Perrone & D'Amelio, 2013; Zhou, Yuann, Deng & Peng, 2012) región mitocondrial (Betson, Nejsun, Bendall, Stohard, 2014, Liu et al., 2012) y 18S rRNA (Søe, Nejsun, Fredensborg & Kapel, 2015), concluyendo que existen nuevos genotipos y haplotipos compartidos entre las dos especies. Adicionalmente se han utilizado otros marcadores moleculares para estudios de epidemiología molecular como AFLP (amplified fragment length) y microsatélites (STRs) (Søe, Kapel & Nejsun, 2016), sugiriendo que deben reconocerse a las dos especies hasta que se presenten pruebas convincentes que justifiquen una reclasificación. Con el objetivo de superar las limitantes de las técnicas actuales para el estudio del nematodo, en el presente trabajo se seleccionaron los loci más variables y representativos de *Ascaris* spp. para diseñar, desarrollar y verificar un protocolo para PCR multiplex con 14 regiones de microsatélites. Este estudio permitió crear perfiles genéticos para una futura caracterización molecular de *Ascaris* spp. en parásitos adultos aislados de cerdos.

1.1 Antecedentes

Las enfermedades intestinales debido a helmintos infectan alrededor de 2 billones de personas en el mundo (Bethony et al., 2006). Los helmintos (o parásitos intestinales) más comunes son *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura* (Bethony et al., 2006). Éstos parásitos pueden sobrevivir por varios años dentro del hospedero y sus efectos en seres humanos resultan en problemas para la salud como: baja nutrición, problemas de crecimiento, inflamación de pulmones, fiebre, náuseas, entre otros (Cooper et al., 2013; Cavallero et al., 2013). Según cifras estadísticas las regiones más afectadas por este nematodo son los países en desarrollo con la mayor población de infección en niños en edad escolar (World Health Organization, 1996; Brooker & Pullan, 2013). Por otro lado, la infección por parte de estos parásitos en cerdos, resulta en pérdidas económica para los agricultores. *Ascaris* spp. presenta un factor importante en el desarrollo socioeconómico de una nación debido a las enfermedades que causa, es por esto que ha sido incluido en la lista de la Organización Mundial de Salud en las enfermedades tropicales desatendidas (Cavallero et al., 2013). La incidencia de estos parásitos se relaciona con factores como pobreza, falta de sanidad e higiene, escaso acceso o distribución inapropiada de agua, entre otras. Las infecciones con *Ascaris* spp. derivan en problemas de la salud para los seres humanos y para los animales (Cooper et al., 2013). El origen hospedero de *Ascaris* spp. todavía no está bien entendido y en la literatura separa a las especies provenientes de cerdos y humanos considerándolos como dos especies diferentes: *Ascaris suum* y *Ascaris lumbricoides* respectivamente.

Sin embargo, la infección cruzada entre humanos y cerdos es posible por lo que investigadores conjuntamente con resultados de otros experimentos han argumentado que podrían ser la misma especie o una combinación híbrida (Leles et al., 2012; Alves, Conceição, Leles, 2016; Betson, Stothard, 2016). Adicionalmente, se ha encontrado evidencia de mayor incidencia de infecciones de *Ascaris* spp. en zonas con alta densidad de animales domésticos viviendo alrededor de hogares (Sackey, 2001; Menzies, 2014, Betson, Nejsun, Bendall, Stothard, 2014), sugiriendo así su potencial de transmisión zoonótico.

Diferentes estudios se han realizado para analizar la epidemiología del parásito *Ascaris* spp. y de esta manera determinar cómo existe esta transmisión entre animales y personas o cómo los animales pueden ser una

posible fuente de transmisión zoonótica. Son necesarios protocolos no invasivos de caracterización de especímenes para una mejor comprensión de la genética de la enfermedad parasítica y la dinámica de transmisión de esta helmintiasis. Además, se necesita establecer cómo se está transmitiendo este parásito entre humanos y cerdos con el objetivo de determinar si las poblaciones de *Ascaris* spp. que se están transmitiendo son iguales o diferentes entre los seres y humanos y cerdos. Esto ayudará a responder la pregunta de qué rol cumplen los cerdos en la transmisión del parásito o viceversa. Cabe recalcar que este estudio no pretende estandarizar un método de diagnóstico del parásito, sino de desarrollar un ensayo de comparación de poblaciones de *Ascaris* spp. de diferente hospedador.

1.2. Características generales y patogenicidad de *Ascaris* spp.

Ascaris lumbricoides y *Ascaris suum* pertenecen a la familia Ascarididae (Linnaeus, 1758). *Ascaris lumbricoides* es el gusano intestinal más grande y más común en los seres humanos. Los machos adultos tienen de 15 a 31 cm de largo por 2 a 4 mm de ancho, mientras que las hembras tienen entre 20 y 40 cm de largo por 3 a 6 mm de ancho. *Ascaris suum* es el gusano común en los cerdos. Los machos adultos y las hembras son de color amarillo-blanco o rosado-gris. Ambas especies difieren ligeramente morfológicamente. Las hembras producen hasta 200.000 huevos fertilizados o no fertilizados por día. Los huevos fertilizados son óvalos redondos, de 45 a 75 μm de largo por 35 a 50 μm de ancho y tienen una estructura áspera albuminosa en su exterior quitinoso. (StGeorgiev, 2001; Olson & Guselle, 2000; Nansen & Roepstorff, 1999). Los gusanos adultos usualmente habitan el intestino delgado, su ciclo de vida se da cuando los huevos maduros (fase infectiva lavar 2) son ingeridos por el organismo hospedador, luego éstos eclosionan en el yeyuno para posteriormente migrar hacia la faringe pasando por la pared intestinal, circulación pulmonar, entre otros y terminar siendo deglutidos para desarrollar la fase adulta en el intestino delgado.

La gravedad de la enfermedad está determinada por el nivel de infección de *Ascaris* spp. (StGeorgiev, 2001). Las manifestaciones clínicas de la ascariasis son extensas, desde síntomas abdominales (riesgo de obstrucción intestinal) hasta pulmonares. Los gusanos adultos pueden causar hinchazón y dolor abdominal, náuseas, dispepsia, cambios en el apetito y diarrea. Por otro lado, un parásito adulto puede migrar hacia el apéndice, conducto biliar o conducto pancreático, causando obstrucción e inflamación del órgano. Esto puede conducir a cólico biliar, colecistitis, colangitis aguda, pancreatitis aguda, apendicitis o absceso hepático. La migración de larvas en desarrollo a través de los pulmones puede resultar en neumonitis eosinofílica resultando en síntomas como fiebre, disnea y broncoespasmo. Finalmente, en casos raros puede ocurrir muerte debido a la obstrucción de un órgano por infección causando gangrena. Al contrario, cuando se da la infección de *Ascaris* spp. en cerdos, en la mayoría de casos se presenta una lesión hepática (Plorde, 2004; Wagenberg et al., 2010).

1.3. Epidemiología y modo de transmisión de *Ascaris* spp.

Ascaris spp. tiene distribución mundial y es más común en áreas tropicales y subtropicales del mundo. Está particularmente asociado con el hacinamiento y una sanidad deficiente. Al ser la infección más frecuente en los niños, estos tienden a mantener el ciclo de vida del parásito. La infección por *Ascaris* spp., es una de las infecciones humanas más comunes en todo el mundo (StGeorgiev, 2001; Sheorey, Biggs, & Traynor, P, 2007).

El modo primario de transmisión es a través de la vía fecal-oral (mano-a-boca) por la ingestión de huevos de suelo contaminado con heces humanas o porcinas y la ingestión de agua contaminada, alimentos o productos agrícolas, entre otras fuentes. (Olsen & Guselle, 2000; Sheorey et al., 2007; Wagenberg et al., 2010). Adicionalmente, en áreas de clima seco y ventoso, los huevos de *Ascaris* spp. pueden ser tragados o inhalados por medio de otras rutas como el aire. Las heces frescas no contienen huevos infecciosos ya que tardan hasta dos semanas en madurar antes de que puedan infectar a seres humanos. Los huevos no son inmediatamente infectivos porque deben ser incubados en el suelo bajo ciertas condiciones antes de que se conviertan en infecciosos. Los huevos son altamente resistentes a las condiciones ambientales y

pueden permanecer viables hasta 6 años en clima templado (Olsen & Guselle, 2000; Sheorey et al., 2007; Hall et al., 2008). De igual importancia, existen reportes en los que *Ascaris suum* puede transmitirse de cerdos a humanos por ingestión de alimentos y agua contaminada por huevos (Olsen & Guselle, 2000).

1.4. Importancia de estudios epidemiológicos en *Ascaris* spp.

Se han desarrollado distintos ensayos y experimentos en *Ascaris lumbricoides* y *Ascaris suum* para analizar su parentesco y posible relación debido a transmisiones zoonóticas entre hospedadores y parásitos intestinales. Se ha demostrado que el ciclo biológico de *Ascaris* spp. con proveniencia de cerdos o humanos, puede ser completado en ambos hospedadores; evidenciando la existencia de transmisión cruzada y eventos de flujo genético e hibridación entre estas dos especies. Adicionalmente, se han comprobado la existencia de genotipos de *Ascaris* comunes entre ambas especies con baja diferencia de secuencias de nucleótidos cuando se los compara (Betson et al., 2014).

Todos estos descubrimientos han sido posibles bajo el estudio de técnicas convencionales (comparaciones fisiológicas), y técnicas moleculares que analizan regiones de ADN específicas de *Ascaris* spp. En lo que respecta a las técnicas moleculares, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha hecho posible amplificar, detectar y reportar varias características de *Ascaris* spp. obtenidos de diferentes hospederos (humanos y cerdos). Algunas regiones del ADN y marcadores que se han identificado para estudios entre éstos parásitos son: ITS, mitocondrial, 18S rRNA, AFLPS entre otras (Søe, Kapel, Nejsun, 2016).

1.5. Técnicas moleculares para la detección de microsatélites STRS

Un microsatélite (STR) es un tramo de ADN en el genoma de un organismo en el que se repiten ciertas bases de ácidos nucleicos en tándem, típicamente de 5-50 veces. Los microsatélites acumulan una mayor tasa de mutación que otras áreas de ADN (Turnpenny & Ellard, 2005). Una posible causa de estas mutaciones en tándem, es el deslizamiento de la ADN polimerasa en la replicación ya que se puede “resbalar” mientras se mueve a lo largo de la hebra molde y continuar con el nucleótido equivocado; esto se da por desajustes entre las cadenas de ADN mientras se está replicando durante la meiosis (Tautz & Schlötterer, 1994). Otra posible

causa de las mutaciones de los microsatélites son las mutaciones puntuales, en las que sólo un nucleótido se copia incorrectamente durante la replicación (Amos, 2010).

Los fragmentos de microsatélites de los organismos pueden ser amplificados para su identificación, determinación y análisis mediante el proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los análisis de microsatélites o STRs (short tandem repeats) están ampliamente utilizados para estudios de perfiles de ADN en el análisis de parentesco (especialmente pruebas de paternidad) y en la identificación forense. Los microsatélites también se utilizan en genética de poblaciones para medir los niveles de relación entre subespecies, grupos e individuos (Manel, Schwartz, Luikart, Gordon & Pierre, 2003).

Los microsatélites son biomarcadores multialélicos, reproducibles, codominantes, con locus específicos y abundantes en todos los genomas. Sin embargo, sus limitaciones son su alto costo de desarrollo y el funcionamiento correcto y eficaz la elaboración y el diseño de cebadores a las regiones flanqueantes (Hao et al., 2015; Alem et al., 2011). En la actualidad, el método actual para análisis de STRs en *Ascaris* spp. es mediante la técnica de la PCR convencional; una reacción por cada región de microsatélite al analizar (Betson et al., 2012; Anderson, Williams, Anderson, 2003; Betson et al., 2011; Zhou, Yuan, Tang, Hu, Peng, 2011; Criscione et al., 2007). El procedimiento para detectar un locus a la vez resulta en extremo dispendioso en tiempo y dinero. Además, existe el riesgo de que mientras más reacciones se preparen por PCR convencional, mayor es el riesgo de contaminación (Hu et al., 2015).

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (multiplex PCR) permite la amplificación de varias secuencias de ADN diferentes de una forma simultánea. Es un método conveniente, rápido, rentable (menor consumo de reactivos) y de alta eficiencia sin disminuir la capacidad analítica de cada experimento por separado. (Hu et al., 2015). La reacción múltiple en cadena de la polimerasa es una variante de la PCR convencional, en la que hace uso de una mezcla de múltiples pares de cebadores (con diferentes secuencias loci específicas a amplificar) (Hu et al., 2015; Bilgic et al., 2013). En la actualidad no se han reportado ensayos de PCR multiplex para la detección simultánea de diferentes loci en microsatélites para parásitos de *Ascaris* spp. Finalmente, el método de validación y confirmación más utilizado para los microsatélites (STRs)

obtenidos de la amplificación por la PCR es la secuenciación por el método Sanger con el objetivo de validar el producto amplificado con su respectivo tamaño y estructura de unidad de repetición.

1.6. Enfoque de la genotipificación de microsatélites en una PCR multiplex para *Ascaris* spp.

Debido a la necesidad de hacer más eficiente el estudio de microsatélites en *Ascaris* spp. es necesario desarrollar y estandarizar nuevas técnicas que permitan; abaratar los costos, ahorrar tiempo y alcanzar niveles de sensibilidad adecuados para el análisis genético del nematodo en cuestión.

Varios métodos y técnicas de epidemiología molecular se han propuesto para caracterizar mejor a *Ascaris* spp. Sin embargo, en el campo del estudio de los microsatélites aún se busca un mejor método para caracterizar a este nematodo. Es por esto que en este trabajo se propone el diseño, desarrollo y verificación de una PCR multiplex con 14 microsatélites variables y representativos para *Ascaris* spp. De modo que permita superar las limitantes actuales (estudios de diferentes microsatélites en una sola reacción), proporcionando una técnica rápida, barata y eficiente para la evaluación y detección simultánea de diferentes loci de STRs en muestras obtenidas de parásitos adultos de *Ascaris* spp.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Estandarizar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa multiplex para 14 microsatélites (STRs) en *Ascaris* spp. (aislados de cerdos).

2.2. Objetivos Específicos

- Diseñar y estandarizar un sistema múltiple de PCR para 14 STRs de *Ascaris* spp. basado en secuencias reportadas en la literatura.
- Validar los resultados obtenidos (tamaño, tipo y estructura) por secuenciación Sanger en cada locus y reportar las regiones de STRs obtenidas en este estudio.

- Proponer una nomenclatura para al menos un alelo homocigoto de cada locus utilizado en cada una de las PCR multiplex.

3. JUSTIFICACIÓN

Se estima que *Ascaris* spp. afecta alrededor del 14.6% de la población del mundo (Brooker & Pullan, 2013; WHO, 1996). Según la CDC (Center for Disease Control and Prevention) la propagación de *Ascaris* spp. es a través de huevos en las heces de sus hospederos. Se han reportado casos en que huevos de *Ascaris* spp. de origen hospedero humano, pueden transmitirse a cerdos y viceversa (Sparks et al, 2015). Se requieren más ensayos para determinar la relación entre *Ascaris suum* y *Ascaris lumbricoides*. Según recientes estudios moleculares (Leles et al., 2012; Alves, Conceição, Leles, 2016; Betson, Stothard, 2016), estas dos especies probablemente son la misma. Sin embargo, se necesita un estudio epidemiológico molecular en detalle que pueda determinar las diferencias o igualdades entre poblaciones de *Ascaris* spp. y además, determinar si la misma población de *Ascaris* spp. está siendo transmitida entre la población de parásitos de cerdos y humanos. Existen varios estudios que demuestran la presencia de *Ascaris* spp. en el Ecuador (Cooper et al., 2013; James et al., 2012). Por ejemplo, existe un 49.7% de infección en un muestreo realizado en las provincias de Pichincha y Esmeraldas por Cooper et al., 2003; 35.5% en la región de la sierra del Ecuador (Jacobsen, Ribeiro, Quist & Rydbeck, 2007), 20.1% de infección en niños de Cuenca-Santa Ana (Rinne et al., 2005), y 48.34% de infección en Morona Santiago y Zamora (Cepon-Robins et al., 2014). Adicionalmente, recientemente se realizó un estudio que encontró la relación de infección en un 33.2% en niños de 3 años en el país (Menzies et al., 2014). No obstante, ninguno de estos reportes analiza el rol de los cerdos en la transmisión del parásito a los humanos (y viceversa) mediante comparaciones a nivel del ADN. Es por esto que es preciso estudiar cómo el parásito está infectando, y además analizar la importancia que tiene cada hospedador. Debido a que el Ecuador es uno de los países con ocurrencia de este parásito es necesario obtener más información acerca de la comprensión de *Ascaris* spp. en diferentes hospedadores.

Para este tipo de estudios uno de los métodos que más información ha aportado para analizar la epidemiología molecular de *Ascaris* spp. es el análisis de microsatélites (Betson et al., 2012; Anderson, Williams, Anderson,

2003; Betson et al., 2011, Criscione et al., 2007; Zhou et al., 2011; Criscione, Anderson, Sudimack, Peng, Williams-Blangero, & Anderson, 2007).

