

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS**



ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

**DETECCION MOLECULAR POR PCR DE *Giardia sp.*,
Hymenolepis sp. Y *Entamoeba sp.* EN EXCRETAS DE
CUCARACHAS DE CENTROS DE ABASTOS PUBLICOS EN
CUSCO 2018**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO

PRESENTADA POR:

Bach. Moreano Briceño Shally

Bach. Velásquez Esquivel Raquel Alexandra

ASESORES:

M. Sc. Jorge Acurio Saavedra

Mtra. Mercedes Maritza Quispe Flórez

CUSCO – PERU

2021

DEDICATORIA

A mis padres Marcos Moreano Sierra y Gladys Norma Briceño Cruz.

Con mucha gratitud porque han sido un pilar fundamental en mi formación profesional.

A Dios, y La Virgen que nunca nos abandonaron, guiaron nuestros caminos, permitiéndonos culminar con éxito esta hermosa carrera, darnos fortaleza y la compañía eterna de nuestras amadas familias.

A mi Madre, Carmen Rosa Esquivel, eres una mujer que simplemente me llena de orgullo, te amo, y no va a haber manera de devolverte tanto. Esta tesis es un logro mas que llevo a cabo, y sin lugar a dudas a sido en gran parte gracias a ti; nose en donde me encontraría de no ser por tu ayuda, tu compañía y tu amor, Gracias Mami.

A mis hijos Salvador y Eduardo que son el motivo para que me levante cada día, esforzarme por el presente y por el mañana, Ustedes son el motivo de todos mis logros y como en este ustedes han estado presentes, los amo infinitamente.

A mis hermanos Rosy y Héctor, con quienes la mayoría del tiempo pareciera que estuviéramos en una batalla, pero hay momentos en los que la guerra cesa y nos unimos para lograr nuestros objetivos. Gracias por no solo ayudarme a combatir mis miedos, sino por todos los bonitos momentos que pasamos Gracias Hermanos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, quien nos ha cuidado y nos ayuda en nuestros planes profesionales.

A la administración de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y la Escuela Profesional de Biología, por el apoyo y facilidades brindadas para realizar este trabajo de investigación.

A nuestros asesores M.Sc. JORGE ACURIO SAAVEDRA y Blga. MERCEDES MARITZA QUISPE FLOREZ por la confianza brindada, por el conocimiento, la orientación constante y eterna paciencia brindada a lo largo del presente trabajo de investigación.

A nuestros amigos y compañeros, que sin esperar nada a cambio nos compartieron su conocimiento y nos brindaron su apoyo: YAHANDA GISELA APAZA CASTILLO.

INDICE

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	ii
PROBLEMA DE LA INVESTIGACION.....	iv
JUSTIFICACIÓN.....	v
OBJETIVOS.....	vi
HIPOTESIS.....	vii
CAPITULO I:.....	1
REVISION BIBLIOGRAFICA.....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	1
1.2 GENERALIDADES.....	6
1.2.1 <i>Periplaneta americana</i>	6
1.2.2 <i>Blatella germánica</i>	13
1.2.3 GÉNERO <i>GIARDIA</i>	17
1.2.4 GÉNERO <i>HYMENOLEPIS</i>	19
1.2.5 GÉNERO <i>ENTAMOEBA</i>	21
CAPITULO II.....	23
MATERIALES Y METODOS	23
2.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	23
2.1.1 CLIMA.....	24
2.2 MATERIALES:.....	25
2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO:.....	25
2.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO:.....	27
2.2.3 MATERIAL DE CAMPO:.....	28
2.3 METODOLOGÍA.....	29
2.3.1 CAPTURA DE ESPECIMENES.....	30
• TRAMPAS CON CEBO.....	30
• CAPTURA POR UNIDAD DE ESFUERZO.....	30
2.3.2 IDENTIFICACION DE ESPECIMENES.....	31
2.3.3 NECROPSIA PARASITOLÓGICA.....	32
2.3.4 IDENTIFICACION DE PARASITOS.....	33
2.3.5 EXTRACCION Y PURIFICACIÓN DE ADN.....	34
2.3.6 EXTRACCION DE ADN.....	36
2.3.7 CUANTIFICACION DE MUESTRAS DE ADN.....	37
2.3.8 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR.....	38
2.3.9 ELECTROFORESIS.....	43
2.3.10 EVALUACION DE GELES:.....	44
2.3.11 ANALISIS DE DATOS.....	45
CAPITULO III.....	46
RESULTADOS Y DISCUSION	46
3.1 RESULTADOS.....	46
3.1.1 RESULTADOS DE IDENTIFICACION DE CUCARACHAS.....	46
3.1.2 RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION MICROSCOPICA DE PARASITOS.....	47
3.1.3 RESULTADOS ENTRE LA RELACION DE ESPECIMENES COLECTADOS Y ESPECIMENES PARASITADOS.....	50

3.1.4 RESULTADOS DE LA DETECCION POR PCR DE LOS GENEROS DE <i>Giardia sp</i> <i>Hymenolepis sp</i> y <i>Entamoeba sp.</i>	53
3.1.5 RESULTADOS DE LA DETECCION POR PCR E IDENTIFICACION POR MICROSCOPIA CONVENCIONAL .	58
3.2 DISCUSIONES	60
CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES	64
BIBLIOGRAFIA	65
ANEXOS	77

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Registro de Temperaturas, Precipitaciones registrados para Cusco	24
Tabla 2 Cucarachas Colectadas en Época de Secas.....	26
Tabla 3 Cucarachas Colectadas en época de lluvias	26
Tabla 4 Primers para <i>Giardia sp.</i>	40
Tabla 5 Primers para <i>Hymenolepis sp.</i>	40
Tabla 6 Primers para <i>Entamoeba sp.</i>	40
Tabla 7 Master mix	41
Tabla 8 Ciclos Estandarizados de PCR para <i>Giardia sp.</i>	42
Tabla 9 Ciclos Estandarizados de PCR para <i>Hymenolepis sp.</i>	42
Tabla 10 Ciclos Estandarizados de PCR para <i>Entamoeba sp.</i>	42
Tabla 11 Determinación en porcentaje de especies de cucarachas.....	47
Tabla 12. Resultados de muestras positivas en examen Coproparasitologico efectuado a las excretas de cucarachas	48
Tabla 13 Resultados de muestras en examen coproparasitológico efectuado a las excretas de cucarachas en dos épocas del año	48
Tabla 14 Resultados de cucarachas parasitadas y no parasitadas por examen coproparasitológico	50
Tabla 15 Resultados de especies de cucarachas parasitadas	50
Tabla 16 Resultados de cucarachas parasitadas por <i>Hymenolepis sp.</i> , <i>Giardia sp</i> y <i>Entamoeba sp.</i> por centro de abastos	51
Tabla 17 Resultados de positividad en detección molecular por PCR para <i>Giardia sp.</i> , <i>Hymenolepis sp.</i> , y <i>Entamoeba sp.</i> en 71 muestras de excretas de cucarachas.	59
Tabla 18 Muestreo de especímenes correspondiente a épocas de secas	77
Tabla 19 Muestreo de especímenes en época de lluvias	88
Tabla 20 Concentración y calidad de ADN para <i>Giardia sp.</i>	93
Tabla 21 CUANTIFICACION DEL ADN para <i>Entamaba sp.</i>	95
Tabla 22 CUANTIFICACION de ADN para <i>Hymenolepis sp.</i>	97
Tabla 23 Relación y concentración de ADN	98

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Ooteca de <i>Periplaneta americana</i>	9
FIGURA 2 Individuo en estadio de ninfa de <i>Periplaneta americana</i>	9
FIGURA 3 Individuo adulto macho de <i>Periplaneta americana</i>	11
FIGURA 4 Mapa de ubicación de centros de abastos	23
FIGURA 5 CLIMATOGRAMA EN BASE A LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL SENAMHI 2019.....	25
FIGURA 6 Flujo de actividades para la detección molecular por PCR de <i>Giardia sp</i> , <i>Hymenolepis sp</i> y <i>Entamoeba sp</i> . Colectadas a partir de excretas de cucarachas de centros de abasto públicos en Cusco	29
FIGURA 7 Trampas para la captura de cucarachas.	31
FIGURA 8 Frecuencia de especies de cucarachas por centro de abastos muestreados en la ciudad del Cusco	46
FIGURA 9 Determinación en porcentaje de especies de cucarachas	47
FIGURA 10 Huevo de <i>Hymenolepis sp</i>	49
FIGURA 11 Quiste de <i>Giardia sp</i>	49
FIGURA 12 Quiste de <i>Entamoeba sp</i>	49
FIGURA 13 Número de ejemplares parasitados por <i>Hymenolepis sp.</i> , <i>Giardia sp.</i> y <i>Entamoeba sp</i> según los centros de abastos en época de secas.....	52
FIGURA 14 Número de ejemplares parasitados por <i>Hymenolepis sp.</i> , <i>Giardia sp.</i> y <i>Entamoeba sp</i> según los centros de abastos en época de lluvias.	53
FIGURA 15 Resultados PCR. para <i>Entamoeba sp.</i> , donde el producto amplificado tiene un tamaño de 550 pb.....	55
FIGURA 16 Resultados PCR. para <i>Hymenolepis sp.</i> , donde el producto amplificado tiene un tamaño de 200 pb.....	56
FIGURA 17 Resultados PCR. para <i>Giardia sp.</i> , donde el producto amplificado tiene un tamaño de 63 pb.	57
FIGURA 18 Comparación de resultados entre la Técnica Molecular de PCR y resultados de Técnica Microscópica	58

RESUMEN

Para el presente estudio se colectaron un total de 613 especímenes de cucarachas (*Periplaneta americana* y *Blatella germanica*), en dos épocas del año 2018, época de secas (Mayo – Setiembre) y época de lluvias (Febrero- Abril) en los sectores de jugos, frutas, verduras, comidas y servicios higiénicos de los centros de abasto de Huancaro (124 especímenes), Ccascaparo (144 especímenes), Rosaspata (121 especímenes), Santa Rosa (71 especímenes) y Vinocanchon (153 especímenes) de la ciudad del Cusco, los que fueron estudiados en el laboratorio de genética y genética molecular C-321 de la facultad de Ciencias escuela profesional de Biología de la Universidad Nacional De San Antonio Abad del Cusco.

La metodología de intervención incluyó la captura por unidad de esfuerzo. A partir de los especímenes colectados se obtuvo muestras de excretas de la última porción del tracto gastrointestinal para la realización del examen directo con Lugol de Dobell – O'Connor; seguidamente se procedió a la extracción de ADN a partir de la purificación y ruptura de quistes por la técnica de shock térmico y acción enzimática, se cuantificó la concentración de ADN mediante métodos de espectrofotometría y se realizó la PCR convencional con la electroforesis en gel de agarosa para la visualización de los productos de amplificación.

En los especímenes colectados mediante la utilización de claves dicotómicas se identificaron dos especies de cucarachas; *Periplaneta americana* con un 69,5% y *Blatella germanica* con 30,5%, por otro lado, mediante la técnica de observación directa se encontró que el 95% de los especímenes estaba parasitado por *Áscaris sp.*, *Blastocystis sp.*, *Enterobius sp.*, *Giardia sp.*, *Entamoeba sp.* y/o *Hymenolepis sp.*; siendo el género más predominante *Giardia sp.*

Mediante la técnica de PCR se detectó tres géneros de parásitos correspondientes a *Giardia sp.*, *Entamoeba sp.* e *Hymenolepis sp.* a partir de 71 muestras obtenidas de excretas de cucaracha con un total de 65,8%, 21,2% y el 13% los mismos que corresponden a fragmentos de amplificación de 63 pb, 550 pb y 209 pb. Respectivamente.

INTRODUCCIÓN

Las cucarachas son insectos que se distribuyen por todo el mundo, se encuentran en muchos hábitats, incluidos desiertos, selvas tropicales, hábitats templados y hábitats comensales especializados, como nidos de hormigas y termitas y estructuras construidas por humanos. Se han descrito aproximadamente 4600 especies, de las cuales 30 especies son sinantrópicas consideradas como plagas de hogares, supermercados, hospitales, oficinas, escuelas, almacenes, baños, cocinas, y otros establecimientos (Kakumanu et al., 2018; Adenusi et al., 2018).

Periplaneta americana y *Blattella germanica* se consideran dos de las especies de plagas cosmopolitas más comunes a nivel mundial (Adenusi et al., 2018; Atiokeng et al., 2017).

