

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS:

**Estandarización de Reacción en Cadena de la Polimerasa
en Tiempo Real para la detección de *Echinococcus spp.* en
ganado vacuno *Bos taurus*. Ayacucho, 2024**

Para optar el título profesional de:
BIÓLOGA, ESPECIALIDAD: MICROBIOLOGÍA

PRESENTADO POR:
Bach. Zuli PALOMINO ÑAUPAS

ASESOR:
Dr. José ALARCÓN GUERRERO

COASESOR:
Dr. Víctor Luis CÁRDENAS LÓPEZ

AYACUCHO - PERÚ

2026

Dedicatoria

A mis queridos padres, Flora y Honorato, porque el esfuerzo de cada día y su ejemplo fueron la huella que marcó este camino.

A Enrique, por su presencia serena, su comprensión y el ánimo que me brindó de manera incesante, lo que me ayudó a mantener el equilibrio y la motivación durante este proceso.

A mis hermanos, Liliam y Rony, porque su apoyo constante fue, y siempre será invaluable.

Y a Zenón, cuya ausencia se hace presente hoy; este logro también lleva su recuerdo, entre la profunda nostalgia y gratitud.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi *alma máter*, le agradezco haberme abierto las puertas para cursar mi formación académica y consolidar tanto mi crecimiento profesional como personal.

Mi gratitud se extiende, asimismo, a la Facultad de Ciencias Biológicas, a la Escuela Profesional de Biología y a todos los docentes, cuya entrega y acompañamiento marcaron de manera significativa mi proceso formativo, inculcándome los valores de la excelencia, la ética y el servicio.

A mi asesor, el Dr. José Alarcón Guerrero, le doy gracias por su apoyo incondicional, su orientación académica y el rigor científico que imprimió a lo largo de todo el proyecto. Su disposición para guiarme en cada fase de este proceso y la claridad de sus indicaciones fueron determinantes para llevar a buen término esta investigación.

Al Dr. Víctor Luis Cárdenas López, mi coasesor, por su valiosa guía metodológica y sus observaciones oportunas, que contribuyeron a fortalecer la calidad del estudio. Su compromiso y apoyo durante el desarrollo de la investigación fueron de gran importancia.

Al Mg. Nyshon Rojas Palomino, Investigador del Laboratorio de Leishmaniasis, Centro Nacional de Salud Pública, del Instituto Nacional de Salud, por su apoyo técnico, orientación en la selección de métodos y experiencia científica que enriquecieron la ejecución de la investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE GENERAL	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE ANEXOS	XIII
RESUMEN	XV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. ANTECEDENTES	3
2.2. MARCO CONCEPTUAL	7
2.2.1. Equinococosis	7
2.2.2. <i>Equinococcus spp.</i>	7
2.2.3. Hospedador definitivo	7
2.2.4. Hospedador intermediario	7
2.2.5. Quiste hidatídico	7
2.2.6. Protoescólex	7
2.2.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	8
2.2.8. PCR en tiempo real (qPCR)	8
2.2.9. Cebadores (primers)	8
2.2.10. Sondas fluorescentes	8
2.2.11. Umbral de ciclo (Ct)	8
2.2.12. Sensibilidad diagnóstica	8
2.2.13. Especificidad diagnóstica	8
2.2.14. Estandarización	9
2.2.15. ADN (Ácido desoxirribonucleico)	9
2.2.16. Zoonosis	9
2.2.17. Diagnóstico molecular	9
2.3. BASES TEÓRICAS	9
2.3.1. Definición y generalidades	9
2.3.2. Agente Etiológico	10
2.3.3. Estructura y morfología	10
2.3.4. Ciclo Biológico	17

2.3.5.	Organización y estructura del genoma de <i>Echinococcus spp.</i>	19
2.3.6.	Epidemiología	22
2.3.7.	Métodos de diagnóstico de <i>Echinococcus spp.</i> en ganado bovino	24
2.3.8.	Métodos de diagnóstico molecular	25
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1.	Lugar de ejecución	27
3.2.	Definición de la población y la muestra	27
3.3.	Metodología y recolección de datos	28
3.4.	Tipo de investigación	33
3.5.	Diseño de investigación	33
3.6.	Análisis estadístico	33
IV.	RESULTADOS	35
V.	DISCUSIÓN	43
VI.	CONCLUSIONES	51
VII.	RECOMENDACIONES	53
	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	55
	ANEXOS	61
	MATRIZ DE CONSISTENCIA	68

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de <i>Echinococcus spp.</i>	31
Tabla 2. Composición inicial de la mezcla de qPCR para la detección de <i>Echinococcus spp.</i>	32
Tabla 3. Condiciones iniciales de amplificación por qPCR para la detección de <i>Echinococcus spp.</i>	32
Tabla 4. Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN extraído de muestras de quistes hidatídicos extraídos de ganado vacuno (<i>Bos taurus</i>) mediante espectrofotometría UV.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Descripción general del huevo y la oncósfera de <i>Echinococcus spp.</i>	11
Figura 2. Esquema de una porción de quiste hidatídico de <i>E. granulosus</i>	13
Figura 3 Diagrama adulto de <i>E. granulosus</i> .	17
Figura 4 Ciclo biológico de <i>Echinococcus spp.</i> adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (s. f.). DPDx—Echinococcosis. U.S. Department of Health and Human Services.	19
Figura 5 Epidemiología molecular global de <i>E. granulosus</i> .	23
Figura 6 Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de concentración, del ADN extraído	37
Figura 7 Curvas de amplificación de la PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de <i>Echinococcus spp.</i> en diferentes diluciones seriadas de ADN	39
Figura 8 Curvas de amplificación por qPCR en 22 muestras de ganado vacuno (<i>Bos taurus</i>) para la detección de <i>Echinococcus spp.</i> , incluyendo controles positivos y negativos. Ayacucho, 2024	40
Figura 9 Curva estándar de qPCR para la detección de <i>Echinococcus spp.</i> en ganado vacuno (<i>Bos taurus</i>). Ayacucho, 2024	41

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1. Procedimiento de obtención del líquido hidatídico	61
ANEXO 2. Procedimiento de extracción y cuantificación de AND del líquido hidatídico.	62
ANEXO 3. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para la detección de <i>Echinococcus spp.</i> en muestras de ganado vacuno (<i>Bos taurus</i>), Ayacucho – 2024	63
ANEXO 4. Análisis de especificidad de los primers mediante BLAST para la detección de <i>Echinococcus spp.</i>	64
ANEXO 5. Análisis de especificidad de los primers mediante BLAST excluyendo <i>Echinococcus spp.</i> para la detección molecular en ganado vacuno (<i>Bos taurus</i>)	65
ANEXO 6. Validación de la especificidad de primers mediante análisis en BLASTN en la base de datos de la National Center for Biotechnology Information, evidenciando alineamientos significativos con secuencias de <i>Echinococcus granulosus</i>	66
ANEXO 7. Evaluación de la sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia de la PCR en tiempo real (qPCR) mediante curva estándar para la detección de <i>Echinococcus spp.</i> en muestras biológicas	67
ANEXO 8. Matriz de consistencia	68

RESUMEN

La equinococosis quística constituye una zoonosis de importancia en salud pública y sanidad animal en la región Ayacucho, donde la crianza extensiva de ganado, la convivencia estrecha entre perros y animales de producción, y las limitaciones en el diagnóstico oportuno favorecen la persistencia de la enfermedad y dificultan su vigilancia epidemiológica. El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar la técnica de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) para la detección de *Echinococcus spp.* en quistes hidatídicos obtenidos de pulmones de ganado vacuno (*Bos taurus*) de la región Ayacucho. Para ello, se realizó la obtención y purificación de ADN parasitario, la optimización de las condiciones de amplificación y la evaluación del desempeño de la técnica mediante curvas estándar.

La investigación fue de tipo básico, con enfoque cuantitativo y diseño experimental. Se analizaron 22 muestras de quistes hidatídicos recolectados de bovinos beneficiados en el matadero del distrito de Carmen Alto. El ADN fue extraído a partir de protoescolices utilizando un kit comercial, evaluándose su concentración y pureza mediante espectrofotometría UV. Posteriormente, se realizó la estandarización de la qPCR utilizando cebadores específicos, aplicando diluciones seriadas del ADN para la construcción de curvas estándar y la determinación de la eficiencia de amplificación.

Los resultados evidenciaron una amplia variabilidad en la concentración y pureza del ADN, las curvas de amplificación mostraron un comportamiento sigmoide característico, con una clara relación inversa entre los valores de Ct y la concentración de ADN. La curva estándar presentó una alta linealidad ($R^2 = 0,99872$), una pendiente de -3,574 y una eficiencia de amplificación del 90%, indicando una adecuada precisión y reproducibilidad del método.

Se concluye que la técnica de qPCR estandarizada constituye una herramienta altamente sensible, específica y confiable para la detección de *Echinococcus spp.* en ganado vacuno. Su implementación en el contexto local representa un aporte significativo para el fortalecimiento del diagnóstico molecular y la vigilancia epidemiológica de la equinococosis en la región Ayacucho.

Palabras Clave: qPCR, *Echinococcus spp.*, diagnóstico molecular, estandarización, sensibilidad, especificidad, equinococosis.

I. INTRODUCCIÓN

La equinococosis, también conocida como hidatidosis, es una zoonosis parasitaria de distribución mundial causada por céstodos del género *Echinococcus*, principalmente *Echinococcus granulosus* y *Echinococcus multilocularis*. Esta enfermedad constituye un importante problema de salud pública y sanidad animal, especialmente en regiones donde prevalece la ganadería extensiva, como ocurre en diversas zonas de América Latina, incluido el Perú (Craig et al., 2017).

El ciclo biológico de *Echinococcus spp.* involucra hospederos definitivos, generalmente cánidos, y hospederos intermediarios, como el ganado vacuno (*Bos taurus*), ovino y otros herbívoros. En estos últimos se desarrollan quistes hidatídicos en órganos como hígado y pulmones, generando pérdidas económicas significativas en la producción pecuaria, además del riesgo de transmisión al ser humano (WHO, 2020). En regiones altoandinas como Ayacucho, factores como el manejo inadecuado del ganado, la convivencia cercana con perros y las limitaciones en el control sanitario favorecen la persistencia de esta zoonosis.

Tradicionalmente, el diagnóstico de la equinococosis en animales se ha basado en métodos post mortem, como la inspección macroscópica de órganos durante el faenado, así como en técnicas serológicas. Sin embargo, estas técnicas presentan limitaciones en cuanto a sensibilidad, especificidad y a su capacidad para detectar la infección en etapas tempranas (Lightowlers, 2013). En este escenario, los métodos moleculares se consolidaron como herramientas de gran precisión para la identificación del ADN parasitario.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real, conocida como qPCR, es considerada hoy una de las herramientas más sofisticadas dentro del diagnóstico molecular. Su principal ventaja radica en que logra, en un solo paso, tanto la amplificación como la detección del ADN, alcanzando niveles altos de

sensibilidad, especificidad y rapidez. A esta capacidad se le suma la posibilidad de cuantificar el material genético del parásito, un dato muy útil para los estudios epidemiológicos y para calcular la carga parasitaria presente en la muestra (Kubista et al., 2006). Numerosas investigaciones han evidenciado que la qPCR resulta eficaz para detectar *Echinococcus spp.* en diversos tipos de muestras biológicas, superando así las limitaciones propias de las técnicas convencionales.

No obstante, la implementación de la qPCR requiere la estandarización de condiciones específicas, tales como la selección de cebadores, concentraciones de reactivos, temperaturas de amplificación y parámetros de validación, con el fin de garantizar resultados reproducibles y confiables. En el contexto local, particularmente en la región Ayacucho, existe una limitada disponibilidad de protocolos estandarizados adaptados a las condiciones de laboratorio y a las características epidemiológicas de la zona.

En este sentido, la presente investigación se orienta a la estandarización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real para la detección de *Echinococcus spp.* en ganado vacuno (*Bos taurus*), con el propósito de contribuir al fortalecimiento del diagnóstico molecular, mejorar la vigilancia epidemiológica y aportar al control de esta importante zoonosis en la región, teniendo como objetivos:

Objetivo general

Estandarizar y determinar la eficiencia de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de *Echinococcus spp.* en ganado vacuno "*Bos taurus*".

Objetivos específicos

1. Obtener el ADN genómico de *Echinococcus spp.* a partir de quistes hidatídicos provenientes de ganado vacuno "*Bos taurus*".
2. Purificar el ADN genómico de *Echinococcus spp.* proveniente de quistes hidatídicos obtenidos de ganado vacuno "*Bos taurus*".
3. Estandarizar la técnica de PCR en tiempo real para la detección de *Echinococcus spp.* a partir de quistes hidatídicos provenientes de ganado vacuno "*Bos taurus*".
4. Determinar la reproducibilidad de la PCR en tiempo real para la detección de *Echinococcus spp.* de quiste hidatídicos obtenidos de ganado vacuno "*Bos taurus*".

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. Antecedentes internacionales

Diversos estudios a nivel internacional han demostrado la utilidad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) como herramienta altamente sensible y específica para la detección de parásitos zoonóticos como *Echinococcus spp.* y otros helmintos de importancia veterinaria.

En este contexto, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real, ha sido ampliamente empleada para mejorar el diagnóstico temprano y la vigilancia epidemiológica.

Uno de los avances más relevantes fue reportado por Zhang, X. et al. (2022), quienes desarrollaron un ensayo triplex de qPCR tipo TaqMan capaz de detectar simultáneamente *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis* y *Echinococcus shiquicus* en muestras fecales de hospedadores definitivos. Este estudio demostró una alta sensibilidad (límite de detección de 10 copias/μL) y excelente reproducibilidad, evidenciando la eficacia de la qPCR en estudios epidemiológicos de equinococosis.

De manera similar, Knapp et al. (2023) diseñaron un ensayo de PCR en tiempo real multiplex para distinguir distintas especies de *Echinococcus* en muestras clínicas humanas, con una especificidad del 100 % y una alta sensibilidad incluso cuando el material genético era escaso. Este trabajo resalta el valor de la qPCR como herramienta de diagnóstico diferencial frente a las infecciones parasitarias zoonóticas.

Dentro del ámbito veterinario, investigaciones como la de Höglund et al. (2013) comprobaron la utilidad de la qPCR para detectar y cuantificar nemátodos

gastrointestinales en ganado bovino, empleando las regiones ITS2 del ADN ribosomal. Los hallazgos mostraron que esta técnica permite una identificación y cuantificación precisa de la carga parasitaria, superando las restricciones de los métodos microscópicos tradicionales.

Del mismo modo, los estudios sobre enfermedades infecciosas en bovinos han confirmado a la qPCR como una técnica de gran fiabilidad. Así, por ejemplo, las investigaciones realizadas sobre *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* en ganado vacuno evidenciaron una alta sensibilidad (con detección de hasta 2 copias de ADN/ μ L) y una especificidad del 100 %, lo que hizo posible identificar infecciones subclínicas que pasan inadvertidas con los métodos convencionales (Logar et al., 2012).

Además, la aparición de nuevas estrategias moleculares, como la amplificación isotérmica en tiempo real aplicada a la equinocosis quística, ha puesto en evidencia el papel clave de estas técnicas en el diagnóstico parasitario, destacando su rapidez, precisión y aplicabilidad dentro de los programas de control de la salud pública a nivel mundial (Ahmed et al., 2016).

2.1.2. Antecedentes nacionales

En el Perú, el empleo de técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su versión en tiempo real (qPCR), ha crecido de manera notable en los últimos años, sobre todo en el diagnóstico de enfermedades infecciosas del ganado bovino.

Uno de los trabajos más relevantes se llevó a cabo en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde Zuluaga (2025) desarrolló una investigación titulada "Detección del virus de la leucosis bovina mediante PCR en tiempo real en muestras de sangre". En ella se utilizó la qPCR para amplificar el gen pol del virus, lo que permitió detectar con precisión el ADN proviral y contrastar los resultados con pruebas serológicas como el ELISA. Se comprobó que esta técnica ofrece una elevada sensibilidad y especificidad, siendo capaz de identificar la infección incluso en etapas subclínicas.

Además, dentro del país se ha empleado la PCR en investigaciones orientadas al estudio de la diversidad genética y a la caracterización molecular del ganado bovino. Un ejemplo es el trabajo de Risco, R. (2024), quien analizó la diversidad genética del ganado criollo peruano (*Bos taurus*) mediante PCR-SSCP y

secuenciamiento de ADN mitocondrial en diversas regiones del Perú, incluyendo Ayacucho. Este estudio puso en evidencia la utilidad de la PCR para identificar la variabilidad genética y caracterizar molecularmente a las poblaciones bovinas, sentando así una base importante para futuros estudios epidemiológicos y de diagnóstico (Risco, 2024).

En el terreno de las enfermedades parasitarias, la investigación desarrollada por Reyna Cotrina (2014) sobre *Fasciola hepatica* en Cajamarca empleó los marcadores moleculares ITS-1, ITS-2 y COX, amplificados mediante PCR, lo que permitió caracterizar la estructura genética del parásito en distintos hospedadores, entre ellos el ganado bovino. Este trabajo demostró que las técnicas moleculares constituyen herramientas eficaces para comprender la epidemiología y la transmisión de los parásitos zoonóticos en el Perú (Reyna, 2014).

Asimismo, en lo que respecta a la estandarización de técnicas moleculares, se ha avanzado en el país en el diseño de protocolos de RT-PCR en tiempo real para la detección de patógenos en animales. Es el caso del estudio sobre el virus de la necrosis pancreática infecciosa en truchas, en el cual se optimizaron las condiciones de amplificación, así como la sensibilidad y la especificidad del ensayo. Estos trabajos evidencian la importancia de la estandarización de técnicas moleculares para garantizar resultados reproducibles y confiables en el diagnóstico veterinario (Castro, 2010).