En este trabajo se propone el diseño, el desarrollo y la verificación de dos reacciones de PCR Multiplex para 14 microsatélites STRs tomando como referencia varios estudios de perfiles de paternidad en humanos y con criterios mundialmente aceptados por la *International Society for Forensic Genetics*. La optimización del método permitirá analizar un mayor número de muestras para alcanzar un número estadísticamente representativo para los estudios de microsatélites, lo cual permitirá determinar el riesgo de infección que tienen las personas que cohabitan con animales, lo que redundaría en recomendaciones para implementar una mejor política de salud pública en el país.

4. AREA DE ESTUDIO

Se colectaron muestras de parásitos adultos de *Ascaris* spp. obtenidos de cerdos en proceso de faenamiento en la Empresa Pública Metropolitana de Rastros Quito (camal sur-Quito) área de Faenamiento de Vísceras, verano del año 2015. Se seleccionó también al barrio Otón de Velez-Yaruquí/Ecuador debido a factores en los cuales se reporta la presencia de *Ascaris* spp, tales como: pobreza, falta de sanidad e higiene, escaso acceso o distribución inapropiada de agua, condiciones climáticas, entre otras. En el 2015 se recolectaron muestras de heces y parásitos adultos de *Ascaris* spp. de cerdos criados en casas de este sector. Se seleccionaron cerdos del tipo “criollos” o de traspatio, es decir cerdos catalogados para usos domésticos que son criados activamente cerca del lugar en donde habitan. Además, éstos animales no son usados para la producción porcina y su comercialización no es inmediata. El tipo de alimentación que recibían los cerdos comprendía desperdicios caseros consumidos por las familias del lugar, rechazo de la cosecha o desperdicios del vegetal palmito y desperdicios de la malta de la cerveza (denominado por los habitantes como “concha de cerveza”); estos dos últimos eran comercializados por productores como materia secundaria.

5. MATERIALES

5.1. Recolección de muestras de heces de cerdos en Otón de Velez-Yaruquí

- Marcador *Sharpie*
- Tableros sujetadores de notas
- Etiquetas
- “Cooler” recipiente para guardar las muestras
- Barreras de bioseguridad
- Frascos estériles.
- Gel Refrigerante
- Solución formol al 10 %
- Paletas de madera estériles
- Refrigeradora -20 ° C
- GPS Garmin Etrex
- BaseCamp software version 4.4.7. GPS visualizador

5.2 Exámenes coproparasitarios:

- Microscopio compuesto.
- Cubre objetos
- Porta objetos.
- Solución salina fisiológica 0.9%
- Lugol
- Cámara fotográfica Canon SD750 Digital

5.3. Recolección de parásitos adultos de *Ascaris* spp.

- Marcador
- Etiquetas
- “Cooler” recipiente para guardar las muestras
- Pinzas de disección
- Barreras de bioseguridad
- Frascos estériles.
- Solución de etanol al 70%.
- Refrigeradora -20 ° C
- Panacur® 10% suspension oral
- Cinta métrica pesadora. Ovni
- Permisos otorgados por el comité de bioética para el desarrollo del presente estudio.
- Autorización para el ingreso de toma de muestras autorizado por el gerente general EPMRQ

5.4. Estandarización de extracción de ADN con Fenol-Cloroformo-alcohol Isoamílico en parásitos adultos de *Ascaris* spp.

- Vortex (Labnet International, Inc.)
- Microcentrifuga (Eppendorf)
- Tubos de 1.5mL (Axygen, Inc.)
- Pinzas de disección
- Bisturí
- Tachuela sujetadoras
- Tabla de soporte
- Pistilos de plástico para tubos de 1.5 mL
- Incubadora
- Etanol 70%
- Balanza
- Buffer de Lisis ATL Kit Invitrogen
- Proteinasa K Qiagen™
- Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1)
- Cloroformo
- Solución salina NaCl 3M
- Solución de isopropanol frío
- Agua para PCR (Gibco)
- Refrigeradora -20 ° C

5.5. Diseño in silico de dos multiplex para 14 STRS de *Ascaris* spp.

- Software Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information)
- Software OligoAnalyzer 3.1 de Integrated DNA Technologies
- Software NEB Tm Calculator v1.9.5
- Software PCR in silico Primer-BLAST de NCBI
- Base de Datos GenBank®

5.6 Estandarización de la múltiple PCR, secuenciación y verificación

- Termociclador SureCycler 8800 de Agilent Technologies
- Agua para PCR (Gibco)
- QIAGEN® Multiplex PCR Kit
- 2 sets de pares de cebadores (Invitrogen y AlphaDNA) mapas de la Multiplex PCR.
- ADN extraído de parásito adulto de *Ascaris* spp.
- Software GeneMapper® V.3.2
- LIZ®-500-600 dye Size Standard de Applied Biosystems,

- POP-7™ Polymer for 3130/3130xl Genetic Analyzers. Applied Biosystems,
- Hi-Di™ Formamide. Applied Biosystems,
- MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate. Applied Biosystems
- Fotodocumentador MiniBIS System de Bio-Imaging Systems
- SYBR® Gold DNA Gel Stain.
- TBE 1X (108g Ultra Pure™ Tris, 55g Ac. Bórico Panreac, 9.3 EDTA Invitrogen™
- Ultra Pure™ Agarosa Invitrogen™.
- Cámara de electroforesis C.B.S. Scientific Co. Model: MGU-502T.
- Taq Platinum Invitrogen
- Buffer de GoTaq Promega
- MgCl₂
- Fuente de poder Fisher Scientific. Model: FB300.
- Software Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information)
- Software Chromas 2.4
- Software Geneious V 8.7.1
- Base de Datos GenBank®
- NanoDrop 1000 (ThermoScientific)
- AMPure de Agencourt
- CleanSEQ, Sanger Sequencing Dye Terminator Removal (Agencourt)
- 1X BigDye® Terminator v3.1 de ThermoFisher Scientific y BigDye Terminator Sequencing Buffer
- Placa magnética.
- Agua Milli-Q®
- Analizador genético de población GenAIEx 6.5

6. MÉTODOS

El presente estudio se realizó con el permiso 2014-135M- Versión #4-Julio 2014 del Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito y el permiso otorgado CEUAID-USFQ 002 por el Comité de Ética en el Uso de Animales en Investigación y Docencia de la USFQ (Febrero, 2016).

En el 2016 se llevó a cabo el trabajo experimental en el Laboratorio del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito (recepción y análisis de los exámenes coproparasitarios). La extracción de ADN de las muestras de parásitos adultos se hizo en el Instituto de Investigaciones de la Universidad de las Américas (evaluación de la PCR Multiplex en ABI secuenciador de electroforesis capilar).

6.1. Recolección de muestras de heces de cerdos para exámenes coproparasitarios en Otón de Velez-Yaruquí

Se recolectaron aproximadamente 10 gramos de muestras de heces de cerdo mediante una paleta de madera estéril y se almacenó en un frasco de plástico estéril de 120 ml. Mediante un GPS Garmin se revisaron las coordenadas realizadas por el estudio de Vasco, 2016; con el fin de conocer puntos comunes donde existan cerdos en Otón de Velez. Se recogieron 50 muestras de heces de diferentes cerdos que se almacenaron en un *cooler* con gel refrigerante. Para finalizar, se llevaron las muestras al Instituto de Microbiología de la USFQ y se conservaron las muestras en Solución Formol al 10 % (Gibbons, 2011) en una refrigeradora a una temperatura de -20 ° C.

6.2. Identificación de muestras positivas para infección de *Ascaris* spp. mediante exámenes coproparasitarios

Posterior a la recolección de las muestras de heces, se procedió a realizar un examen coproparasitario por el método frotis directo. Se colocó en un portaobjetos una gota de solución salina preparada al 0.9%, más aproximadamente de 1-3 mg de muestra de heces y una gota de lugol. Luego, se mezcló hasta conseguir una suspensión homogénea retirando en lo posible fibras y otros desechos inorgánicos con partículas grandes visibles. Luego, se instaló el portaobjetos y se observó al microscopio con una magnificación de 400x. Para las muestras que presentaban infecciones positivas con huevos de *Ascaris* spp. se tomó una fotografía con una Cámara fotográfica Canon SD750 Digital por el lente ocular y se registró el resultado.

6.3. Recolección de parásitos adultos de *Ascaris* spp. en cerdos infectados

Con el permiso de bioética para ensayo en animales respectivo y bajo la capacitación e instrucción por parte de veterinarios del Colegio de Ciencias de la Salud Escuela de Veterinaria de la Universidad San Francisco de Quito se procedió a administrar antiparasitarios a los cerdos que obtuvieron resultados positivos en las pruebas coproparasitarias para huevos de *Ascaris* spp. en Otón De Velez-Yaruquí. Se inició contactando los puntos de coordenadas en el GPS para los cuales las muestras fueron positivas. Luego, se administró Panacur® 10% suspensión oral en presentación líquida (cada ml contiene 100 mg de fenbendazol como principio activo) con una dosis de 7,5 mg/kg de peso del animal mezclado con el alimento.

Para la administración de la dosis del fármaco se tomó en cuenta el peso del animal por medio de cintas métricas pesadoras (cinta zootécnica para cerdos). Después, el animal fue colocado en un perímetro de espacio delimitado con el fin de recolectar las heces 24 horas después del suministro del fármaco. El día siguiente, luego de haber suministrado el antiparasitario se recolectaron las muestras de los parásitos adultos de *Ascaris* spp. expelidos de los cerdos, se lavó por separado con solución salina fisiológica y se guardó en envases estériles debidamente etiquetados y se preservó las muestras en etanol al 70% para luego almacenar a -20°C hasta su uso en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

Paralelamente a los métodos hasta aquí mencionados, se vio la necesidad de conseguir parásitos adultos de *Ascaris* spp. con otro origen con el fin de aprovechar el tiempo y utilizarlos en ensayos previos antes de que se obtengan las muestras de la población de Otón de Vélez. Para esto se recolectaron parásitos adultos en la Empresa Pública Metropolitana de Rastros Quito (EPMRS) en el área de faenamiento de vísceras. Primero, se adquirió el debido permiso otorgado por el Ing. Luis Montalvo, gerente general de la empresa. Los especímenes fueron obtenidos de cerdos en proceso de faenamiento, se recogieron los parásitos de los intestinos, mientras personal de la EPMRS se encontraba en el proceso de lavado. Los parásitos adultos nematodo fueron almacenados por separado en envases estériles con etanol al 70% para luego ser almacenados a -20°C hasta su uso en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. Se utilizó pinzas de disección para una mejor manipulación del nematodo.

6.4. Estandarización de protocolo de extracción de ADN en parásitos adultos de *Ascaris* spp.

6.4.1. Disección del parásito

Se colocó al nematodo estirado y se realizó un corte longitudinal parcial con un bisturí. Posteriormente, se estiró la dermis sujetándola con tachuelas. Se abrió al espécimen seccionando la cutícula, dermis y tejido muscular. Se cortaron las vísceras en pequeños trozos y se almacenaron en un tubo de 1.5 ml con la ayuda de pinzas de disección. En este estudio las muestras de los parásitos no fueron identificadas por género al ser amplificadas. Se trató de evitar recolectar parte de sus órganos reproductores con el fin de obtener solamente

parte del tejido autosómico del organismo. Finalmente, se pesaron 25mg de muestra de vísceras de parásito adulto de *Ascaris* spp.

6.4.2. Extracción de ADN con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico

El siguiente protocolo se realizó en el Laboratorio de Vectores y Parasitología del Instituto de Microbiología de la USFQ. Se añadió 180 µL de buffer de lisis ATL (QIAamp® DNA Mini Kit) a los 25mg de muestra diseccionada. A continuación se maceró firmemente la muestra con un pistilo plástico sobre una cama o gradilla fría para romper el tejido. Después, se agregó 5 µL de proteinasa K (Qiagen™) y se dejó incubar toda la noche a 56.6 °C homogenizando la muestra con ayuda de un vórtex cada cierto tiempo. El siguiente día, se agregó un volumen en proporción 1:1 de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1) pH 8.0 y se mezcló por inversión. Luego, se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf® de 1.5 mL. Se realizó este procedimiento por duplicado. Después, se adicionó un volumen en proporción 1:1 de cloroformo puro y se mezcló por inversión para luego centrifugar a 8000 rpm durante 10 minutos. Subsecuentemente se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo para luego agregar un volumen igual al 10% del sobrenadante recuperado de NaCl 3M. Se mezcló por inversión y se adicionó un volumen en proporción 1:1 de isopropanol frío y se mezcló por inversión dejando luego reposar las muestras de 5 a 10 minutos. Se centrifugaron las muestras a 13000 rpm por 30 minutos a una temperatura de 20°C. Se descartó el sobrenadante, preservando el pellet al fondo del tubo. Se resuspendió el pellet con 500 µL de etanol frío al 70% y se centrifugó a 13000 rpm durante 7 minutos. Luego se descartó el sobrenadante y se volvió a resuspender el pellet obtenido con 500 µL de etanol frío al 70% para luego volver a centrifugarlo y descartar el sobrenadante. Finalmente se colocaron las muestras en una estufa a 37°C toda la noche. Al día siguiente se resuspendieron las muestras con 50 µL de agua libre de nucleasas (agua para PCR) y se cuantificó la concentración de ADN en NanoDrop 1000 (ThermoScientific®).

6.5. Preparación de *in silico* para el diseño de dos sets de primers (dos miniplex) para *Ascaris* spp.

Se diseñaron dos sistemas de PCR múltiplex (miniplex 1 y 2) con 7 microsatélites (STRs) loci cada uno. Inicialmente se probaron 8 pares de primers para la miniplex 1 y 2 sin embargo posteriormente se descartaron los loci DQ988872 y DQ988862. Los mapas se estructuraron mediante cuatro tipos de fluoróforos para marcaje, en dirección 5' (6-FAM, VIC, NET Y PET) para cada primer forward. Se utilizaron los primers más representativos reportados por Criscione et al., 2007, según su mayor información polimórfica (heterocigocidad observada, diversidad genética, número de alelos y el contenido de información de polimorfismo) (Tabla 3), así también por rango alélico (Tabla 5).

Se ordenaron los set de primers a modo de que sus rango alélicos reportados no se sobrelapen dependiendo de los tamaños de alelo reportados (Betson et al., 2012; Anderson, Williams, Anderson, 2003; Betson et al., 2011, Criscione et al., 2007; Zhou et al., 2011; Criscione, Anderson, Sudimack, Peng, Williams-Blangero, & Anderson, 2007). Se separaron como mínimo en 5-10 pb de su rango alélico para cada sección de marcaje fluorescente resultando en 8 loci para cada miniplex.

Para el diseño de la múltiple se tomaron en cuenta recomendaciones de multiplex PCR (Chung, 2004; Henegariu et al., 1997; Innis, Gelfand & Sninsky, 1999). Como primer paso se verificó que las secuencias de los primers reportados por Criscione et al., 2007 pertenezcan a *Ascaris* spp. por medio de la búsqueda de alineación básica (Kent, 2002) del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI). Luego, se verificó que los primers seleccionados: cumplan con una longitud de 18-25 nucleótidos, tengan una diferencia de tamaño menor o igual a 3 pb entre *Forward* y *Reverse*, su producto amplificado tenga un rango de 100-300bp, tengan al menos entre 40-60% de bases nitrogenadas de guaninas y citosinas. Además, se analizó la posibilidad de que los primers no formen horquillas o heterodímeros mediante el software *OligoAnalyzer V 3.1* (se verificó que los primers tengan un valor ΔG más positivo que -3,0 kcal / mol). Otro factor importante fue que todos los primers posean una misma temperatura de *annealing*.

Para el perfil térmico se modificó el protocolo por Criscione et al., 2007 y Zhou & Peng, 2012 y se utilizó inicialmente un perfil de 96°C durante 45 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto. Con el fin de homogeneizar la temperatura para el primer *forward* y *reverse* de ALAC08, se agregó una base extra realizando una búsqueda de secuencias en la página del NCBI. Para comprobar la correcta

adición de la nueva base y la temperatura de los demás primers se utilizó el programa *Tm Calculator* de NewEngland, Biolabs (<http://tmcalculator.neb.com/#/>). Se comprobó que en promedio todos los primers tengan una temperatura *melting* promedio de 60°C. Finalmente se analizó cada par de primers en la aplicación *In Silico PCR Primer Blast* (Ye et al., 2012) para confirmar su porcentaje de cobertura en *Ascaris* spp.

6.6 Reacciones de la PCR:

La amplificación de ADN de las muestras obtenidas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la lectura e interpretación se realizó en el Instituto de Investigaciones de la Universidad de las Américas. Las reacciones de PCR se diseñaron para amplificar 16 loci GenBank ID: DQ988847 (ALAC07), DQ988848 (ALAC08), DQ988849 (ALAC09), DQ988855 (ALGA15), DQ988859 (ALGA31), DQ988860 (ALGA32), DQ988864 (ALGA48), DQ988869 (ALTN04), DQ988845 (ALAC01), DQ988853 (ALAC32), DQ988857 (ALGA20), DQ988872 (Locus010), DQ988862 (ALGA44), DQ988866 (ALTN01), DQ988867 (ALTN02), DQ988863 (ALGA47), la Tabla 4 detalla la información de primers utilizados.