Las cucarachas se alimentan con frecuencia de heces humanas, basura y aguas residuales, convirtiéndose en vectores mecánicos eficientes de transmisión de patógenos a través del desplazamiento físico, regurgitación o deposición de gránulos fecales, sobre y/o dentro de los alimentos, esto las hace ofensivas e inseguras para el consumo humano. Se han aislado bacterias, hongos virus, y parásitos de las superficies corporales y/o intestino de las cucarachas en entornos domésticos, de manipulación de alimentos y hospitalarios, además se las ha involucrado epidemiológicamente en la transmisión de protozoos como *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Giardia lamblia*, *Hymenolopis nana*, *Toxocora canis*, *Strongyloides stercoralis* entre otros (Adenusi et al., 2018; Graczyk et al., 2005; Kakumanu et al., 2018; Atiokeng et al., 2017).

La parasitosis intestinal está distribuida por todo el mundo, en forma predominante en América Latina, África y Asia; son responsables de una morbilidad y mortalidad considerables, especialmente en los niños que es la población más vulnerable. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, en el 2018, el 25% de la población mundial estaba infectada con parásitos, siendo más común en áreas tropicales, subtropicales y países en vías de desarrollo; se transmite por ingestión

directa de quistes infecciosos o huevos y/o larvas (helmintos) en los alimentos especialmente frutas y verduras, agua, suelo, o manos contaminadas (Adenusi et al., 2018; Vidal et al., 2020; Valle et al., 2020).

En el Perú el parasitismo intestinal tiene alta prevalencia, uno de cada tres peruanos es portador de uno o más parásitos. Estudios realizados en localidades de la sierra y selva peruana, muestran prevalencias de parasitismo superiores al 95%, mostrando un predominio de helmintos en selva y de protozoarios en la costa y sierra (Rúa et al. (2010); Marcos et al. (2008); Alarcón et al. (2010); citado por Ticona & Martínez, 2016). Así también la Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud (MINSA) reportó para el año 2003 que la prevalencia de los enteroparásitos *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Blastocystis hominis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Hymenolepis nana*, *Taenia sp.* y *Cryptosporidium sp.* oscila entre el 30 - 80% (Valladares, 2016).

La inadecuada infraestructura y deficientes prácticas de manipulación y salubridad existentes en los centros de abasto de la ciudad del Cusco, se constituyen en lugares adecuados para que las cucarachas que llegan a estos lugares en las cajas de alimentos traídos de otras zonas del país puedan sobrevivir y convertirse en vectores mecánicos de transmisión de parásitos intestinales. Es escasa o inexistente la información de estudios realizados en este tema, por lo que el presente trabajo de investigación tiene por objetivo detectar mediante la reacción en cadena de la polimerasa la presencia de *Giardia sp.*, *Hymenolepis sp.*, y *Entamoeba sp.*, en excretas de cucarachas de Centros de Abastos públicos en la ciudad del Cusco.

PROBLEMA DE LA INVESTIGACION

Las enfermedades causadas por parásitos son responsables de una morbilidad considerable en todo el mundo, de esta forma se presentan con frecuencia síntomas y altas tasas de prevalencia. Entre las diez enfermedades más comunes a nivel mundial, se encuentran: La ascariosis, tricocefalosis, giardiosis y amebiosis. Son enfermedades que presentan baja mortalidad pero que ocasionan problemas importantes debido a su sintomatología y complicaciones. (Martínez & Ticona, 2016)

La parasitosis constituye una patología frecuente en Perú, representando un grave daño en la salud con un índice del 65%, siendo la población más vulnerable los niños en edad escolar, en Cusco en particular se tiene referencia que Bejar et al., 2017, estudiaron la prevalencia de las enteroparasitosis encontrando una prevalencia del 85% encontrándose *Giardia lamblia* con un índice de 44.0% y *Entamoeba coli* con un 48%, entre otros (Bejar et al., 2017)

Las cucarachas contaminan los alimentos y otras materias primas. Además, pueden actuar como vectores mecánicos de diferentes patógenos, pueden contribuir a aumentar los procesos alérgicos y son considerados agentes de inducción y exacerbación del asma, las cucarachas tienen ciertas proteínas en sus cuerpos que pueden ser alérgenos para ciertas personas como lo menciona (Miriam, 2017).

Contaminan los alimentos y otras materias primas. Además, pueden actuar como vectores mecánicos de diferentes patógenos, pueden contribuir a aumentar los procesos alérgicos y son considerados agentes de inducción y exacerbación del asma, las cucarachas tienen ciertas proteínas en sus cuerpos que pueden ser alérgenos para ciertas personas como lo menciona (Miriam, 2017).

Siendo la interrogante de investigación:

¿Están presentes géneros de *Giardia sp*, *Hymenolepis sp.* y *Entamoeba sp.* en excretas de cucaracha en centros de abasto público de la ciudad del Cusco identificadas mediante técnicas moleculares de PCR?

JUSTIFICACIÓN

Es de importancia pública conocer los parásitos presentes en cucarachas, debido a que son considerados como vectores mecánicos, y en vista que la parasitosis es un problema de salud pública no solo por los problemas de salud que presenta, sino principalmente por las reinfecciones producidas sin saber o tener en claro en muchos casos como se producen estas.

La detección de estos parásitos encontrados en cucarachas de centros de abastos del Cusco mediante la técnica molecular de PCR, no solo nos dará un indicio claro de cómo se maneja el control de sanidad en dichos centros, sino también nos dará a conocer el grado de riesgo presente debido a contaminación en los productos adquiridos en estos centros que son de asistencia masiva y familiar.

Los Centros de Abastos estudiados en el presente trabajo no solo carecen en muchos casos de un sistema adecuado de eliminación de desechos, sino también de fumigaciones adecuadas, ya que estos insectos tienen un evolucionado poder adaptativo, volviéndose cada vez más resistentes a diversos productos químicos, lo que los vuelve un verdadero problema de salubridad y convierte a estos Centros de Abastos en puntos de concentración de estos insectos, ya que aquí encuentran un medio ideal para vivir.

Siendo de importancia su presencia en salud pública, son pocos los trabajos de investigación al respecto en el Perú, en vista de la existencia de trabajos realizados hasta el momento que llegan a nivel de sedimentación y microscopía convencional donde puede haber errores en el proceso de la identificación y no se pueden realizar investigaciones muy profundas debido a la baja resolución de los lentes, por ello nos vemos en la necesidad de validar la observación directa con la técnica de PCR. Por lo que, a través del presente estudio se identificó y caracterizó géneros de parásitos presentes en cucarachas, que no solo se encuentran establecidos y adaptados en estos centros de abastos, sino que muchas veces son traídos con los insumos por expendirse en los camiones de carga.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Detectar mediante la técnica de PCR los géneros de *Giardia sp.*, *Hymenolepis sp.* y *Entamoeba sp.* en excretas de cucarachas de centros de abastos públicos en Cusco.

Objetivos específicos.

1. Determinar las especies de cucarachas colectadas en los centros de abastos públicos de Cusco: Santa rosa, Ccascaparo, Vinocanchon, Rosaspata, Huancaro.
2. Identificar a los diferentes parásitos presentes en excretas de cucarachas mediante examen directo.
3. Detectar mediante PCR los géneros de *Giardia sp.*, *Hymenolepis sp.* y *Entamoeba sp.*

HIPOTESIS

Es posible detectar e identificar géneros de *Giardia sp*, *Hymenolepis sp.* y *Entamoeba sp.* mediante la técnica de PCR a partir de excretas de cucarachas capturadas en centros de abasto público de la ciudad de Cusco.

CAPITULO I: REVISION BIBLIOGRAFICA

1.1 ANTECEDENTES

Stensvold et al. (2018). Evaluaron un nuevo diagnóstico de PCR convencional desarrollado para el cribado de muestras fecales para *Entamoeba polecki*. La PCR permitió la identificación de los cuatro subtipos (ST1 a ST4) de *Entamoeba polecki* por secuenciación del producto de PCR. La mayoría (23/28) de las muestras positivas para *Entamoeba polecki* reflejaron la colonización por ST4 y se observaron en viajeros / extranjeros. También se detectaron dos y tres casos humanos de ST2 y ST3, En conclusión, el ensayo de PCR actual permite el cribado simple y rentable de muestras fecales y de aguas residuales para *Entamoeba polecki*. Los casos humanos de *Entamoeba polecki* parecen involucrar principalmente ST4, mientras que *Entamoeba polecki* detectado en aguas residuales puede ser principalmente de origen animal.

Adedotun et al. (2018). Evaluaron 749 cucarachas (*Periplaneta americana*, 509, *Blattella germanica*, 240) capturadas mediante trampas de 120 hogares utilizando técnicas parasitológicas estándar. La prevalencia de parásitos intestinales humanos en cucarachas fue del 96,4%. No hubo diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) en la prevalencia de parásitos entre *Periplaneta americana* (95.7%) y *Blattella germanica* (97.9%). Las especies de parásitos identificadas y su prevalencia, fueron: *Entamoeba histolytica/dispar* (44,1%), *Entamoeba coli* (37,8%), *Giardia lamblia* (18,7%), *Cryptosporidium sp.* (13,8%), *Ascaris lumbricoides* (61,3%), *Trichuris trichiura* (55,8%), anquilostomas (11,6%), *Strongyloides stercoralis* (11,7%), *Taenia/Echinococcus spp.* (10,5%), *Enterobius vermicularis* (17,2%) e *Hymenolepis nana* (11,6).

Anwar (2016), Determinaron la presencia de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en cucarachas *Periplaneta americana* en el Mercado Colón de la ciudad de Guatemala. Se recolectaron las cucarachas en el mercado Colón aproximadamente 440 insectos. Posteriormente a cada muestra obtenida, se le realizó cinco centrifugaciones a 3000 rpm por 5 minutos, como también se descartó cinco veces

el sobrenadante. Luego se llevó al microscopio observando en el objetivo 40x y 100x ooquistes de *Toxoplasma gondii*. Se procesaron 86 (cinco cucarachas por muestra) muestras en total, de las cuales 26 fueron grado de infestación leve y 4 con grado de infestación moderada dando un total de 30 muestras positivas. Las muestras negativas a presencia de ooquistes de *Toxoplasma gondii* fueron descartadas. Las 30 muestras positivas, se incubaron por 15 días a 37°C. Al sedimento final ya incubado se le agregó antibiótico. Se inocularon oralmente los 30 ratones de laboratorio, luego se realizó necropsias a los 30 días post inoculación. A la necropsia se encontraron 7 ratones positivos de 30, los resultados sugieren que la cucaracha es un huésped de transporte de ooquistes viables de *Toxoplasma gondii*.

Cazorla et al. (2015), indicaron los taxones entero parásitos en tegumento y tracto gastro intestinal de ninfas y adultos de cucaracha (*Periplaneta americana*). Entre abril y noviembre de 2014 fueron recolectados 149 ejemplares (102 adultos y 47 ninfas), en tres sitios de la ciudad de Coro, estado Falcón, Venezuela: mercado municipal (N=32), recinto universitario (N= 62) y Hospital Universitario “Alfredo Van Grieken” (HUAVG) (N=55).El análisis parasitológico reveló la presencia en el 97,99% (146/149) de las cucarachas muestreadas de 13 taxa entero-parasitarias, de las cuales siete son consideradas de interés sanitario (*Blastocystis spp.*, *Leptomonas spp.*, *Cyclospora spp.*, *Cystoisospora spp.*, *Lophomonas blattarum*, *Ascaris spp.* y *Enterobius vermicularis*). Las taxa más prevalentes fueron *Blastocystis spp.* (82,6%: 123/149) y *Leptomonas spp.* (70,5%: 105/149). Se discute las implicaciones de estos hallazgos en el contexto de la salud pública.

Hamu et al. (2014), afirmaron que las cucarachas son transmisores mecánicos de microorganismos que causan enfermedades, como parásitos intestinales, bacterias, hongos y virus. Este estudio evaluó el potencial de la cucaracha alemana *Blattella germanica* en la transmisión mecánica de parásitos intestinales de importancia para la salud pública. Se recolectaron un total de 2010 cucarachas de 404 hogares en Jimma Town, suroeste de Etiopía. Todas las cucarachas recolectadas fueron identificadas como especie *Blatella germanica*. Se examinó el contenido de sus intestinos y partes externas del cuerpo para detectar la presencia de parásitos intestinales. En total, se encontró que 152 (75,6%) de los 210 lotes albergaban al

menos una especie de parásito intestinal humano. *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Taenia spp*, *Strongyloides sp.* parásitos similares a *Entamoeba histolytica / dispar / moshkovski*, *Giardia duodenalis* y *Balantidium coli* se detectaron en el contenido intestinal. Además, también se aislaron parásitos de la superficie externa en 22 (10,95%) de los lotes. Hubo una diferencia significativa en la tasa de transporte de parásitos de las cucarachas entre los sitios de estudio ($P = 0.013$). En conclusión, se encontró que *Blatella germanica* alberga parásitos intestinales de importancia para la salud pública. Por lo tanto, es necesario crear conciencia sobre el papel potencial de las cucarachas en la transmisión mecánica de los parásitos intestinales humanos. Además, se requiere una mayor identificación del gusano similar a *Strongyloides sp.* utilizando diagnósticos moleculares.