En conjunto, los estudios nacionales demuestran que la PCR y la qPCR son herramientas ampliamente utilizadas en el Perú para el diagnóstico, caracterización genética y vigilancia epidemiológica de agentes infecciosos en animales. Sin embargo, aún existe limitada evidencia específica sobre la estandarización de qPCR para la detección de *Echinococcus spp.* en ganado bovino, lo que justifica la necesidad de desarrollar investigaciones orientadas a este campo.

2.1.3. Antecedentes locales

En la región Ayacucho, la equinocosis quística constituye un problema importante de salud pública y veterinaria debido a las condiciones socioeconómicas y al sistema de crianza tradicional de animales, donde coexisten hospedadores definitivos (perros) e intermediarios como bovinos, ovinos y camélidos.

Un estudio realizado por Zárate, Y. (2014) en el distrito de Hualla, provincia de Víctor Fajardo (Ayacucho), evaluó la seroprevalencia de equinocosis en población escolar, evidenciando que esta zoonosis se encuentra estrechamente relacionada con factores ambientales y de convivencia con animales domésticos. El estudio resalta que la enfermedad es endémica en zonas altoandinas donde existe contacto directo entre humanos, perros y ganado, lo que favorece su transmisión.

Asimismo, investigaciones desarrolladas en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga han abordado la caracterización molecular del parásito en animales de producción. Huamaní, N. (2012) realizó la genotipificación de *Echinococcus granulosus* en alpacas procedentes de Ayacucho, empleando técnicas de PCR y secuenciación de ADN, lo que permitió identificar variantes genéticas del parásito en la región. Este estudio evidencia la presencia activa del agente etiológico y la aplicabilidad de técnicas moleculares en el diagnóstico parasitario local.

Por otro lado, estudios recientes en Ayacucho también han analizado la situación epidemiológica de la enfermedad en humanos. Huarcaya (2024) estimó la seroprevalencia de la equinocosis quística en adultos del distrito de Puyusca (Ayacucho), y halló una relación significativa con factores como la ausencia de desparasitación de los animales domésticos, las deficiencias en la higiene de los alimentos y el limitado acceso a los servicios de salud. Estos resultados evidencian que la enfermedad continúa siendo un problema vigente en la región.

Además, investigaciones locales sobre parasitismo en animales, como el estudio de Janampa, J. (2021) en alpacas del distrito de Paras (Ayacucho), demuestran una alta frecuencia de infecciones parasitarias en sistemas de producción extensivos, lo que refleja condiciones favorables para la persistencia y transmisión de zoonosis parasitarias como la equinocosis.

En conjunto, estos estudios locales evidencian que la equinocosis y otras enfermedades parasitarias continúan siendo un problema relevante en Ayacucho, con presencia tanto en humanos como en animales. Sin embargo, existe limitada evidencia sobre la aplicación y estandarización de técnicas moleculares como la PCR en tiempo real para la detección de *Echinococcus spp.* en ganado bovino, lo que justifica la necesidad de desarrollar investigaciones en este campo.

2.2. MARCO CONCEPTUAL

2.2.1. Equinococosis

La equinococosis es una enfermedad parasitaria de tipo zoonótico, originada por céstodos del género *Echinococcus*, que se manifiesta mediante la formación de quistes hidatídicos en los órganos internos de los hospederos intermediarios. Por su impacto representa un problema relevante tanto para la salud pública como para el ámbito veterinario. (Craig et al., 2017)

2.2.2. *Echinococcus spp.*

Este término alude a un conjunto de especies de helmintos que pertenecen a la familia Taeniidae. Entre las de mayor relevancia se encuentran *Echinococcus granulosus* y *Echinococcus multilocularis*, responsables, respectivamente, de la equinococosis quística y de la equinococosis alveolar (Deplazes et al., 2017).

2.2.3. Hospedador definitivo

Se trata del organismo en el que el parásito alcanza su fase adulta y lleva a cabo su reproducción sexual. En el caso de *Echinococcus spp.*, el principal hospedero definitivo es el perro (Moro y Schantz, 2009).

2.2.4. Hospedador intermediario

Es el organismo que alberga la fase larvaria del parásito. En la presente investigación, el ganado vacuno (*Bos taurus*) cumple el papel de hospedero intermedio, ya que en él se desarrollan los quistes hidatídicos en órganos como el hígado y los pulmones (Thompson, 2017).

2.2.5. Quiste hidatídico

Es la estructura larvaria del parásito que se forma en los tejidos del hospedero intermedio. Se compone de una capa externa (periquiste), una membrana laminada y una capa germinativa, responsable de generar los protoescólices (Eckert y Deplazes, 2004).

2.2.6. Protoescólex

Es la forma infecciosa que se encuentra dentro del quiste hidatídico y que, al ser ingerida por el hospedero definitivo, tiene la capacidad de transformarse en un parásito adulto (Craig et al., 2017).

2.2.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica molecular que permite amplificar fragmentos específicos de ADN mediante ciclos térmicos controlados, facilitando la detección de material genético incluso en bajas concentraciones (Bowles et al., 1992).

2.2.8. PCR en tiempo real (qPCR)

Es una variante de la PCR que permite detectar y cuantificar el ADN en tiempo real a partir de las señales fluorescentes. Se distingue por ofrecer una elevada sensibilidad, especificidad y rapidez en comparación con los métodos convencionales (Bustin et al., 2009).

2.2.9. Cebadores (primers)

Son secuencias cortas de ADN que se unen de manera específica a la región de interés del genoma y dan inicio al proceso de amplificación durante la PCR (Bustin et al., 2009).

2.2.10. Sondas fluorescentes

Son moléculas marcadas con fluorocromos que se acoplan a secuencias específicas del ADN durante la qPCR, lo que permite detectar la amplificación en tiempo real (Knapp et al., 2014).

2.2.11. Umbral de ciclo (Ct)

El Ct (Cycle threshold) es el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente supere un nivel de detección. Es inversamente proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra (Bustin et al., 2009).

2.2.12. Sensibilidad diagnóstica

Es la capacidad que tiene una prueba para reconocer de forma correcta a quienes se encuentran infectados. Al alcanzar una sensibilidad elevada, disminuye la cantidad de resultados falsos negativos (OIE, 2019).

2.2.13. Especificidad diagnóstica

Es la capacidad de una prueba para reconocer de manera acertada a los individuos no infectados. Cuando la especificidad es elevada, se reduce la aparición de resultados falsos positivos (OIE, 2019).

2.2.14. Estandarización

Es un procedimiento mediante el cual se ajustan y validan las condiciones de una técnica de diagnóstico, con la finalidad de asegurar que los resultados sean reproducibles y confiables (Bustin et al., 2009).

2.2.15. ADN (Ácido desoxirribonucleico)

Es la molécula que guarda la información genética de los seres vivos, y precisamente sobre ella se enfocan las técnicas moleculares como la PCR, ya que es el material que se amplifica durante el proceso (Bustin et al., 2009).

2.2.16. Zoonosis

Es la enfermedad que puede transmitirse de los animales hacia el ser humano. La equinococosis constituye una zoonosis de considerable importancia, sobre todo en contextos rurales (Craig et al., 2017).

2.2.17. Diagnóstico molecular

Es el conjunto de técnicas que se apoyan en la detección del material genético de un patógeno, lo que permite identificar las infecciones de forma precisa y temprana (Knapp et al., 2014).

2.3. BASES TEÓRICAS

2.3.1. Definición y generalidades

2.3.1.1 *Echinococcus spp.*

El género *Echinococcus* comprende un grupo de céstodos (helminthos planos) responsables de la enfermedad zoonótica denominada equinococosis o hidatidosis, la cual afecta tanto a animales como al ser humano. Esta enfermedad tiene distribución mundial, especialmente en regiones ganaderas donde existe estrecha interacción entre animales domésticos y humanos.

Los términos hidatidosis y equinococosis suelen emplearse de manera indistinta para referirse a la zoonosis causada por céstodos del género *Echinococcus*. No obstante, existe una distinción conceptual importante que conviene precisar: el término "enfermedad hidatídica" hace referencia, de manera específica, a la afección provocada por la fase larvaria del parásito en los hospedadores intermediarios, mientras que "equinococosis" se emplea para designar la infección del hospedador definitivo, en la que el parásito se encuentra en su forma adulta (Armira, 2004). En este marco, los perros constituyen la principal fuente de

contagio hacia los seres humanos en la transmisión de la enfermedad hidatídica (Reyes et al., 2012).

2.3.2. Agente Etiológico

2.3.2.1 Clasificación Taxonómica

Taxonómicamente *Echinococcus sp.*, ha sido clasificado de la forma siguiente (Eckert, J. y Desplazes, P. 2004)

Phylum	:	Platyhelminthes
Clase	:	Eucestoda
Orden	:	Cyclophyllidea
Familia	:	Taeniidae
Género	:	<i>Echinococcus</i>
Especies	:	<i>E. granulosus</i> , <i>E. multilocularis</i> , <i>E. oligarthrus</i> y <i>E. vogeli</i> .

2.3.3. Estructura y morfología

2.3.3.1 Huevo

El huevo de *Echinococcus spp.* constituye la forma infectante del parásito para los hospedadores intermediarios, incluyendo al ser humano. Estos huevos son eliminados al ambiente a través de las heces de los hospedadores definitivos, principalmente cánidos, y presentan una alta resistencia a condiciones ambientales adversas, lo que favorece su persistencia y diseminación en suelos, agua y alimentos contaminados (Eckert y Deplazes, 2004).

Desde el punto de vista morfológico, los huevos de *Echinococcus spp.* son esféricos u ovoides, con un diámetro aproximado de 30 a 40 μm , y poseen una estructura similar a los huevos de otros céstodos de la familia Taeniidae, lo que dificulta su diferenciación microscópica. Están rodeados por una gruesa pared embriofórica que protege al embrión interno, conocido como oncósfera o embrión hexacanto, caracterizado por la presencia de seis ganchos (Thompson, 2017).

La oncósfera es la estructura responsable de iniciar la infección en el hospedador intermediario. Una vez ingerido el huevo, este eclosiona en el intestino delgado, liberando la oncósfera, la cual atraviesa la mucosa intestinal y accede al torrente sanguíneo o linfático, migrando hacia órganos como el hígado y los pulmones, donde se desarrolla la fase larvaria o metacéstodo (Craig et al., 2017).

Desde el punto de vista epidemiológico, los huevos de *Echinococcus spp.* desempeñan un papel crucial en la transmisión de la equinococosis, debido a su elevada resistencia ambiental y su capacidad de adherirse a superficies como vegetales, agua y pelaje de animales. Esta característica incrementa el riesgo de infección en poblaciones humanas expuestas a condiciones sanitarias deficientes y estrecho contacto con perros infectados (Eckert & Deplazes, 2004)

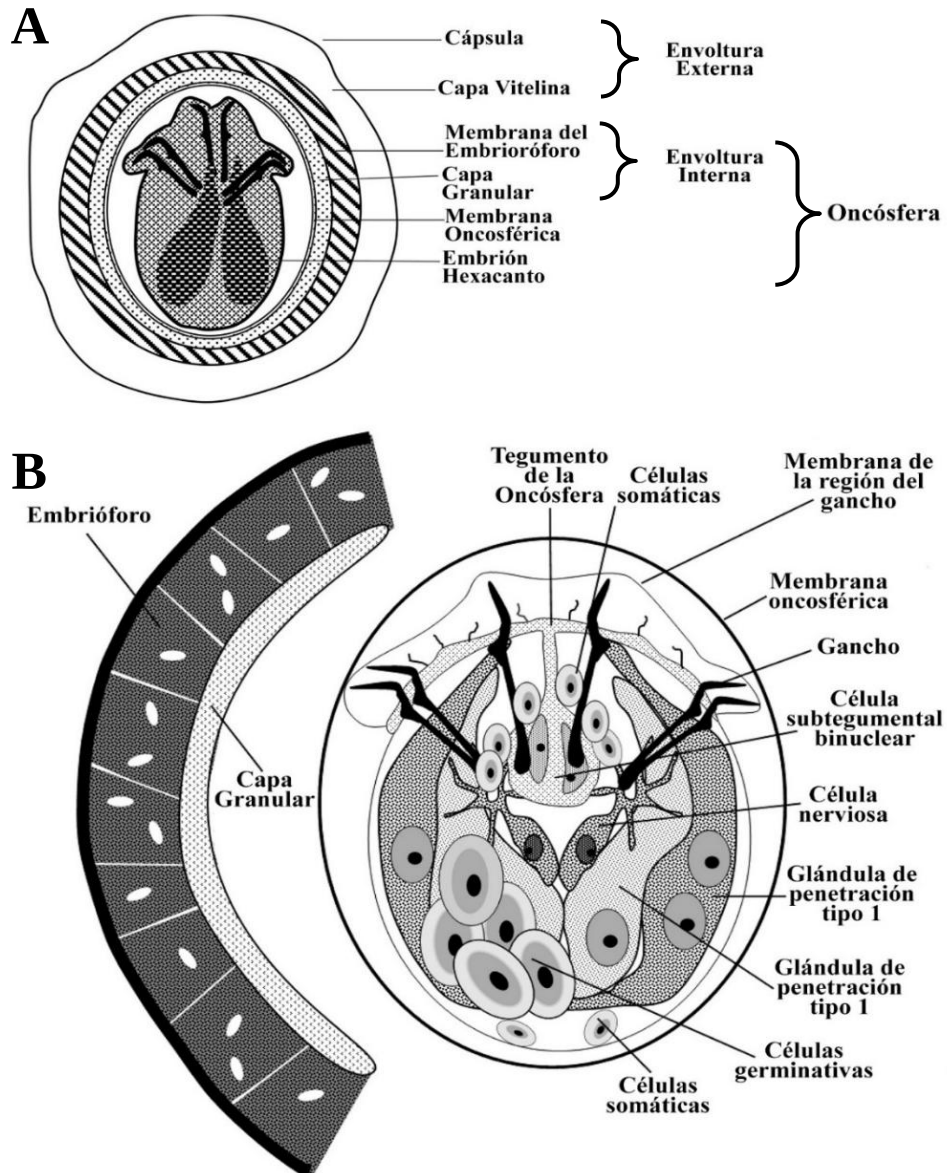


Figura 1. Descripción general del huevo y la oncosfera de *Echinococcus spp.*, según Vuitton et al. (2020). **(A)** Diagrama esquemático de una oncosfera que ilustra la estructura y la simetría bilateral en el patrón de ganchos y la organización celular del embrión hexacanto. **(B)** Organización celular de la oncosfera. Las oncosferas miden aproximadamente 25 × 30 µm. Adaptado de Jabbar et al. (2010).

2.3.3.2 Quiste hidatídico madre

El quiste hidatídico madre corresponde a la forma larvaria o metacéstodo de *Echinococcus spp.*, que se desarrolla en los hospedadores intermediarios, como los herbívoros y el ser humano, tras la ingestión de huevos embrionados. Esta estructura quística representa la fase patogénica del parásito y se localiza con mayor frecuencia en órganos como el hígado y los pulmones (Eckert & Deplazes, 2004).

Desde el punto de vista estructural, el quiste hidatídico madre está constituido por tres capas bien definidas: una capa externa o adventicia, formada por tejido fibroso del hospedador; una capa laminada acelular, de naturaleza quitinosa y altamente resistente; y una capa germinal interna, que es metabólicamente activa y responsable de la producción de estructuras reproductivas (Craig et al., 2017).

La capa germinal da origen a las vesículas prolíferas, dentro de las cuales se desarrollan los protoescólices, que constituyen las formas infectantes para el hospedador definitivo. En condiciones favorables, estas vesículas pueden desprenderse y dar lugar a quistes hijos dentro del quiste madre, incrementando su complejidad estructural y su capacidad infectiva (Thompson, 2017).

El contenido del quiste está conformado por el denominado líquido hidatídico, una sustancia clara, rica en nutrientes, proteínas y antígenos parasitarios, que favorece el crecimiento y desarrollo del parásito. Desde el punto de vista clínico, el quiste hidatídico madre puede permanecer asintomático durante largos periodos; sin embargo, su crecimiento progresivo puede generar efectos compresivos sobre los tejidos circundantes, así como complicaciones graves en caso de ruptura, como reacciones anafilácticas o diseminación secundaria (Eckert y Deplazes, 2004).

En términos epidemiológicos, esta fase es de gran importancia, ya que representa el eslabón clave para la transmisión hacia el hospedador definitivo, el cual se infecta al ingerir vísceras que contienen quistes fértiles con protoescólices viables, perpetuando así el ciclo biológico de *Echinococcus spp.* (Craig et al., 2017).