El procedimiento comenzó con la amplificación de la PCR convencional para cada locus individualmente, usando condiciones estándares recomendadas por la literatura. (Criscione et al., 2007; Innis et al., 1999). Se utilizó el termociclador SureCycler 8800 de Agilent Technologies, el volumen final de cada reacción fue de 5 µL repartidos de la siguiente forma: 0,5 µl de 0,5 µM de cada primer *forward* y *reverse*, 2,5 µl de QIAGEN® Multiplex PCR 1X, 1 µl de agua para PCR y 0.5 µl de muestra de ADN con concentración de 5ng/µl. Los amplificados para cada loci fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Gold, se utilizó 5µL de amplicón corridos a 90V con TBE 1X durante una hora. Posteriormente su visualización se realizó bajo luz UV. Se utilizó una escalera molecular de 100pb. Para la estandarización de la reacción primero se realizó un gradiente de *annealing* de PCR en las dos multiplex para conocer la temperatura más óptima de cada sistema. Se compararon las diferentes temperaturas: 54,1°C; 54,8°C; 56,1° C; 57,3°C; 58,4°C y 60° C. Luego, se probaron diferentes variaciones

en el perfil de amplificación (denaturación, annealing, extensión) en: 35, 33, 30, 29, 28 y 26 ciclos. Adicionalmente, se realizaron ensayos de artefactos/inespecificidades de primers en controles negativos que fueron sujetos al perfil térmico (ciclado) y otros que no se puso en el termociclador (no ciclado).

Una vez definidos los parámetros ideales del perfil térmico se reforzaron los loci más tenues, adicionando más volumen de primer a modo de obtener amplificadores balanceados. La concentración de los cebadores fue variando considerablemente entre los loci y en un principio se establecieron los valores de una forma empírica. Luego, las concentraciones fueron calculadas a partir del balance de volumen- concentración inicial y final para cada mix ($C_1V_1=C_2V_2$) que se fueron agregando durante el proceso.

Referente al ciclo térmico se programó un activación pre-PCR con una temperatura de inicio de 95 °C por 15 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 54,8 °C por 1 min, 72 °C por 75 segundos, luego para la elongación final 72 °C por 1 hora y finalmente 4 °C por 10 minutos. Este protocolo fue regulado para lograr la menor ausencia de *pull-ups* posibles, rangos alélicos coincidentes y alturas de fluorescencia óptimas en la amplificación. Finalmente, la reacción de la multiplex 1 y 2 tuvo un volumen final de 5 µl.

6.7. Electroforesis capilar

Las amplificaciones de las multiplex PCR se visualizaron por medio de una electroforesis capilar en el equipo ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Cada muestra se preparó mezclando 0,15 µL de marcador de peso molecular LIZ GS500 (Applied Biosystems) con 9 µL de formamida desionizada y 1,2 µL de amplificado en un plato de 96 pocillos MicroAmp Optical. La inyección de la muestra se efectuó a 15000 V y se corrió durante 15 min a 60 °C, voltaje de corrido a 15KVolts e inyección de voltaje de 1200V, polímero POP-7™. Tiempo de inyección 25 segundos. La recolección de datos se realizó mediante el programa 3130 Data Collection Software y Software GeneMapper® V.3.2 (Applied Biosystems). Cada marcador se evaluó teniendo en cuenta el tamaño en pares de bases con respecto a los controles reportados en la literatura.

6.8. Ajuste de *bins* (rangos alélicos) de 2 set de primers (2 miniplex) para la epidemiología molecular de *Ascaris* spp.

La visualización de los electroferogramas se hizo por medio del software *GeneMapper*® V.3.2. Inicialmente los rangos alélicos se designaron de acuerdo a la literatura. Posteriormente, estos valores se modificaron de acuerdo a las muestras de parásitos adultos extraídas en este estudio: Otón de Velez n=6 y Camal Metropolitano n=1. Estos compartimientos digitales (*bins*) fueron dispuestos de modo de que las señales del genotipado de cada loci sea revelado/detectado en un rango distinguible entre cada locus. Se ajustaron los valores de los *bins* para la miniplex 1 (99 pb-377 pb) y para la miniplex 2 (95 pb a 345 pb) de acuerdo los tamaños aquí registrados de los distintos alelos de cada loci. Estos valores servirán como referencia inicial para un estudio subsiguiente de tipificación con un número de muestras mayor (n=50)

6.9. Verificación de la estructura y número de repetición en los diferentes microsatélites por secuenciación Sanger

Se seleccionaron las muestras de ADN con genotipos homocigotos para cada locus y se amplificaron individualmente en reacciones de PCR separadas para cada uno de los marcadores. Se utilizaron los primers fríos reportados en la Tabla 4. Además se diseñaron nuevos primers para algunos loci con problemas de lectura de secuenciación. Para el diseño de los nuevos primers se aseguró que exista un espacio mínimo entre la región flanqueante a la que se pega el cebador a la unidad de repetición, de al menos 50 pares de bases (Tabla 8). Esto debido a que las zonas de repetición se encuentran muy cercanas a la zona de flaqueo por lo que su amplificación puede resultar incompleta. Posterior a la amplificación se siguió el protocolo implementado y sugerido por los técnicos del Instituto de Investigaciones de la Universidad de las Américas para la secuenciación de regiones de microsatélites por el método Sanger. Finalmente se diluyó el amplificado con 20 ul de agua Milli-Q® para PCR. Las muestras se sometieron a electroforesis capilar, en el analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystems), durante 28 minutos a 60°C, en polímero POP-7™(Applied Biosystems), con un tiempo de inyección de 12 segundos a 1.2 KV, y un tiempo de corrido de 30 min a 8.5 KV. Los electroferogramas se analizaron y editaron con el Software Sequencing Analysis de Applied Biosystems y el Software Geneious V 8.7.1; las secuencias se compararon con los alelos tipo reportados, con

el fin de verificar su tamaño y variación en: Software Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Zhang, et al., 2000; Morgulis et al., 2008), Software Geneious V 8.7.1. y Chromas V 2.4.

Finalmente, para la asignación alélica se recopiló toda la información conocida sobre los alelos observados y la información de secuencias reportadas con el objetivo de buscar patrones en las estructuras de repetición. Se denominaron de la siguiente manera: *simple consisting* (unidades de repetición en tándem con secuencias y tamaños idénticos), *Compound consisting* (dos o más repeticiones simples adyacentes), *Complex repeats* (repeticiones compuestas de longitudes o secuencias variables con posibles secuencias intermedias), *non-consensus alleles* (alelos con unidades repetitivas incompletas). Se comenzó con la descripción del motivo en la literatura y luego se procedió a recopilar datos sobre más alelos y patrones establecidos de STRs. Finalmente, se llegó a un consenso sobre el tipo y tamaño de estructura de repetición, paralelamente, bajo las recomendaciones del *International Society for Forensic Genetics* (Gettings, Aponte, Kiesler, & Vallone, 2015; Butler, Kline, & Decker, 2008; Bar et al., 1997, Griffiths et al., 1998).

Adicionalmente, se analizó la variabilidad entre los marcadores moleculares utilizados (14 loci) en las 7 muestras de *Ascaris* spp. mediante el software GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse 2006, 2012).

7. RESULTADOS

7.1. Recolección de muestras de heces de cerdos en Otón de Vélez-Yaruquí

Se recolectaron 50 muestras de heces de cerdos criollos en la población de Otón de Vélez de 35 hogares (en algunas casas se muestreó más de un animal), se tomó como referencia las coordenadas descritas por Vasco, 2016. La Figura 1 muestra el mapa de la comunidad con los puntos localizados por el GPS de las muestras tomadas en este estudio, así como las coordenadas del lugar (Tabla 1).

Los exámenes coproparasitarios indicaron 9 muestras positivas de 50 para infección de *Ascaris* spp. (Tabla 2). En los hogares en los que se evaluaron dos animales, ambos resultaron positivos (FYR001, FYR007), se trabajó sólo con uno de éstos animales.

7.2. Recolección de parásitos adultos de *Ascaris* spp. en cerdos infectados

En Otón De Velez-Yaruquí 7 casas tuvieron resultados positivos de infección de *Ascaris* spp. Los cerdos de traspatio o criollo a desparasitarse presentaron un rango de edad entre 1-3 años y un peso entre 50 y 65 kg (según el valor estimado por la cinta métrica pesadora). En cuanto a su modo de vida se encontraban en confinamientos/instalaciones poco elaborados, un techo de zinc con un soporte de madera. Se observó que es bastante común que durante el día se encuentren amarrados con una soga en algún lugar y pasen la noche en algún recinto tipo corral. Finalmente se obtuvieron 6 especímenes parásitos adultos. En una de las casas nombre de la coordenada FYR026, no se obtuvo ningún parásito adulto.

En la empresa pública metropolitana de rastros Quito (Anexos 2) se recogieron varios parásitos adultos al azar. Se observó que los parásitos adultos se encontraron en el intestino delgado de las varias vísceras que seguían a ser lavadas y cortadas. Adicionalmente, se observaron infecciones severas al ocupar casi la totalidad del intestino delgado el parásito en estudio en varias ocasiones. La procedencia de los cerdos que fueron hospederos de los parásitos adultos recolectados fue desconocida ya que por cuestiones de comercialización no se otorgó esta información.

7.3. Estandarización de extracción de ADN en parásitos adultos de *Ascaris* spp.

Se trabajó inicialmente con muestras de ADN de parásitos adultos recogidas en el camal metropolitano, que sirvieron para realizar las pruebas iniciales de la estandarización multiplex PCR. Se evidenciaron dificultades con el ADN obtenido por el método de extracción de chelex ya que disminuían en su concentración y calidad con el paso del tiempo. A pesar de que inicialmente las muestras cuantificadas tenían en promedio una concentración aproximada de 709 ng/ul a una relación de $A_{260}/A_{280} = 1.35$. Se decidió entonces cambiar de método de extracción al método de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico. Para este ensayo se trabajó con los parásitos adultos obtenidos de la población de Otón de Vélez $n=6$ (ASCF1-ASCF6) y $n=1$ una muestra obtenida previamente del camal (ASCF7). Las muestras cuantificadas tuvieron en promedio una concentración entre 216-670 ng/ul con una calidad promedio de $A_{260}/A_{280} = 1.95$.

7.4. Preparación in silico para el diseño de dos sets de primers para *Ascaris* spp.

En la Tabla 4 se muestra la información detallada de las secuencias para los 16 pares de primers de STRs seleccionados en este estudio. Se muestra también la información de rango alélicos reportados en la literatura para cada loci en 4 estudios (Tabla 5). Estos datos sirvieron para diseñar el set de primers de 2 miniplex (Figura 3). Se registraron sus límites dependiendo del rango más bajo o más alto existentes en cada locus (esta información fue útil para la creación en la fase inicial de *bins* en el software *GeneMapper*® V.3.2). En el diseño de los 2 sets de primers cada múltiple estuvo por 4 grupos clasificados por su fluoróforo (6-FAM, VIC, NET Y PET). En cada múltiple existieron dos marcadores STR no sobrelapantes por fluoróforo excepto en NED que existe sólo uno, resultando en 2 múltiples PCR con 14 loci de microsatélites. Cada primer en su canal cromático está separado como mínimo entre 5-10 pb para evitar sobrelapamiento de alelos.

7.5. Optimización de dos sets de primers (2 miniplex) para *Ascaris* spp.

Las figuras 4 y 5 presentan las amplificaciones individuales en cada loci detalladas por el software *GeneMapper*® V.3.2 en cada uno de los loci para la miniplex 1 y 2. Además, se visualizaron las bandas por medio de un gel de agarosa mostrando bandas detectables que coincidieron con el tamaño respectivo de cada locus.

En los ensayos de gradiente de temperatura se observó que para la línea del fluorocromo azul en la multiplex 1 ALAC09 entre mayor fue la temperatura, los picos heterocigotos se fueron diferenciando. En la línea del fluorocromo verde para ALGA32 y ALTN02, entre mayor fue la temperatura los picos fueron desapareciendo, caso similar a ALTN01. Por otro lado, en la línea roja del fluoróforo PET, mientras más se aumentó la temperatura hubo un mayor desbalance en el genotipo. En ALTN04 la temperatura que mostró el genotipo heterocigoto es la más baja, en las temperaturas siguientes éste muestra un decaimiento en el alelo con tamaño 175 (pb). Para el ensayo con diferentes números de ciclos térmicos, en la multiplex 1 las líneas de FAM y VIC los picos decrecieron al existir un menor número de ciclos, lo mismo ocurre para NET Y PET. Además en el canal cromático PET en ALTN04 desapareció el alelo 175 mientras

menos ciclos ocurran. Para la Miniplex 2, se repitió el mismo patrón. Finalmente se observó que 30 ciclos con una temperatura de 54,8° C de *annealing* son los más adecuados. Para la miniplex 1 se realizó una solución mix de primers con concentraciones que oscilaron entre 0,45 µM- 6,68 µM y para la miniplex 2 entre: 1,26 µM- 3,72 µM. Se obtuvieron 14 perfiles alélicos de 7 muestras de parásito adulto ASCF1-ASCF7 de *Ascaris* spp. Las intensidades de picos mostraron generalmente un valor mayor a 500 y menor a 4500 Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU's). Los electroferogramas en su mayoría mostraron picos bien definidos, con un buen balance entre alelos. Las condiciones para el perfil térmico se muestran en la Tabla 7.

Para los rangos alélicos de la multiplex 1 los valores oscilan entre 99 pb-377 pb y para la Multiplex 2 entre un rango de 95 pb a 345 pb.

7.6. Verificación de la estructura y número de repetición en los diferentes microsatélites por secuenciación Sanger

Se observaron diferencias en la estructura de repetición y designación alélica de los STRs. Se propuso una nueva estructura, nomenclatura y tipo de repetición para las secuencias de los STRs ya reportados, mismos que están representados en la Tabla 9. Adicionalmente, se encontraron mutaciones puntuales (inserciones, deleciones y cambios de nucleótidos) en las secuencias de STR secuenciadas con las muestras tipo de Criscione et al., 2007. Para los microsatélites secuenciados, las sustituciones de transición fueron más predominantes que las transversiones (64,18% vs 35,82%). Las transiciones A<-->G o C<-->T, están representadas con 26,87% y 37,31% de las sustituciones totales respectivamente, mientras que de las cuatro clases de transversión la sustitución A<-->C fue la más predominante con 17,91% de frecuencia (Figura 7). La proporción de transiciones/transversiones observado fue cercano a 2: 1. Por otro lado, se observó que sólo 14 loci de los 16 planteados inicialmente, muestran un perfil de multiplex adecuado, se descartó ALGA44 y L010. Finalmente, los resultados de GenAIEx señalan que los marcadores utilizados en este estudio tienen una gran aplicabilidad ya que sus índices de heterocigocidad esperada y observada fueron mayores a 0.6. Asimismo, el valor de la probabilidad de

exclusión para 14 STRs fue de $9,9999495E-01$. La tabla 12 muestra las frecuencia alélicas de cada locus para cada alelo utilizado en $n=7$ muestras.

8. DISCUSIÓN

Este estudio piloto pretende servir de guía para el estudio de *Ascaris* en STRs, ya que contempla todas las fases para su análisis desde: la extracción del parásito adulto hasta la amplificación y determinación de diversos genotipos en dos sistemas multiplex.

En zonas donde los cerdos y humanos coexisten se ha encontrado que la transmisión cruzada es una fuente importante de infecciones (Leles et al., 2012); por esto se seleccionó una área de estudio en la que convivieran seres humanos y cerdos con un ambiente de sanidad no óptimo, ya que esto los hace más propensos a infecciones con *Ascaris* spp (StGeorgiev, 2001). Adicionalmente, las casas de Otón De Velez-Yaruquí están distribuidas longitudinalmente (Figura 1) de forma que se podría rastrear una infección potencial.

En el muestreo para los exámenes coproparasitarios se observó que la mayoría de animales no poseía un recipiente aislado del piso para colocar su comida. Esta información hace aún más propenso al grupo de estudio de una posible infección parasítica debido a que uno de los modos primarios de transmisión es a través de la ingestión de huevos de suelo o agua contaminada (Olsen & Guselle, 2000; Wagenberg et al., 2010). La falta de protección del alimento con el suelo aumenta la posibilidad de que huevos convertidos en polvo puedan ser transmitidos hacia su lugar de comida (clima seco y ventoso). Además, los cerdos al estar atados a un poste la mayor parte del tiempo (Anexos 1) defecaban en el mismo lugar y enterraban las heces que luego se convertirían en polvo y que podrían ser una importante fuente de infección. Más aún, por el promedio de vida de los cerdos de traspatio (1-3 años antes de su venta o sacrificio), éstos espacios no se renovaban o limpiaban con lo que es posible una infección a un animal recién llegado (larga viabilidad de huevos de *Ascaris* spp. hasta de 6 años) (Sheorey et al., 2007). Se evidencia claramente la infección entre animales del mismo lugar, por ejemplo en FYR001 que se tomó la muestra

No. 1 y 2, ambas dieron positivas para la infección (Tabla 2) confirmando la alta infectividad de este parásito en espacios compartidos.

Los resultados del examen coprológico (Figura 1) mostraron que las casas que dieron positivas para huevos de *Ascaris* spp. están correlacionadas por su proximidad (FYR006-FYR007, FYR013-FYR014) confirmando así su potencial de transmisión en zonas vecinas (StGeorgiev, 2001). Sin embargo, las muestras de las casas aledañas correspondientes a las muestras FYR026 y FYR029 resultaron ser negativas. Esto se explica posiblemente porque los cerdos infectados fueron relativamente nuevos a su ambiente o porque hubo una mejora en los hábitos de sanidad del lugar.