Rodriguez et al. (2011), estudiaron 310 muestras fecales colectadas en dos Escuelas de la Provincia de Loja, Cantón Pindal analizadas por microscopía y PCR en tiempo real (q-PCR), se encontraron que todas las muestras fueron negativas para *Taenia solium* y ocho positivas para *Hymenolepis nana* (2.52%), en microscopia, mientras que, tres muestras positivas para *Taenia solium* (0.94%) y 18 positivos para *Hymenolepis nana* (5.66%) fueron diagnosticadas por q-PCR. Por otro lado, ninguna muestra resultó positiva para *Taenia saginata* con ninguno los dos métodos.

Hamza & Mahdi (2010), examinaron 150 cucarachas de las cuales resultaron positivas 125: mediante microscopia convencional, estudiando y demostrando que el porcentaje de infección y numero de parásitos de cucarachas atrapadas en los baños de casa era mayor que las cucarachas atrapadas en las cocinas de las casas (100% y 50%respectivamente), este estudio revelo que las cucarachas representan un importante reservorio de parásitos humanos con importancia medica como *Enterobius vermicularis* y *Ascaris lumbricoides*.

Rivero et al. (2008), estudiaron 204 muestras de heces de individuos de la comunidad de Santa Rosa de Agua (Municipio Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela), fueron analizadas a través del examen directo con SSF (0,85%) y lugol, concentrado de formol-éter y PCR. Al examen microscópico, 42 individuos (20,58%) presentaron

formas evolutivas del complejo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, mientras que la técnica de PCR evidenció un total de 47 casos positivos a estas amibas; de los cuales 22 eran portadores de *Entamoeba histolytica* (10,78%), 16 (7,84%) de *Entamoeba dispar* y 9 (4,41%) presentaron infección mixta. No hubo diferencia significativa al relacionar las variables sexo y presencia de *Entamoeba histolytica* y/o *Entamoeba dispar*, ni con los grupos etarios. No existieron casos de estas amibas, en los menores de 2 años. La frecuencia observada de *Entamoeba histolytica* (31/204), demuestra el carácter endémico de la amibiasis en esta comunidad.

Salehzadeh et al. (2007), recolectaron un total de 178 cucarachas, mostraron contaminación con alta carga bacteriana (más de 1×10^3) mientras que solo 2 de 45 (4,45%) cucarachas del grupo de control portaban una infección de importancia médica. Bacterias con alta carga bacteriana. Los exámenes bacteriológicos revelaron que casi todas las cucarachas de prueba tenían al menos uno de los siguientes microorganismos en la superficie de su cuerpo o en el tracto digestivo. *Enterobacter sp.* (22,6%), *Klebsiela sp.* (21%), *Enterococcus sp.* (17,3%), *Staphylococcus sp.* (16,5%), *Escherichia coli* y *Streptococcus sp.* (8,3%), *Pseudomonas sp.* (3%), y también *Shigella sp.*, *Haemophilus sp.* y beta-hemolítico del grupo A *Streptococcus sp.* cada uno menos del 1%. Además, los resultados mostraron que (74,4%) de las cucarachas de prueba albergaban hongos: *Candida sp.* (48,9%), *Mucor sp.* (10,5%), *Aspergillus niger* (7,5%), *Rhizopus sp.* (4. 5) y también *Penicillium sp.* y *Aspergillus fumigans* cada 1,5%. También se aislaron algunos gusanos parásitos de importancia médica de las cucarachas de prueba, pero las tasas de porte fueron bajas.

Montaño & Herveg (2006), establecieron que existen dos especies distintas de amebas que originalmente fueron conocidas como *Entamoeba histolytica*. Ellas son *Entamoeba dispar* (forma no patogénica) y *Entamoeba histolytica* (forma patogénica). El diagnóstico diferencial de estas dos especies es esencial para la decisión del tratamiento y la salud pública. Se puede usar un método rápido de extracción de DNA directamente de especímenes suspendidos en formalina éter. La extracción de ADN fue usada para la identificación de las especies existentes en las herramientas por reacción de cadena polimerasa (PCR). Un total de 75 muestras

recolectadas aleatoriamente fueron analizadas. Después de la confirmación por PCR: 7/75 muestras resultaron positivas para *Entamoeba histolytica*, 60/75 muestras resultaron positivas para *Entamoeba dispar* y 8/75 resultaron negativas porque no amplificaron, pudiendo tratarse de otras amebas como *Entamoeba hartmani*, *Entamoeba iodoamoeba*, *Entamoeba coli*, etc. Estas observaciones implican que el uso del DNA extraído directamente a partir de concentración de quistes para amplificación por PCR, es una herramienta útil para obtener un diagnóstico sensitivo y preciso que puede ser aplicado incluso en epidemiología.

Ponce et al. (2005). Las cucarachas pertenecen a uno de los grupos de insectos mejor conocidos y más antiguos; los organismos pertenecientes a este grupo, tienen la característica de adaptarse a una gran variedad de hábitat. Presentan una gran variedad de formas, tamaños, colores y hábitat en los que subsisten, siendo solo unas cuantas las que representan importancia en salud pública; en la actualidad se conocen alrededor de 45 patógenos que pueden transmitir de manera mecánica y natural, principalmente bacterias, hongos protozoarios, helmintos y virus. Mostrándolos como un riesgo para salud pública en las colectividades humanas.

Fernández (2001), estudió 244 especímenes de *Periplaneta americana Linnaeus* procedentes del alcantarillado de 13 zonas de la ciudad de Ica. Se identificaron 2 protozoarios y 2 nemátodos propios de la fauna parasitaria de la “cucaracha doméstica”: *Lophomonas blattarum*, *Leptomonas sp.*, *Leidynema appendiculatum* y *Hammerschmidtella diesingi* y protozoarios que parasitan al hombre, de los cuales 3 especies son patógenas: *Giardia lamblia*, *Blastocystis hominis* y *Cryptosporidium sp.*

1.2 GENERALIDADES

1.2.1 *Periplaneta americana*

Según evidencias de restos fósiles, se piensa que la cucaracha americana *Periplaneta americana*. apareció en la tierra hace aproximadamente 340 millones de años. Es originaria del continente africano, de regiones tropicales, llegando al continente americano mediante los navíos comerciales en el siglo XVII (Barbara, 2000)

1.2.1.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE *Periplaneta americana*

Periplaneta americana se caracteriza por ser una especie grande, los adultos tienen un tamaño que van desde los 34 a los 53 mm de largo, son de color rojizo-marrón con variaciones substanciales en patrones de coloración claro a oscuro, en la superficie superior del pronoto tiene un listón marrón- amarillo. Ambos, machos y hembras, tienen alas completas. A diferencia de las hembras, las alas de los machos se extienden un poco después del abdomen. Las ninfas son similares en apariencia, pero más pequeñas y no tienen alas. Es capaz de volar, pero, lo hacen en raras ocasiones (Jacobs, 2002).

El primer estadio de ninfa es uniformemente café pálido, y las puntas de los palpos maxilares y labiales son de color blanco; las antenas son tan largas como el cuerpo y son de color café pálido. Las almohadillas de las alas se desarrollan durante el tercero o cuarto estadio de la ninfa, y en el sexto estadio de ninfa tiene parches cafés pálido en el pronoto; las almohadillas de las alas en el último estadio de la ninfa miden alrededor de 7 mm de largo. El sexo de los estadios de las ninfas puede ser distinguido por el margen posterior del esternito 9, que tiene un corte mediano en las hembras y solo ligeramente dentado en los machos (Robinson, 2005).

La ooteca mide de 8 a 10 mm de largo, y es de color café oscuro a café negruzco; donde los compartimentos de huevos son indistintos; tiene 16 dientes en la quilla. La ooteca contiene 14- 16 huevos. Los que eclosionan según la temperatura reinante en el medio a: a 24°C en 57días, a 30°C en 32 días, y a 30-36°C en 24-38 días (Robinson, 2005).

El hábitat de la cucaracha americana es peri doméstica más cosmopolita entre las de su género, son encontradas comúnmente en construcciones comerciales, vertederos, sistemas de alcantarillado municipales, sistemas de drenaje, tanques sépticos, espacios angostos debajo de edificios, áticos, copas de las palmeras, huecos en las paredes, barcos, cuevas y minas (Ponce et al., 2005).

Alimentos: Poseen un amplio espectro en relación a materiales orgánicos. Prefieren los alimentos que contengan azúcar y almidón, además de tener la capacidad de ingerir cualquier tipo de alimento que sea consumido por el ser humano. También poseen la capacidad de ingerir diferentes tipos de materiales como papel, cartón, libros, cabellos. Así mismo, diferentes tipos de tejidos como el sanguíneo, sangre fresca o seca, restos de organismos de sus mismas especies, practican el canibalismo (Bell & Adiyodi, 1981) (Rozendaal, 1997).

1.2.1.2 UBICACIÓN TAXONÓMICA DE *Periplaneta americana*

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Subfilo: Hexapoda

Clase: Insecta

Subclase: Pterigota

Infraclase: Neoptera

Orden: Blattodea

Familia: Blattidae

Género: *Periplaneta*

Especie: *Periplaneta americana*

(Linnaeus, 1758).

Nombre común: cucaracha americana (Gallego, 2006).

1.2.1.3 CICLO BIOLÓGICO DE *Periplaneta americana*

La cucaracha americana tiene tres etapas de desarrollo: huevo, ninfa y adulto.

ESTADIO DE HUEVO

Los huevos son puestos en cápsulas (OOTECA) de color marrón oscuro, de forma simétrica y de 5/16 pulgadas (mm) de largo. La hembra deposita una cápsula luego de un día de formada. A veces los deposita en lugares adecuados cerca de fuentes de comida y en áreas protegidas. Cada cápsula tiene de 14 a 16 huevos en promedio. Una cápsula se produce, usualmente, cada semana y se aseguran, con secreciones de la boca de la hembra, en lugares escondidos. La hembra produce de 15 a 90 cápsulas. El tiempo de duración de la etapa del huevo varía de 29 a 58 días (Steven & Jacobs, 2016)



FIGURA 1 Ooteca de *Periplaneta americana*
(Barbara, 2000)

ESTADÍOS NINFALES:

A temperatura normal, las ninfas salen del huevo entre 50 a 55 días. Las ninfas jóvenes son de color marrón grisáceo y luego de mudar su piel larval, se tornan marrón rojizo. La etapa ninfal varía de 160 a 971 días. El número promedio de crías por año es de 800 (Steven & Jacobs, 2016)



FIGURA 2 Individuo en estadio de ninfa de *Periplaneta americana*.
(Barbara, 2000).

INSECTO ADULTO

Bajo condiciones ideales una hembra adulta vive hasta 15 meses; los machos por un tiempo más corto (Steven & Jacobs, 2016).

En esta etapa del desarrollo de *Periplaneta americana* muestra una diferenciación entre machos y hembras, presentan alas y son de un color café-rojizo. Cuya diferencia del macho está es la presencia de espículas, que son estructuras utilizadas para la reproducción y que se encuentran en

la parte terminal del abdomen, siendo su promedio de vida de 100 a 700 días y, para las hembras, 100 a 400 días (Barbara, 2000).

Los insectos adultos presentan diversas capacidades para poder sobre vivir en los diferentes tipos de ambientes. En relación a la temperatura, tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas cercanas a los 4°C utilizando un método conocido como diapausa en el cual las cucarachas tienen la capacidad de reducir sus funciones metabólicas a niveles mínimos.

Por otra parte, poseen un muy variado tipo de enzimas como la esterasa y acetilcolinesterasa lo que le confiere diferentes ventajas ante situaciones adversas. Un ejemplo de esto se presenta en el desarrollo de resistencia a antibióticos, ya que las enzimas producidas por la cucaracha le ayudan a desdoblar o inactivar las estructuras químicas de un amplio número de insecticidas (Mariño, 2011).

Debido al hábitat donde se encuentra, sirve como transporte mecánico de agentes infecciosos como hongos, bacterias, virus, helmintos y protozoarios, actuando como vectores mecánicos, convirtiéndose así en un potencial transmisor de enfermedades.

La mayoría de estos parásitos vectorizados, son causantes de enfermedades gastrointestinales entre ellas microorganismos patógenos del hombre como: bacterias, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*; parásitos, como quistes de *Áscaris sp.*, *Trichuris sp.*, *Entamoeba hystolitica*; y hongos, que contaminan alimentos como el género *Aspergillus sp.*; virus como poliovirus y el de la hepatitis A y B (Ponce et al., 2005).



FIGURA 3 Individuo adulto macho de *Periplaneta americana*.
(Mariño, 2011).