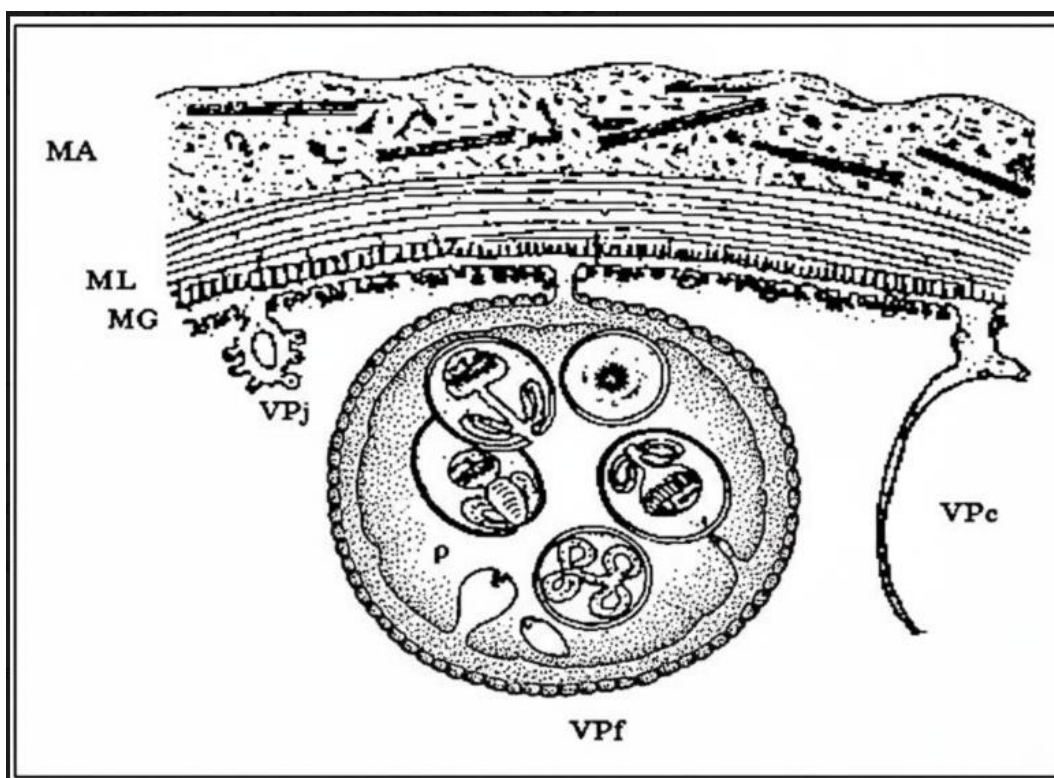


Figura 2. Esquema de una porción de quiste hidatídico de *E. granulosus*. MA: membrana adventicia, ML: membrana laminar, MG: membrana germinativa, VPj: vesícula prolífera joven, VPf: vesícula prolífera fértil, VPc: vesícula prolífera estéril, P: protoescolice (Reus et al., 1992).

2.3.3.3 Líquido Hidatídico

El líquido hidatídico es el contenido intracavitario del quiste hidatídico en la fase larvaria de *Echinococcus spp.* y constituye un componente esencial para la supervivencia, nutrición y desarrollo del parásito. Este fluido es producido principalmente por la capa germinal del quiste y se encuentra contenido dentro de la cavidad delimitada por la capa laminada (Eckert y Deplazes, 2004).

Desde el punto de vista bioquímico, el líquido hidatídico es una sustancia clara, incolora o ligeramente amarillenta, rica en proteínas, lípidos, carbohidratos, electrolitos y metabolitos del parásito. Además, contiene una elevada concentración de antígenos parasitarios, lo que le confiere una alta inmunogenicidad y lo convierte en un elemento clave en el diagnóstico serológico de la equinococosis (Craig et al., 2017).

En su interior se encuentran suspendidas diversas estructuras parasitarias, como protoescolices, vesículas prolíferas y detritos celulares, que en conjunto constituyen la denominada arena hidatídica. La presencia de estos elementos

indica la fertilidad del quiste y su potencial infectante para el hospedador definitivo (Thompson, 2017).

Desde el punto de vista clínico, el líquido hidatídico tiene gran relevancia debido a que su liberación, ya sea por ruptura espontánea o durante procedimientos quirúrgicos, puede desencadenar reacciones de hipersensibilidad, incluyendo anafilaxia, debido a su alto contenido antigénico. Asimismo, la diseminación del contenido quístico puede originar la formación de nuevos quistes secundarios en diferentes órganos (Eckert y Deplazes, 2004).

En términos biológicos y epidemiológicos, el líquido hidatídico actúa como un medio de soporte que favorece el crecimiento del metacéstodo y la viabilidad de las estructuras infectantes, contribuyendo así a la perpetuación del ciclo de vida de *Echinococcus spp.* (Craig et al., 2017).

2.3.3.4 Vesículas prolíferas

Las vesículas prolíferas son estructuras derivadas de la capa germinal del quiste hidatídico en el ciclo biológico de *Echinococcus spp.* y representan unidades reproductivas fundamentales dentro del metacéstodo. Estas vesículas se forman por gemación endógena a partir de la capa germinal, la cual es la única porción viva y metabólicamente activa del quiste (Eckert & Deplazes, 2004).

Desde el punto de vista morfológico, las vesículas prolíferas son pequeñas estructuras vesiculares que se proyectan hacia el interior del quiste, suspendidas en el líquido hidatídico. En su interior se desarrollan múltiples protoescólices, que corresponden a las formas infectantes para el hospedador definitivo. Cada protoescólex presenta una organización similar al escólex del verme adulto, con ventosas y ganchos, aunque en estado invaginado (Thompson, 2017).

Cuando las vesículas prolíferas maduran, pueden desprenderse de la capa germinal y quedar libres dentro del líquido hidatídico, contribuyendo a la formación de la denominada arena hidatídica, compuesta por protoescólices libres, cápsulas prolíferas y detritos celulares (Craig et al., 2017). Este material es altamente infectante si es ingerido por el hospedador definitivo, lo que permite la continuación del ciclo biológico del parásito.

Desde una perspectiva biológica y epidemiológica, las vesículas prolíferas son esenciales para la multiplicación asexual del parásito dentro del hospedador intermediario, incrementando significativamente la carga parasitaria y la capacidad

de transmisión. Su presencia también tiene implicancias clínicas, ya que la ruptura del quiste puede liberar estas estructuras, favoreciendo la diseminación secundaria de la infección en el organismo (Eckert & Deplazes, 2004).

2.3.3.5 Protoescólex

El protoescólex constituye la forma infectante del estadio larvario de *Echinococcus spp.* para el hospedador definitivo y se desarrolla en el interior de las vesículas prolíferas del quiste hidatídico. Estas estructuras representan una fase clave en el ciclo biológico del parásito, ya que son precursoras del escólex del verme adulto (Eckert & Deplazes, 2004).

Desde el punto de vista morfológico, el protoescólex presenta una organización similar a la del escólex adulto, aunque se encuentra en estado invaginado. Está conformado por una región apical que incluye un rostelo armado con ganchos y cuatro ventosas musculares, estructuras que le permitirán fijarse a la mucosa intestinal del hospedador definitivo una vez que se evagine tras la ingestión (Thompson, 2017).

Los protoescólices se originan por gemación a partir de la capa germinal del quiste hidatídico, dentro de las vesículas prolíferas. Cada vesícula puede contener numerosos protoescólices, los cuales, al desprenderse, pasan a formar parte de la denominada arena hidatídica, suspendida en el líquido del quiste (Craig et al., 2017).

Desde el punto de vista funcional, el protoescólex es altamente infectante para el hospedador definitivo. Cuando un cánido ingiere vísceras infectadas que contienen quistes hidatídicos fértiles, los protoescólices son liberados en el intestino delgado, donde se evaginan, se fijan a la mucosa intestinal y se desarrollan progresivamente hasta convertirse en vermes adultos, completando así el ciclo biológico del parásito (Eckert y Deplazes, 2004).

En términos epidemiológicos, la viabilidad y cantidad de protoescólices dentro de un quiste determinan su capacidad infectiva, siendo los quistes fértiles aquellos que contienen protoescólices viables. Esta característica es fundamental en la transmisión de la equinococosis, especialmente en sistemas ganaderos donde existe acceso de perros a vísceras crudas infectadas (Craig et al., 2017).

2.3.3.6 Verme adulto

El estadio adulto de *Echinococcus spp.* corresponde a la fase sexualmente

madura del parásito, la cual se desarrolla en el intestino delgado de los hospedadores definitivos, principalmente cánidos domésticos y silvestres, como el perro. En esta etapa, el parásito presenta un tamaño reducido en comparación con otros céstodos, alcanzando generalmente entre 2 y 7 mm de longitud, lo que le confiere una morfología característica adaptada a su nicho intestinal (Eckert & Deplazes, 2004).

Desde el punto de vista estructural, el verme adulto está constituido por un escólex, un cuello corto y una estróbila formada por un número limitado de proglótides, usualmente entre tres y cinco segmentos. El escólex presenta cuatro ventosas musculares que facilitan la fijación a la mucosa intestinal del hospedador, además de un rostelo armado con una doble corona de ganchos en especies como *Echinococcus granulosus*, lo que refuerza su capacidad de adherencia (Thompson, 2017).

La estróbila del parásito está conformada por proglótides inmaduras, maduras y grávidas. La proglótide grávida es funcionalmente relevante, ya que contiene un útero repleto de huevos embrionados, los cuales son liberados al ambiente a través de las heces del hospedador definitivo. Estos huevos poseen una alta resistencia a condiciones ambientales adversas, lo que favorece su dispersión y la infección de hospedadores intermediarios, como los herbívoros y, accidentalmente, el ser humano (Craig et al., 2017).

El estadio adulto cumple un rol fundamental en el ciclo biológico de *Echinococcus spp.*, debido a que en esta fase ocurre la reproducción sexual del parásito y la producción de huevos infectantes. La eliminación continua de estos huevos al medio ambiente permite la perpetuación del ciclo parasitario y la transmisión de la equinococosis, constituyendo así un importante problema de salud pública y sanidad animal, especialmente en regiones donde existe estrecha interacción entre perros, ganado y poblaciones humanas (Eckert & Deplazes, 2004).

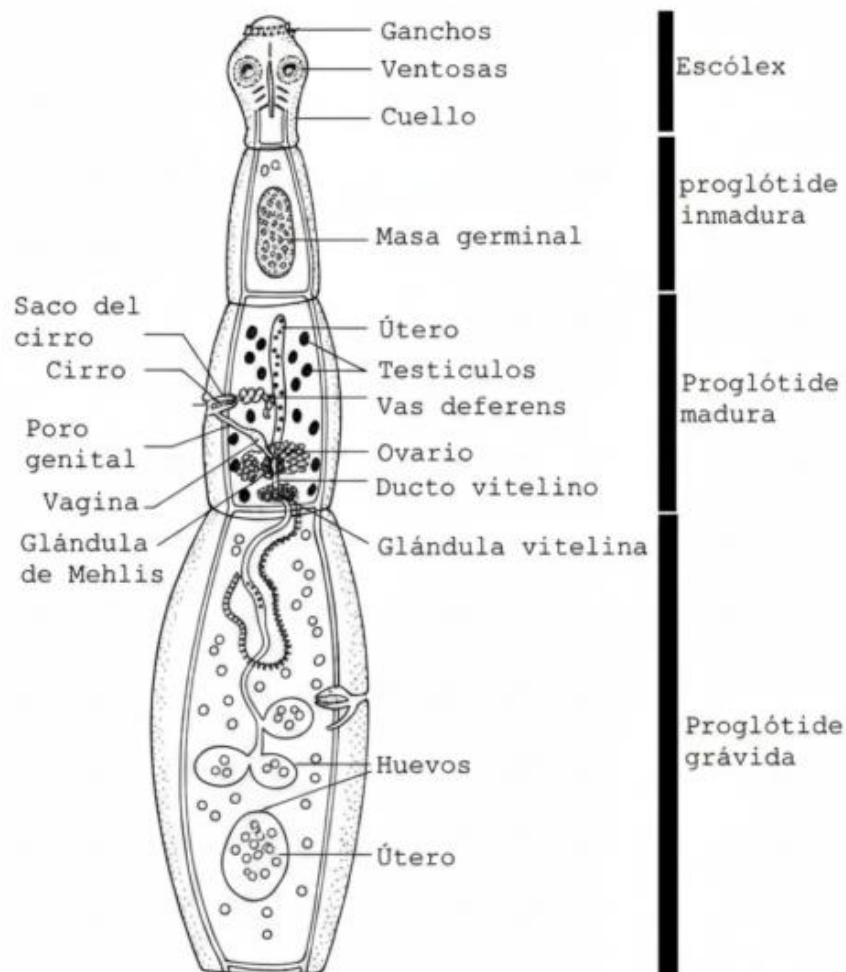


Figura 3. Diagrama adulto de *E. granulosus* (Camicia, 2011).

2.3.4. Ciclo biológico

El ciclo biológico de *Echinococcus spp.* es indirecto o heteroxeno, ya que requiere la participación de dos tipos de hospedadores: un hospedador definitivo, generalmente cánidos (principalmente el perro), y un hospedador intermediario, como herbívoros (ovinos, bovinos, caprinos) y, de manera accidental, el ser humano (Eckert y Deplazes, 2004).

El ciclo se inicia cuando el hospedador definitivo alberga el verme adulto en el intestino delgado. En esta fase, el parásito produce proglótides grávidas que liberan huevos embrionados al ambiente a través de las heces. Estos huevos contienen la oncósfera (embrión hexacanto), que constituye la forma infectante para los hospedadores intermediarios (Thompson, 2017).

Los hospedadores intermediarios adquieren la infección al ingerir alimentos o agua contaminados con huevos del parásito. Una vez en el intestino delgado, los

huevos eclosionan y liberan la oncosferas, la cual atraviesa la mucosa intestinal y migra por vía sanguínea o linfática hacia órganos como el hígado y los pulmones, donde se desarrolla la fase larvaria denominada metacástor o quiste hidatídico (Craig et al., 2017).

En el interior del quiste hidatídico se forman vesículas prolígeras que contienen numerosos protoescolices, estructuras que constituyen la forma infectante para el hospedador definitivo. Cuando un cánido ingiere vísceras crudas infectadas con quistes fértiles, los protoescolices se liberan en el intestino, se evaginan y se fijan a la mucosa intestinal, desarrollándose hasta convertirse en vermes adultos, completando así el ciclo biológico (Eckert y Deplazes, 2004).

El ser humano actúa como hospedador intermediario accidental, al ingerir huevos del parásito a través de agua, alimentos contaminados o contacto directo con perros infectados. En este caso, el ciclo no se completa, pero se desarrolla el quiste hidatídico, lo que genera la enfermedad conocida como hidatidosis, de gran importancia en salud pública (Craig et al., 2017).

Desde una perspectiva epidemiológica, el ciclo biológico de *Echinococcus spp.* está estrechamente relacionado con prácticas de manejo ganadero, faenamiento domiciliario y convivencia estrecha con perros, factores que favorecen la transmisión y mantenimiento de la enfermedad, especialmente en regiones rurales (Eckert y Deplazes, 2004).

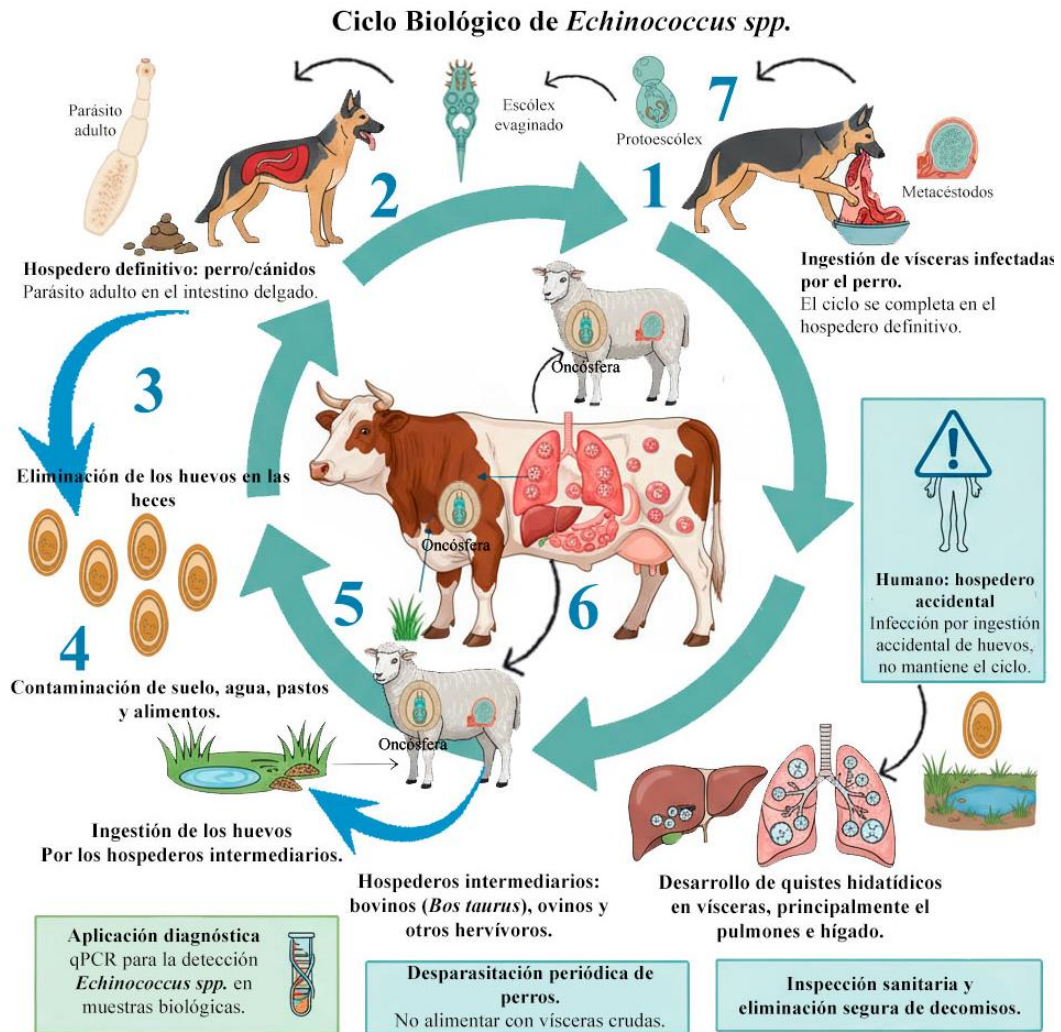


Figura 4. Ciclo biológico de *Echinococcus* spp. adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (s. f.). DPDx—Echinococcosis. U.S. Department of Health and Human Services. <https://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/index.html>

2.3.5. Organización y estructura del genoma de *Echinococcus* spp.

El género *Echinococcus* comprende céstodos de importancia zoonótica cuyo genoma ha sido objeto de intenso estudio en las últimas décadas. El genoma nuclear de *Echinococcus* spp. tiene un tamaño aproximado de 115 Mb, organizado en seis pares de cromosomas ($n = 6$), con un contenido de GC del 42 % y un número estimado de 10 000 a 11 000 genes codificantes de proteínas (Tsai et al., 2013; Zheng et al., 2013). El genoma mitocondrial, por su parte, es una molécula circular de aproximadamente 13 600 a 18 200 pb que contiene 12 genes codificantes de proteínas, entre ellos *cox1*, *nad1* y *nad5*, 2 genes de ARNr y 22 genes de ARNt (Kinkar et al., 2019).