La obtención de 7 muestras positivas (20% de infección) de un total de 35 casas muestreadas representa un grado de infección de *Ascaris* spp. relativamente menor a el porcentaje de infección reportado para personas de la Sierra del Ecuador (35,5%) (Jacobsen et al., 2007). La mayoría de muestras positivas están más distantes al Aeropuerto Internacional Mariscal Sucre, una de las explicaciones según las versiones de los habitantes del sector, es que el Ministerio de Salud Pública del Ecuador ha estado controlando e inspeccionando las zonas más aledañas al aeropuerto, por lo que los habitantes se han visto en la necesidad de tomar mejores hábitos de cuidado con sus animales por temor a alguna sanción.

Con respecto a la ausencia de la expulsión del parásito adulto luego del fármaco en la muestra FYR026, esto pudo haber sido por una mala interpretación del examen coprológico o porque el parásito no fue expulsado aún del organismo del animal en el tiempo de recolección. Este caso es similar al estudio de Boes Eriksen & Nansen, 1998, en el que la expulsión de parásitos adultos luego de la administración de albendazol tardó más de un día en algunos casos; otros fármacos como el pamoato de pirantel y el diclorhidrato de piperazina causaron la expulsión rápida.

Para la extracción de ADN de los parásitos se trabajó con tejido visceral ya que la parte de externa de la dermis del helminto contiene inhibidores de la PCR (ensayos previos). Un paso crítico en la fase de extracción de ADN fue la dilución de las muestras a 5 ng/ul, y una maceración exhaustiva de la muestra

conjuntamente con la aplicación de una base fría para evitar activar posibles enzimas que degraden el ADN.

Para el diseño de las Multiplex PCR se seleccionaron los loci que brindaron la mayor variabilidad genética de los reportados en Criscione et al., 2007; y se los comparó según la literatura disponible hasta la fecha (Tabla 3). En el estudio 1: Criscione et al., (2007) la heterocigocidad observada de todos los loci es mayor a 0.5 siendo el Locus ALAC01 el mayor con un porcentaje de 0.945, caso similar pasa en su diversidad genética; en 2: Betson et al., (2012) $H_o \geq 0.45$ y $H_e \geq 0.47$; 3: Betson et al., (2011) $H_o \geq 0.60$ y $H_e \geq 0.60$; finalmente para 4: Zhou & Peng, (2012), H_o , H_e se encuentran entre los valores de 0.4 y 0.9. Asimismo, en Zhou & Peng, 2012, los valores de PIC variaron de 0,4 a 0,9. Quince SSR loci fueron altamente informativos ($PIC \geq 0,5$), mientras que sólo uno (ALGA31) fue razonablemente informativo ($0,5 < PIC < 0,25$), no hubo ningún loci ligeramente informativo ($PIC < 0,25$) (Moges et al., 2016). La mayoría de marcadores tienen un alto grado de diversidad representada el número alto de alelos (10 a 26). Estas características se traducirán en un mayor poder de discriminación entre los perfiles analizados.

La Figura 3 muestra los arreglos y modificaciones de cada miniplex. Se modificaron los cebadores del marcador ALAC08 añadiendo una guanina extra en el extremo 3' del primer forward y para el reverse se adicionó una timina extra con el fin de subir su temperatura de annealing a 55° C común a los primers restantes. La literatura reporta algunos primers con temperaturas de annealing bajas (ALGA47 y ALGA15), sin embargo éstos no se modificaron ya que el análisis *in silico* mostró temperaturas de *melting* que oscilan entre 57 y 60 °C (común entre los otros primers). La especificidad del diseño se probó en la fase de amplificación de la multiplex. Se verificó la homología de los diferentes primers con secuencias reportadas para *Ascaris* spp mediante una búsqueda BLAST (Innis, Gelfand & Sninsky, 1999). Adicionalmente, la verificación de las secuencias en la longitud, el porcentaje de bases de G-C y la ausencia de hairpins de cada uno de los primers, reafirmaron la predicción de una temperatura de *melting* homogénea, manteniendo la especificidad y estabilidad además mejorando la eficiencia de reacción. Por otro lado, luego de analizar las características de amplificación y para minimizar la posibilidad de solapamiento en tamaños de loci ubicados en el mismo canal cromático se descartaron los cebadores de

ALGA44 Y L010. Asimismo, para garantizar la diferenciación entre primers se utilizaron cebadores con colorantes fluorescentes de color diferente. Los primers marcados con cromóforos son más costosos; sin embargo, son altamente sensibles y más seguros (Mansfield et al., 1993).

Los parámetros del perfil térmico en este estudio fueron diferentes a los reportados por Criscione et al., 2007. La temperatura de annealing estandarizada fue de 54,8° C. Se logró alcanzar una PCR multiplex óptimo con señales bien definidas y balanceadas. Esto se dedujo luego de realizar el ensayo de gradiente de temperatura y escoger una condición común para todos los cebadores que cumpla con el requisito de captar la señal de fluorocromo. Al fijar este parámetro se obtuvo una altura homogénea entre las señales, genotipos heterocigotos balanceados y ausencia de inespecificidades.

Asimismo, se verificaron algunos artefactos como por ejemplo con el genotipo de ALTN04 que en el gradiente de temperatura se mostró la desaparición de uno de sus alelos mientras se incrementaba la temperatura. Se descartó la posibilidad de que el alelo sea una inespecificidad, ya que al realizar el “test para *stutter* (o inespecificidad)” dividiendo el valor de su señal de RFU para la altura del pico más alto, no se encontró en el rango de 10%-20% (Butler, 2005). Luego, se analizaron diferentes números de ciclos en el perfil de amplificación (Anexo 3) con el cual se dedujo que a menor número de ciclos la calidad de señal de los alelos disminuye. Por el contrario, un número alto de ciclos produce inespecificidades *pull ups*. Esto se obtiene cuando la fluorescencia de un canal es muy alta y afecta al canal cromático siguiente porque la matriz del equipo no alcanza a separar las longitudes de onda y se registran picos adicionales (Butler, 2005). Por otro lado, en el fluorocromo PET se reporta un caso de alelo nulo por inespecificidad de primers ya que con la disminución de ciclos en ALTN04 desaparece el alelo 175. Debido a que existió un mejor consenso de perfiles amplificados entre los loci presentados, se determinó 30 ciclos para la condición del perfil térmico a amplificar. Adicional a esto, otro artefacto común que se tuvo que modificar constantemente fue el *dye blob* que ocurre cuando los marcadores fluorescentes se desprenden de sus respectivos cebadores y migran independientemente a través del capilar. Estos picos se caracterizan por ser anchos y bastante amplios (Butler, 2005). Ciertos fluorocromos como el VIC, tienen una intensidad

de señal alta y las cantidades de primers ubicados en este canal cromóforo fueron menores a las de los demás por lo que esto ayudó a contrarrestar el efecto de una concentración inicial baja en algunos primers. Las concentraciones óptimas de los perfiles alélicos estandarizados se muestran en la Tabla 6, en algunos casos existieron artefactos que aparecieron ocasionalmente en las multiplex, sin embargo, estos son descartados por la prueba del test de *stutter* y su patrón de aparición (Butler, 2005).

El perfil de 3 alelos de ASCF1 en ALGA20 puede ser por la inespecificidad denominada *shadow peaks*, este tipo de artefacto son moléculas dsDNA que se deben a una desnaturalización incompleta o rehibridación de las dos cadenas de ADN complementarias. Otra de las posibles razones de este patrón trialélico puede ocurrir cuando un alelo de un locus adyacente se detecta en un rango diferente (Butler, 2015); sin embargo esto se descarta debido a que el rango de separación es lejano entre ALAC32 y ALGA 20. Por otro lado, perfiles de ADN anormales pueden surgir de diversos procesos biológicos, incluyendo variantes del número de copias como duplicaciones o deleciones, mutaciones somáticas, entre otros (Butler, 2015). Finalmente, otra de las posibles causas es que haya adquirido un cromosoma extra o que sea originaria de contaminación esporádica (*allele drop-in*) (Butler, 2005).

En la siguiente etapa, el alineamiento de las secuencias obtenidas en este estudio, versus los alelos tipo reportados por Criscione et al., 2007 comprobó la variedad y alta diversidad en los loci de microsatélites (Brinkman, Klintschar, Franz & Rolf, 1998).

El resultado del análisis de mutaciones puntuales en la Figura 7 confirman que las transiciones (T↔C, A↔G) se producen a frecuencias más altas que las transversiones (Wakeley, 1996). Más aún, las mutaciones C→T son más frecuentes que los cambios T→C coincidiendo con el estudio de Hall, 1991. Estas interrupciones son importantes porque se ha observado que los STR se pueden estabilizar mediante inserciones de una composición de nucleótidos diferente (Fan & Chu, 2007; Hile & Eckert, 2008). Se ha propuesto también que las variaciones de la secuencia en los microsatélites tienen un papel positivo en la evolución mostrando efectos fenotípicos en la variación de la longitud de los microsatélites (Rothenburg, Koch-Nolte, Rich, & Haag, 2001). Por ejemplo, en algunas bacterias patógenas se ha demostrado un alto grado de variación en los genes de contingencia (localizados en regiones STRs), estas

secuencias en estos genes pueden mutar y cambiar la expresión de algunas proteínas. Estas proteínas no son necesarias para la viabilidad de las bacterias, pero pueden ayudar a evadir el sistema inmunológico del hospedero (Fan & Chu, 2007). Asimismo, estudios de modelos evolutivos de microsatélites proponen que las distribuciones de los STRs alrededor del genoma reflejan un equilibrio entre las mutaciones dentro de un alelo (Kruglyak et al., 1998).

En este estudio se los reportó a la nomenclatura del SNP dependiendo del código IUPAC respecto a cada nucleótido degenerado, por ejemplo la designación “Y” en la muestra ASCF4 en el locus ALAC08 en la posición 181 pb.

Se propone también la designación alélica de los loci homocigotos secuenciados y los reportados en Criscione et al., 2007 (Tabla 9). Además, el tipo de estructura y de repetición para secuencias de STRs de *Ascaris* spp. Además, se denota un cambio en la estructura de repetición del locus ALGA32, en el que Criscione et al., reporta al STR como (AC)_n, sin embargo, luego de analizar su composición se determina su motivo como *Compound with nonconsensus alleles* por su patrón tetranucleótido con repeticiones incompletas y microvariantes (Urquhart et al., 1994). Las repeticiones de tetranucleótidos son más sencillas de definir en términos de nomenclatura que las repeticiones de dinucleótidos. En el caso del locus ALGA15 es una mezcla de repeticiones tetra y dinucleótidos incompletos. Se decide designar el motivo de repetición como tetranucleótido (a diferencia del dinucleótido reportado por Criscione et al., 2007), a los dinucleótidos como microvariantes de repeticiones medias y luego .1, .2, .3 para repeticiones incompletas. Así, en ASCF4 se tiene 40 repeticiones de dinucleótidos más 6 tetranucleótidos obteniendo la designación alélica de 26. Por otro lado, se presenta un caso de *isoalelos* en el locus ALGA32 con la muestra ASCF2 y la secuencia de referencia DQ988860, ya que ambas tienen designaciones alélicas de 16,2 repeticiones pero su secuencia interna es diferente. Este tipo de variante puede contener unidades de repetición en los que el orden de STRs cambia en alelos de una misma longitud (Butler, 2015). Además, se observa que las repeticiones de dinucleótidos tienen mayor mutación e inespecificidades que las secuencias con repeticiones trinucleótidas o tetranucleóticas, esto concuerda con el estudio de Chakraborty, 1997. Por otro lado, al relacionar los perfiles obtenidos en este estudio se observa que las

secuencias *Compound consisting* y *Complex repeats* tienen menos inespecificidad tipo *stutter*. En algunas ocasiones en loci con secuencias de microvariantes (ALGA32, ALGA44, ALTN02, ALAC32 y ALGA15) también se comprueba el bajo porcentaje de *stutter* como menciona Butler, 2005.

Los perfiles alélicos aquí mostrados comprueban el mayor potencial para la PCR multiplex como un medio de optimización del número de reacciones que pueden llevarse a cabo simultáneamente ahorrando recursos y menor esfuerzo.

Finalmente, los datos de análisis de marcadores por GenAlEx señalan que todos los marcadores menos uno, poseen un índice cercano a 0,6 confirmando la utilidad de los mismo mediante la revisión bibliográfica (Moges et al., 2016). Además, se muestra la frecuencia alélica de ALA08 y ALGA15 con el objetivo de comparar el contraste de una alta incidencia de diversidad en varios loci. Asimismo, la utilizada de la comparación de las frecuencias alélicas y análisis de diversidad en marcadores, radica en la optimización de la multiplex; ya que en futuros ensayos se podría determinar los marcadores mejores y rediseñar una sola multiplex con los indicadores más informativos. Adicionalmente, en la tabla de diversidad de marcadores se puede notar una columna con el nombre de I que refiere al Índice de Shannon. Este consiste en determinar la diversidad de las especies que se estudian o individuos en base a rangos y comparaciones. Este es un índice de diversidad que mide la riqueza y cantidad relativa de las especies (Beovides, 2006). Los rangos de este índice van entre 0,5 y 5, donde el valor normal de diversidad se halla entre 1 y 3. Estos datos de diversidad de genética de poblaciones aplicados al análisis de marcadores sirvieron para conocer la extensibilidad de la utilidad de los 14 microsatélites aplicados al estudio de la epidemiología molecular de *Ascaris* spp.

9. CONCLUSIONES

- Se estandarizó 2 sistemas de PCR multiplex que permiten detectar con éxito las diferentes variaciones alélicas en 14 loci de microsatélites (STRs) para *Ascaris* spp. obtenidos de parásitos adultos de cerdos.
- Los resultados del secuenciamiento Sanger mostraron plena concordancia entre los genotipos, se validaron los resultados obtenidos de STRs (tamaño, tipo y estructura) en cada locus y se propone la designación alélica para las muestras analizadas
- El porcentaje de mutaciones en las regiones de los microsatélites para interrumpir las repeticiones sugiere un mecanismo de estabilización y equilibrio en el genoma.

10. RECOMENDACIONES

- Los resultados obtenidos por medio de las Multiplex estandarizadas son preliminares, por lo que se recomienda analizar una muestra más grande e incorporar el análisis de parásitos adultos extraídos de humanos. Esto con el fin de evaluar y obtener variabilidad genética entre diferentes poblaciones de *Ascaris* spp. y determinar su diversificación de alelos. Además, al tener un número mayor de muestras y por ende más alelos, se podrá comparar la variabilidad genética y reordenar el diseño de las multiplex en una sola con los loci más informativos.
- Se recomienda identificar las muestras de parásito adulto de *Ascaris* spp. por edad y género. De esta forma se podrá identificar productos de PCR inespecíficos y relacionar loci de microsatélites (homocigotos) ligados al sexo.
- Se recomienda realizar ensayos con un menor tiempo de inyección o voltaje en la electroforesis capilar, con el fin de hacer más eficiente el proceso.
- Se recomienda estudiar más en detalle la dinámica de interrupciones en secciones de STRs ya que puede ser crucial para la comprensión de la estabilidad del genoma. Asimismo, analizar las regiones flanqueantes de los microsatélites puesto que se observó que mientras esta sección contenía un mayor número de bases de guaninas y citosinas, menor eran las mutaciones en las unidades de repetición (no presentado).
- Se recomienda probar las Multiplex estandarizadas con otra especie de parásito cercano como *Trichuris* spp. con el fin de verificar la especificidad del sistema.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alem, D., Narancio, R., Dellavalle, P. D., Rebuffo, M., Zarza, R., & Dalla Rizza, M. (2011). Molecular characterization of cultivars of *Lotus corniculatus* using transferable microsatellite markers. *Ciencia e Investigación Agraria*, 38(3), 453-461.
- Amos W (2010). Mutation biases and mutation rate variation around very short human microsatellites revealed by human-chimpanzee-orangutan genomic sequence alignments. *J. Mol. Evol.* 71: 192–201. doi:10.1007/s00239-010-9377-4
- Anderson, J. D., Williams-Blangero, S., & Anderson, T. J. C. (2003). Spurious genotypes in female nematodes resulting from contamination with male DNA. *Journal of Parasitology*, 89(6), 1232-1234.
- Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S. M., Loukas, A., Diemert, D., & Hotez, P. J. (2006). *Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm*. *The Lancet*, 367(9521), 1521-1532.
- Betson, M., & Stothard, J. R. (2016). *Ascaris lumbricoides* or *Ascaris suum*: What' s in a Name?. *Journal of Infectious Diseases*, 213(8), 1355-1356.
- Betson, M., Halstead, F. D., Nejsun, P., Imison, E., Khamis, I. S., Sousa-Figueiredo, J. C., ... & Stothard, J. R. (2011). A molecular epidemiological investigation of *Ascaris* on Unguja, Zanzibar using isoenzyme analysis, DNA barcoding and microsatellite DNA profiling. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(7), 370-379.
- Betson, M., Nejsun, P., Bendall, R. P., Deb, R. M., & Stothard, J. R. (2014). Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. *Journal of Infectious Diseases*, 210(6), 932-941.
- Betson, M., Nejsun, P., Llewellyn-Hughes, J., Griffin, C., Atuhaire, A., Arinaitwe, M., ... & Stothard, J. R. (2012). Genetic diversity of *Ascaris* in southwestern Uganda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(2), 75-83.
- Bilgiç, H. B., Karagenç, T., Simuunza, M., Shiels, B., Tait, A., Eren, H., & Weir, W. (2013). Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Experimental parasitology*, 133(2), 222-229.