1.2.1.4 DISTRIBUCIÓN

Poseen una distribución cosmopolita habitando principalmente en microambientes húmedos y con abundante materia orgánica, en lugares como alcantarillas, jardines, casas habitación y edificios por lo cual se considera una plaga urbana (Ruiz & Chávez, 2015)

Las cucarachas tienen una distribución mundial, con mayor abundancia y diversidad (Torres, 2015) en las regiones tropicales, subtropicales y templadas y, aunque la existencia de algunas especies está acotada a una determinada región biogeográfica, otras especies están consideradas como cosmopolitas, pues se les encuentra en todo el orbe (Mariño, 2011).

En Perú se encuentran ampliamente distribuidas en las zonas cálidas y húmedas del país, encontrándose en mayor proporción en la costa y selva del país, por el contrario, en la sierra se encuentra en menor medida, debido a las deficientes condiciones para su propagación, aunque es evidente el aumento progresivo debido a su gran adaptabilidad (Ruiz & Chávez, 2015)

1.2.1.5 IMPORTANCIA DE *Periplaneta americana*

IMPORTANCIA ECONÓMICA.

Genera pérdidas económicas al ser humano, por la acción de blátidos que entran en contacto con sus alimentos. Dichos insectos, al regurgitar su comida, parcialmente digerida, secretan sustancias mediante glándulas odoríferas o depositan sus excretas en los productos alimenticios, ocasionando que éstos no puedan ser consumidos, por lo que deben eliminarse al estar contaminados por olores desagradables o, peor aún, por microorganismos patógenos que provocan graves enfermedades o pueden ser mortales, no sólo al ser humano sino a diferentes vertebrados.

Esto acrecienta aún más las pérdidas, por los costos laborales, médicos, sanitarios, que implican la afectación y restauración de la salud (Mariño, 2011).

IMPORTANCIA EN LA SALUD PÚBLICA

Las cucarachas representan una plaga, de prácticas nocturnos y una alimentación de tipo omnívora, que operan como vectores naturales en las casas; acarreando gérmenes patógenos que logran perdurar viables en su materia fecal, tubo digestivo y su tegumento, por varios días o semanas.

Como diversos tipos de gastroenteritis aparecen como las principales enfermedades transmitidas por las cucarachas. Además de náuseas, dolores abdominales, vómito, diarrea, disentería y otras (Ponce et al., 2005).

Los agentes patógenos que producen estas enfermedades, son transportados en las patas y cuerpos de las cucarachas y son depositados en la comida y diversos utensilios. Su materia fecal y mudas también contienen numerosos alérgenos que afectan ojos y piel. Pero uno de los más importantes, son los que producen asma (Ponce et al., 2005).

1.2.2 *Blatella germánica*

Se conoce que esta especie, es originaria en el norte de África o al oeste de Asia y fue diseminada de estos lugares mediante el intercambio de comercio (Jaramillo et al, 2009).

1.2.2.1 DESCRIPCIÓN MORFOLOGICA DE *Blatella germánica*.

Las cucarachas alemanas *Blatella germánica* (Linnaeus, 1767) adultas son de 1/2 a 5/8 pulgadas de largo y de color bronceado a marrón claro. Aunque tienen alas desarrolladas, no vuelan. Las ninfas son similares a las adultas excepto que son más pequeñas y carecen de alas. La cucaracha alemana es mejor identificada por su tamaño pequeño y por dos líneas paralelas oscuras que recorren desde la parte trasera de la cabeza hasta las alas. Usualmente se encuentran en cocinas (cerca de lavadoras de platos, estufas y fregaderos) y en baños (Steven & Jacobs, 2016).

Las cucarachas alemanas son la especie más exitosa en infestar edificios en Pennsylvania. Son varias las razones por las que se explica la perseverancia de esta cucaracha y la dificultad para controlarlas. Las cucarachas alemanas producen un gran número de huevos por cápsula y se desarrollan en un tiempo bien corto desde que salen del huevo hasta que alcanzan su madurez sexual, resultando en un crecimiento acelerado de la población. Un gran número de ninfas se desarrollan sin problemas pues las hembras cargan la cápsula durante el tiempo que los embriones se están desarrollando dentro del huevo. Además, hay algo muy importante, las cucarachas alemanas son más pequeñas, comparadas con otras cucarachas y se pueden esconder en muchos lugares inaccesibles a otras especies más grandes (Steven & Jacobs, 2016).

1.2.2.2 UBICACIÓN TAXONOMICA

La posición taxonómica de la especie de *Blattella germánica* seleccionada se describió en base al sistema de clasificación de:

Clase: Insecta

Orden: Dictyoptera

Suborden: Blattaria

Superfamilia: Blaberoidea

Familia: Blattellidae

Género: *Blattella*

Especie: *Blattella germánica* (Linnaeus, 1767).

Nombre común: Cucaracha alemana (Linnaeus, 1767).

1.2.2.3 CICLO BIOLOGICO

El desarrollo de *Blattella germánica* es del tipo hemimetábolo o de metamorfosis incompleta, durante el cual se diferencian tres estados: huevo, ninfa y adulto (Navarro et al., 2017).

ESTADIO DE HUEVO

Las hembras producen una cápsula marrón claro (ooteca) que contiene de 30 a 40 huevos aproximadamente dispuestos en dos filas, la cual cargan durante unas tres semanas en su abdomen hasta el día en que salen las crías, momento en el que la depositan en una grieta o espacios seguros. La longitud de la ooteca varía entre 7 y 9 mm, y es acarreada por la hembra hasta el momento de la eclosión, cuando es depositada en lugares apropiados (Navarro et al., 2017).

ESTADIOS NINFALES

Las ninfas son, todos semejantes a los adultos, salvo por el hecho que carecen de alas y de aparato reproductor desarrollado (Navarro et al., 2017).

INSECTO ADULTO

El adulto de *Blatella germánica* es uno de los más pequeños entre las cucarachas domésticas, midiendo de 10 a 15 mm de largo. El color de los adultos es marrón - amarillento en el caso de machos y ligeramente más oscuro en hembras. Los adultos y las ninfas tienen en el tórax dorsal dos bandas paralelas longitudinales negras separadas situadas en el pronotum (entre las alas y la cabeza). Por una ligera raya (Navarro et al., 2017).

1.2.2.4 DISTRIBUCION

Las cucarachas son consideradas como un grupo sinantrópico debido a la estrecha relación existente con el hombre, la cual data desde que este último habitaba las cavernas. Debido a que las cucarachas se adaptan fácilmente al medio ambiente, se han ajustado exitosamente a vivir con los humanos. Existen cerca de 3,500 especies de cucarachas alrededor del mundo y, de estas, 55 especies se encuentran en los Estados Unidos. Solo cuatro especies son plagas comunes en las estructuras de Pennsylvania. Estas son la cucaracha alemana, de Banda Marrón, Oriental y americana (Gonzales & Medina, 2001).

En Perú se encuentran ampliamente distribuidas en las zonas cálidas y húmedas del país, encontrándose en mayor proporción en la costa y selva del país, por el contrario, en la sierra se encuentra en menor medida, debido a las deficientes condiciones para su propagación, aunque es evidente el aumento progresivo debido a su gran adaptabilidad (Ruiz & Chávez, 2015)

1.2.2.5 IMPORTANCIA DE *Blatella germánica*

IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA.

Pocas son las especies de importancia en el área de salud que invaden las viviendas, como lo son la cucaracha americana, alemana, café, ahumada, oriental y australiana, que representan una plaga de prácticas nocturnos y

una alimentación de tipo omnívora, que operan como vectores naturales en las casas; acarreando gérmenes patógenos que logran perdurar viables en su heces, tubo digestivo e integumento por varios días o semanas (Navarro et al., 2017).

Diversos tipos de gastroenteritis aparecen como las principales enfermedades transmitidas por las cucarachas. Además de náuseas, dolores abdominales, vómito, diarrea, disentería y otras enfermedades. Los agentes patógenos que producen estas enfermedades, son transportados en las patas y cuerpos de las cucarachas y son depositados en la comida y diversos utensilios. El excremento y mudas también contienen numerosos alérgenos que afectan ojos y piel. Pero uno de los más importantes, son los que producen asma; cualquier tipo de contacto con la cucaracha puede producir las enfermedades antes mencionadas, sin embargo, no están asociados con enfermedades epidémicas (Navarro et al., 2017).

1.2.3 GÉNERO *GIARDIA*

1.2.3.1 DESCRIPCION MORFOLOGICA

Los representantes de los diplomonadina, como es el caso de *Giardia sp.*, viven en el intestino de sus hospederos, y la luz del intestino se alimentan mediante fagocitosis del contenido intestinal, almacenando hidratos de carbono que toman del glucógeno, y que después será metabolizado anaerobiamente; en presencia de oxígeno respiran activamente, por lo que son aerobios aereotolerantes. La transmisión por fecalismo se realiza a través de quistes que son eliminados con las heces; las paredes de los quistes contienen elementos filamentosos estabilizantes y se separan de la superficie del parásito mediante un proceso de exocitosis (Tanata et al., 2018).

Presenta dos formas a la microscopia de luz: el trofozoíto y el quiste. El primero es piriforme. Al observarlo de frente y lateralmente, semeja una coma, con una cara cóncava y otra convexa. Mide entre 10 y 20 mm de largo, por 5 a 15 mm de ancho y 2 a 4 mm de grosor. Posee simetría bilateral y su cuerpo aparece dividido en mitades por un engrosamiento citoplasmático compuesto por microtúbulos, el axostilo, el que es un esqueleto axial. En su extremo anterior presenta dos núcleos grandes y vesiculares, con nucléolos muy visibles en preparaciones teñidas. A diversas alturas de la superficie celular emergen cuatro pares de flagelos que le dan movilidad (Apt Barouch, 2013).

Los quistes son ovalados y miden de 8-12 mm y de 7-10 mm respectivamente; en observación a la microscopia directa aparecen como cuerpos muy refringentes, con una membrana quística de doble pared y, en su interior, se aprecian cuatro núcleos y una serie de filamentos, los que constituyen los restos flagelares y cuerpos parabasales (Apt Barouch, 2013).

1.2.3.2 UBICACIÓN TAXONÓMICA

Dominio: Eukaria (Cavalier-Smith, 2013)

Reino: Protista (Haeckel, 1866).

Superreino: Archezoa (Cavalier-Smith, 2013)

Infrareino: Excavata. (Cavalier-Smith, 2013)

Phylum: Metamonada (Grasse, 1952).

Clase: Trepomonadea (Cavalier & Smith, 2013)

Orden: Diplomonadida (Cavalier & Smith, 2013)

Suborden: Giardiina (Cavalier-Smith, 2013)

Familia: Giardiidae (Cavalier-Smith, 2013)

Género: *Giardia* (Kunstler, 1882)

(Cavalier & Smith, 2013)

1.2.3.3 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE *GIARDIA*

Giardia sp. contienen cinco cromosomas y son polipoides; algunas estructuras, tales como mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y nucléolos, no han sido identificadas. Hechos muy recientes demuestran que varios genotipos, aparentemente con diferentes grados de virulencia, integran las especies (Almannoni et al., 2008).

Posee al menos cuatro, y quizás ocho o más, copias de cada cromosoma por organismo y tienen una complejidad genómica estimada de 1.2×10^7 pb de ADN y un contenido de GC del 46%. Existe evidencia de recombinación en los telómeros de algunos de los cromosomas, y se han identificado variantes de tamaño múltiple de cromosomas individuales dentro de los aislados clonados. Sin embargo, las regiones internas de los cromosomas no muestran evidencia de recombinación. (Adam, 2000).

El análisis de la unidad ribosomal 16S de *Giardia*, indica que este protozoo se encuentra ubicado entre los eucariontes más primitivos (Campos & Vazquez, 2009).

1.2.4 GENERO *HYMENOLEPIS*

1.2.4.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

La familia Hymenolepididae está constituida por un grupo diverso de cestodos, unas 230 especies en mamíferos y alrededor de 260 en aves, pero tres de ellas han sido objeto de mayor atención: *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta* e *Hymenolepis microtoma*. Se consideran agentes etiológicos de importancia medica *Hymenolepis nana* e *Hymenolepis diminuta*, aunque existen discrepancias debido a la existencia de especies crípticas que no se reportan (Nkouawa et al., 2016).

1.2.4.2 UBICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Animalia.

Phylum: Platyhelminthes (Gegenbaur, 1859).

Clase: Cestoda (Monecille, 1892).

Orden: Cyclophyllidae (Braun, 1990).

Familia: Hymenolepididae (Railliet & Henry, 1909).

Género: *Hymenolepis* (Henry, 1909).

(Werner, 2014).

1.2.4.3 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE *HYMENOLEPIS*

El género *Hymenolepis* sp. posee un número de 10 a 12 cromosomas dependiendo este número de la especie, siendo citológicamente bastante uniformes (Tanveer, et al., 2015). El ensamblaje final del genoma es de 177 Mbp con un tamaño de contig N50 de 75 kbp y un tamaño de andamio N50 de 2,3 Mbp (Nowak et al., 2019).