Entonces, desde una perspectiva taxonómica, Thompson (2008) estableció que el género *Echinococcus* está conformado por especies genéticamente diversas, cuyo estatus taxonómico ha sido objeto de revisión continua. Los estudios genómicos han confirmado la existencia de un complejo de especies crípticas dentro de *E. granulosus sensu lato*, lo que ha llevado a una reclasificación basada en evidencia molecular.

Es así que los primeros esfuerzos de secuenciación del genoma completo revelaron una notable expansión de familias génicas relacionadas con la evasión inmune y la interacción parásito-hospedero, así como la pérdida de genes asociados con vías metabólicas biosintéticas, reflejando una adaptación evolutiva al parasitismo obligado (Tsai et al., 2013; Zheng et al., 2013).

2.3.5.1. ADN genómico del *Echinococcus spp.*

El genoma nuclear de *Echinococcus spp.* presenta una organización compleja que ha sido dilucidada progresivamente mediante técnicas de secuenciación de nueva generación. Tsai et al. (2013) reportaron el primer ensamblaje del genoma de *E. granulosus* (genotipo G1) con un tamaño de 114,5 Mb, identificando aproximadamente 11 000 genes codificantes. El estudio reveló una expansión de familias génicas relacionadas con la evasión inmune y la interacción parásito-hospedero, incluyendo genes que codifican para proteínas de choque térmico, proteasas y antígenos de superficie. Además, se identificaron rutas metabólicas empobrecidas, lo que refleja la adaptación del parásito a un estilo de vida parasitario obligatorio.

Por su parte, Zheng et al. (2013) secuenciaron y ensamblaron el genoma de *E. granulosus*, confirmando un tamaño aproximado de 115 Mb y la presencia de 11 325 genes codificantes. Este trabajo puso de relieve la pérdida de genes asociados a las vías metabólicas biosintéticas, coherente con la dependencia nutricional del parásito respecto de su hospedador, así como la expansión de familias génicas relacionadas con el transporte de nutrientes y la modulación de la respuesta inmunitaria.

Tiempo después, Korhonen et al. (2022) lograron un avance relevante al publicar el primer ensamblaje a escala cromosómica del genoma nuclear de *E. granulosus* (genotipo G1). Mediante el scaffolding del genoma nuclear contra el genoma de alta calidad de *E. multilocularis*, organizaron el genoma en seis cromosomas con un tamaño total de aproximadamente 173 Mb. Este ensamblaje permitió

caracterizar en detalle la familia génica Eg95, compuesta por genes que codifican el antígeno vacunal EG95, un inmunógeno clave utilizado en el desarrollo de vacunas contra la hidatidosis ovina.

Más recientemente, Wu et al. (2025) llevaron a cabo un estudio de genómica poblacional de *E. granulosus sensu stricto* basado en el análisis de 715 521 SNPs a lo largo de todo el genoma nuclear. Sus resultados revelaron discordancia mito-nuclear entre los genotipos G1 y G3, evidenciando que estos no pueden diferenciarse confiablemente solo con marcadores mitocondriales. Además, encontraron evidencia de reproducción por fecundación cruzada y señales de selección equilibradora en genes relacionados con la adaptación al ambiente interno del hospedero.

2.3.5.2.ADN mitocondrial del *Echinococcus spp.*

El genoma mitocondrial de *Echinococcus spp.* es una molécula circular que ha sido ampliamente estudiada como fuente de marcadores moleculares para la diferenciación de especies y genotipos. Kinkar et al. (2019) recurrieron a la secuenciación de lecturas largas (PacBio) para analizar el genoma mitocondrial completo del genotipo G1 de *E. granulosus sensu stricto*, y así encontraron una región repetida en tándem de 4,4 kb que eleva el tamaño total del genoma mitocondrial a aproximadamente 18 200 pb. Esta zona repetitiva, que pasa inadvertida para la secuenciación convencional de Sanger, resultó ser un componente estructural relevante de dicho genoma.

Un trabajo clave dentro de esta línea fue el de Bohard et al. (2023), quienes secuenciaron y examinaron genomas mitocondriales completos de *E. multilocularis* obtenidos de pacientes con equinococosis alveolar en Francia, identificando polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a lo largo de todo el genoma mitocondrial. Este estudio permitió caracterizar la diversidad haplotípica y establecer relaciones filogeográficas entre las cepas que circulan en Europa.

Ampliando la perspectiva, Lallemand et al. (2024) llevaron a cabo un análisis filogenético de gran alcance a partir de los genomas mitocondriales completos de 64 aislados de *E. multilocularis* procedentes de las principales zonas endémicas del mundo. Mediante análisis de máxima verosimilitud y redes de haplotipos, cuestionaron las relaciones filogenéticas previamente establecidas y propusieron una nueva estructura poblacional para este parásito.

Más recientemente, Biedermann et al. (2025) realizaron la exploración mitocondrial completa de los genotipos G6 y G7 de *E. granulosus* sensu lato a partir de 222 aislados a nivel global. Mediante secuenciación de mitogenomas completos, identificaron nuevos marcadores para la diferenciación de estos genotipos zoonóticos y descubrieron un nuevo haplogrupo (G6b) en Mongolia.

2.3.6. Epidemiología

2.3.6.1. Distribución geográfica

La equinococosis es una zoonosis de distribución mundial causada por especies del género *Echinococcus*, con mayor prevalencia en regiones donde predominan sistemas de producción ganadera extensiva.

Según la Organización Mundial de la Salud, la enfermedad es endémica en:

- América del Sur (Perú, Argentina, Chile, Uruguay)
- Asia Central y China
- África del Norte
- Europa del Este

En América Latina, la equinococosis quística causada por *Echinococcus granulosus* es la forma más frecuente, especialmente en zonas altoandinas donde la crianza de ganado y la convivencia con perros favorecen la transmisión (OMS, 2020).

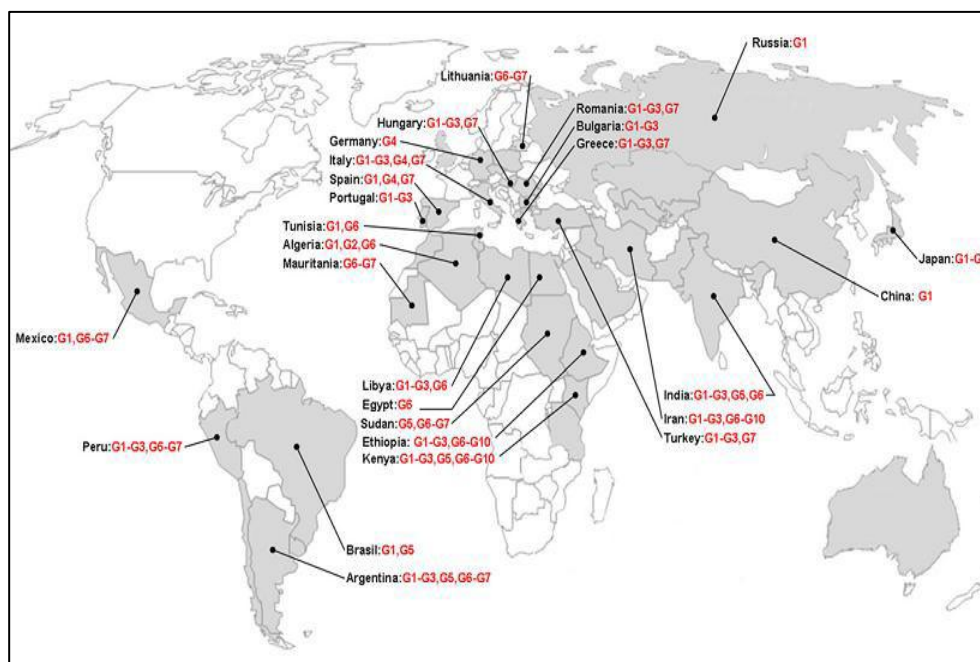


Figura 5. Epidemiología molecular global de *E. granulosus*. Las áreas grises indican los países donde la equinocosis quística ha sido reportada (Carmena, 2012).

2.3.6.2. Magnitud del problema

La equinocosis representa un problema significativo de salud pública y economía pecuaria.

- Más de 1 millón de personas afectadas globalmente
- Pérdidas económicas anuales superiores a 3 mil millones de dólares
- Alta carga en sistemas de salud y producción ganadera

Datos de la Organización Panamericana de la Salud indican que el Perú es uno de los países con mayor endemicidad en Sudamérica, especialmente en regiones como la sierra central y sur (OPS, 2019).

2.3.6.3. Epidemiología en el Perú

En el Perú, la equinocosis es considerada una enfermedad endémica, principalmente en zonas rurales de la sierra.

Regiones más afectadas:

- Junín
- Pasco
- Huancavelica
- Ayacucho
- Puno

Factores predominantes:

- Ganadería extensiva
- Falta de control sanitario en perros
- Deficiente inspección en mataderos

2.3.7. Métodos de diagnóstico de *Echinococcus spp.* en ganado bovino

2.3.7.1. Métodos de diagnóstico clásico

Los métodos de diagnóstico clásico de la equinococosis se basan principalmente en la observación directa del parásito o en la respuesta inmunológica del hospedador. Estos métodos han sido ampliamente utilizados en medicina veterinaria debido a su accesibilidad y bajo costo, aunque presentan limitaciones en sensibilidad y especificidad (Craig et al., 2017).

Inspección post mortem

La inspección post mortem es el método más utilizado para la detección de *Echinococcus spp.* en ganado bovino. Consiste en la revisión macroscópica de órganos como hígado y pulmones en mataderos, donde se identifican quistes hidatídicos característicos. Estos quistes pueden variar en tamaño, número y viabilidad.

Este método permite confirmar infecciones avanzadas; sin embargo, no detecta infecciones tempranas ni distingue entre especies del género *Echinococcus*. Además, depende de la experiencia del inspector y puede subestimar la prevalencia real (OIE, 2019; Moro y Schantz, 2009).

Técnicas serológicas

Las pruebas serológicas detectan anticuerpos o antígenos relacionados con la infección. Entre las más utilizadas se encuentran:

- ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
- Inmunoblot (Western blot)

Estas técnicas permiten el diagnóstico en animales vivos, lo que representa una ventaja significativa. No obstante, pueden presentar reacciones cruzadas con otros parásitos, afectando la especificidad, y no siempre diferencian infecciones activas de pasadas (Zhang et al., 2015).

Examen coproparasitológico (en hospedadores definitivos)

Aunque no se aplica directamente en bovinos (hospedadores intermediarios), el análisis coproparasitológico en perros (hospedadores definitivos) permite identificar huevos de *Echinococcus spp.* mediante técnicas de flotación.

Sin embargo, los huevos son morfológicamente indistinguibles de otros céstodos, lo que limita su valor diagnóstico específico (Deplazes et al., 2017).

2.3.8. Métodos de diagnóstico molecular

Los métodos moleculares han revolucionado el diagnóstico de enfermedades parasitarias debido a su alta sensibilidad, especificidad y capacidad para identificar especies y genotipos (Craig et al., 2017).

2.3.8.1.Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR convencional)

La PCR convencional permite amplificar fragmentos específicos del ADN de *Echinococcus spp.* a partir de muestras biológicas como tejidos infectados o quistes hidatídicos.

Este método es altamente específico y útil para confirmar la presencia del parásito, así como para estudios de caracterización genética. Sin embargo, requiere etapas posteriores de análisis (electroforesis), lo que incrementa el tiempo de procesamiento. (Bowles et al., 1992).

2.3.8.2.PCR en tiempo real (qPCR)

La PCR en tiempo real (qPCR) es una técnica avanzada que permite la detección y cuantificación de fragmentos, regiones específicas del ADN del parásito en tiempo real mediante el uso de sondas fluorescentes.

Entre sus principales ventajas destacan:

- Alta sensibilidad (detecta bajas cargas parasitarias)
- Alta especificidad (uso de sondas específicas)
- Rapidez en la obtención de resultados
- Reducción del riesgo de contaminación

Además, la qPCR permite cuantificar la carga parasitaria, lo cual es útil en estudios epidemiológicos y en la evaluación de la intensidad de infección (Knapp et al., 2014).

2.3.8.3.Secuenciación genética

La secuenciación del ADN permite identificar con precisión la especie y el genotipo de *Echinococcus spp.*, lo que es fundamental para estudios epidemiológicos y de diversidad genética.

Este método suele emplearse como complemento de la PCR, aunque su costo y complejidad limitan su uso rutinario (Nakao et al., 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH), durante los años de 2024 y 2025, en la ciudad de Ayacucho.

El proceso de extracción de ADN y estandarización de técnica de qPCR, se realizó en el Laboratorio de Parasitología de Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, distrito de Ayacucho, departamento de Ayacucho.

3.2. Definición de la población y muestra

3.2.1. Población

La población de estudio estuvo conformada por bovinos (*Bos taurus*) beneficiados en matadero del distrito de Carmen Alto durante los años 2024 y 2025, de los cuales se obtuvieron muestras biológicas para la detección de *Echinococcus spp.*

3.2.2. Muestra

La muestra estuvo conformada por 25 muestras biológicas (quistes hidatídicos), obtenidas en diferentes días y recolectadas del pulmón de bovinos (*Bos taurus*) beneficiados en el matadero del distrito de Carmen Alto, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, de las cuales 03 muestras biológicas fueron descartadas por no cumplir con los criterios de inclusión; por lo tanto, procedimos a realizar el análisis de las 22 muestras que sí cumplían estos parámetros.

3.2.3. Muestreo

El tipo de muestreo fue no probabilístico por conveniencia, seleccionando aquellas muestras que presentaron características compatibles con infección por *Echinococcus spp.*.

3.2.4. Unidad Experimental

La unidad de análisis estuvo constituida quistes hidatídicos obtenidas de bovinos (*Bos taurus*) beneficiados en el matadero del distrito Carmen alto, provincia de Huamanga departamento de Ayacucho

Dichas muestras fueron sometidas a análisis molecular mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) para la detección de *Echinococcus spp.*.

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Procedimiento para la recolección de datos

Obtención de las muestras de pulmones infectados

Se recolectaron muestras de pulmones de ganado vacuno "*Bos taurus*" con evidencia visual de hidatidosis en su estructura.

Los quistes hidatídicos pulmonares fueron diseccionados junto a una porción del tejido y colocados en un táper de plástico PET (polietileno tereftalato) con solución salina fisiológica al 0.9% y a su vez fue llevado a una caja *cooler* de conservación, empacados con geles refrigerantes, para evitar la acción de las proteasas. Luego fueron transportados al Laboratorio de Parasitología para ser procesados dentro de las 18 a 24 horas.

Obtención del líquido hidatídico

Los quistes hidatídicos identificados en pulmones y/o hígados de bovino se limpiaron externamente con alcohol al 70% para evitar contaminación superficial. Mediante una jeringa estéril de 10 mL acoplada a una aguja N° 18, se punzó cuidadosamente la pared del quiste y se aspiró el líquido hidatídico, evitando perforar el lado opuesto del quiste. El líquido aspirado se depositó en un tubo Falcon estéril de 50 mL y se trasladó al laboratorio en condiciones de refrigeración (4 °C) para su procesamiento inmediato.

Obtención y concentración de protoescolices

El líquido hidatídico aspirado se dejó en reposo a 4 °C durante 20 minutos para permitir la sedimentación pasiva de la arena hidatídica. Transcurrido este tiempo, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante, dejando aproximadamente 10 mL de sedimento en el fondo del tubo. El sedimento se transfirió a un tubo Falcon estéril de 15 mL y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Culminada la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el sedimento final, rico en protoescolices, se conservó a 4 °C hasta su procesamiento para la extracción de ADN.

Obtención del ADN del *Echinococcus spp.*

El ADN de *Echinococcus spp.* se obtuvo de los protoescolices contenidos en el fluido hidatídico de los quistes presentes en los pulmones.

Para la obtención de ADN se tomó en cuenta los siguientes criterios de inclusión y exclusión respectivamente:

Criterios de inclusión

Se consideraron como óptimos los quistes que tienen aproximadamente 3 cm de diámetro a más, de consistencia blanda, que presentaron membranas translúcidas ya que ello nos garantizó la presencia de protoescolices.

Criterios de exclusión

Se desecharon los que presentaron degeneración, calcificación y aquellos donde el líquido hidatídico tenga un aspecto turbio, lo cual indica contaminación bacteriana.

Con la finalidad de mantener las condiciones de esterilidad, fueron desinfectados externamente con alcohol yodado y preparados bajo una cámara de flujo laminar con instrumental quirúrgico estéril.

La obtención del ADN parasitario se obtuvo según recomendaciones del kit comercial de extracción y purificación de ADN innuPRED DNA Mini Kit.