- Biosystems, A. (2005). *Applied Biosystems 3130 and 3130xl Genetic Analyzers*. from Applied Biosystems https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_041990.pdf
- Boes, J., Eriksen, L., & Nansen, P. (1998). Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs isolated from worms expelled by pigs treated with albendazole, pyrantel pamoate, ivermectin or piperazine dihydrochloride. *Veterinary parasitology*, 75(2), 181-190.
- Brinkmann, Bernd; Klitschar, Michael; Neuhuber, Franz; Hühne, Julia; Rolf, Burkhard (1998) Mutation Rate in Human Microsatellites: Influence of the Structure and Length of the Tandem Repeat. *The American Journal of Human Genetics*. 62 (6): 1408–1415. doi:10.1086/301869. PMC 1377148
- Brooker, S., & Pullan, R. (2013). *Ascaris lumbricoides and ascariasis: estimating number infected and burden of disease*. pp. 343–362 in C. Holland (Ed.) *Ascaris: the neglected parasite*.
- Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Academic Press.
- Butler, J. M. (2015). *Advance topics in forensic DNA typing: interpretation*. Academic Press.
- Butler, J. M., Shen, Y., & McCord, B. R. (2003). The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *Journal of forensic sciences*, 48(5), 1054-1064.
- Butler, J., Kline, M., & Decker, A. (2008). Addressing Y-chromosome short tandem repeat allele nomenclature. *J. Genet. Geneal*, 4, 125-148.
- Cavallero, S., Snabel, V., Pacella, F., Perrone, V., & D'Amelio, S. (2013). Phylogeographical studies of *Ascaris* spp. based on ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(4), e2170.
- Cepon-Robins, T. J., Liebert, M. A., Gildner, T. E., Urlacher, S. S., Colehour, A. M., Snodgrass, J. J., ... & Sugiyama, L. S. (2014). Soil-transmitted helminth prevalence and infection intensity among geographically and economically distinct Shuar communities in the Ecuadorian Amazon. *Journal of Parasitology*, 100(5), 598-607.
- Chakraborty, R., Kimmel, M., Stivers, D. N., Davison, L. J., & Deka, R. (1997). Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(3), 1041-1046.
- Chung, D. (2004). *The development of novel STR miniplex primer sets for the analysis of degraded and compromised DNA samples* (Doctoral dissertation, Ohio University).

- Cooper, P. J., Chico, M. E., Bland, M., Griffin, G. E., & Nutman, T. B. (2003). Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 168(3), 313-317.
- Cooper, P., Walker, A. W., Reyes, J., Chico, M., Salter, S. J., Vaca, M., & Parkhill, J. (2013). Patent human infections with the whipworm, *Trichuris trichiura*, are not associated with alterations in the faecal microbiota. *PloS one*, 8(10), e76573.
- Criscione, C. D., Anderson, J. D., Raby, K., Sudimack, D., Subedi, J., Rai, D. R., ... & Anderson, T. J. (2007). Microsatellite markers for the human nematode parasite *Ascaris lumbricoides*: development and assessment of utility. *Journal of Parasitology*, 93(3), 704-708.
- Criscione, C. D., J. D. Anderson, D. Sudimack, W. Peng, B. Jha, S. Williams-Blangero, and T. J. C. Anderson (2007) Disentangling hybridization and host colonization in parasitic roundworms of humans and pigs. *Proceedings of the Royal Society B* 274:2669-2677.
- Fan, H., & Chu, J. Y. (2007). A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 5(1), 7-14.
- Gettings, K. B., Aponte, R. A., Kiesler, K. M., & Vallone, P. M. (2015). The next dimension in STR sequencing: Polymorphisms in flanking regions and their allelic associations. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e121-e123.
- Gibbons LM, Jacobs DE, Fox MT (2011) *La Guía RVC/FAO para el diagnóstico parasitológico veterinario. Examen fecal para determinación de helmintos parásitos.*
http://www.rvc.ac.uk/Review/Parasitology_Spanish/Index/Index.htm (verificado el 17 de Diciembre de 2017).
- Griffiths, R. A. L., Barber, M. D., Johnson, P. E., Gillbard, S. M., Haywood, M. D., Smith, C. D., ... & Gill, P. (1998). New reference allelic ladders to improve allelic designation in a multiplex STR system. *International journal of legal medicine*, 111(5), 267-272.
- Hall, A., Hewitt, G., Tuffrey, V., & De Silva, N. (2008). A review and meta-analysis of the impact of intestinal worms on child growth and nutrition. *Maternal and Child Nutrition*, 4(SUPPL.1), 118-236.
- Hall, B. G. (1991). Spectrum of mutations that occur under selective and non-selective conditions in *E. coli*. *Genetica*, 84(2), 73-76.

- Hao, W., Wang, S., Liu, H., Zhou, B., Wang, X., & Jiang, T. (2015). Development of SSR Markers and Genetic Diversity in White Birch (*Betula platyphylla*). *PLoS ONE*, 10(4), e0125235. doi.org/10.1371/0125235
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23(3), 504-511.
- Hile, S. E., & Eckert, K. A. (2008). DNA polymerase kappa produces interrupted mutations and displays polar pausing within mononucleotide microsatellite sequences. *Nucleic acids research*, 36(2), 688-696.
- Holterman, M. (2006). Phylum-Wide Analysis of SSU rDNA Reveals Deep Phylogenetic Relationships among Nematodes and Accelerated Evolution toward Crown Clades. *Molecular Biology and Evolution*, 23(9), 1792-1800.
- Hu, W., Wu, S., Yu, X., Abullahi, A. Y., Song, M., Tan, L., ... & Li, G. (2015). A multiplex PCR for simultaneous detection of three zoonotic parasites *Ancylostoma ceylanicum*, *A. caninum*, and *Giardia lamblia* assemblage A. *BioMed research international*, 2015.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., & Sninsky, J. J. (Eds.). (1999). *PCR applications: protocols for functional genomics*. Academic Press.
- Jacobsen, K. H., Ribeiro, P. S., Quist, B. K., & Rydbeck, B. V. (2007). Prevalence of intestinal parasites in young Quichua children in the highlands of rural Ecuador. *Journal of Health, Population and nutrition*, 399-405.
- James, H. R., Kelly, L. A., Pochan, S. L., Commins, S. P., Workman, L. J., Nganga, L. W., ... & Platts-Mills, T. A. E. (2012). Parasite-related IgE Antibodies, Including IgE to Galactose-alpha-1, 3-galactose, in Sera from Virginia and Ecuador. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(2), AB82.
- Kent, W. J. (2002) The BLAST-like alignment tool. The BLAST server is available at ENSEMBL(<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>). *Genome Res*, 12(4), 656-64.
- Kruglyak, S., Durrett, R. T., Schug, M. D., & Aquadro, C. F. (1998). Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), 10774-10778.
- Leles, D., Gardner, S. L., Reinhard, K., Iñiguez, A., & Araujo, A. (2012). Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species?. *Parasites & vectors*, 5(1), 42.

- Linnaeus, C. V. (1758). *Systema Naturae*, edition X, vol. 1 (*Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata*). Holmiae Salvii, 824.
- Liu, G. H., Wu, C. Y., Song, H. Q., Wei, S. J., Xu, M. J., Lin, R. Q., ... & Zhu, X. Q. (2012). Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene*, 492(1), 110-116.
- Manel, Stéphanie; Schwartz, Michael K.; Luikart, Gordon; Taberlet, Pierre (2003). "Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics". *Trends in Ecology & Evolution*. 18 (4): 189–197. doi:10.1016/S0169-5347(03)00008-9
- Mansfield, *et al.* (1993) Alternative labeling techniques for automated fluorescence based analysis of PCR products. *BioTechniques* 15: 274-279.
- Menzies, S. K., Rodriguez, A., Chico, M., Sandoval, C., Broncano, N., Guadalupe, I., & Cooper, P. J. (2014). Risk factors for soil-transmitted helminth infections during the first 3 years of life in the tropics; findings from a birth cohort. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(2), e2718.
- Moges, A. D., Admassu, B., Belew, D., Yesuf, M., Njuguna, J., Kyalo, M., & Ghimire, S. R. (2016). Development of Microsatellite Markers and Analysis of Genetic Diversity and Population Structure of *Colletotrichum gloeosporioides* from Ethiopia. *PLoS ONE*, 11(3), e0151257.
- Nansen, P., & Roepstorff, A. (1999). Parasitic helminths of the pig: Factors influencing transmission and infection levels. *International Journal for Parasitology*, 29(6), 877-891.
- Olson, M. E., & Guselle, N. (2000). Are pig parasites a human health risk? *Adv Pork Production*, 11, 153-162.
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539
- Plorde, J. J. (2004). *Intestinal nematodes*. In K. J. Ryan, & C. G. Ray (Eds.), *Sherris Medical Microbiology, an Introduction to Infectious Disease* (4th ed., pp. 763-777). USA: McGraw-Hill.
- Rinne, S., Rodas, E. J., Galer-Unti, R., Glickman, N., & Glickman, L. T. (2005). Prevalence and risk factors for protozoan and nematode infections among children in an Ecuadorian highland community. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(8), 585-592.

- Rothenburg, S., Koch-Nolte, F., Rich, A., & Haag, F. (2001). A polymorphic dinucleotide repeat in the rat nucleolin gene forms Z-DNA and inhibits promoter activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16), 8985-8990.
- Sackey, M. E. (2001). *Intestinal Parasitic Infection: Prevalence, Risk Factors and Consequences for Child Growth, Iron Status and Development in Rural Ecuador* (Doctoral dissertation, Virginia Tech).
- Sheorey, H., Biggs, B. A., & Traynor, P. (2007). Nematodes. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 2144-2155.). Washington, D.C.: ASM press.
- Søe, M. J., Kapel, C. M., & Nejsum, P. (2016). *Ascaris* from humans and pigs appear to be reproductively isolated species. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(9), e0004855.
- Søe, M. J., Nejsum, P., Fredensborg, B. L., & Kapel, C. M. O. (2015). DNA typing of ancient parasite eggs from environmental samples identifies human and animal worm infections in Viking-age settlement. *The Journal of parasitology*, 101(1), 57-63. 650.1 PMID: 25357228
- Sparks, A. M., Betson, M., Oviedo, G., Sandoval, C., Cooper, P. J., & Stothard, J. R. (2015). Characterization of *Ascaris* from Ecuador and Zanzibar. *Journal of helminthology*, 89(4), 512.
- St Georgiev, V. (2001). *Pharmacotherapy of ascariasis*. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2(2), 223-239.
- Tautz D., Schlötterer C. (1994). *Simple sequences*. *Current Opinion in Genetics & Development*. 4 (6): 832–837. doi:10.1016/0959-437X(94)90067-1. PMID 7888752.
- Turnpenny P, Ellard S (2005). *Emery's Elements of Medical Genetics* (12th ed.). London: Elsevier.
- Urquhart, A., Kimpton, C. P., Downes, T. J., & Gill, P. (1994). Variation in short tandem repeat sequences—a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *International journal of legal medicine*, 107(1), 13-20.
- van Wagenberg, C. P. A., Backus, G. B. C., Kuiper, W. E., van der Vorst, J. G. A. J., & Urlings, H. A. P. (2010). Incentive mechanisms for liver lesion control in finishing pigs in the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*, 93(1), 19-24.
- Vasco, K., Graham, J. P., & Trueba, G. (2016). Detection of zoonotic enteropathogens in children and domestic animals in a semirural community in Ecuador. *Applied and environmental microbiology*, 82(14), 4218-4224.

- Wakeley, J. (1996). The excess of transitions among nucleotide substitutions: new methods of estimating transition bias underscore its significance. *Trends in ecology & evolution*, 11(4), 158-162.
- World Health Organization. (1996). *Report of the WHO Informal Consultation on the use of Chemotherapy for the Control of Morbidity Due to Soil-Transmitted Nematodes in Humans*. Geneva
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. doi:10.1186/1471-2105-13-134
- Zhou Chun-Hua, PENG Wei-Dong (2012). Genetic diversity of *Ascaris* with the shared genotype G2 from humans and pigs in China. *Chinese Journal of Zoonoses*, 28(11): 1093-1097.
- Zhou, C., Li, M., Yuan, K., Deng, S., & Peng, W. (2012). Pig *Ascaris*: an important source of human ascariasis in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(6), 1172-1177.
- Zhou, C., Yuan, K., Tang, X., Hu, N., & Peng, W. (2011). Molecular genetic evidence for polyandry in *Ascaris suum*. *Parasitology research*, 108(3), 703-708.

12. TABLAS

Tabla 1. Coordenadas de las muestras de heces tomadas en este estudio en Otón de Vélez-Yaruquíes. Las banderas azules muestran los puntos en los cuales los exámenes coproparasitarios dieron negativo a la presencia de huevos de *Ascaris* spp., las banderas rojas muestran resultados positivos.

Nombre de Coordenada en el Mapa	SIMBOLO EN MAPA	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD(m)
FYR001	Bandera Roja	-0.099912956	-78.348.795.008	2403.9
FYR002	Bandera Azul	-0.107162632	-78.348.228.307	2383.7
FYR003	Bandera Azul	-0.109102959	-78.347.915.830	2400.5
FYR004	Bandera Azul	-0.108610690	-78.346.317.736	2401.7
FYR005	Bandera Azul	-0.112699298	-78.347.432.530	2407.7
FYR006	Bandera Roja	-0.114607690	-78.348.221.267	2403.2
FYR007	Bandera Roja	-0.115381172	-78.347.999.062	2408.5
FYR008	Bandera Azul	-0.115187969	-78.347.514.085	2408.5
FYR009	Bandera Azul	-0.120493211	-78.347.855.480	2415.2
FYR010	Bandera Azul	-0.121068293	-78.347.480.139	2419.3
FYR011	Bandera Azul	-0.121377921	-78.347.790.521	2418.3
FYR012	Bandera Azul	-0.125112059	-78.346.247.328	2407.0
FYR013	Bandera Roja	-0.125234099	-78.346.588.304	2419.7
FYR014	Bandera Roja	-0.125563759	-78.345.892.942	2325.5
FYR015	Bandera Azul	-0.125947064	-78.346.989.462	2420.0
FYR016	Bandera Azul	-0.125791831	-78.346.996.587	2418.8
FYR017	Bandera Azul	-0.126586687	-78.345.378.879	2421.9
FYR018	Bandera Azul	-0.126500688	-78.345.047.459	2423.8
FYR019	Bandera Azul	-0.126360375	-78.344.448.069	2427.0
FYR020	Bandera Azul	-0.127073256	-78.345.011.165	2429.1
FYR021	Bandera Azul	-0.127951093	-78.344.808.072	2401.7
FYR022	Bandera Azul	-0.128816441	-78.344.159.313	2422.6
FYR023	Bandera Azul	-0.129022719	-78.343.705.013	2384.7
FYR024	Bandera Azul	-0.129833668	-78.344.018.748	2422.6
FYR025	Bandera Azul	-0.129649770	-78.343.713.898	2319.8
FYR026	Bandera Roja	-0.129330251	-78.343.079.807	2425.5
FYR027	Bandera Azul	-0.130704297	-78.343.263.874	2437.5
FYR028	Bandera Azul	-0.131049464	-78.342.998.419	2445.7
FYR029	Bandera Roja	-0.131967617	-78.342.744.028	2444.7
FYR030	Bandera Azul	-0.131702749	-78.342.320.323	2453.6
FYR031	Bandera Azul	-0.131302262	-78.341.766.279	2447.4
FYR032	Bandera Azul	-0.132198287	-78.342.524.506	2436.8
FYR033	Bandera Azul	-0.132554686	-78.343.083.160	2443.3
FYR034	Bandera Azul	-0.134184295	-78.341.082.651	2447.6
FYR035	Bandera Azul	-0.134172142	-78.340.999.922	2447.9

Tabla 2. Resultados de los exámenes coproparasitarios para *Ascaris* spp. en muestras de heces de cerdos. 1: significa un resultado positivo y 0: negativo. Para que una muestra sea positiva bastó que tenga uno varios huevos con la morfología aparente del nematodo en estudio. Las muestras y este análisis fueron realizados en el mismo año 2016.

Muestra No.	# de muestras por casa/ CÓDIGO	Resultado Coproparasitario	Nombre de Coordenada en el Mapa de Otón de Vélez
1	1,1	1	FYR001
2	1,2	1	
3	2	0	FYR002
4	3,1	0	FYR003
5	3,2	0	
6	4,1	0	FYR004
7	4,2	0	
8	5	0	FYR005
9	6	1	FYR006
10	7,1	1	FYR007
11	7,2	1	
12	8,1	0	FYR008
13	8,2	0	
14	8,3	0	
15	9,1	0	FYR009
16	9,2	0	
17	10,1	0	FYR010
18	10,2	0	
19	10,3	0	
20	11,1	0	FYR011
21	11,2	0	
22	12,1	0	FYR012
23	12,2	0	
24	13	1	FYR013
25	14	1	FYR014
26	15,1	0	FYR015
27	15,2	0	
28	15,3	0	
29	16,1	0	FYR016
30	16,2	0	
31	17,1	0	FYR017
32	17,2	0	
33	18	0	FYR018

34	19	0	FYR019
35	20	0	FYR020
36	21	0	FYR021
37	22	0	FYR022
38	23	0	FYR023
39	24	0	FYR024
40	25	0	FYR025
41	26	1	FYR026
42	27	0	FYR027
43	28	0	FYR028
44	29	1	FYR029
45	30	0	FYR030
46	31	0	FYR031
47	32	0	FYR032
48	33	0	FYR033
49	34	0	FYR034
50	35	0	FYR035

Tabla 3. Información de parámetros para la selección de primers de loci de microsatélites de *Ascaris* spp. utilizados en este estudio. 5 diferentes estudios con parámetros: Ho= Heterocigocidad Observada, HE= Heterocigocidad Esperada y PIC= Contenido de Información polimórfica para los marcadores utilizados. A: Criscione et al., (2007); B: Betson et al., (2012); C: Betson et al., (2011); D: Zhou & Peng, (2012); E: Criscione, Anderson, Sudimack, Peng, Williams-Blangero, & Anderson, (2007). n/a se utilizó para los estudios que no dispongan información o no aplique para los STRs seleccionados.