Por otro lado, su genoma mt tiene un tamaño de 13.764 pb y codifica 36 genes, incluidos 12 genes que codifican proteínas, 2 genes de ARN ribosómico y 22 genes de ARN de transferencia. Todos los genes se transcriben en la misma dirección. El orden de los genes y el contenido del

genoma son completamente idénticos. Análisis filogenéticos basados en secuencias de aminoácidos concatenados de 12 genes que codifican proteínas por inferencia bayesiana, máxima probabilidad, y la parsimonia máxima mostró la división de la clase Cestada (Cheng et al., 2016).

1.2.5 GÉNERO *ENTAMOEB*A

1.2.5.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Este género comprende a todas las amebas endoparásitos, el núcleo tiene un tamaño entre 4 μm – 7 μm de diámetro. La membrana nuclear se presenta como una doble membrana interrumpida por numerosos poros de aproximadamente 65 nm. La cromatina está generalmente uniformemente repartida dentro de la membrana nuclear. El cariosoma es una masa pequeña y esférica, aproximadamente 0,5 μm de diámetro, localizada en la parte central del núcleo y que parece no corresponderse con el nucléolo de otras células eucariotas (Ravdin, 2000).

El trofozoíto, mide entre 10-60 μm , con un promedio entre 15-30 μm . Al fresco se le reconoce un ectoplasma claro y un endoplasma más oscuro. El ectoplasma cumple las funciones de locomoción con emisión de pseudópodos direccionales que, por cambios fisicoquímicos, arrastran al endoplasma. En el ectoplasma se efectúan las funciones digestivas (Apt Baruch, 2013).

En su forma quística transforma la membrana celular en una pared gruesa e incorpora en su citoplasma material de reserva, vacuolas de glucógeno y barras cromatoidales. Estos prequistes o quistes inmaduros pueden tener de uno o dos núcleos y miden entre 5-20 μm . Por mitosis se transforma en el quiste maduro, hasta con ocho núcleos (Apt Barouch, 2013)

1.2.5.2 UBICACIÓN TAXONOMÍA:

Reino: Protista
Subreino: Protozoa
Phylum: Sarcomastigophora
Subphylum: Sarcodina
Superclase: Rhizopoda
Clase: Lobosa
Orden: Amoebida
Familia: Endamoebidae
Género: *Entamoeba*
(Botero & Restrepo, 2012)

1.2.5.3 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE *ENTAMOEBA*

El ADN genómico de *Entamoeba sp.* está constituido por 24 millones de bases (Mb) púricas y pirimídicas, de las cuales alrededor del 75% corresponden a adenina (A) y timina (T). Los análisis in silico de la información que se puede obtener de bases de datos en Internet revelaron que, de los 9 938 genes identificados, solamente 49% codifica para proteínas, y de éstos tan sólo el 12% presenta las secuencias llamadas intrones (Vargas, 2013).

El genoma de *Entamoeba sp.* tiene un bajo contenido de Guanina (G) y Citocina (C), 22,4%, y este compuesto por cromosomas lineales y varias moléculas circulares, similares a plásmidos. Los genes de ARNr están ubicados exclusivamente en algunos de los ADN circulantes (Unbhattacharya et al., 2015).

El análisis del cariotipo por electroforesis en gel de campo pulsado sugiere la presencia de 14 grupos de ligamiento conservados en una amplia variedad de tamaño entre cromosomas homólogos de diferentes aislados. Los genes de *Entamoeba* tienen regiones cortas de 3 y 5 sin traducir y están muy empaquetados (Unbhattacharya et al., 2015).

CAPITULO II MATERIALES Y METODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDIO

Las colectas se realizaron en los centros de abastos de Huancaro, Santa Rosa, Vinocanchon, Ccascaparo y Rosaspata. Ubicados en el área urbana de la Provincia y Región del Cusco, en la sierra sur, al borde oeste de la Cordillera Oriental de los Andes, cuyo territorio provincial está a una altura de 3399m, con un clima templado en las zonas bajas y frías en las zonas altas; con un clima de zona quechua, y un promedio de humedad anual de 64%, y con una población de 427,580 habitantes.



FIGURA 4 Mapa de ubicación de centros de abastos
Realizado en base a datos del Sistema ArcGIS

2.1.1 CLIMA

Según el SENAMHI, el clima de Cusco se encuentra a 3368 metros sobre el nivel del mar. El clima es cálido y templado en, en invierno hay mucho menos lluvia que en verano, el clima aquí se clasifica como Cwb por el sistema Köppen-Geiger (SENAMHI,2019).

La temperatura promedio es de 13.2 °C. La precipitación es de 693 mm al año con una temperatura anual máxima de 25.17 °C y una temperatura mínima de 3.2 °C (SENAMHI,2019).

Tabla 1. Registro de Temperaturas, Precipitaciones registrados para Cusco Enero – Diciembre 2019

	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Precipitaciones (mm / m ²)
Enero 2018	24.4	10.7	60.4
Febrero 2018	23.0	11.2	119.0
Marzo 2018	24.17	8.5	99.2
Abril 2018	25.0	9.2	15.1
Mayo 2018	25.0	9.3	2.3
Junio 2018	23.2	9.9	1.52
Julio 2018	23.9	3.2	1.61
Agosto 2018	24.4	3.4	5.6
Setiembre 2018	25.17	6.5	2.8
Octubre 2018	25.0	8.2	15.2
Noviembre 2018	25.0	9.3	29.5
Diciembre 2018	23.2	9.9	118.5

SENAMHI – Oficina de Estadística, 2019.

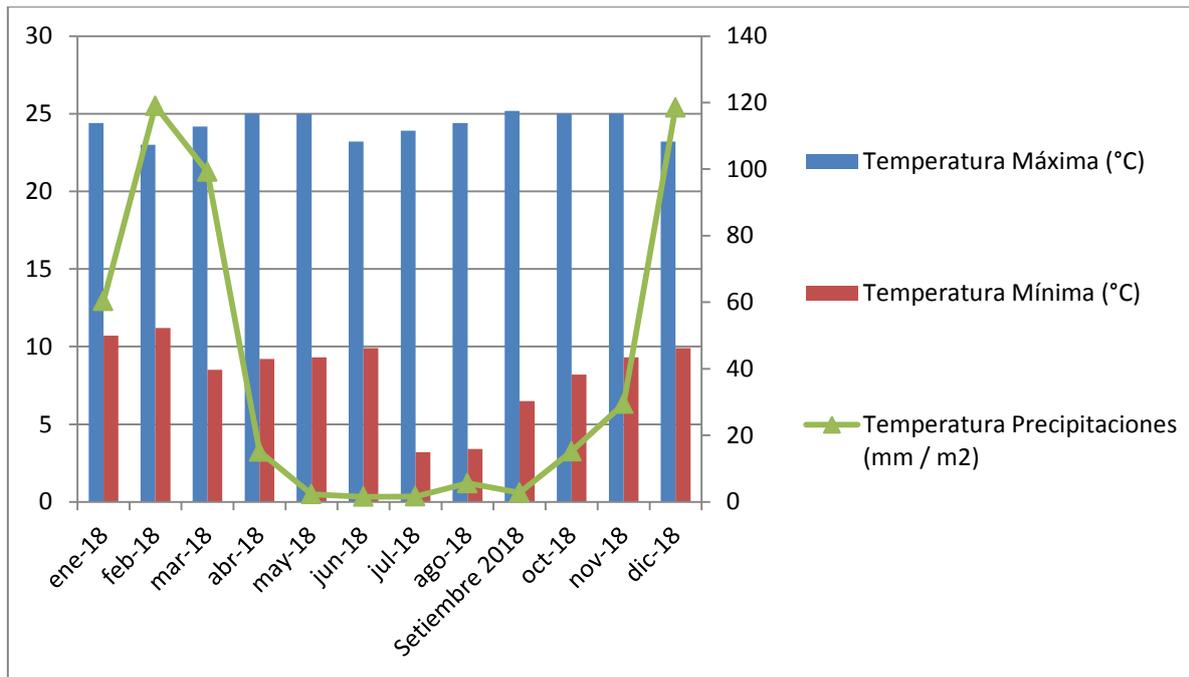


FIGURA 5 CLIMATOGRAMA EN BASE A LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL SENAMHI 2019

Basados en datos de SENAMHI

2.2 MATERIALES:

2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

Las muestras de ADN fueron extraídas mediante métodos convencionales a partir de las excretas (obtenidas de la última porción del tubo intestinal) de *Blatella germánica* y *Periplaneta americana*. por necropsias parasitológicas.

Tabla 2 Cucarachas Colectadas en Época de Secas

AREAS	Mercado	Mercado	Mercado	Mercado	Mercado
	Huancaro	Casccaparo	Rosaspata	Santa Rosa	Vinocanchon
S.S.H.H.	22	20	12	15	20
Jugos	0	23	28	13	27
Comidas	32	22	20	10	30
Frutas	16	15	18	8	15
Verduras	12	18	12	5	17
Total	82	98	90	51	109
Total, de especímenes Colectados 430					

Tabla 3 Cucarachas Colectadas en época de lluvias

AREAS	Mercado	Mercado	Mercado	Mercado	Mercado
	Huancaro	Casccaparo	Rosaspata	Santa Rosa	Vinocanchon
S.S.H.H.	10	8	5	7	12
Jugos	0	10	8	4	8
Comidas	18	11	8	4	10
Frutas	7	12	6	2	7
Verduras	7	5	4	3	7
Total	42	46	31	20	44
Total, de especímenes colectados 183					

2.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO:

Equipos

- Termociclador. Applied Biosystems. Proflex
- Cabina de PCR. UVP. UV3 HEPA PCR
- Espectrofotómetro. DeNovix. Ds-11
- Vortex. Thermo Scientific
- Balanza Analítica. Sartorius
- Cámara de electroforesis Horizontal. BioRad
- Campana de extracción. BioBase
- Fotodocumentador. Vivilber. E-box
- Microscopio Estereoscopio LABOMED CZM 6
- Refrigeradora. Thermo Scientific. REVCO
- Microscopio. Carl Zeiss. Axio Imager M2
- Centrifuga. Thermo Scientific. Micro CL17
- Micropipetas. 0.2-2; 2-20; 20-200 y 100-1000 μ L. Thermo Scientific.

Reactivos:

- Kit de amplificación 2x PCR master mix with dual Dye
- Primers 1 μ M
- Agua libre de nucleasas (NFW nuclease free water)
- Agarosa 1.5%
- PBS Tampón 10 mM, 96%
- Lugol parasitológico Dobell O'Connor 5%
- Éter glacial 96 %
- Alcohol absoluto
- Alcohol al 70%
- Proteínasa K (895 U/ml; 19,6 mg/ml)
- Buffer TAE 1x (2 M Tris, 0,1 M EDTA, pH 8,0).
- Buffer TE (Tris 2mM, HCL10Mm, EDTA 1Mm, Ph8)

- Sacarosa (1.275g/100ml)
- Fenol saturado Thermo scientific
- Solución de Thelemann (NaCl 5g, Formaldehído en solución 37%, 50ml, Agua destilada 45 ml)
- Buffer de lisis (100 mM, tris-HCl, 200 mM NaCl, 100 mM EDTA, 2% SDS, 1 mM)

Fungibles y consumibles:

- Baguetes de vidrio.
- Laminas Porta Objetos
- Láminas Cubre Objetos
- Luna de reloj
- Tubos de microcentrifuga 1.5 ml
- Amplitaq
- Puntas para micropipetas

Equipo de Bioseguridad Personal

- Jabón líquido
- Papel absorbente
- Pinzas
- Tijeras

2.2.3 MATERIAL DE CAMPO:

- Libreta de datos y cámara fotográfica
- Trampa con cebo para la captura de cucarachas
- Sistema de Posicionamiento Geográfico (GPS)