3.3.2. Protocolo de Extracción del ADN del *Echinococcus spp.*:

- Se transfirió 200 µL de sedimento a un tubo Eppendorf y luego se añadió 400 µL de solución de Lisis TLS y 25 µL de Proteinasa K, se mezcló vigorosamente mediante agitación vorticial pulsada durante 5 segundos.

- Posteriormente se incubó a 50 °C hasta que la muestra esté completamente lisada durante dos a tres horas para una completa digestión.
- Se añadió 200 µL de Buffer de unión (Binding Buffer) y se mezcló por 4" y luego se incubó a 70° C por 10'.
- Se añadió 200 µL de etanol absoluto y luego se homogenizó inmediatamente.
- Se transfirió el contenido a una columna de sílica y luego se centrifugó a 11 000 rpm por un minuto. Se descartó el contenido del tubo colector.
- Se añadió 500 µL de Wash Buffer I a la columna de sílica y luego se centrifugó a 14 000 rpm durante 1 minuto y se descartó el tubo colector.
- Se añadió 500 µL de Wash Buffer II y luego se centrifugó a 14 000 rpm durante 1 minuto y se descartó el tubo colector. Una vez eliminado el contenido del tubo colector se realizó una centrifugación adicional durante 2 min para eliminar residuos de etanol.
- Se transfirió la columna a un tubo Eppendorf estéril y se añadió 50–100 µL de Elution Buffer. Se incubó 1–5 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó durante 1 min para recuperar el ADN.
 - Se guardó en la congeladora a -20 °C para luego realizar trabajos de PCR.

3.3.3. Cuantificación del ADN

Tras obtener el material genético, es fundamental determinar su rendimiento mediante espectrofotometría. Según la ley de Beer-Lambert, la concentración de una molécula disuelta depende de la cantidad de luz que absorben dichas moléculas. Una propiedad del ADN es que absorbe luz ultravioleta (UV) a 260 nm, lo cual permite estimar su concentración a través de la espectrofotometría. Si la cubeta donde se disuelve el ADN tiene 1 cm de longitud, la absorbancia equivale a la densidad óptica (DO). En el caso del ADN genómico o de doble cadena, una densidad óptica corresponde a 50 µg/ml (Nelson y Cox, 2017). Para obtener la concentración en nanogramos por microlitro (ng/µL), es necesario considerar el factor de dilución. No obstante, con algunos equipos no hace falta diluir la muestra, pues el mismo instrumento entrega directamente la concentración en ng/µL. Dado que una reacción de PCR requiere entre 10 y 200 ng, se necesita obtener al menos 5 ng/µL de ADN por muestra; si se recuperaron 50 µL, el rendimiento neto de la extracción sería de 0.25 µg. Concentraciones más bajas dificultan la estandarización de la PCR o de otras técnicas. Para estimar la pureza del ADN se emplea el cociente entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm: se considera que

una proporción de 1.8 corresponde a ADN puro, mientras que valores menores indican presencia de proteínas. Una segunda forma de valorar la pureza de los ácidos nucleicos es la proporción 260/230, cuyos valores aceptados se ubican entre 2.0 y 2.2; si la relación es menor, señala la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol (Sambrook, 2001).

3.3.4. Estandarización de la PCR en tiempo real

Las muestras de ADN obtenidos fueron eluidas en un volumen final de 100 µL, dispuestos en dos tubos de 1,5 ml (50 µL c/u).

Empleando las muestras de ADN genómico cuantificado de *Echinococcus spp.* se realizó la estandarización de la PCR en tiempo real empleando los cebadores (primers) como iniciadores los cuales se detallan a continuación:

Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de *Echinococcus spp.*

Primer Name		Sequence (5' to 3')
Ec-2-FW	Forward	5'-TAG TTG CTG CTG GTG TTT GGT-3'
Ec-2-Rev	Reverse	5'-TAG ACT GCG AAC CAC CAC TAC-3'

Se emplearon este par de cebadores o primers, los cuales amplifican un fragmento de 309 pb correspondiente al gen nad5, que codifica para la subunidad 5 del complejo NADH deshidrogenasa del ADN mitocondrial de *Echinococcus spp.* La región de amplificación se localiza entre las posiciones 1054 y 1362 del mitogenoma de *E. felidis*, y se ha demostrado que estos oligonucleótidos permiten la detección de *E. granulosus sensu stricto* y *E. canadensis*, según lo reportado por Hüttner et al. (2017), quienes validaron su especificidad mediante análisis in silico con BLASTN, confirmando alineamientos significativos y exclusivos con secuencias del gen nad5 de *E. granulosus*.

En el contexto de nuestro estudio, estos cebadores constituyen marcadores moleculares de carácter diagnóstico, donde la presencia del amplicón de 309 pb evidencia la positividad de la muestra para *Echinococcus spp.*

Tabla 2. Composición inicial de la mezcla de qPCR para la detección de *Echinococcus spp.*

Componente	Concentración Inicial	Concentración por Reacción	1 vol (10 µL)
H ₂ O PCR c.s.p			1.6 µL
Ec-2-Fw (100 µmol/µL)	10 µmol/µL	0.2 µmol	0.20 µL
Ec-2-Rev (100 µmol/µl)	10 µmol/µL	0.2 µmol	0.20 µL
SybrGreen qPCR	2X	1X	5.00 µL
Volumen del Mix			7.00 µL
DNA	Variable	-	3.00 µL
Volumen Total			10.00 µL

Así mismo, las condiciones de amplificación inicial fueron constituidos por:

Tabla 3. Condiciones iniciales de amplificación por qPCR para la detección de *Echinococcus spp.*

Fase	Temperatura	Duración	Ciclos
Denaturación inicial	95°C	1 minuto	1
Denaturación	95°C	15 segundos	45
Hibridación/extensión	60°C	30 segundos	

Una vez estandarizado, se realizó diluciones sucesivas hasta alcanzar al menos 5 diluciones, a partir del cual se determinó la eficiencia de la PCR y el límite de detección.

3.3.5 Evaluación de la Técnica de PCR para el diagnóstico

Para la evaluación del método, se elaboró una curva estándar a concentración de ADN genómico desde 10^3 , 10^2 , 10, 1, 10^{-2} , 10^{-3} ng/uL a partir de una muestra de ADN genómico de *Echinococcus spp.*, se determinó el límite de detección, eficiencia y reproducibilidad del método (Vignes Rathinasamy, 2018).

Se determinó la desviación estándar y el % de variación.

Así mismo, se determinará la sensibilidad y especificidad del método a partir de muestras de ADN procedentes de ganado vacuno confirmado para la enfermedad por evidencia de los quistes en el pulmón.

3.4 Tipo de investigación

Básica-experimental

3.5 Diseño de investigación

Experimental.

3.6 Análisis de datos estadísticos

Los datos obtenidos durante la estandarización de la PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de *Echinococcus spp.* en ganado vacuno (*Bos taurus*) fueron organizados en hojas de cálculo y analizados utilizando el software Microsoft Excel y el paquete estadístico IBM SPSS Statistics (versión XX).

Se realizó un análisis descriptivo de las variables cuantitativas, tales como la concentración de ADN (ng/μL), los valores de ciclo umbral (Ct) y la eficiencia de amplificación, empleando medidas de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar).

Para la evaluación de la estandarización de la técnica de qPCR, se construyó una curva estándar a partir de diluciones seriadas del ADN, determinándose la eficiencia de amplificación y el coeficiente de determinación (R²). La eficiencia de la reacción fue calculada mediante la fórmula:

$$E = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100$$

Considerándose aceptables valores de eficiencia entre 90% y 110% y un R² ≥ 0.98.

Asimismo, se evaluó la reproducibilidad de la técnica mediante el cálculo del coeficiente de variación (CV) entre réplicas. Para el análisis inferencial, cuando fue necesario, se aplicaron pruebas estadísticas como la prueba t de Student o ANOVA, considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Finalmente, se determinó la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba, comparando los resultados de la qPCR con métodos de referencia, mediante la construcción de tablas de contingencia.

IV. RESULTADOS



Figura 6. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de concentración del ADN extraído, empleados para la detección de *Echinococcus spp.* en muestras de ganado vacuno (*Bos taurus*).

Leyenda:

M: Marcador de peso molecular (DNA ladder).

Carriles 1–12: Muestras de ADN analizadas.

CN: Control negativo

Tabla 4. Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN extraído de muestras de quistes hidatídicos extraídos de ganado vacuno (*Bos taurus*) mediante espectrofotometría UV.

Nº	CUANTIFICACIÓN	UNIDAD	A260	260/230	260/280
1	6.308	ng/μL	0.0888	0.06	3.86
2	8.454	ng/μL	1.6908	0.47	1.77
3	45.915	ng/μL	0.9183	0.38	1.99
4	196.533	ng/μL	3.9307	0.59	2.02
5	99.747	ng/μL	1.9949	0.16	1.9
6	361.888	ng/μL	7.2378	1.15	1.96
7	416.722	ng/μL	8.3344	1.55	1.95
8	314.183	ng/μL	6.2837	3.26	2.32
9	937.413	ng/μL	18.7483	1.14	1.99
10	93.137	ng/μL	1.8627	0.19	1.76
11	223.121	ng/μL	4.4624	0.86	1.88
12	534.430	ng/μL	10.6886	0.98	2.03
13	1,115.681	ng/μL	22.3136	1.51	2.01
14	661.650	ng/μL	13.2330	1.97	1.99
15	512.622	ng/μL	10.2524	1.43	2.00
16	162.392	ng/μL	3.2478	0.87	1.87
17	297.763	ng/μL	5.9553	1.20	1.91
18	523.740	ng/μL	10.4748	1.33	1.94
19	1,419.978	ng/μL	28.3996	1.34	1.99
20	95.926	ng/μL	1.9185	1.44	1.54
21	20.174	ng/μL	0.4035	0.07	1.91
22	102.727	ng/μL	2.0545	0.2	1.71

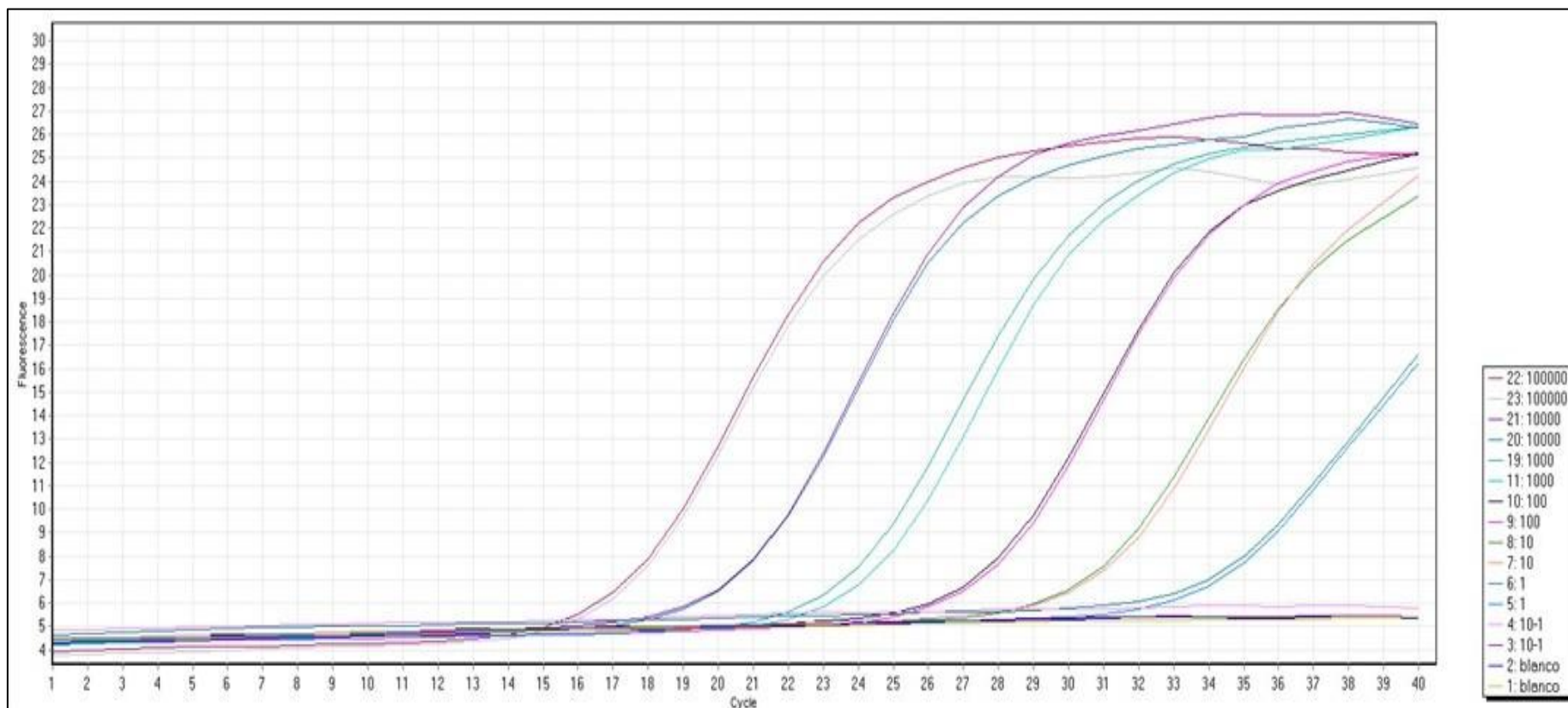


Figura 7. Curvas de amplificación de la PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de *Echinococcus* spp. en diferentes diluciones seriadas de ADN.

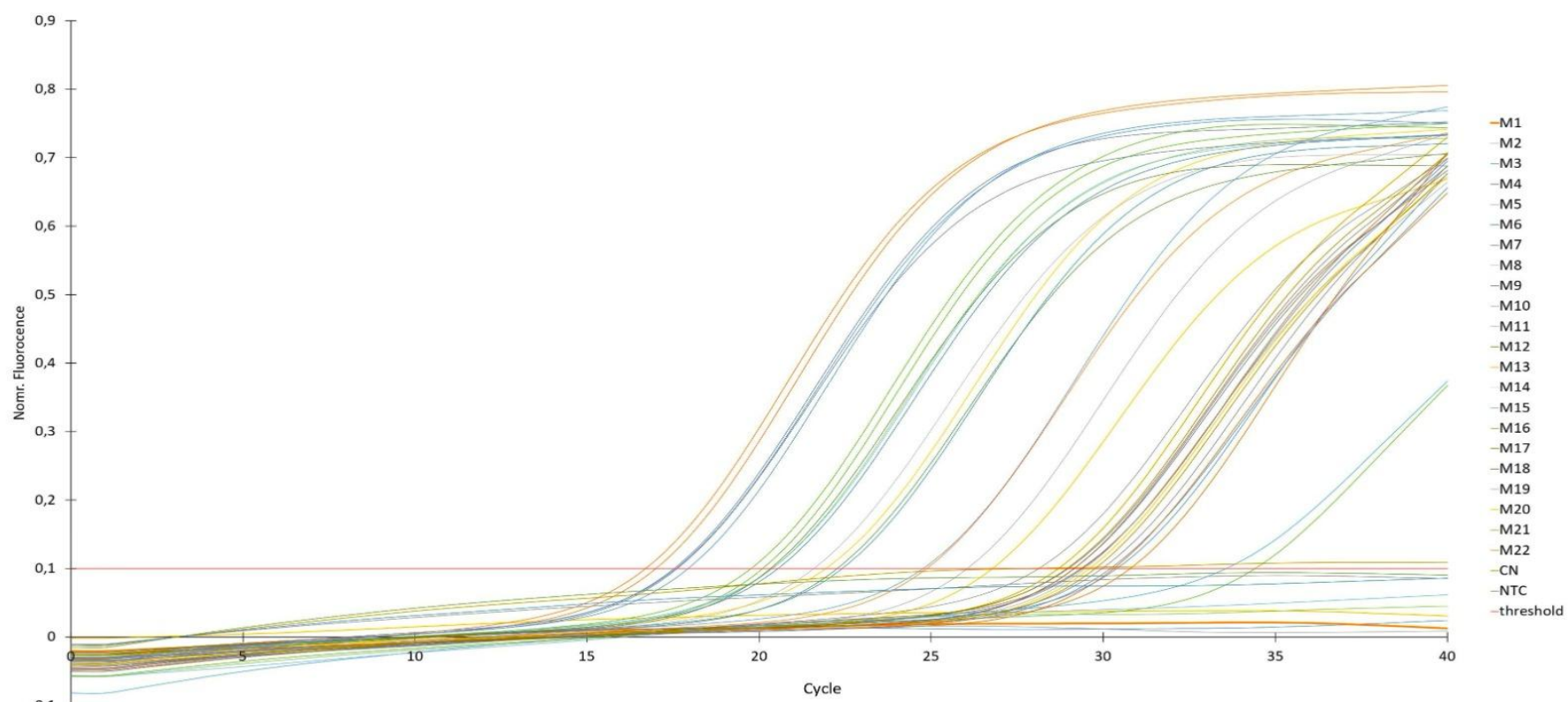


Figura 8. Curvas de amplificación por qPCR en 22 muestras de ganado vacuno (*Bos taurus*) para la detección de *Echinococcus spp.*, incluyendo controles positivos y negativos. Ayacucho, 2024.