Comparación de estudios que han utilizado marcadores de microsatélites con indicadores de Ho= Heterocigocidad Observada, HE= Heterocigocidad Esperada y PIC= Contenido de Polimórfica															
LOCUS/PRIMER	A			B			C			D				E	PROMEDIO Número de Alelos
	Ho	HE	Número de Alelos	Ho	HE	Número de Alelos	Ho	HE	Número de Alelos	Ho	HE	Número de Alelos	PIC	Número de Alelos	
ALAC07 (1)	0.759	0.828	18	0.79	0.81	16	0.80	0.88	17	0.362	0.847	7	0.822	27	17
ALAC08 (2)	0.759	0.814	25	0.79	0.88	27	n/a	n/a	n/a	0.623	0.928	13	0.915	25	22
ALAC09 (3)	0.731	0.770	14	0.76	0.88	16	0.71	0.84	11	0.683	0.869	12	0.848	16	14
ALGA15 (4)	0.824	0.873	15	0.73	0.81	27	n/a	n/a	n/a	0.741	0.872	5	0.854	26	18
ALGA31 (5)	0.852	0.813	16	0.71	0.82	17	n/a	n/a	n/a	0.258	0.410	7	0.400	21	15
ALGA32 (6)	0.889	0.900	23	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.435	0.884	21	0.871	34	26
ALGA48 (7)	0.667	0.746	12	0.59	0.75	15	0.48	0.75	12	0.500	0.836	7	0.816	26	14
ALTN04 (8)	0.722	0.750	13	0.45	0.47	13	0.63	0.67	16	0.698	0.934	16	0.922	21	16
ALAC01 (9)	0.870	0.945	26	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.414	0.906	15	0.892	32	24
ALAC32 (10)	0.833	0.823	20	0.77	0.84	15	n/a	n/a	n/a	0.898	0.910	6	0.894	24	16
ALGA20 (11)	0.880	0.937	31	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.542	0.893	7	0.878	39	26
Locus 010 (12)	0.870	0.892	19	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.386	0.883	15	0.868	23	19
ALGA44 (13)	0.639	0.725	9	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.812	0.825	5	0.798	15	10
ALTN01 (14)	0.796	0.816	15	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.922	0.933	21	0.922	26	21
ALTN02 (15)	0.546	0.566	10	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.467	0.862	10	0.845	18	13
ALGA47 (16)	0.843	0.896	20	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.683	0.941	14	0.931	37	24

Tabla 4. Secuencias de 16 primers de microsatélites para *Ascaris* spp. utilizados en este estudio. El par de primer ALAC08 es el único modificado de los reportados en Criscione et al., 2007, por la adición de 1 pb en el extremo 3'.

LOCUS/NOMBRE PRIMER	FORWARD* (5'→3')	REVERSE (5'→3')	CODIGO ACCESO GENBANK	SECUENCIA DE UNIDAD DE REPETICIÓN
ALAC07 (1)	^V AATCGTGTTCCTTTGAAGTGG	AACACGCTGAAATTGAAACT	DQ988847	(GT)n
ALAC08 (2)	^P CATTAATTGCAAAGCACAGAG	CGATTTTGCTGGCTATAGTTI	DQ988848	(AC)n
ALAC09 (3)	^F TGCAAATTTTACTATTTTAGCGTTT	GATAATTTTCATGCCCTACTTGAG	DQ988849	(GT)n
ALGA15 (4)	^P TTGGATGTTCTCATCTCATCTC	ATGAGGAGCCATCACATTTT	DQ988855	(GA)n
ALGA31 (5)	^F CGCTTTCTTTAATAACGCATA	TGATGCATAAAAAGAAGTGATT	DQ988859	(TC)n
ALGA32 (6)	^V CGTTCGCTCTAAAGAAATCA	AAAATAAACACAGCCTTCCA	DQ988860	(TC)n
ALGA48 (7)	^N AGAAATTTTCCAACCGTTTTT	TTGTGTTGGTTCCTCATTTG	DQ988864	(CT)n(CA)n
ALTN04 (8)	^P TAATTAGTGACAGCCGGAGT	TTGGTCGCAAGAGTTAGAAT	DQ988869	(TTTG)n
ALAC01 (9)	^P TGCCGGAATTTTATCTTCAA	TGATCGACTGTCTATGCAAACC	DQ988845	(AC)n
ALAC32 (10)	^F AACGCTGCCACACCAGTATC	ACCTGCGCACATCAAGAC	DQ988853	(GT)n
ALGA20 (11)	^F ATTGTTCCGTTGCTGGAAAG	TATACCCACCCTTTCGCCTA	DQ988857	(GA)n
Locus010 (12)	^{NR} AACGTAATTTTCATGCTGCT	AGGACTTGTTTTGACAGTGG	DQ988872	(GA)n
ALGA44 (13)	^{NR} GCTGGAGACGCAACTAGATA	CAACCAATTTTGCAGATCA	DQ988862	(GA)n
ALTN01 (14)	^N CGTGACACTCAGACAAATCA	TGTTAATTCGATGAAAATGC	DQ988866	(CAA)n
ALTN02 (15)	^V CAAACGGCACTATGAAAA	ATATCGATTGGCTCATCAAC	DQ988867	(TTTG)n
ALGA47 (16)	^V AAGTTGGGCTATTTTCCACA	AAACGACAATGAACGGAAAT	DQ988863	(GA)n

*El superíndice al inicio de la dirección 5' en las secuencias de primers forward, indica el marcaje con el fluoróforo (F-6FAM, P-PET, V-VIC, N-NED, NR-NED-repl.).

Tabla 5. Rango alélicos reportados en la literatura actual. Se muestra el tamaño del amplicón desde el más alto registrado al más bajo. Las referencias de los números significan 1: Criscione et al., (2007); 2: Betson et al., (2011); 3: Betson et al., (2012); 4: Criscione, Anderson, Sudimack, Peng, Williams-Blangero, & Anderson, (2007). n/a se utilizó para los estudios que no dispongan información o no aplique para los STRs seleccionados.

Rango alélicos observados para cada loci en 4 estudios. Se muestra el tamaño del amplicón desde el más alto registrado al más bajo.									
	1	2		3		4		LIMITES RANGOS	
LOCUS/PRIMER	Promedio de Rango (pb)	Rango menor (pb)	Rango mayor (pb)	Rango menor (pb)	Rango mayor (pb)	Rango menor (pb)	Rango mayor (pb)	RANGO MENOR (pb)	RANGO MAYOR (pb)
ALAC07 (1)	233	221	251	221	251	227	286	221	286
ALAC08 (2)	312	n/a	n/a	300	345	304	374	300	374
ALAC09(3)	200	182	214	182	210	186	232	182	232
ALGA15 (4)	306	n/a	n/a	286	345	289	343	286	345
ALGA31 (5)	297	n/a	n/a	291	318	294	344	291	344
ALGA32 (6)	184	n/a	n/a	99	145	147	229	99	229
ALGA48 (7)	218	202	233	191	227	192	242	191	242
ALTN04 (8)	193	148	216	148	216	150	232	148	232
ALAC01 (9)	246	n/a	n/a	n/a	n/a	184	254	184	254
ALAC32 (10)	129	n/a	n/a	n/a	n/a	107	157	107	157
ALGA20 (11)	234	n/a	n/a	n/a	n/a	208	338	208	338
Locus010 (12)	222	n/a	n/a	n/a	n/a	180	234	180	234
ALGA44 (13)	220	n/a	n/a	n/a	n/a	194	233	194	233
ALTN01 (14)	240	n/a	n/a	n/a	n/a	156	284	156	284
ALTN02 (15)	249	n/a	n/a	n/a	n/a	237	300	237	300
ALGA47 (16)	171	n/a	n/a	n/a	n/a	147	217	171	217

Tabla 6. Concentraciones finales para cada master mix en la miniplex 1 y 2. a) Concentraciones finales de los primers en la Miniplex 1 y Miniplex 2. b) Preparación de cada miniplex para este estudio con un volumen final de 20 μ l y 40 μ l para la Miniplex 1 y 2 respectivamente. Se muestran los cálculos y el volumen agregado de cada primer Forward y Reverse para llegar a cada concentración. La concentración observada de los Primer Forward fue de 100 μ M

a)

	Primers	CONCENTRACION FINAL MINIPLEX 1 (μ M)
1	ALTN01	1,60
2	ALGA32	2,39
3	ALGA31	4,07
4	ALTN02	1,40
5	ALAC08	3,11
6	ALAC09	6,68
7	ALTN04	0,45

	Primers	CONCENTRACION FINAL MINIPLEX 2 (μ M)
1	ALAC07	1,32
2	ALAC32	3,10
3	ALGA20	3,72
4	ALGA47	1,39
5	ALAC01	1,26
6	ALGA15	2,92
7	ALGA48	2,34

b)

VOLUMEN FINAL	FORWARD		REVERSE	
	VOLUMEN C/U PRIMERS (μ l)	CONCENTRACION OBSERVADA PRIMERS REV	VOLUMEN C/U PRIMERS (μ l)	
20,00	0,32	30,00	1,06	
20,00	0,48	10,00	4,79	
20,00	0,81	100,00	0,81	
20,00	0,28	10,00	2,79	
20,00	0,62	50,00	1,25	
20,00	1,34	30,00	4,46	
20,00	0,09	10,00	0,90	
	3,94		16,06	

VOLUMEN FINAL	FORWARD		REVERSE	
	VOLUMEN C/U PRIMERS (μ l)	CONCENTRACION OBSERVADA	VOLUMEN C/U PRIMERS (μ l)	
40,00	0,53	50,00	1,06	
40,00	1,24	100,00	1,24	
40,00	1,49	20,00	7,44	
40,00	0,56	10,00	5,55	
40,00	0,50	10,00	5,03	
40,00	1,17	30,00	3,90	
40,00	0,94	10,00	9,36	
	6,42		33,58	

Tabla 7.- Perfil térmico para PCR Multiplex para *Ascaris* spp. Se establecen las condiciones para la reacción de Multiplex PCR optimizadas.

	Valores de Temperatura	Tiempo	Ciclos/Veces
Denaturación Inicial	95 °C	15 min	1x
Denaturación	94 °C	45 segs	30x
Annealing	54,8 °C	1 min	30x
Extensión	72 °C	75 segs	30x
Elongación	72 °C	1 hora	1x
Storage/Pause	4 °C	10 mins	1x

Tabla 8. Secuencias de primers de STRs modificadas para secuenciación Sanger. Se diseñaron nuevos primers para 6 cebadores. Se muestra resalta las nuevas secuencias en la Tabla. Los 10 pares de primers restantes conservaron su secuencia ya descrita en la tabla 4; adicionalmente ninguno de los primers Forward tienen el marcaje del Fluorocromo.

LOCUS /NOMBRE PRIMER	FORWARD (5'→3')	REVERSE (5'→3')	CODIGO GENBANK	UNIDAD DE REPETICIÓN
ALAC08	<u>TCAACATTGAAGTATCGCTGTTT</u>	CGATTTTGCTGGCTATAGTTT	DQ988848	(AC)n
ALGA48	<u>CAATAAAGGAGAAATTTCCAACCG</u>	TTGTGTTGGTTCCTCATTG	DQ988864	(CT)n(CA)n
ALTN04	TAATTAGTGACAGCCGGAGT	<u>CCGCATATTTTCCCAGGCAG</u>	DQ988869	(TTTG)n
ALAC32	<u>ACAGAAGACCATTTGCTCTCG</u>	<u>TTACCGCGAGTATCGCATCC</u>	DQ988853	(GT)n
LOCUS010	<u>AGTAGAAAGTATTAGTGAGGGGTTT</u>	<u>GTTCGAGAAAAATGAGGACTTGT</u>	DQ988872	(GA)n
ALGA47	<u>CCGTTGAGTGTCTTCGTGGA</u>	<u>TGTCTATGTTTGGAACCGCTCA</u>	DQ988863	(GA)n

Tabla 9. Descripción de alelos observados por secuenciación Sanger en productos de la PCR en microsatélites. Se indica el tipo de repetición clasificado por Urquhart et al., 1994, así como la estructura de repetición y designación alélica siguiendo los parámetros establecidos por el Formato del ISFG. Las letras de color anaranjado representan el patrón en la literatura.

STR LOCUS	Acceso	Designación Alélica #	Estructura de la repetición	Tipo de repetición	Referencia
ALAC08	DQ988848	13	[AC] ₁₃	<i>Simple consisting</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF4	17	[AC] ₁₅ AT [AC]	<i>Compound consisting</i>	Este estudio
ALAC09	DQ988849	30	[GT] ₁₂ AT [GT] ₁₇	<i>Compound consisting</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF1	11	[GT] ₁₁	<i>Simple consisting</i>	Este estudio
ALGA31	DQ988859	22	[TC] ₄ CC [TC] CC [TC] ₁₅	<i>Compound consisting</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF4	17	[TC] ₄ TT [TC] ₂ TT [TC] ₂ TT [TC] ₆	<i>Compound consisting</i>	Este estudio
ALGA32	DQ988860	16,2	[TCTC] ₈ CC [TCTC] [TTTC] ₃ [TTTA] ₄	<i>Compound with nonconsensus alleles</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF3	9,2	[TCTC] ₂ TC [TTTC] ₆ [TTTA]	<i>Compound with nonconsensus alleles</i>	Este estudio
	ASCF2	16,2	[TCTC] ₂ TC [TTTC] ₁₃ [TTTA]	<i>Compound with nonconsensus alleles</i>	Este estudio
ALGA44	DQ988862	18,1	[GA] ₉ GG GA [GG] ₂ G [GA] ₅	<i>Compound with nonconsensus alleles</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF2	17,1	[GA] ₇ GG GA [GG] ₂ G [GA] ₆	<i>Compound with nonconsensus alleles</i>	Este estudio
ALTN01	DQ988866	27,1	[CAAA] ₂₂ TAAA A [CAAA] ₄	<i>Simple with nonconsensus alleles</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF6	18	[CAAA] ₁₈	<i>Simple consisting</i>	Este estudio
ALTN02	DQ988867	9,2	[TTTG] ₈ TT [TTTG]	<i>Simple with nonconsensus alleles</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF2	8,2	[TTTG] ₇ CT [TTTG]	<i>Simple with nonconsensus alleles</i>	Este estudio
ALTN04	DQ988869	17	[TTTG] ₅ TTTT [TTTG] ₁₁	<i>Compound consisting</i>	Este estudio

	ASCF4	9	[TTTG] ₆ CTTG [TTTG] ₂	<i>Compound consisting</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF3	5	[TTTG] ₅	<i>Simple consisting</i>	Este estudio
ALAC01	DQ988845	38	[AC] ₃₈	<i>Simple consisting</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF2	7	[AC] ₇	<i>Simple consisting</i>	Este estudio
ALAC07	DQ988847	11	[GT] ₁₁	<i>Simple consisting</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF3	7	[GT] ₇	<i>Simple consisting</i>	Este estudio
ALAC32	DQ988853	34,1	[GT] ₉ G [GT] ₄ AG TT TG [GT] ₁₁ [AT] ₃	<i>Compound with nonconsensus alleles</i>	Criscione et al. (2007)
	003	24,1	[GT] ₈ G [GT] ₇ AT [GT] ₇ [AT]	<i>Compound with nonconsensus alleles</i>	Este estudio
	ASCF2	27	[GT] ₁₃ AT [GT] ₁₀ [AT] ₃	<i>Compound consisting</i>	Este estudio
ALGA15	DQ988855	20,2	[GA] ₂₂ [GAAA] ₃ [GA] ₂ A G [GA] ₂ [GGGA] ₃ [GA] ₂	<i>Complex repeats</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF6	19,2	[GA] [*] ₂₂ [GAAA] ₂ [GA] [*] ₄ AG [GA] ₂ [GGGA] ₂ [GA] ₂	<i>Complex repeats</i>	Este estudio
	ASCF4	26	[GA] ₅ AA [GA] ₁₈ GG [GA] ₂ GC [GA] ₂ AA [GA] ₂ [GAAA] ₄ [GA] ₂ AG [GA] ₂ [GGGA] ₂ [GA] ₂	<i>Complex repeats</i>	Este estudio
ALGA20	DQ988857	29	[GA] ₂₉	<i>Simple consisting</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF7	31	[GA] ₁₁ TG TA [GA] ₁₈	<i>Compound consisting</i>	Este estudio
	004	17	[GA] ₈ TG TA [GA] ₇	<i>Compound consisting</i>	Este estudio
ALGA47	DQ988863	31	[GA] ₂ T [GA] ₂₀ G [GA] ₄	<i>Complex repeats</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF5	25	[GA] AA T [GA] ₁₉ G [GA] ₄	<i>Complex repeats</i>	Este estudio

ALGA48	DQ988864	37,1	[TT] ₄ [CT] ₆ TT [CT] ₁₀ [CA] ₆ {18bp} [AA] ₄ [TT] ₅ A [AA]	<i>Complex repeats</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF5	31	[TT] ₄ [CT] ₆ TT [CT] ₈ [CA] ₃ {18bp} [AA] ₄ [TT] ₄ [AA]	<i>Complex repeats</i>	Este estudio
	ASCF4	33,1	[TT] ₄ [CT] ₂ CA [CT] ₃ TT [CT] ₃ [CA] ₃ {18bp} [AA] ₂ [TT] ₁₀ T [AA]	<i>Complex repeats</i>	Este estudio
L010	DQ988872	29	[GA] ₂₉	<i>Simple consisting</i>	Criscione et al. (2007)
	ASCF4	9	[GA] ₂ GG [GA] ₆	<i>Compound consisting</i>	Este estudio

Tabla 10. Descripción de mutaciones puntuales en alelos observados de loci amplificados en microsatélites de *Ascaris* spp. Se consideran mutaciones por inserciones, deleciones, y sustituciones en los nucleótidos. Se toma como secuencia normal o “wild-type” a las secuencias reportadas por Criscione et al., 2007, de los loci en estudio. No se tomó en cuenta las variantes de las unidades de repetición. Adicionalmente se muestran algunos SNPs, Y= C o T, R= A o G, K= G o T.