2.3 METODOLOGÍA

FLUJOGRAMA DE TRABAJO

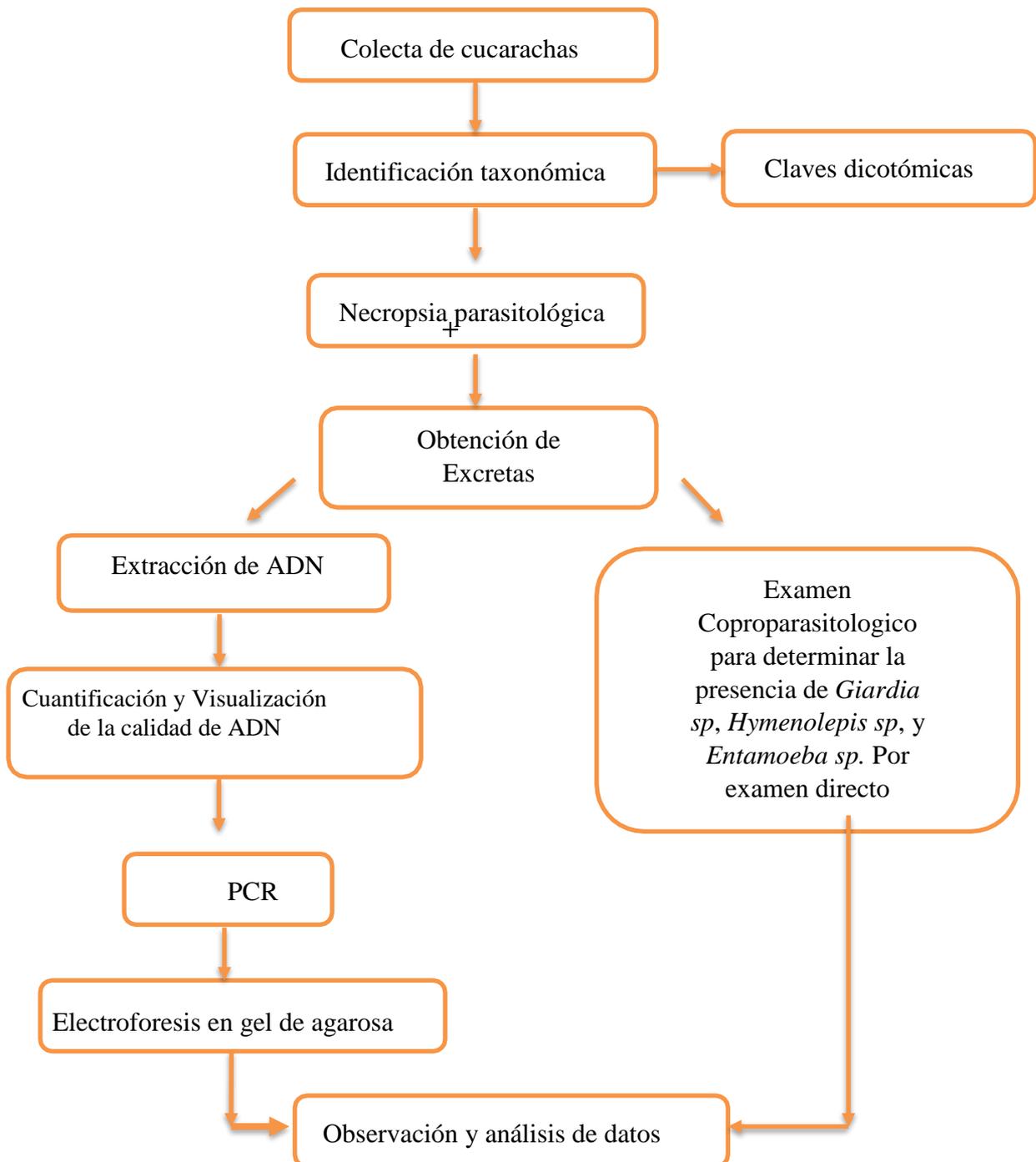


FIGURA 6 Flujo de actividades para la detección molecular por PCR de *Giardia sp*, *Hymenolepis sp* y *Entamoeba sp*. Colectadas a partir de excretas de cucarachas de centros de abasto públicos en Cusco

2.3.1 CAPTURA DE ESPECIMENES

Las técnicas de muestreo son los procedimientos (equipo y modo en que se hace una captura) utilizados para recoger la información en una unidad de muestreo dada (Cazorla et al., 2015).

- **TRAMPAS CON CEBO**

Estas trampas, donde se usan botellas de variada morfología u otro tipo de recipientes que se colocan y se llenan parcialmente con el cebo. El propio líquido de cebo es el que atrapa a los insectos atraídos. Este tipo de trampas es fácilmente adaptable de modo que capturen a los insectos vivos y de ese modo poder realizar estudios de captura, marcaje y recaptura (Cazorla et al., 2015).

- **CAPTURA POR UNIDAD DE ESFUERZO**

Está fundamentado en la valoración de tiempo, determinado para la captura de un número de ejemplares donde se monitorea cada botella de muestro durante 60 min.

Se colectó al azar un total de 613 muestras (cucarachas) en dos épocas, época de lluvias (mayo – setiembre) y época de secas (mayo – setiembre) empleando trampas con cebo (azúcar y restos de comida en fermentación) (figura 7).

2.3.1.1 ELABORACIÓN DE LAS TRAMPAS PARA CAPTURA DE ESPECIMENES

- La botella de plástico de 2l. Fue cortada en la mitad. La porción superior se coloca sobre la inferior a modo de embudo invertido.
- Para colocarla en su interior, dejando dentro gránulos de azúcar o restos de comida, como atrayente para las cucarachas.

- Por lo que las cucarachas pueden ingresar y no pueden salir (ver figura 7).



FIGURA 7 Trampas para la captura de cucarachas.
(Cazorla et al., 2015).

2.3.1.2 COLECTA DE MUESTRAS

Se colectaron 613 ejemplares de cinco mercados de la ciudad del Cusco Ccascaparo, Rosaspata, Santa Rosa, Huancaro, Vinocanchon de cinco secciones específicas S.S.H.H., Comidas, Frutas, Verduras, Jugos. (Ver tabla N° 10 y 11).

Se colocaron 4 trampas (una por esquina) en cada sector de muestreo de los centros de abastos, conteniendo el cebo. Transcurrido el tiempo de 1 hora se procedió a recoger las trampas, previamente rotuladas.

Las trampas conteniendo los especímenes fueron trasladadas al laboratorio C-321 (Laboratorio de genética – genética molecular) de la escuela profesional de Biología - UNSAAC.

2.3.2 IDENTIFICACION DE ESPECIMENES

La identificación de las 613 especies de cucarachas colectadas se realizó con un microscopio estereoscopio LABOMED CZM6 por medio de claves dicotómicas (Pratt, 1988).

Una clave dicotómica consiste en un modelo o esquema que permite la

determinación de distintas especies, a través de la comparación (Lahitte et al., 1997) de dos caracteres excluyentes. Están constituidas por una serie de caracteres disyuntivos contrapuestos y relacionados de modo tal que, eligiendo uno de los dos caminos planteados, se transita Por las distintas series de opciones hasta lograr la determinación del ejemplar en cuestión.

Los caracteres utilizados para confeccionar las distintas opciones de la clave deben ser relativamente constantes y poder ser identificados sin dificultad. Es preciso aclarar que no hay un criterio preestablecido para elaborar los dilemas u organizar su secuencia, sin embargo, es muy útil identificar primero los ejemplares pertenecientes a taxones o grupos con características muy diferentes (Lanteri, Fernández, & Gallardo, 2004). (Mestres & Torres, 2008) señalan que, al incorporar más información a los dilemas, se aporta mayor cantidad de datos acerca del ejemplar a determinar; facilitando la decisión a tomar. Para la construcción de una clave dicotómica, debe asignarse a cada una de las opciones o alternativas un símbolo (número y letra), el cual puede tener o no sangría (Lahitte et al., 1997), que las identifique; el mismo permitirá seguir el camino hasta la identificación del organismo que se desea determinar.

2.3.2.1 IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR

Después de colectados los 613 especímenes se procedió a realizar una identificación preliminar a simple vista tomando en cuenta algunas características comunes de las especies, como son tamaño y color en general. (Ver anexo 09 y 10)

2.3.3 NECROPSIA PARASITOLÓGICA

Cuya técnica se fundamenta en la obtención de los componentes de órganos internos. Tratándose de un macro invertebrado se procedió a la técnica de necropsia, a los 613 ejemplares de cucarachas colectadas para la obtención de la parte posterior del intestino donde se encuentra el recto contenido las heces o excretas (ASOCAE ONGD, 2017).

El tubo digestivo está dividido en tres regiones: estomodeo, mesodeo y proctodeo. El estómago alberga la boca, faringe, esófago y estomago; el mesodeo es el intestino, que presenta varias glándulas digestivas; el proctodeo es la porción terminal (ectodérmica) del tubo digestivo, finaliza en el telson, una región que se encuentra al final del abdomen donde se encuentra el ano y el recto (ASOCAE ONGD, 2017). (Ver anexo 11)

Cuyo procedimiento es el siguiente:

- En una placa Petri que contenía algodón embebido con éter se coloca las cucarachas.
- Seguidamente con alcohol de 70% se las sacrifico, con el objetivo de diseccionarlas se les quito las patas, alas, el tórax, liberando el abdomen. Al abdomen liberado se le añadió gotas de suero para aperturarlo, exponiendo los órganos internos y separando la última porción del intestino (recto) donde se acumulan las excretas antes de la eliminación.
- Se Realizó la disección del intestino medio anterior y posterior, según la técnica de (Garate & Naupay, 1993).
- Las excretas fueron colectadas en los tubos de microcentrifuga de 1.5ml.

2.3.4 IDENTIFICACION DE PARASITOS

- El lavado de la última porción del intestino (recto) de las 613 cucarachas colectadas se homogenizo en 1ml de alcohol al 70%.
- Una alícuota (gota) del sedimento se colocó en un portaobjetos, se coloreó con lugol de Dobell O'Connor, que resalta algunas estructuras, como núcleos de protozoos y da una coloración café a los huevos y quistes de parásitos. Para observarlo a microscopía de campo claro (examen directo) con objetivo de 40x (Botero & Restrepo, 2012).
- Se identificó a los parásitos presentes (parásitos de interés de estudio y otros géneros que sirvieron para el descarte en la selección de muestras

para PCR), registrándose mediante fotografías.

2.3.5 EXTRACCION Y PURIFICACIÓN DE ADN

El propósito del aislamiento del ADN es separar el material genético de todos los componentes celulares (agua, iones orgánicos, aminoácidos, nucleótidos, lípidos, proteínas y RNA para obtener una separación homogénea de ADN que represente toda la información genética contenida en la célula.

La aplicación de las diferentes técnicas moleculares empleadas en la biología molecular para el análisis del genoma, depende en gran medida de la habilidad del investigador (Velazco, 2005). La calidad del ADN constituye un elemento crucial, la cual necesita un método de extracción lo más estandarizado posible con el que se obtenga un ADN puro, no degradado, libre de ARN y de inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa ya que cambios en la pureza afectan los perfiles de amplificación y esto se manifiesta en la presencia de bandas falsas y en la poca reproductibilidad del ensayo (Fraga et al., 2005). En general existen varios métodos, todos ellos constan de cuatro pasos esenciales que son:

2.3.5.1 PURIFICACION DE QUISTES Y HUEVOS

Se trabajó con 71 muestras aptas, en condiciones de calidad, cantidad y carga parasitaria para la extracción del ADN con dos técnicas o protocolos modificados, según (Leber & Novak, 1999).

PROTOCOLO A:

- El contenido de la última porción del tubo intestinal (excretas) de las cucarachas se colocó con alcohol al 70% contenidas en los tubos de microcentrifuga de 1.5 ml y se centrifugo a 1500 rpm por 5 minutos.
- El pellet se resuspendio en 500 ul de solución de thelemann, con 600 ul de éter.
- Se centrifugo 5 minutos a 1500rpm.
- Se descartó el sobrenadante y se agregó 500ul de PBS.

PROTOCOLO B:

- Se centrifugó 5 minutos a 1500rpm (los quistes y huevos quedan en el fondo del tubo de microcentrifuga por peso).
- Se descartó el sobrenadante.
- Se agregó 500ul de PBS y se resuspendio por vortex..
- Se agregó por las paredes de tubo 500 ul de solución de sacarosa.
- Se centrifugo a 1500rpm por 5 minutos y se aspiró la fase de sacarosa a otro tubo de microcentrifuga (en la fase de sacarosa se quedan los huevos y quistes).
- Se agregó 2 volúmenes de PBS (1000UL).
- Se centrifugó a 2000rpm por 5 minutos y es descarto el sobrenadante.
- Se Agregó 500 ul de PBS y se almaceno 4 °C para su posterior uso.

2.3.5.2 RUPTURA CELULAR PARA EXTRACCION DE ADN

La ruptura de la membrana celular es uno de los pasos más importantes en el aislamiento de ADN. Los procedimientos para romper las células son químicos, mecánicos y enzimáticos. Los métodos mecánicos incluyen a la sonicación, molienda, licuado o alta presión, sin embargo su aplicación puede causar fragmentación del ADN los mejores procedimientos para abrir las células u obtener ADN intacto son atreves de los químicos (detergentes) o enzimas. Los detergentes pueden solubilizar los lípidos de la membrana celular resultando en una lisis celular. En ciertos casos las células no se rompen únicamente con detergente, por lo que es necesario un tratamiento inicial con enzimas, el cual permite que el detergente actué sobre la membrana celular (Surzycki, 1999).

a) RUPTURA DE QUISTES Y HUEVOS

- Se trabajó la técnica de Shock térmico y Acción enzimática descrita por (Upton, 1997).
- Los quistes y huevos purificados se sometieron a 3,4,5 y 6 ciclos

de enfriamiento (incubación a -80 C durante 30 minutos) y calentamiento (incubación a +80 C durante 30 minutos).