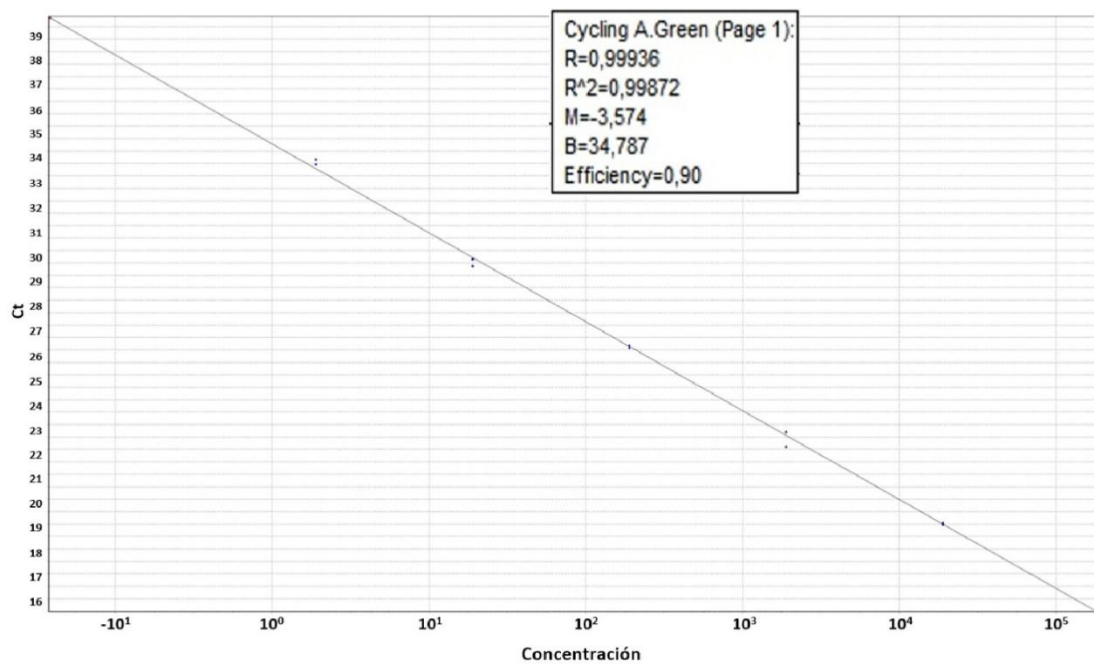


Figura 9. Curva estándar de qPCR para la detección de *Echinococcus spp.* en ganado vacuno (*Bos taurus*). Ayacucho, 2024.

Tabla 5. Componentes y condiciones finales de la mezcla de reacción utilizada para la amplificación y detección de *Echinococcus spp.* mediante qPCR-SYBR Green.

Componente	Concentración Inicial	Concentración por Reacción	1 vol (0 µL)
H ₂ O PCR c.s.p			6.4 µL
Ec-2-Fw (100 µmol/µL)	10 µmol/µL	0.53 µmol	0.8 µL
Ec-2-Rev (100 µmol/µl)	10 µmol/µL	0.53 µmol	0.8µL
Master Mix	2X	1X	10.00 µL
DNA	Variable	-	2.00 µL
Volumen Total			20.00 µL

Fase	Temperatura	Duración	Ciclos
Denaturación inicial	95°C	10 minutos	1
Denaturación	95°C	15 segundos	40
Hibridación/extensión	60°C	1 minuto	

V. DISCUSIÓN

La figura 6 muestra la imagen de electroforesis muestra la amplificación de fragmentos de ADN correspondientes a *Echinococcus spp.* en las muestras analizadas (1–12), evidenciándose bandas definidas en la mayoría de los carriles. Esto indica la presencia del material genético del parásito en las muestras evaluadas. El marcador molecular (M) permite corroborar el tamaño esperado del amplicón, confirmando la especificidad de la reacción. Por otro lado, los controles negativos (CN) no presentan bandas visibles, lo cual descarta contaminación y valida la confiabilidad de los resultados obtenidos.

La presencia de bandas nítidas en la electroforesis sugiere un bajo nivel de fragmentación del ADN. Los resultados obtenidos guardan relación con lo reportado por Simsek et al. (2010), quienes señalan que la presencia de bandas nítidas y claramente diferenciadas en geles de agarosa constituye una evidencia de que el proceso de extracción de ADN fue adecuado y que las muestras biológicas conservaron una buena calidad. En este estudio, el empleo de un kit comercial para la extracción del material genético habría contribuido a obtener ADN con un mayor grado de pureza, ya que este tipo de metodología permite reducir la presencia de contaminantes e inhibidores que pueden interferir posteriormente en la amplificación, en comparación con procedimientos tradicionales como la extracción con fenol-cloroformo.

Asimismo, se observaron diferencias en la intensidad de fluorescencia entre los distintos carriles del gel, lo que podría estar relacionado con variaciones en la cantidad inicial de ADN presente en cada una de las muestras. Craig et al. (2003) mencionan que el rendimiento del material genético puede verse condicionado por diversos factores biológicos, entre ellos la viabilidad de los protoescolices y el grado de maduración del quiste hidatídico. Por ello, aunque la electroforesis

convencional permite realizar únicamente una valoración aproximada de la cantidad de ADN obtenida, los resultados encontrados proporcionan una base adecuada para continuar con el análisis mediante qPCR. Esta metodología permitirá realizar una cuantificación más precisa y, al mismo tiempo, detectar con mayor sensibilidad aquellas muestras que presenten una baja carga parasitaria.

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos en la cuantificación de ADN, donde se evidencia una considerable variación en las concentraciones entre las diferentes muestras, con valores que fluctúan desde 6.308 ng/μL hasta 1,419.978 ng/μL. Esta diferencia puede estar relacionada con la eficiencia del proceso de extracción y con la cantidad de material genético disponible en cada muestra proveniente de quistes de ganado bovino. En los análisis moleculares, este tipo de variabilidad es frecuente, debido a que factores como la naturaleza del tejido analizado, el protocolo de extracción empleado y el nivel de conservación o degradación del ADN pueden influir directamente en la concentración final obtenida.

Respecto a la pureza del ADN, la relación de absorbancia A260/280 constituye un parámetro fundamental para determinar la posible presencia de contaminantes proteicos. La mayoría de las muestras evaluadas presentan valores dentro o próximos al intervalo considerado adecuado (1.8–2.0), lo cual indica una calidad aceptable del ADN extraído. No obstante, algunas muestras mostraron valores alejados de este rango, como la muestra 1 (3.86) y la muestra 20 (1.54), lo que podría estar asociado con la presencia de sustancias interferentes o con variaciones durante el proceso de medición. De acuerdo con Wilfinger et al. (1997), valores de absorbancia fuera del rango recomendado pueden comprometer el desempeño de las reacciones de PCR al afectar la actividad de las enzimas involucradas en la amplificación.

Por otro lado, el índice A260/230 permite estimar la presencia de compuestos contaminantes como residuos de fenoles, sales u otros compuestos orgánicos derivados del proceso de extracción. En este análisis, varias muestras presentaron valores inferiores al rango considerado óptimo (2.0–2.2), lo que podría indicar la presencia de agentes inhibidores capaces de reducir la eficiencia de la amplificación molecular. Estos resultados son concordantes con lo descrito por Sambrook y Russell (2001), quienes señalan que una baja relación A260/230 puede afectar la reproducibilidad y el rendimiento de los ensayos basados en PCR.

Igualmente, las muestras que presentaron concentraciones elevadas de ADN, como las muestras 13 y 19, podrían requerir una etapa previa de dilución antes de su utilización en qPCR, con el propósito de evitar posibles efectos inhibitorios ocasionados por un exceso de material genético en la reacción. En cambio, aquellas muestras con concentraciones reducidas, como las muestras 1 y 21, podrían representar un desafío para la detección molecular, especialmente en situaciones donde la cantidad de parásitos presentes sea limitada.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la mayoría de las muestras poseen concentraciones de ADN compatibles con análisis moleculares; sin embargo, las diferencias observadas en los parámetros de pureza resaltan la importancia de mejorar o complementar el protocolo de extracción mediante etapas adicionales de limpieza y purificación. Estas consideraciones son esenciales para asegurar una adecuada sensibilidad, eficiencia y reproducibilidad durante la estandarización de la qPCR orientada a la detección de especies del género *Echinococcus*.

La figura 7 presenta las curvas de amplificación obtenidas a partir de diluciones seriadas del ADN objetivo, donde se observa el comportamiento sigmoidal característico de una reacción de qPCR. Se evidencia que, conforme disminuye la concentración inicial de ADN, las curvas presentan un desplazamiento progresivo hacia la derecha, acompañado de un incremento en los valores del ciclo umbral (Ct). Este comportamiento demuestra la relación inversamente proporcional entre la cantidad inicial de ADN presente en la muestra y el número de ciclos necesarios para alcanzar el nivel de detección establecido.

Las muestras con mayores concentraciones de ADN alcanzaron la fase de amplificación en ciclos más tempranos, mientras que las diluciones más bajas (10^{-1}) requirieron un mayor número de ciclos para generar una señal detectable. Este patrón es esperado en ensayos de qPCR con una adecuada eficiencia de amplificación. Además, la ausencia de señal en los controles negativos confirma la inexistencia de contaminación durante el procedimiento, respaldando la especificidad del ensayo realizado.

Estos resultados coinciden con lo señalado por Bustin et al. (2009), quienes indican que una reacción de qPCR correctamente optimizada debe presentar curvas de amplificación definidas, con una separación uniforme entre las diferentes diluciones seriadas, lo cual refleja una eficiencia adecuada del proceso.

Además, destacan que la relación lineal entre los valores de Ct y el logaritmo de la concentración inicial de ADN constituye un criterio fundamental para obtener una cuantificación molecular confiable.

De manera complementaria, Kubista et al. (2006) mencionan que factores como la presencia de compuestos inhibidores o diferencias en la calidad del ADN pueden modificar el rendimiento de la qPCR, generando retrasos en la amplificación o alteraciones en la forma esperada de las curvas. En el presente análisis, la distribución ordenada y consistente de las curvas sugiere que no existen interferencias significativas y que la reacción presenta buena repetibilidad.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que el proceso de estandarización de la qPCR fue satisfactorio, evidenciando niveles adecuados de sensibilidad, especificidad y eficiencia. Esto permite considerar esta metodología como una herramienta confiable para la detección molecular de *Echinococcus spp.* en las muestras analizadas.

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), donde se evidencia la amplificación del ADN objetivo en varias de las muestras evaluadas, lo que confirma la presencia de *Echinococcus spp.* en muestras procedentes de ganado bovino (*Bos taurus*). Las curvas de amplificación presentan variaciones en los valores del ciclo umbral (Ct), lo que refleja diferencias en la cantidad de ADN parasitario presente entre las muestras analizadas y, por tanto, posibles variaciones en la intensidad de la infección. Este comportamiento coincide con lo descrito por Thompson (2008), quien menciona que la distribución de las especies del género *Echinococcus* en sus hospedadores intermediarios no ocurre de manera uniforme, debido a la influencia de diversos factores epidemiológicos, ambientales y biológicos. En este sentido, las muestras que alcanzaron la señal de amplificación en ciclos iniciales (valores de Ct bajos) indicarían una mayor cantidad de ADN parasitario al inicio de la reacción, mientras que aquellas que presentaron valores de Ct elevados corresponderían a muestras con menor cantidad de material genético detectable.

Los resultados obtenidos también concuerdan con lo señalado por Craig et al. (2017), quienes destacan que la qPCR representa una metodología altamente sensible, capaz de identificar cantidades reducidas de ADN de *Echinococcus spp.*, superando las limitaciones de métodos tradicionales como la evaluación mediante inspección post-mortem. Esta característica resulta especialmente importante en

estudios donde la carga parasitaria puede ser baja o presentar una distribución irregular dentro de la población analizada.

En cuanto a los controles empleados, tanto el control negativo (CN) como el control sin plantilla (NTC) no presentaron señales de amplificación, lo cual demuestra que no existió contaminación durante la preparación de los reactivos ni durante el desarrollo del ensayo. La correcta respuesta de estos controles respalda la especificidad y confiabilidad de la metodología aplicada, considerando que, según la Organización Mundial de la Salud (2021), los controles negativos constituyen un elemento esencial para validar los procedimientos basados en técnicas moleculares.

De esta manera, la forma sigmoidea de las curvas de amplificación indica que las condiciones establecidas para la estandarización de la qPCR fueron apropiadas, permitiendo una adecuada replicación del fragmento de ADN seleccionado. En este contexto, Trachsel et al. (2007) señalan que la optimización de los cebadores y sondas es un aspecto determinante para lograr una detección específica de *Echinococcus spp.* y reducir la posibilidad de resultados derivados de amplificaciones inespecíficas.

Desde una perspectiva epidemiológica, estos hallazgos adquieren relevancia para la región de Ayacucho, debido a que evidencian la posible presencia y circulación del parásito en poblaciones bovinas, representando un potencial riesgo sanitario por el carácter zoonótico de la equinococosis. De acuerdo con la World Organisation for Animal Health (2020), los bovinos pueden participar como hospedadores intermediarios dentro del ciclo biológico del parásito, favoreciendo su mantenimiento en áreas donde existen condiciones epidemiológicas adecuadas.

En conjunto, los resultados obtenidos respaldan la utilidad de la qPCR como una herramienta molecular sensible, específica y reproducible para la detección de *Echinococcus spp.* en muestras biológicas. Su aplicación permite fortalecer los sistemas de vigilancia epidemiológica y generar información relevante para el diseño de estrategias orientadas al control y prevención de esta zoonosis.

En la figura 9 se observa la curva estándar obtenida para la detección de *Echinococcus spp.* mediante PCR en tiempo real, donde se evidencia una relación lineal altamente significativa entre el logaritmo de la concentración de ADN y los valores de Ct (ciclo umbral). Esta relación se encuentra respaldada por un

coeficiente de correlación de $R = 0.99936$ y un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.99872$, valores que demuestran una excelente correlación y una elevada capacidad predictiva del modelo utilizado.

La alta linealidad obtenida constituye un parámetro fundamental para validar la aplicación cuantitativa de la qPCR, debido a que permite establecer una relación confiable entre la cantidad inicial de ADN presente en la muestra y el ciclo en el cual se produce la detección de la señal fluorescente. Asimismo, la pendiente de la curva estándar ($M = -3.574$) se encuentra dentro de los valores aceptados para ensayos de qPCR, aunque presenta una ligera diferencia respecto al valor considerado ideal (-3.32), lo que corresponde a una eficiencia de amplificación aproximada del 90%.

Según Bustin et al. (2009), los ensayos cuantitativos mediante qPCR presentan una eficiencia adecuada cuando se encuentran dentro del intervalo de 90% a 110%, por lo que los valores obtenidos en este estudio indican que la reacción estandarizada posee un desempeño aceptable, además de mostrar características de reproducibilidad y confiabilidad. La eficiencia registrada sugiere que el sistema de amplificación permite un incremento cercano al doble del ADN objetivo durante cada ciclo de reacción.

Sin embargo, la ligera variación respecto a la eficiencia teórica máxima podría estar relacionada con diversos factores experimentales que pueden influir en el rendimiento de la reacción, tales como:

- presencia de inhibidores en la muestra,
- condiciones subóptimas de concentración de primers o sondas,
- calidad del ADN extraído.

De acuerdo con Dorak T. M. (2006), pequeñas variaciones en la pendiente pueden afectar la precisión cuantitativa, pero no necesariamente comprometen la detección cualitativa del patógeno, lo cual es relevante en estudios epidemiológicos.

Además, el valor del intercepto obtenido ($B = 34.787$) representa el valor de C_t esperado para concentraciones mínimas detectables de ADN, lo que evidencia que la metodología desarrollada presenta una sensibilidad adecuada. Esta característica resulta fundamental en la detección temprana de infecciones causadas por *Echinococcus spp.*, particularmente en hospedadores

intermediarios como el ganado bovino (*Bos taurus*), donde la cantidad de ADN parasitario presente puede ser reducida.

La capacidad de identificar concentraciones bajas de material genético permite mejorar la precisión del diagnóstico molecular, incluso en muestras con cargas parasitarias limitadas, contribuyendo a una detección más eficiente del agente infeccioso y fortaleciendo las estrategias de vigilancia epidemiológica.

La dispersión mínima de los puntos experimentales alrededor de la recta de regresión indica una alta reproducibilidad del ensayo, lo cual coincide con lo reportado por Kubista Mikael et al. (2006), quienes destacan que una baja variabilidad técnica es esencial para la validación de métodos moleculares.

En conjunto, estos resultados demuestran que la técnica de qPCR estandarizada presenta:

- Alta linealidad ($R^2 > 0,99$)
- Eficiencia aceptable (90%)
- Buena reproducibilidad
- Adecuada sensibilidad analítica

Lo cual la convierte en una herramienta confiable para la detección de *Echinococcus spp.* en muestras de ganado bovino en condiciones locales como las de Ayacucho y otras regiones de nuestro país.

Los resultados obtenidos en la tabla 5, son los resultados finales de los componentes y las condiciones de amplificación de la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) estandarizada para la detección de *Echinococcus spp.* En esta tabla se presenta un adecuado desempeño analítico, reflejado en la capacidad de amplificar ADN parasitario incluso en bajas concentraciones. Estos resultados demuestran la elevada sensibilidad de la qPCR, característica fundamental para el diagnóstico temprano y la vigilancia epidemiológica de la equinococosis. La alta capacidad de detección observada coincide con lo reportado por Zhang X. y colaboradores, quienes desarrollaron una qPCR tipo TaqMan para la detección simultánea de diferentes especies de *Echinococcus*, alcanzando un límite de detección de hasta 10 copias de ADN/ μ L y una elevada reproducibilidad, concluyendo que esta metodología constituye una herramienta confiable para estudios epidemiológicos, un que en nuestro trabajo de investigación se usó sybr green.