STR LOCUS	Acceso	Mutation (Posición 5'→3')
ALAC08	DQ988848	<i>Referencia</i>
	ASCF4	C→Y (163), T→C (201), C→T (255), A→T (256), T→C (366), C→T (376)
ALAC09	DQ988849	<i>Referencia</i>
	ASCF1	T→C (80), T→Y (173), A→R (196)
ALGA31	DQ988859	<i>Referencia</i>
	ASCF4	AC (inserción en 61), C→T (80), C→T (86), C→T (92), T→C (152), T→C (194), C→T (280)
ALGA32	DQ988860	<i>Referencia</i>
	ASCF3	G (Delección 223), A→C(301), A→C(305), A→C(309), A (Delección 328), Y→T(329), GCA (Delección 349-351), C→A (356)

	ASCF2	G (Delección 154), A→C(260), A→C(264), A→C(268), A (Delección 287), Y→T(290), GCA (Delección 308-310), C→A (315)
ALGA44	DQ988862	<i>Referencia</i>
	ASCF2	A→C(159), G→A(169)
ALTN01	DQ988866	<i>Referencia</i>
	ASCF6	G→A(110), G→C(248), C→T (271)
ALTN02	DQ988867	<i>Referencia</i>
	ASCF2	T→C (185), C→G (227), T→C (137)
ALTN04	DQ988869	<i>Referencia</i>
	ASCF4	T→C (101), T→C (209)
	ASCF3	---
ALAC01	DQ988845	<i>Referencia</i>
	ASCF2	A→C(188)
ALAC07	DQ988847	<i>Referencia</i>
	ASCF3	G (Inserción 111), G→A(141), T→C(219), A→G(219)
ALAC32	DQ988853	<i>Referencia</i>
	003	G→T(164), T→G(165), T→G(167), G→T(168)
	ASCF2	G→A(150), G (Delección 154)
ALGA15	DQ988855	<i>Referencia</i>
	ASCF6	C→T (140), T→K(172), G→R(184), A→M(203), G→R(208), A→R(228), R→G(315)
	ASCF4	C→T (246), T→G(278), R→G(445)
ALGA20	DQ988857	<i>Referencia</i>
	ASCF7	---
	004	G→A(148)
ALGA47	DQ988863	---
	ASCF5	G→A(66)
ALGA48	DQ988864	<i>Referencia</i>
	ASCF5	G→A(135)
	ASCF4	T→A(101), A→T (178), G→A(189), C→T (201)
L010	DQ988872	<i>Referencia</i>
	ASCF4	A→G(92), C→A (122), T→C(153), A→G (157), G→T(211), A→G(275)

Tabla 11. Número de alelos efectivos y diferentes valores de heterocigidad de los loci analizados. Na= número de alelos diferentes, Ne= número de alelos efectivos, I = Índice de información de Shannon, Ho= Heterocigidad observada, He= Heterocigidad Esperada

Locus	No de Muestras	Na	Ne	I	Ho	He
ALAC08	7	10	7,000	2,144	0,7143	0,8571
ALAC09	7	3	2,513	0,992	0,7143	0,6020
ALGA31	7	6	3,267	1,468	0,7143	0,6939
ALGA32	7	6	5,444	1,748	0,5714	0,8163
ALTN01	7	8	5,158	1,866	0,7143	0,8061
ALTN02	7	6	4,083	1,569	0,7143	0,7551
ALTN04	7	7	4,083	1,673	0,5714	0,7551
ALAC01	7	9	6,533	2,045	0,5714	0,8469
ALAC07	7	5	3,379	1,376	0,4286	0,7041
ALAC32	7	8	6,125	1,946	0,7143	0,8367
ALGA15	7	3	2,649	1,035	0,5714	0,6224
ALGA20	7	8	6,125	1,946	0,8571	0,8367
ALGA47	7	8	4,900	1,829	0,7143	0,7959
ALGA48	7	6	3,769	1,537	0,5714	0,7347
Promedio	7	6,643	4,645	1,655	0,612	0,762

Tabla 12. Frecuencias alélicas por cada locus analizados en las población de cerdo

Locus	Alelo	Frecuencia en Población cerdos n=7
ALAC08	304	0,071
	310	0,071
	311	0,071
	316	0,071
	318	0,286
	320	0,143
	322	0,071
	324	0,071
	328	0,071
	332	0,071
ALAC09	183	0,357
	193	0,500
	195	0,143
ALGA31	290	0,500
	300	0,143
	302	0,071
	304	0,071
	310	0,143
	318	0,071
ALGA32	153	0,143
	161	0,143
	183	0,286
	193	0,143
	195	0,143
	200	0,143
ALTN01	160	0,357
	184	0,071
	196	0,071
	197	0,071

	198	0,143
	199	0,143
	202	0,071
	206	0,071
ALTN02	235	0,357
	247	0,286
	249	0,071
	251	0,143
	257	0,071
	291	0,071
ALTN04	150	0,143
	154	0,143
	166	0,429
	167	0,071
	176	0,071
	194	0,071
	196	0,071
ALAC01	184	0,286
	192	0,071
	199	0,071
	203	0,143
	210	0,071
	222	0,143
	224	0,071
	231	0,071
	234	0,071
ALAC07	225	0,286
	227	0,429
	231	0,071
	232	0,143
	235	0,071
ALAC32	113	0,071
	115	0,143
	119	0,143
	121	0,286

	123	0,071
	125	0,071
	131	0,071
	219	0,143
ALGA15	300	0,214
	302	0,500
	326	0,286
ALGA20	210	0,071
	212	0,071
	234	0,143
	236	0,143
	240	0,286
	246	0,143
	248	0,071
	260	0,071
ALGA47	163	0,071
	167	0,214
	169	0,357
	173	0,071
	175	0,071
	181	0,071
	194	0,071
	195	0,071
ALGA48	117	0,071
	193	0,071
	195	0,214
	205	0,429
	211	0,071
	223	0,143

Tabla 13. Posiciones de alelos en cada locus de los 14 marcadores en 7 muestras de parásitos de *Ascaris* spp. extraídos de cerdos. Formato de plantilla para el programa GenAIEx para análisis de marcadores codominantes con una población

Locus	Población	ALAC08		ALAC09		ALGA31		ALGA32		ALTN01		ALTN02		ALTN04	
ASCF1	Cerdos	320	320	183	183	290	302	183	183	202	160	247	257	154	166
ASCF2	Cerdos	318	322	183	193	290	300	183	183	160	160	247	247	154	176
ASCF3	Cerdos	310	316	183	193	290	304	153	153	184	197	235	235	150	150
ASCF4	Cerdos	318	318	183	193	290	290	195	195	196	206	249	291	166	166
ASCF5	Cerdos	318	332	195	193	290	300	161	161	160	199	235	251	166	194
ASCF6	Cerdos	304	311	195	193	290	318	193	193	198	198	235	251	167	196
ASCF7	Cerdos	324	328	193	193	310	310	200	200	160	199	235	247	166	166
		ALAC01		ALAC07		ALAC32		ALGA15		ALGA20		ALGA47		ALGA48	
ASCF1	Cerdos	184	192	225	227	121	125	300	302	240	248	169	169	195	205
ASCF2	Cerdos	184	184	225	235	121	121	300	302	210	240	169	181	195	195
ASCF3	Cerdos	199	231	227	227	115	119	300	326	240	260	163	167	117	223
ASCF4	Cerdos	224	234	232	232	219	219	326	326	240	246	167	195	193	223
ASCF5	Cerdos	184	210	227	231	115	131	302	326	212	234	169	169	205	205
ASCF6	Cerdos	222	222	227	227	119	123	302	302	234	246	173	175	205	205
ASCF7	Cerdos	203	203	225	225	113	121	302	302	236	236	167	194	205	211

13. FIGURAS

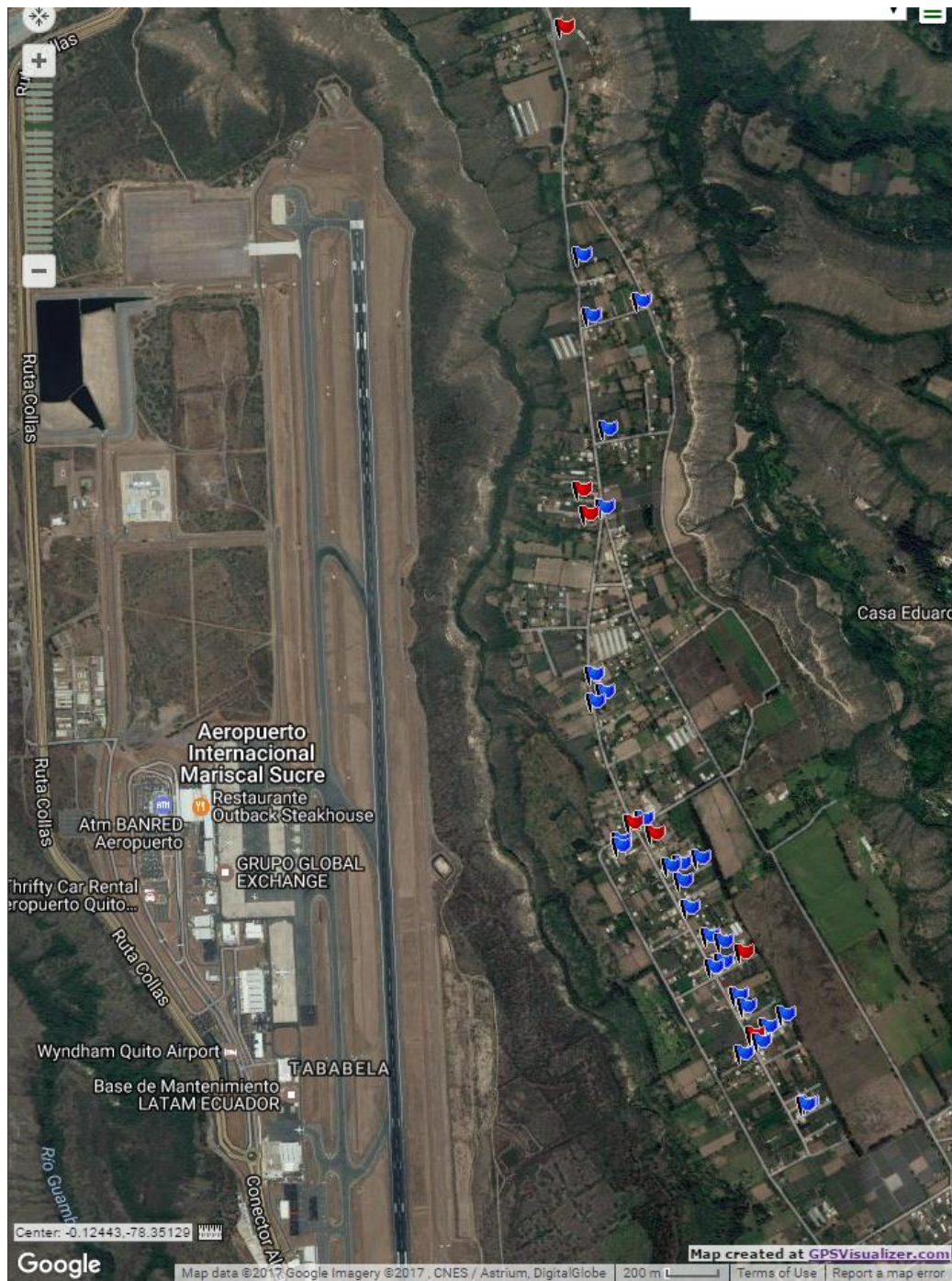


Figura 1. Mapa de la comunidad Otón de Vélez- Yaruquíes con los muestreados. Las banderas azules muestran los puntos en los cuales los exámenes coproparasitarios de los cerdos fueron negativos a la presencia de huevos de *Ascaris* spp. las banderas rojas muestran resultados positivos. El mapa claramente los puntos de infección de algunas casas por su proximidad.

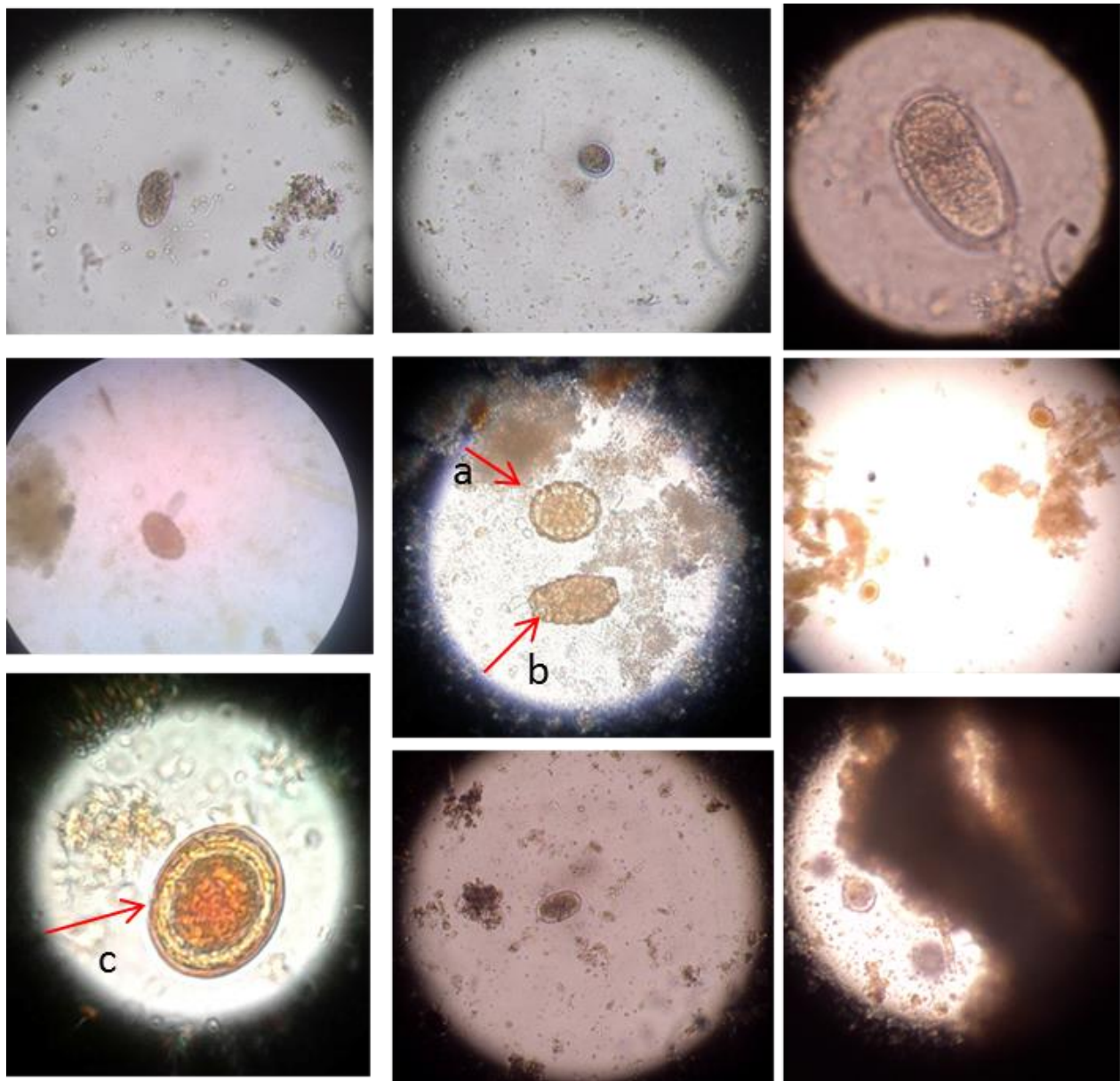
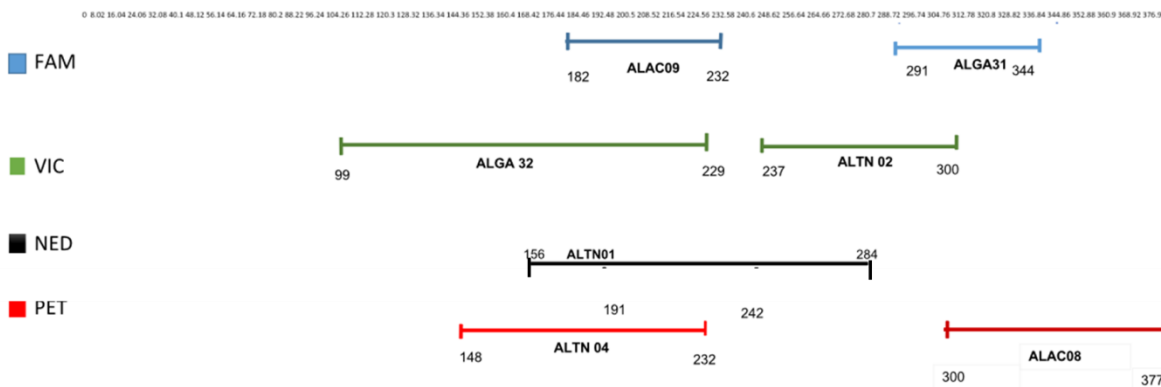


Figura 2. Micrografía de luz de huevos de *Ascaris* spp. para resultados identificados como positivos en coproparasitarios. Se puede apreciar en a) un huevo de *Ascaris* spp. fertilizado con una superficie rugosa alrededor, pintado de color marrón b) un huevo no fertilizado con su apariencia más alargada y c) un huevo fertilizado “decorticado” que muestra su revestimiento grueso y transparente y con una sola fase celular en su interior.