- Se llevó a ebullición a 100 C por 15 minutos.
- Las muestras se incubaron con Proteinasa K (para romper y degradar las proteínas que están unidas al ADN) 1ul a 60 C por 24 horas.
- Se añadió a las muestras incubadas buffer de lisis a 37 C durante 24 horas

b) REMOCIÓN DE PROTEÍNAS Y ARN

El segundo paso en la purificación y remoción de proteínas y ARN del lisado celular. La remoción de proteínas de la solución de ADN depende de las diferencias físicas entre las propiedades de los ácidos nucleicos y proteínas. Los métodos de desproteinización explotan ciertas diferencias mediante uso de solventes orgánicos (diferencia en solubilidad), gradiente de densidad (diferencias en volumen específico) y proteínas (sensibilidad a enzimas digestivas). La remoción del ARN de las preparaciones de ADN se lleva a cabo usando procedimientos enzimáticos mediante RNAsa (Surzycki, 1999).

2.3.6 EXTRACCION DE ADN

Se trabajó por el método de (Sambrook & Russell, 2001).

- A la muestra de 500ul, se le agrego 200ul de una mezcla de solventes orgánicos (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, 25:24:1) y se centrifugo a 11000rpm durante 10 minutos (en centrifuga refrigerada).
- El sobrenadante se colocó a otro tubo de microcentrifuga y se le agrego dos volúmenes de etanol absoluto (400ul).
- Se agregó acetato de sodio a 0,3M con pH 5,2 (30 ul)
- Se centrifugo a 11 000 rpm por 30 minutos (en centrifuga refrigerada).
- Se descartó el sobrenadante.

- Se agregó 400ul de Etanol al 70%.
- Se centrifugo a 11 000 rpm durante 5 minutos.
- Se descartó el sobrenadante y se dejó secar toda la noche.
- Se resuspendio el ADN con 30ul de Buffer TE a 40 °C por 1 hora. (Sambrook & Russell, 2001)

2.3.7 CUANTIFICACION DE MUESTRAS DE ADN

La cuantificación de ADN se realizó en el espectrofotómetro DeNovix. Ds-11, permitió confirmar que se contó con cantidad y calidad óptima de Ácidos Nucleicos de 71 muestras (Anexo 03). Este paso de la purificación de ADN tiene dos propósitos. Primero concentrar el ADN de la solución de Desproteización y Segundo remover las impurezas que permanecen en la solución producto de la lisis celular. Este paso puede ser implementado de dos maneras: precipitando el ADN con los alcoholes o diálisis al concentrar el ADN usando compuestas que absorban el agua (Dellaporta et al., 1983).

- **DETERMINACIÓN DE LA PUREZA Y CANTIDAD DE ADN**

El último paso en cualquier procedimiento de aislamiento de ADN es la evaluación de los resultados, el cual se realiza al determinar la pureza y concentración del ADN. Este tipo de determinaciones se las puede realizar mediante espectrofotometría UV, flurometría y comparación de la intensidad de bandas en geles de agarosa, En espectrofotometría se conoce la concentración de ADN a partir de la medida de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm y se conoce la pureza al comparar la lectura de la absorbancia a 260 nm y 280 nm (propia de proteínas). En flurometría la concentración se calcula a partir de la fluorescencia emitida por fluorocromos fijados en el ADN, la cual se comparan con patrones estándar (Surzycki, 1999).

Mientras que en los geles de agarosa electroforesis se compara la muestra de ADN con marcadores de peso molecular útiles para

cuantificación y determinación de pureza.

2.3.8 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica muy valiosa, ya que permite obtener una gran cantidad de copias de fragmentos de ADN *in vitro*, duplicando solo secuencias deseadas específicas. Los componentes para una reacción estándar de PCR son (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

- La polimerasa termoestable (enzima que replica el ADN)
- Primers (fragmento que señalan las secuencias a duplicarse)
- Desoxirribonucleicos trifosfato
- MgCl₂ (cofactor enzimático)
- Sales estabilizadoras (estabilizadores de enzima)

El fundamento de la técnica de la PCR es la repetición cíclica de tres reacciones que varían en cuanto a su temperatura de incubación. El primer paso consiste en la desnaturalización del ADN nativo de doble hebra por calentamiento a temperatura elevada, proporcionando hebras sencillas. En el segundo paso, a menor temperatura se alinean los primers con su secuencia complementaria del ADN diana. En el tercer paso se realiza la síntesis de una segunda hebra complementaria de ADN nuevo, que se produce al extenderse el primer utilizando la ADN Taq polimerasa, copiando la secuencia del ADN molde adyacente. Tras la extensión de los primers, el ciclo se repite, aumentando primero la temperatura, de modo que todo el ADN de doble hebra se convierta en ADN de cadena sencilla y de esta manera las hebras del ADN sintetizadas de nuevo son molde de las siguientes (Gonzales & Medina, 2001).

El número de ciclos de la amplificación para producir una banda visible en un gel de agarosa depende del número de copias de ADN molde y la eficiencia de los primers. El límite de la reacción ocurre generalmente después de los 30

ciclos con una concentración de 105 copias del ADN molde y una eficiencia del ADN polimerasa del 70%. Los fragmentos generados son separados por electroforesis y así se detectan los diferentes patrones de bandas característicos de cada marcador molecular (Joshi et al., 1999).

La amplificación de los diferentes fragmentos pertenecientes a los géneros trabajados fueron los siguientes: para identificación de género de *Giardia* la sub unidad ribosomal 16S con 81%de especificidad y el 100% de sensibilidad (Santoro, et al., 2017), para *Hymenolepis* del del gen 18S rRNA con 83%de especificidad y el 100% de sensibilidad (Atis Muehlenbachs et al., 2015), y para identificación de *Entamoeba* la sub unidad ribosomal 18S con 83%de especificidad y el 100% de sensibilidad y especificidad (Nolan et al., 2017) en sus primers. Para realizar la amplificación se trabajó con los primers que se detallan en los siguientes cuadros:

Tabla 4 Primers para *Giardia sp.*

Giardia sp.				
Primers	Secuencias	Longitud	Temperatura	G-C%
Forward	GACGGCTCAGGACAACGGTT	20	60	60%
Reverse	TTGCCAGCGGTGTCCG	16	59	68%

Primer con 100% de sensibilidad y 81% de especificidad (Santoro, et al., 2017).

Tabla 5 Primers para *Hymenolepis sp.*

Hymenolepis sp.				
Primers	Secuencias	Longitud	Temperatura	G-C%
Forward	CTGTTAGGTTTGAGGCTTGTTTC	23	62	43.5%
Reverse	CCCACTAACCAATTCTCTCTCAG	23	62	47.8%

Primer con 100% de sensibilidad y 83% de especificidad (Atis Muehlenbachs et al., 2015).

Tabla 6 Primers para *Entamoeba sp.*

Entamoeba sp.				
Primers	Secuencias	Longitud	Temperatura	G-C%
Forward	GTTGATCCTGCCAGTATTATATG	23	51	39.1%
Reverse	CACTATTGGAGCTGGAATTAC	21	50.8	42.9%

Primer con 100% de sensibilidad y 83% de especificidad (Nolan, et al., 2017).

Tabla 7 Master Mix

Orden	Componente	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen para reacción 1 (ul)	Volumen para reacción 100 (ul)
1ro	Agua de grado molecular			2	200
2do	Trehalosa buffer	10%	5%	6.25	625
3ro	10X buffer	10x	1x	1.25	125
4to	MgCl ₂	50mM	2.5mM	0.625	62.5
5to	dNTPs	10mM	0.05mM	0.0625	6.25
6to	Forward primer	10uM	0.1uM	0.125	12.5
7mo	Reverse primer	10uM	0.1uM	0.125	12.5
8tavo	Taq polimerasa	5U/ul	0.025U/ul	0.0625	6.25
	Volumen total del master mix para la PCR			10.5	1.050
final	DNA (30-50ng/ul)			2	
	Volumen total de la reacción			12.5	

Los amplitaq, se colocaron en un termociclador BioRad (MyCycler™ ThermalCyclerSystem With GradientOption) el cual se programó de la siguiente manera:

Tabla 8 Ciclos Estandarizados de PCR para *Giardia sp.*

PARA <i>Giardia sp.</i>		
Desnaturalización inicial		94°C / 4min
Amplificación: 33 ciclos	Desnaturalización	94 °C/ 30 seg.
Alineamiento		54°C/ 30 seg.
Extensión		72 °C/ 1min
Extensión final		72 °C/ 10 min.

Tabla 9 Ciclos Estandarizados de PCR para *Hymenolepis sp.*

PARA <i>Hymenolepis sp.</i>		
Desnaturalización inicial		94°C / 2min
Amplificación: 50 ciclos	Desnaturalización	94 °C/ 20 seg.
Alineamiento		63°C/ 20 seg.
Extensión		72 °C/ 42 seg.
Extensión final		72 °C/ 7min.

Tabla 10 Ciclos Estandarizados de PCR para *Entamoeba sp.*

PARA <i>Entamoeba sp.</i>		
Desnaturalización inicial		94°C / 15 min
Amplificación: 40 ciclos	Desnaturalización	94 °C/ 30 seg.
Alineamiento		51°C/ 60 seg.
Extensión		72 °C/ 40 seg.
Extensión final		72 °C/ 5 min .

Luego de la amplificación las muestras fueron mantenidas en el termociclador a 4°C (post incubación).

2.3.9 ELECTROFORESIS

La electroforesis es una técnica analítica de separación de macromoléculas. La separación tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las macromoléculas cargadas cuando son sometidas a la influencia de un campo eléctrico. Durante la electroforesis solo los iones positivos hidratados, normalmente asociados con los grupos aniónicos fijados de la agarosa, pueden moverse hacia el electrodo negativo y las moléculas negativas, como el ADN, migran hacia el electrodo positivo. El índice de migración del ADN a través de los geles de agarosa depende del tamaño de la molécula, concentración del gel, voltaje aplicado, conformación del ADN y buffer usada (Surzycki, 1999).

Las moléculas de ADN migran en el gel de electroforesis en un índice inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular o número de pares de bases. El rango de movilidad lineal depende de la concentración del gel y el voltaje aplicado. Un fragmento de ADN de un determinado tamaño migra con índices diferentes en geles que contienen diferentes concentraciones de agarosa. Usando geles de diferentes concentraciones es posible distinguir fragmentos de diferentes tamaños en un amplio rango, si se aplica un voltaje correcto al gel. Normalmente el índice de migración de los fragmentos de ADN es directamente proporcional (Surzycki, 1999).

El producto de PCR fue transferido a geles de agarosa al 1.5%. y la corrida de muestras se procedió durante un tiempo de una hora a 80 voltios. Consecuentemente, la fuerza de campo aplicada en la, mayoría de los geles debe ser entre 0,5V/cm y 10V/cm (Surzycki, 1999).

La forma del ADN (conformación) también influencia el índice de migración. Existen tres estados conformacionales del ADN que son el circular cerrado superenrollado, circular abierto con moléculas relajadas y lineales. La movilidad relativa de estas tres formas depende de la concentración del gel, voltaje aplicado y la fuerza iónica del buffer, Como regla general, el buffer TAE (tris- acetato EDTA) las diferentes formas de ADN migran (de la más lenta a la

más rápida) en este orden: lineal, superenrollado y circular relajado. Mientras que en el buffer TBE (tris-borato EDTA) el orden es el siguiente: relajado circular, lineal y superenrollado (Surzycki, 1999).

Finalmente, para visualizar el ADN en los geles de agarosa se utiliza bromuro de etidio, Bromuro de etidio se une a los ácidos nucleicos al intercalarse entre las bases nitrogenadas, El bromuro de etidio absorbe la radiación ultravioleta en una longitud de onda entre 302 y 366 nm y la reemite como una fluorescencia de una longitud de onda de 590nm. Mediante foto documentadora es posible ver el ADN en estos geles y almacenar la información digitalmente (Surzycki, 1999).

2.3.10 EVALUACION DE GELES:

Una vez terminada la electroforesis se procede a visualizar la separación de los ácidos nucleicos. Las visualizaciones de los ácidos nucleicos separados en geles de agarosa pueden llevarse a cabo por la introducción previa a la electroforesis en el gel de bromuro de etidio (BrEt) en el propio gel. Esta sustancia se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y presenta fluorescencia cuando se ilumina con luz ultravioleta, observándose así las distintas bandas de ADN en el gel (Mota et al., 2016).