Los resultados observados en la tabla 5 son concordantes con los obtenidos por Knapp J. y colaboradores, quienes demostraron que la qPCR posee una especificidad diagnóstica cercana al 100 % y mantiene una elevada sensibilidad incluso cuando las muestras contienen cantidades reducidas de ADN parasitario. Los autores destacaron que esta capacidad permite reducir significativamente la ocurrencia de falsos negativos, aspecto esencial en infecciones parasitarias zoonóticas donde la carga parasitaria puede ser baja.

También los resultados obtenidos en este trabajo de investigación guardan relación con lo informado por Ahmed et al. (2016), quienes evaluaron metodologías moleculares para el diagnóstico de la equinococosis quística y concluyeron que las técnicas basadas en amplificación de ADN presentan alta precisión, rapidez y reproducibilidad, superando ampliamente las limitaciones de los métodos convencionales. Según estos autores, la detección molecular constituye actualmente uno de los enfoques más robustos para el diagnóstico de infecciones causadas por *Echinococcus spp.*

Los resultados finales obtenidos en esta investigación son comprables con los trabajos reportados por Höglund J. et al. (2013), quienes utilizaron qPCR para la detección de helmintos gastrointestinales en bovinos mediante regiones ITS2 del ADN ribosomal, observando una elevada sensibilidad y una adecuada cuantificación de la carga parasitaria. Los autores señalaron que la qPCR ofrece ventajas significativas respecto a las técnicas parasitológicas tradicionales debido a su capacidad para detectar infecciones con baja carga parasitaria y proporcionar resultados altamente reproducibles.

Finalmente, los resultados obtenidos en la presente investigación confirman que la qPCR constituye una herramienta molecular altamente sensible, específica y reproducible para la detección de *Echinococcus spp.* en ganado vacuno (*Bos taurus*), contribuyendo al fortalecimiento de los programas de vigilancia epidemiológica y control de la equinococosis en regiones endémicas como Ayacucho y también aplicarlos en la detección del parásito en el ser humano teniendo como muestra el líquido hidatídico obtenido durante procedimientos quirúrgicos o punciones, tejido de quistes hidatídicos resecados, membranas germinales o protoescolices recuperados de quistes y en algunos casos, muestras de sangre o suero, aunque la sensibilidad suele ser menor debido a la poca cantidad de ADN circulante.

VI. CONCLUSIONES

1. Se logró estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) para la detección de *Echinococcus spp.* en muestras de quistes hidatídicos obtenidos del ganado vacuno (*Bos taurus*), estableciendo condiciones óptimas de amplificación que garantizan resultados confiables y reproducibles.
2. La obtención y purificación del ADN a partir de quistes hidatídicos resultó adecuada en la mayoría de las muestras, evidenciándose concentraciones variables pero suficientes para su uso en análisis moleculares como es el caso de la técnica qPCR.
3. La técnica de qPCR mostró una alta eficiencia de amplificación (90%), un coeficiente de determinación elevado ($R^2 = 0,99872$) y una pendiente dentro del rango aceptable, lo que indica una adecuada linealidad, precisión y confiabilidad del método estandarizado y curva estándar obtenida demostró una relación inversa consistente entre el valor de Ct y la concentración de ADN, confirmando la capacidad de la técnica para detectar diferentes niveles de carga parasitaria, incluso en bajas concentraciones. Las curvas de amplificación presentaron un comportamiento sigmoide característico, con adecuada separación entre diluciones seriadas y ausencia de amplificación en controles negativos, lo que evidencia alta especificidad y ausencia de contaminación en el ensayo.
4. La técnica de qPCR demostró ser una herramienta altamente sensible, específica y reproducible para la detección de *Echinococcus spp.*, superando las limitaciones de los métodos convencionales y permitiendo una detección más precisa del material genético del parásito.

VII. RECOMENDACIONES

1. Implementar la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) estandarizada en laboratorios de diagnóstico veterinario y de investigación de la región Ayacucho, con el fin de mejorar la detección temprana de *Echinococcus spp.* en ganado bovino.
2. Optimizar el proceso de extracción y purificación de ADN, incorporando etapas adicionales de limpieza o el uso de kits de mayor eficiencia, para mejorar los índices de pureza (relaciones 260/280 y 260/230) y garantizar resultados más consistentes en la amplificación.
3. Estandarizar protocolos de manejo de muestras biológicas desde su recolección hasta su procesamiento, asegurando condiciones adecuadas de conservación (temperatura, tiempo y transporte) para evitar la degradación del ADN.
4. Ampliar el tamaño de muestra y realizar estudios en diferentes zonas geográficas de la región, con el propósito de obtener datos más representativos sobre la presencia de *Echinococcus spp.* y su impacto epidemiológico.
5. Complementar la técnica de qPCR con métodos de secuenciación genética, a fin de identificar especies y genotipos específicos de *Echinococcus*, lo cual permitirá una mejor comprensión de la dinámica de transmisión en la región.
6. Capacitar al personal técnico y profesional en el uso de técnicas moleculares avanzadas, como la qPCR, para fortalecer las capacidades diagnósticas en instituciones académicas y de salud pública.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, M. E., Eldigail, M. H., Elamin, F. M., et al. (2016). Desarrollo y evaluación de un ensayo de amplificación isotérmica mediada por bucles en tiempo real para la detección rápida de la equinococosis quística. *BMC Veterinary Research*, 12, 202. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0809-2>
- Biedermann, A., Kinkar, L., Laurimäe, T., Romig, T., Saarma, U., & Bagrade, G. (2025). Zoonotic *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes G6 and G7: New insights from the global mitogenome analysis. *International Journal for Parasitology*, 55(11), 569–579. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2025.04.014>
- Bohard, L., Lallemand, S., Knapp, J., Courquet, S., Millon, L., & Umhang, G. (2023). Complete mitochondrial exploration of *Echinococcus multilocularis* from French alveolar echinococcosis patients. *International Journal for Parasitology*, 53(9), 493–504. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2023.03.006>
- Bowles, J., Blair, D., & McManus, D. P. (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 54(2), 165–173.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., et al. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622.
- Camicia, F. (2011). Caracterización de transportadores de aminoácidos en *Echinococcus granulosus* [Tesis doctoral]. Universidad de Buenos Aires.
- Castro Sanguinetti, G. R. (2010). Estandarización de la técnica RT-PCR a tiempo real para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) [Tesis de título profesional]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Craig, P. S., Hegglin, D., Lightowers, M. W., Torgerson, P. R., & Wang, Q. (2017). Echinococcosis: Control and prevention. *Advances in Parasitology*, 96, 55–158. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.09.002>
- Deplazes, P., Rinaldi, L., Alvarez Rojas, C. A., Torgerson, P. R., Harandi, M. F., Romig, T., & Jenkins, E. J. (2017). Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis. *Advances in Parasitology* 95, 315–493. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.11.001>
- Dorak, T. M. (2006). Real-time PCR. Taylor & Francis Group.

- Eckert, J., & Deplazes, P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 107–135. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.107-135.2004>
- Eckert, J., Gemmell, M. A., Meslin, F. X., & Pawlowski, Z. S. (2001). WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern. World Health Organization.
- Höglund, J., Engström, A., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., & Tydén, E. (2013). Real-time PCR detection for quantification of infection levels with *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in cattle faeces. *Veterinary Parasitology*, 197(1–2), 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.044>
- Huamaní Basilio, N. N. (2012). Genotipificación de *Echinococcus granulosus* en alpacas procedentes de Ayacucho, empleando técnicas de PCR y secuenciamiento de ADN [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- Huarcaya, A. (2024). Seroprevalencia de equinococosis hídática y factores de riesgo en adultos que asisten al Centro de Salud Puyusca – Ayacucho, 2024 [Tesis de pregrado o posgrado]. Universidad Privada Norbert Wiener.
- Janampa Allcarima, J. (2021). Prevalencia de parasitismo gastrointestinal en alpacas (*Vicugna pacos*) en el distrito de Paras, Ayacucho [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- Kinkar, L., Korhonen, P. K., Young, N. D., Wang, T., Boag, P. R., Saarma, U., & Gasser, R. B. (2019). Long-read sequencing reveals a 4.4 kb tandem repeat region in the mitogenome of *Echinococcus granulosus* (*sensu stricto*) genotype G1. *Parasites & Vectors*, 12(1), Article 238. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3492-x>
- Knapp, J., Lallemand, S., Monnien, F., Felix, S., Courquet, S., Umhang, G., & Millon, L. (2023). Real-time multiplex PCR for human echinococcosis and differential diagnosis. *Parasite*, 30, Article 3. <https://doi.org/10.1051/parasite/2023003>
- Knapp, J., Umhang, G., Poulle, M. L., & Millon, L. (2014). Development of a real-time PCR for detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fecal samples. *Parasitology Research*, 113(6), 2111–2121.
- Korhonen, P. K., Kinkar, L., Young, N. D., Cai, C., Boag, P. R., Saarma, U., & Gasser, R. B. (2022). Chromosome-scale *Echinococcus granulosus* (genotype G1) genome reveals the Eg95 gene family and conservation across the tapeworm.

- Communications Biology, 5(1), Article 261. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03125-1>
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., & Sindelka, R. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Lallemand, S., Oyhenart, J., Valot, B., Borne, R., Bohard, L., Umhang, G., ... & Knapp, J. (2024). Challenging the phylogenetic relationships among *Echinococcus multilocularis* isolates from main endemic areas. *International Journal for Parasitology*, 54(10), 511–522. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2024.05.004>
- Lightowlers, M. W. (2013). Cysticercosis and echinococcosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 365, 315–335. https://doi.org/10.1007/82_2012_234
- Logar, K., Kopinč, R., Bandelj, P., et al. (2012). Evaluación de la extracción de ADN de alta eficiencia combinada con PCR en tiempo real para la detección de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis en ganado lechero con infección subclínica. *BMC Veterinary Research*, 8, 49. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-49>
- Moro, P., & Schantz, P. M. (2009). Echinococcosis: A review. *International Journal of Infectious Diseases*, 13, 125–133.
- Nakao, M., Lavikainen, A., Iwaki, T., Haukisalmi, V., Konyaev, S., Oku, Y., ... & Ito, A. (2013). Molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology International*, 62(5), 427–437.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry* (7th ed.). W.H. Freeman.
- OIE (World Organisation for Animal Health). (2019). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*.
- Organización Mundial de la Salud. (2020). Echinococcosis.
- Organización Panamericana de la Salud. (2019). Situación de la equinococosis en América Latina.
- Rathinasamy, V., Hosking, C., Tran, L., Kelley, J., Williamson, G., Swan, J., Elliott, T., Rawlin, G., Beddoe, T., & Spithill, T. W. (2018). Development of a multiplex quantitative PCR assay for detection and quantification of DNA from *Fasciola hepatica* and the intermediate snail host, *Austropeplea tomentosa*, in water samples. *Veterinary Parasitology*, 259, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.06.018>

- Reus Sánchez, F. (1992). Caracterización, purificación y localización inmunohistoquímica de los antígenos mayoritarios de *Echinococcus granulosus*. Antígeno 5 y antígeno B [Tesis doctoral]. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Reyes, M. M., Taramona, C. P., Saire Mendoza, M., Gavidia, C. M., Barron, E., & Boufana, B. (2012). Human and canine echinococcosis infection in informal, unlicensed abattoirs in Lima, Perú. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(4), e1462. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001462>
- Reyna Cotrina, G. M. (2014). Caracterización molecular de *Fasciola hepatica* procedente de diferentes hospederos bovino, ovino y porcino mediante marcadores moleculares ITS-1, ITS-2 y COX, en el distrito de Cajamarca – Perú, 2013 [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de Cajamarca.
- Risco Sotelo, R. O. (2024). Caracterización de la diversidad genética poblacional del bovino criollo peruano (*Bos taurus*), en siete localidades de los Andes del Perú, mediante PCR-SSCP [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Simsek, S., Balkaya, I., & Koroglu, E. (2010). Epidemiological survey and molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in cattle in an endemic area of eastern Turkey. *Veterinary Parasitology*, 172(3–4), 347–349. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.05.016>
- Thompson, R. C. A. (2008). The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Experimental Parasitology*, 119(4), 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.016>
- Thompson, R. C. A. (2017). Biology and systematics of *Echinococcus*. *Advances in Parasitology*, 95, 65–109. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.07.001>
- Trachsel, D., Deplazes, P., & Mathis, A. (2007). Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. *Parasitology*, 134(Pt 6), 911–920. <https://doi.org/10.1017/S0031182007002235>
- Tsai, I. J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garciarrubio, A., Sánchez-Flores, A., Brooks, K. L., & Berriman, M. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*, 496(7443), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nature12031>
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on

- the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474–481. <https://doi.org/10.2144/97223st01>
- World Health Organization (WHO). (2020). Echinococcosis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/echinococcosis>
- World Health Organization (WHO). (2021). Echinococcosis Fact Sheet.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). (2020). Echinococcosis Manual.
- Wu, Y.-D., Chen, Y.-Y., Li, J., Zhang, X.-Y., Wang, H.-C., Song, M., ... & Wang, S.-N. (2025). Whole-genomic comparison reveals complex population dynamics and parasitic adaptation of *Echinococcus granulosus sensu stricto*. *mBio*, 16(5), e03256-24. <https://doi.org/10.1128/mbio.03256-24>
- Zárate Sulca, Y. (2014). Seroprevalencia de equinococosis quística y factores de riesgo asociados en población escolar del distrito de Hualla, provincia de Víctor Fajardo, Ayacucho, 2013 [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/979>
- Zhang, W., Zhang, Z., Wu, W., Shi, B., Li, J., Zhou, X., Wen, H., & McManus, D. P. (2015). Epidemiology and control of echinococcosis in central Asia, with particular reference to the People's Republic of China. *Acta Tropica*, 141(Pt B), 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.03.014>
- Zhang, X., Jian, Y., Guo, Z., Duo, H., & Wei, Y. (2022). Development of a triplex real-time PCR assay to detect *Echinococcus* species in canid fecal samples. *Journal of Parasitology*, 108(1), 79–87. <https://doi.org/10.1645/21-72>
- Zheng, H., Zhang, W., Zhang, L., Zhang, Z., Li, J., Lu, G., ... & Chen, X. (2013). The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nature Genetics*, 45(10), 1168–1175. <https://doi.org/10.1038/ng.2757>
- Zuluaga Sucapuca, S. (2025). Detección del virus de la leucosis bovina mediante PCR en tiempo real (qPCR) en muestras de sangre total de ganado bovino en la región de Lima, 2024 [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

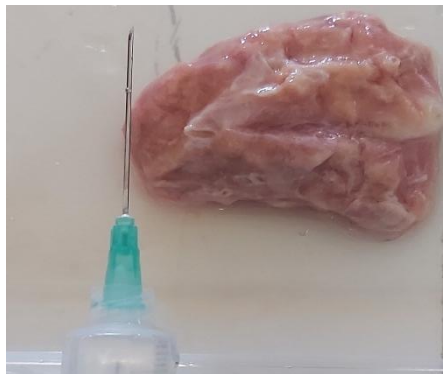
ANEXOS

ANEXO 1. Procedimiento de obtención del líquido hidatídico

Lesión compatible con quiste hidatídico pulmonar en bovino beneficiado.



Punción y aspiración de líquido hidatídico



Preparación para la conservación de muestras biológicas. (Lavado con SSF al 0.9%)

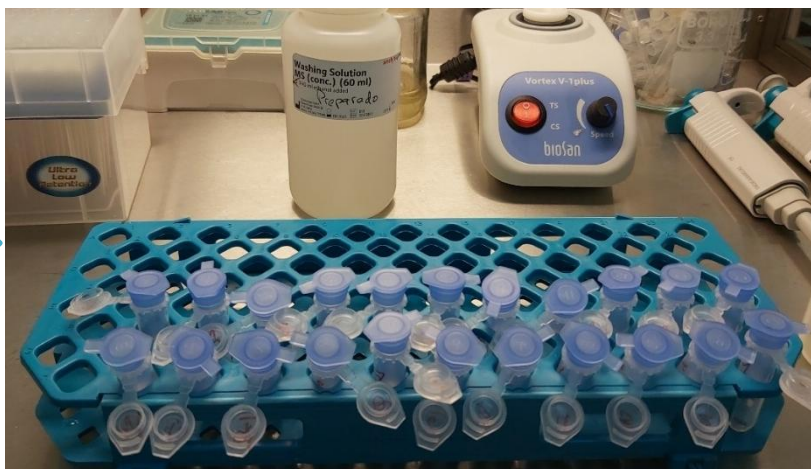


Preparación para la conservación de muestras biológicas. (centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos)



ANEXO 2. Procedimiento de extracción y cuantificación de AND del líquido hidatídico

Procedimiento de extracción de ADN genómico de *Echinococcus* spp. en la cámara de fujo.



Procedimiento de extracción de ADN genómico de *Echinococcus* spp. (centrifugado 11000 rpm por 3 minutos).