MINIPILEX 1



MINIPILEX 2

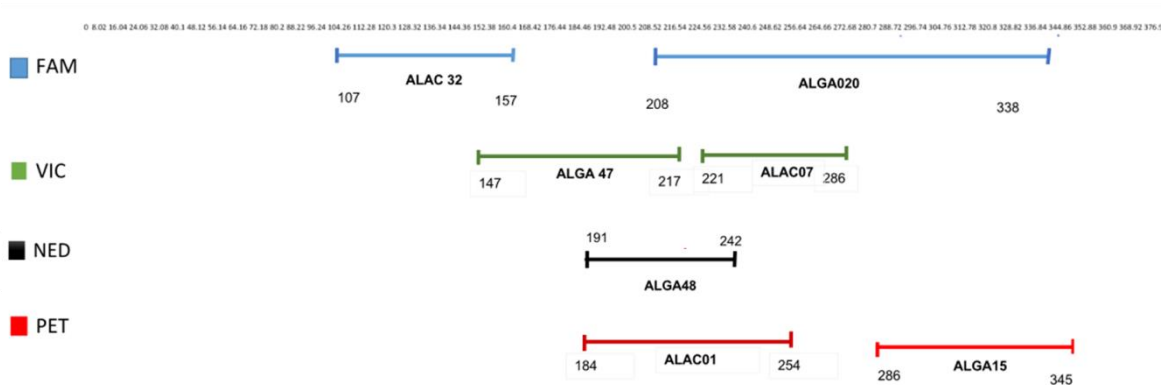


Figura 3. Mapa de diseño para 2 reacciones Multiplex PCR. Se presentan 2 miniplex con 7 loci de microsatélites para *Ascaris* spp. Cada Primer en su canal cromático está separado como mínimo entre 5-10 pb para evitar solapamiento de alelos.

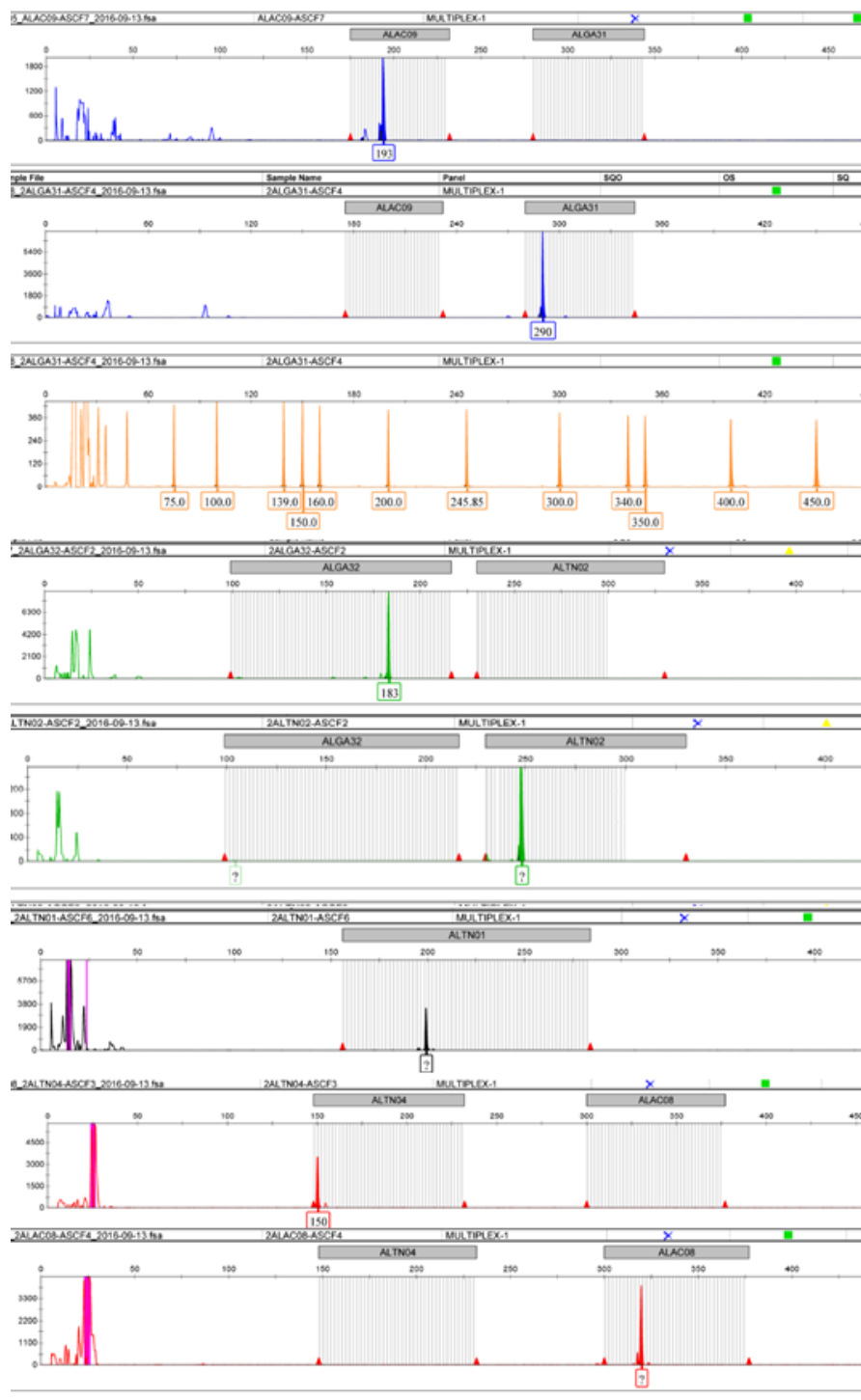


Figura 4. Perfiles alélicos de amplificaciones individuales de cada locus para la Miniplex 1 con diferentes muestras de ADN en electroforesis capilar. Se presenta los marcadores para microsatélites de ALAC09, ALGA31, ALGA32, ALTN02, ALTN01, ALTN04 y ALAC08. La muestra de ADN utilizado se describe en cada recuadro del marcador. Se muestra en el canal cromático naranja el patrón del peso molecular interno *GeneScan 500 LIZ*. Se utilizó 5 μ M de concentración inicial de cada primer Forward y Reverse en cada locus.

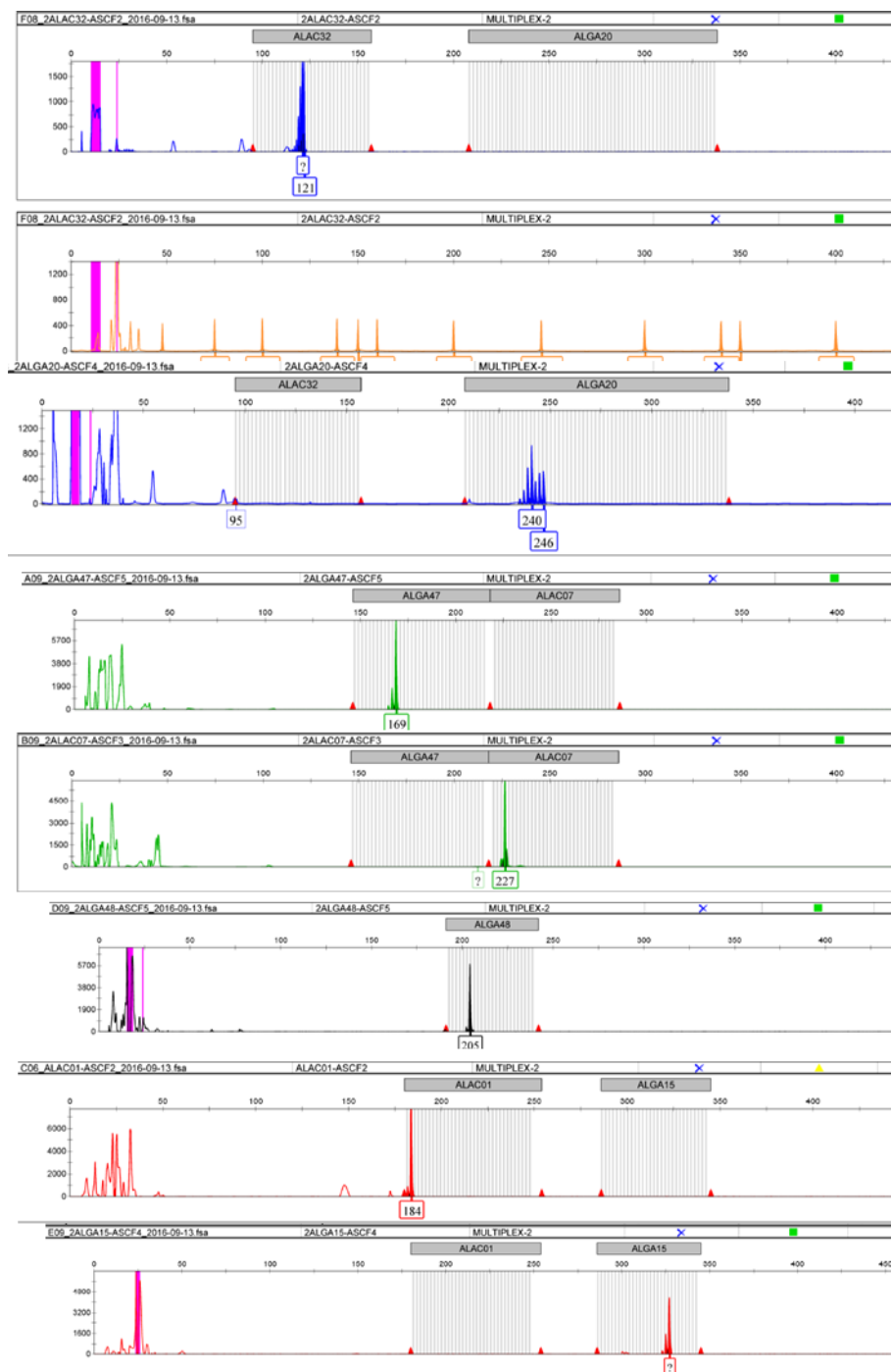


Figura 5. Perfiles alélicos de amplificaciones individuales de cada locus para la Miniplex 2 con diferentes muestras de ADN en electroforesis capilar. Se presenta los marcadores para microsatélites de ALAC09, ALGA31, ALGA32, ALTN02, ALTN01, ALTN04 y ALAC08. La muestra de ADN utilizado se describe en cada recuadro del marcador. Se muestra en el canal cromático naranja el patrón del peso molecular interno *GeneScan 500 LIZ*. Se utilizó 5 μ M de concentración inicial de cada primer Forward y Reverse en cada locus.

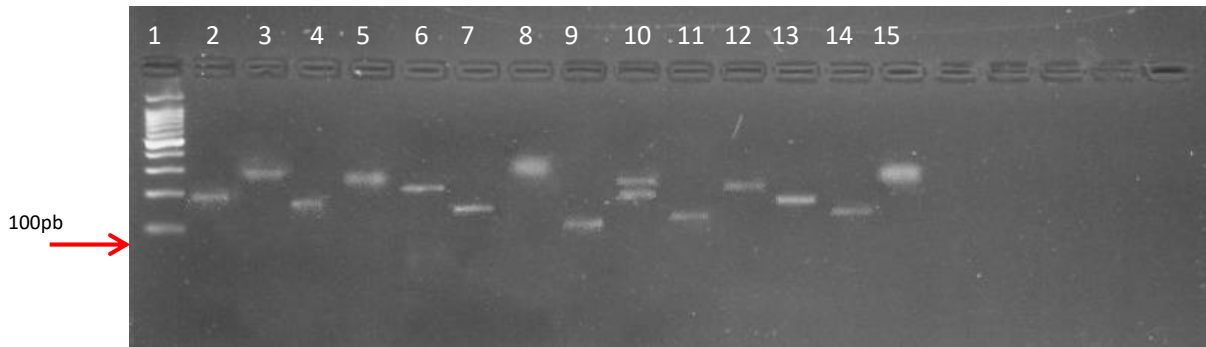


Figura 6. Amplificación de perfiles alélicos individuales de cada locus de la Miniplex1 y 2 con diferentes muestras de ADN revelados en gel de agarosa. La muestra de ADN utilizado se describe en cada recuadro del marcador de la figura 4 y 5. **Carril 1: ladder 100pb; 2: ALAC09; 3: ALGA31; 4: ALGA32; 5: ALTN02; 6: ALTN01; 7: ALTN04; 8: ALAC08; 9: ALAC32; 10: ALGA20; 11: ALGA47; 12: ALAC07; 13: ALGA48; 14: ALAC01; 15: ALGA15.** Se puede observar la doble banda del alelo heterocigoto para ALGA20

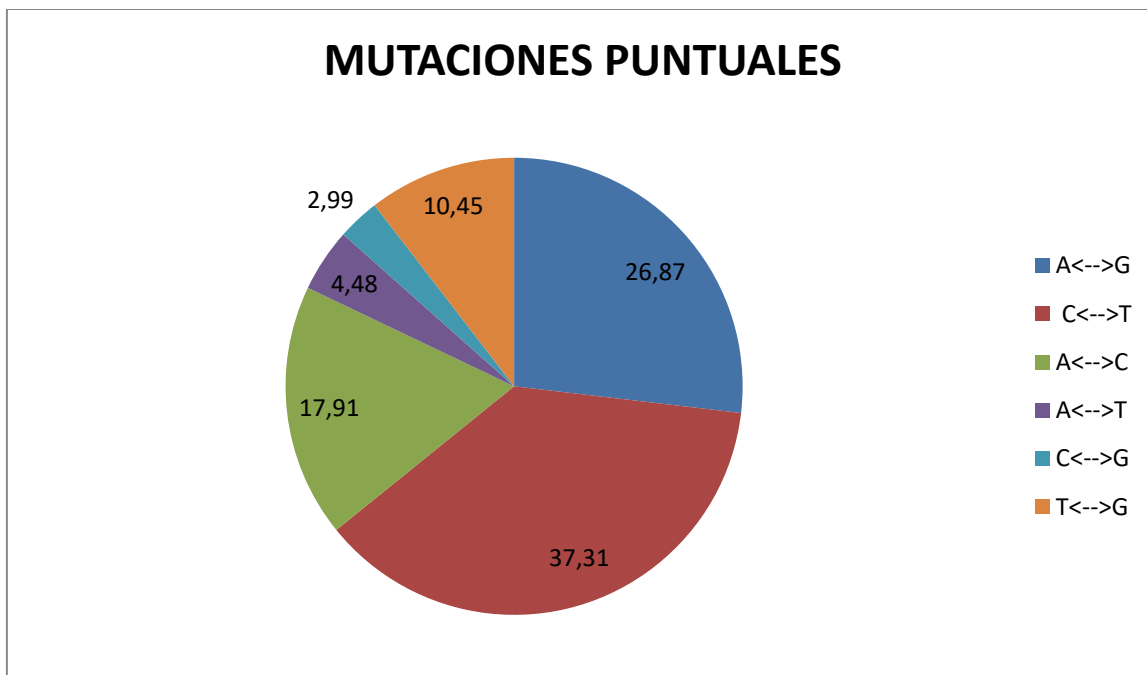


FIGURA 7. Distribución de transiciones y transversiones entre mutaciones puntuales de las regiones amplificadas de los microsatélites. Transición (A<-->G o C<-->T), Transversión (A<-->C, A<-->T, C<-->G, T<-->G). Se consideraron 67 mutaciones puntuales en los alelos observados en este estudio. Para calcular su frecuencia no se tomó en cuenta cambios en las secuencias por inserciones =3 y deleciones =11. Es decir, en total hubo 81 mutaciones puntuales.

14. ANEXOS

ANEXOS 1. Sitios donde habitan los cerdos criollos en Otón de Vélez- Yaruquí. Se puede apreciar el tipo de construcción precaria para su vivienda: Latas de zinc sujetas por un palo de arbusto, siendo amarrados por una sogá y cubiertos por una especie de tela carpa.



ANEXOS 2. Área de faenamiento de vísceras en la Empresa Pública Metropolitana de Rastros Quito (Camal Sur-Quito). Se puede observar mediante los indicadores a) los puestos de lavado y cortado de vísceras, b) el intestino delgado de los cerdos luego de ser procesado, c) el canal por donde bajan las vísceras para ser tratadas.