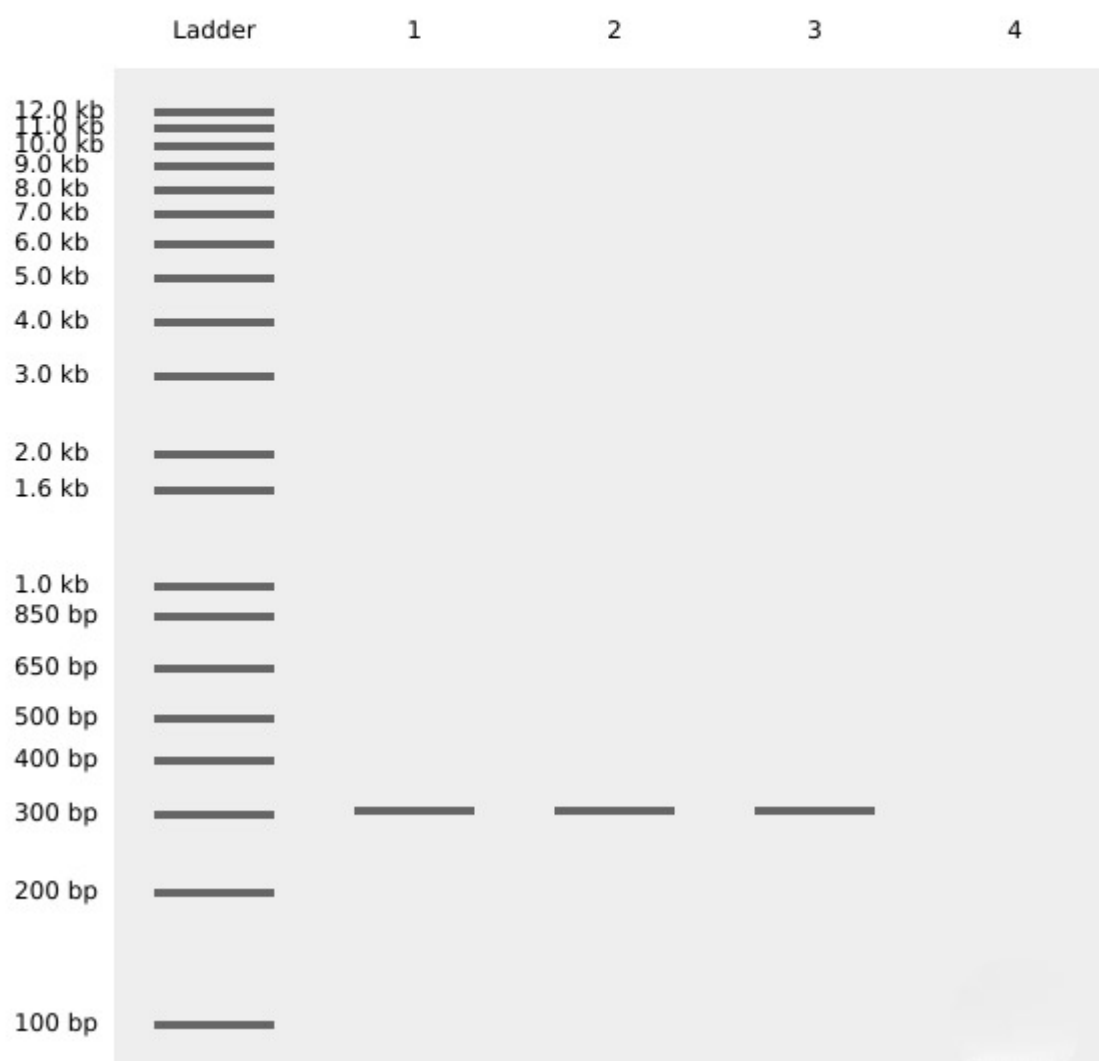


Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN genómico de *Echinococcus* spp. mediante espectrofotometría en equipo DeNovix.



ANEXO 3. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para la detección de *Echinococcus* spp. en muestras de ganado vacuno (*Bos taurus*), Ayacucho – 2024

Ladder	Life 1 kb Plus
1	<i>E. granulosus</i> MW287330 [344-652] - AaII
2	<i>E. felidis</i> AB732958 [602-910] - AaII
3	<i>E. granulosus</i> s.l. MK682654 [348-656] - AaII
4	<i>Fasciola hepatica</i> GU121095 [51-51] - AaII



ANEXO 4. Análisis de especificidad de los primers mediante BLAST para la detección de *Echinococcus spp.*

Exclusividad de los primers

The screenshot displays the NCBI BLAST search results interface. At the top, the NIH National Library of Medicine logo is visible. The search title is "BLAST® » blastn suite » results for RID-WYEEWCD5016". The search parameters are listed on the left: Job Title (Nucleotide Sequence), RID (WYEEWCD5016), Program (Citation), Database (core_nt), Query ID (lclQuery_603195), Description (None), Molecule type (dna), Query Length (306), and Other reports. A "Filter Results" section on the right allows filtering by Percent Identity, E value, and Query Coverage. A yellow banner at the bottom of the results area states: "No significant similarity found. For reasons why, click here". The footer includes social media links for Twitter, Facebook, LinkedIn, and RSS, along with a "Feedback" button.

ANEXO 5. Análisis de especificidad de los primers mediante BLAST excluyendo *Echinococcus spp.* para la detección molecular en ganado vacuno (*Bos taurus*)

Exclusividad de los primers

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite » results for RID-WYEUAB3Y014

Home Recent Results Saved Strategies Help

[Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Job Title Nucleotide Sequence
RID WYEUAB3Y014 Search expires on 04-04 12:00 pm [Download All](#)
Program BLASTN [Citation](#)
Database core_nt [See details](#)
Query ID lclQuery_7287573
Description None
Molecule type dna
Query Length 306
Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results
Organism only top 20 will appear ☐ exclude
Type common name, binomial, taxid or group name
[+ Add organism](#)
Percent Identity to E value to Query Coverage to
[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Select columns](#) [Show](#) 100 [?](#)

☒ select all 2 sequences selected

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Taenia maritima mitochondrial DNA, complete genome, isolate, TmaCr	Taenia maritima	206	206	98%	2e-48	79.40%	13536	NC_020153.1
☒ Glycophthalma sp. LW2G mitochondrial DNA, complete genome	Glycophthalma sp. LW2G	102	102	52%	3e-17	78.53%	14200	MW427960.1

GenBank **Graphics** [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

FOLLOW NCBI

[Twitter](#) [Facebook](#) [LinkedIn](#) [RSS](#)

ANEXO 6. Validación de la especificidad de primers mediante análisis en BLASTN en la base de datos de la National Center for Biotechnology Information, evidenciando alineamientos significativos con secuencias de *Echinococcus granulosus*

BLAST® » blastn suite » results for RID-WYEDDM62016

HomeRecent ResultsSaved StrategiesHelp

Edit SearchSave SearchSearch Summary▼

How to read this report?BLAST Help VideosBack to Traditional Results Page

Job TitleNucleotide Sequence

RIDWYEDDM62016Search expires on 04-04 11:53 amDownload All▼

ProgramBLASTN?Citation▼

Databasecore_ntSee details▼

Query IDlclQuery_6841033

DescriptionNone

Molecule typedna

Query Length306

Other reportsDistance tree of resultsMSA viewer?

Filter Results

Organismonly top 20 will appear☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

+ Add organism

Percent Identity

E value

Query Coverage

to

to

to

FilterReset

DescriptionsGraphic SummaryAlignmentsTaxonomy

Sequences producing significant alignmentsDownload▼Select columns▼Show100▼?

☒ select all100 sequences selected

GenBankGraphicsDistance tree of resultsMSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Echinococcus granulosus isolate TRS16 NADH dehydrogenase subunit 5 (nad5) gene, partial cds, mitochondrial	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	705	OP889097.1
☒ Echinococcus granulosus clone S111 mitochondrion, partial genome	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	13307	MG672191.1
☒ Echinococcus granulosus isolate T2 mitochondrion, partial genome	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	13307	PX908867.1
☒ Echinococcus granulosus isolate Arm43 mitochondrion, partial genome	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	13307	PX908821.1
☒ Echinococcus granulosus clone A10 mitochondrion, partial genome	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	13307	MG672208.1
☒ Echinococcus granulosus clone H575 mitochondrion, partial genome	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	13307	MG672226.1
☒ Echinococcus granulosus isolate H15 mitochondrion, partial genome	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	13307	PX908839.1
☒ Echinococcus granulosus isolate E4 mitochondrion, partial genome	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	13307	PX908828.1
☒ Echinococcus granulosus haplotype bTB11 NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) gene, partial cds, mitochondrial	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	683	MN270011.1
☒ Echinococcus granulosus clone OU20 mitochondrion, partial genome	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	13307	MG672274.1
☒ Echinococcus granulosus clone V8 mitochondrion, partial genome	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	13307	MG672130.1
☒ Echinococcus granulosus isolate Arm30 mitochondrion, partial genome	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	13307	PX908813.1
☒ Echinococcus granulosus clone IR13 mitochondrion, partial genome	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	13307	MG672232.1
☒ Echinococcus granulosus clone B20 mitochondrion, partial genome	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	13307	MG672257.1
☒ Echinococcus granulosus isolate A1 NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) gene, partial cds, mitochondrial	Echinococcus gr...	566	566	100%	1e-156	100.00%	627	MW835719.1

66

ANEXO 7. Evaluación de la sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia de la PCR en tiempo real (qPCR) mediante curva estándar para la detección de *Echinococcus spp.* en muestras biológicas

No.	Concentración	Type	Resultado	Ct	Given Conc (parasitos- equiv/reaction)	Calc Conc (parasitos- equiv/reaction)	Variación (%)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Rep. Calc. Conc.
1	NTC	Unknown	Negativo							
2	NTC	Unknown	Negativo							
3	0.2	Standard	Negativo		0.2					
4	0.2	Standard	Negativo		0.2					
5	1.9	Standard	Positivo	33.96	1.9	1.7	10.53%	34.05	0.13	1.65
6	1.9	Standard	Positivo	34.14	1.9	1.6	15.79%			
7	19	Standard	Positivo	30.14	19	20	5.26%	30	0.20	21.35
8	19	Standard	Positivo	29.86	19	22.7	19.47%			
9	190	Standard	Positivo	26.56	190	200	5.26%	26.62	0.08	193.6
10	190	Standard	Positivo	26.67	190	187.2	1.47%			
11	1900	Standard	Positivo	23.18	1900	1765.5	7.08%	22.89	0.41	1917.55
19	1900	Standard	Positivo	22.6	1900	2069.6	8.93%			
20	19000	Standard	Positivo	19.46	19000	19351.4	1.85%	19.5	0.06	18915.45
21	19000	Standard	Positivo	19.54	19000	18479.5	2.74%			
22	190000	Standard	Positivo	16.04	190000	175224.2	7.78%	16.07	0.04	171977.65
23	190000	Standard	Positivo	16.10	190000	168731.1	11.19%			
28	F.hepatica	Unknown	Negativo							
29	F.hepatica	Unknown	Negativo			0				

ANEXO 8. MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO: Estandarización de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real para la detección de *Echinococcus* spp. en ganado vacuno *Bos taurus*. Ayacucho, 2024
PERSONAL INVESTIGADOR: Zuli Palomino Ñaupas

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES	METODOLOGÍA
Estandarización de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real para la detección de <i>Echinococcus</i> spp. en ganado vacuno <i>Bos taurus</i>. Ayacucho, 2024	La hidatidosis o echinococosis es una enfermedad parasitaria, de gran impacto en la economía y la salud pública, generada por los céstodos del género <i>Echinococcus</i> , particularmente en su estado larval o metacéstodo. Es de suma importancia en la salud humana, así como la de animales domésticos.	GENERAL Estandarizar y determinar la eficiencia la técnica de PCR en tiempo real para la detección de <i>Echinococcus</i> spp. en ganado vacuno "<i>Bos taurus</i>". ESPECÍFICOS • Obtener el ADN genómico de <i>Echinococcus</i> spp. a partir de quistes hidatídicos provenientes de ganado vacuno "<i>Bos taurus</i>". • Purificar el ADN genómico de <i>Echinococcus</i> spp. proveniente de quistes hidatídicos obtenidos de ganado vacuno "<i>Bos taurus</i>". • Estandarizar la técnica de PCR en tiempo real para la detección de <i>Echinococcus</i> spp. a partir de quistes hidatídicos provenientes de ganado vacuno "<i>Bos taurus</i>". • Determinar la reproducibilidad de la PCR en tiempo real para la detección de <i>Echinococcus</i> spp. de quiste hidatídicos obtenidos de ganado vacuno "<i>Bos taurus</i>".	GENERAL Sí se puede estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa em tiempo real para detectar <i>Echinococcus</i> spp. en ganado vacuno <i>Bos taurus</i>. Ayacucho 2024. ESPECÍFICA Los parámetros de estandarización de la PCR en tiempo real para la detección de <i>Echinococcus</i> spp. en ganado vacuno, Ayacucho 2024, están dadas en función a la concentración de componentes para la amplificación de esta prueba.	La Equinococosis quística es producida por un céstodo, platelminto de cuerpo alargado con forma de cinta, acelomados cubiertos por un tegumento especializado por donde ocurre el intercambio de los nutrientes y la eliminación de los desechos. Generalmente necesitan de uno o dos hospederos distintos para completar su ciclo de vida. El estadio adulto se encuentra parasitando el tracto digestivo de hospedadores definitivos, que usualmente son vertebrados, mientras que los estadios larvarios serán capaces de establecerse en diversos órganos de los hospedadores intermediarios.	Variable independiente: Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real. Variable dependiente: Detección de <i>Echinococcus</i> spp.	Tipo de investigación: Básica-experimental Diseño de Investigación: Experimental Población: Estará conformada por todos los quistes hidatídicos provenientes del ganado vacuno beneficiados en el camal de Carmen Alto, Ayacucho. Muestra: Conformada por 25 quistes hidatídicos provenientes de ganado vacuno beneficiados en el camal de Carmen Alto Unidad experimental: Muestras colectadas de ADN de <i>Echinococcus</i> spp. Análisis estadístico: Los datos serán agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. Los resultados serán procesados mediante el paquete de software del Mic Real Time PCR Cyclar versión 2.12.



UNSCH

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bach. Zuli PALOMINO ÑAUPAS

RESOLUCIÓN DECANAL N° 096-2026-UNSCH-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día jueves nueve de julio del año dos mil veintiséis, se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, estando como presidente encargado el Blgo. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH con Memorando N° 139-2026--UNSCH-FCB con fecha nueve de julio del año dos mil veintiséis; a su vez actuando como miembro jurado el Blgo. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH con Memorando N° 096-2026--UNSCH-FCB-D, miembro jurado la Dra. Kusi YARANGA PALOMINO con Memorando N° 096-2026--UNSCH-FCB-D, miembro jurado Mg. Jime Jack RIVERA VILLAR con Memorando N° 096-2026--UNSCH-FCB-D, miembro asesor el Dr. José ALARCÓN GUERRERO con Memorando N° 096-2026--UNSCH-FCB-D; actuando como secretario docente encargado la Blga. Betsy Rocío AGUILAR ATME con Memorando N° 137-2026—UNSCH (IN) – FCB, para presenciar la sustentación de tesis titulada **Estandarización de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real para la detección de *Echinococcus spp.* en ganado vacuno *Bos taurus*. Ayacucho, 2024**, presentado por la Bachiller Zuli PALOMINO ÑAUPAS; el presidente luego de verificar la documentación que da fe al acto académico, indica al secretario docente encargado dar lectura, seguidamente informa a la sustentante que cuenta con un tiempo máximo de cuarenta y cinco minutos tal como establece el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología, luego indicó a cada uno de los Miembros del Jurado a participar con sus preguntas, observaciones y sugerencias, luego se invitó a abandonar el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas para que el Jurado evaluador pueda realizar la deliberación correspondiente tal como se refleja a continuación:

Miembros del Jurado Evaluador	Exposición	Respuesta/preguntas	Promedio
Dr. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH	18	18	18
Dra. Kusi YARANGA PALOMINO	16	17	17
Mg. Jime Jack RIVERA VILLAR	18	18	18
PROMEDIO			18

La sustentante alcanzó el promedio de 18. El presidente invitó a ingresar a la sustentante y público asistente al auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. El presidente dio a conocer los resultados, indicando de este modo que ha concluido el presente acto académico firmando al pie de dicho documento en señal de conformidad, siendo las seis de la noche.

Blgo. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH
Presidente (e) – Miembro Jurado

Dra. Kusi YARANGA PALOMINO
Miembro - Jurado

Mg. Jime Jack RIVERA VILLAR
Miembro - Jurado

Dr. José ALARCÓN GUERRERO
Miembro - Asesor

Blga. Betsy Rocío AGUILAR ATME
Secretario Docente (e)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA-ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

Nº 50-2026-FCB-D

Yo, SERAPIO ROMERO GAVILÁN, Director de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **Estandarización de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real para la detección de *Echinococcus spp.* en ganado vacuno *Bos taurus*. Ayacucho, 2024**, por ZULI PALOMINO ÑAUPAS; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 8%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario Nº 039-2021-UNSCH-CU.

En consecuencia, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 03 de septiembre de 2026.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Escuela Profesional de Biología

Dr. Serapio Romero Gavilán
DIRECTOR

Estandarización de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real para la detección de Echinococcus spp. en ganado vacuno Bos taurus. Ayacucho, 2024

por ZULI PALOMINO ÑAUPAS

Estandarización de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real para la detección de Echinococcus spp. en ganado vacuno Bos taurus. Ayacucho, 2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%	8%	2%	3%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net	1%
	Fuente de Internet	
2	cybertesis.unmsm.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
3	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga	1%
	Trabajo del estudiante	
4	tesiunamdocumentos.dgb.unam.mx	1%
	Fuente de Internet	
5	worldwidescience.org	1%
	Fuente de Internet	
6	livrosdeamor.com.br	1%
	Fuente de Internet	
7	documents.mx	<1%
	Fuente de Internet	
8	revista.nutricion.org	<1%
	Fuente de Internet	
9	pt.scribd.com	<1%
	Fuente de Internet	
10	Javier Leyton, Javier Fernández, Patricia Acosta, Andrés Quiroga, Francesc Codony. "Reduction of Helicobacter pylori cells in rural water supply using slow sand filtration", Environmental Monitoring and Assessment, 2024	<1%
	Publicación	
11	repositorio.unsch.edu.pe	<1%
	Fuente de Internet	
12	bioone.org	<1%
	Fuente de Internet	