La evaluación del producto de electroforesis, se realizó mediante un transiluminador en fotodocumentador de geles Vivilber. E-box, y a partir de las imágenes generadas, se procedió a la observación directa y evaluación de presencia y ausencia de patrones de bandas mediante la escala del Marcador de Peso Molecular (FullRanger) de 100 bp de ADN, correspondiendo a los siguientes pesos moleculares: para *Entamoeba sp.*, 550 pb e *Hymenolepis sp.* 209 pb. según información del producto de amplificación del Gen Bank. Cabe señalar, que para *Giardia sp.*, se utilizó el Marcador de Peso Molecular (FullRanger) de 50 bp ADN, correspondiendo entre 63 pb. Según información del producto de amplificación del Gen Bank.

2.3.11 ANALISIS DE DATOS

El registro de datos morfológicos para la identificación de especies de los especímenes se realiza mediante claves dicotómicas.

El registro de datos moleculares para la identificación de la presencia y ausencia de bandas se basa en un patrón de bandas para cada muestra y se registra mediante la visualización directa y se registra las imágenes en un documentador de geles.

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 RESULTADOS

3.1.1 RESULTADOS DE IDENTIFICACION DE CUCARACHAS

- **IDENTIFICACION PRELIMINAR DE ESPECIES DE CUCARACHA**

Después de colectados los especímenes, se procedió a realizar una identificación preliminar a simple vista tomando en cuenta algunas características comunes de la especie, como son tamaño y color en general. Las posibles especies se enlistaron (ver Anexo 10) y esto sirvió para comparar con la identificación definitiva.

- **IDENTIFICACION DEFINITIVA DE ESPECIES DE CUCARACHA**

En cada una de las 613 muestras se realizó una separación de especímenes, que con ayuda de un microscopio estereoscopio LABOMED CZM6 y las claves dicotómicas (ver Anexo 11) para la identificación de cucarachas (Choate et al., 2008) se lograron identificar a nivel de especie y fueron corroboradas por Blgo, Henry Hugo Yañez Trujillano (Ver Anexo 13), coordinador del departamento de entomología de la Dirección Regional De Salud Cusco. La frecuencia de cada especie se presenta en la figura 8.

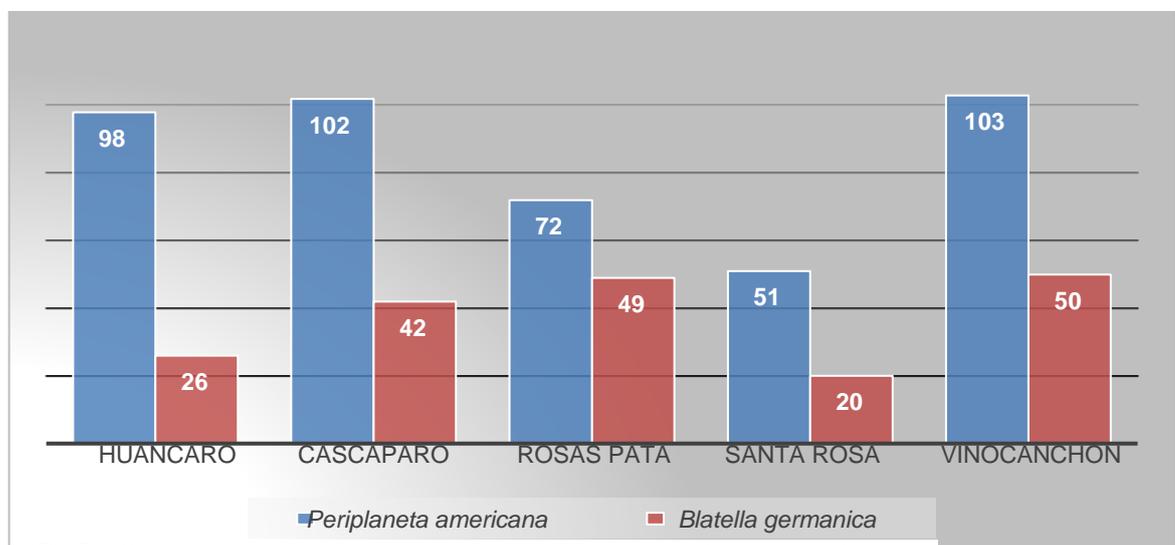


FIGURA 8 Frecuencia de especies de cucarachas por centro de abastos muestreados en la ciudad del Cusco

- **DE LA DETERMINACION DE ESPECIES DE CUCARACHAS**

De un total de 613 especímenes de cucarachas colectadas, se identificaron dos especies: 187 especímenes de *Blatella germánica* y 426 de *Periplaneta americana*, con su equivalente en porcentaje como se muestra en la figura 9.

Tabla 11 Determinación en porcentaje de especies de cucarachas

	NUMERO N°	PORCENTAJE %
<i>Blatella germánica</i>	187	31.00%
<i>Periplaneta americana</i>	426	69.00%
TOTAL	613	100.00%

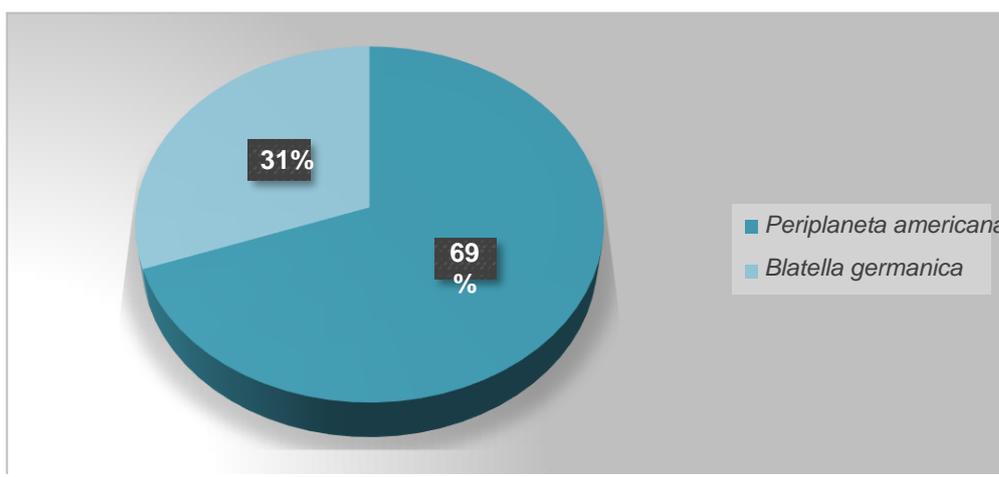


FIGURA 9 Determinación en porcentaje de especies de cucarachas

3.1.2 RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION MICROSCOPICA DE PARASITOS

Se encontraron seis géneros de parásitos (*Giardia sp.*, *Entamoeba sp.*, *Hymenolepis sp.*) parásitos de interés de estudio y otros (*Blastocystis sp.*, *Áscaris sp.* Y *Enterobius sp.*) como se detalla en la tabla 18 en dos especies de cucarachas (*Periplaneta americana* y *Blatella germánica*) (Anexo 1y 2)

Del total de 613 muestras, 584 resultaron positivas para al menos un parásito

de los antes mencionados, las figuras 6,7 y 8 muestran los parásitos de interés de estudio hallados a microscopia directa a 40x, El parásito con la mayor frecuencia fue *Giardia sp.*, con un 21.3% ver tabla 12.

Tabla 12. Resultados de muestras positivas en examen Coproparasitológico efectuado a las excretas de cucarachas

EXAMEN DIRECTO		
	Positivo N°	Positivo %
<i>Hymenolepis sp.</i>	34	5.8%
<i>Giardia sp.</i>	124	21.3%
<i>Entamoeba sp.</i>	99	16.9%
Otros parásitos	327	56.0%
TOTAL	584	100.00%

Entre los meses de mayo y setiembre meses correspondiente a época de secas, y los meses de febrero y abril correspondientes a época de lluvias, se realizaron estudios coproparasitológicos a un total de 613 muestras, 430 correspondientes a época de secas y 183 correspondiente a época de lluvias, con los resultados que se muestran en la tabla 13.

Tabla 13 Resultados de muestras en examen coproparasitológico efectuado a las excretas de cucarachas en dos épocas del año

	Época de secas		Época de lluvias	
	N°	%	N°	%
<i>Hymenolepis sp</i>	20	4.65%	14	7.66%
<i>Giardia sp</i>	79	18.38%	46	25.14%
<i>Entamoeba sp</i>	64	14.89%	34	18.57%
Otros parásitos	254	59.06%	73	39.89%
Negativos	13	3.02%	16	8.74%
TOTAL	430	100.00%	183	100.00%

En el cuadro anterior evidenciamos que el parásito con mayor frecuencia hallado fue *Giardia sp.* tanto en época de lluvias como época de secas, lo que atribuimos a que muchos de los productos que se expenden en estos centros de abastos son lavados con aguas contaminadas (aguas servidas).



FIGURA 10 Huevo de *Hymenolepis sp.*

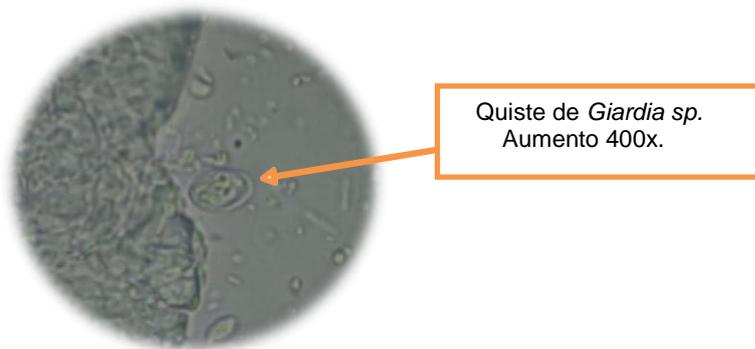


FIGURA 11 Quiste de *Giardia sp.*

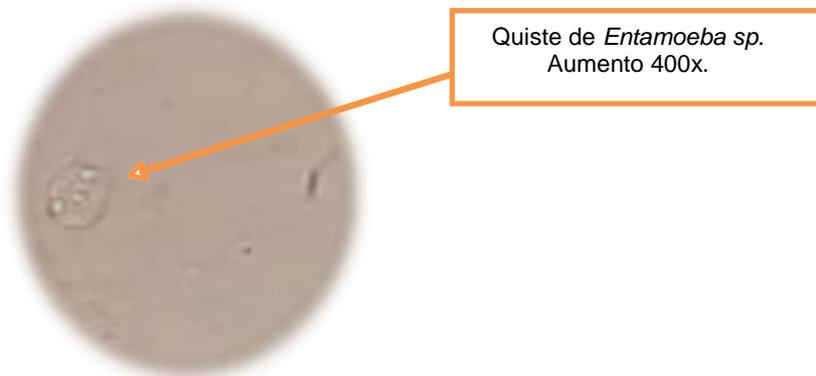


FIGURA 12 Quiste de *Entamoeba sp.*

3.1.3 RESULTADOS ENTRE LA RELACION DE ESPECIMENES COLECTADOS Y ESPECIMENES PARASITADOS

Se encontró un total de 95.27% (584) de especímenes parasitados ver tabla 14, siendo la cucaracha americana (*Periplaneta americana*), la especie más parasitada con 69.52% de frecuencia ver tabla 15, asimismo, es interesante las diferencias halladas entre las colectas en los diferentes centros de abastos ver tabla 16.

Tabla 14 Resultados de cucarachas parasitadas y no parasitadas por examen coproparasitológico

	N°	%
Cucarachas parasitadas	584	95.27 %
Cucarachas no parasitadas	29	4.73 %
TOTAL	613	100.00 %

Tabla 15 Resultados de especies de cucarachas parasitadas

	Cucarachas Parasitadas N°	Cucarachas Parasitadas %
<i>Blatella germánica</i>	178	30.48 %
<i>Periplaneta americana</i>	406	69.52 %
TOTAL	584	100.00 %

De la tabla anterior podemos evidenciar que *Periplaneta americana* fue la especie más parasitada y también la más hallada en los centros de abastos, esto debido a que está mucho mejor adaptada a nuestro clima, pudiendo considerarse especie endémica, por el contrario, *Blatella germánica* se encuentra en zonas cálidas y secas, como sería el norte de nuestro país, pudiendo ser traída en el transporte de alimentos, lo que justificaría su menor presencia en los centros de abastos

Tabla 16 Resultados de cucarachas parasitadas por *Hymenolepis sp.*, *Giardia sp.* y *Entamoeba sp.* por centro de abastos

Centro de Abastos	<i>Hymenolepis sp.</i>		<i>Giardia sp.</i>		<i>Entamoeba sp.</i>	
	N°	%	N°	%	N°	%
Huancaro	16	47%	27	21.77%	16	16.1%
Ccascaparo	6	17.7%	34	27.42%	22	22.2%
Rosaspata	2	5.8 %	21	16.93%	21	21.2%
Santa Rosa	2	5.9%	14	11.29%	15	15.2%
Vinocanchon	8	23.6%	28	22.59%	25	25.3%
TOTAL	34	100.0%	124	100.0%	99	100.0%

Es posible evidenciar que la mayor incidencia de *Hymenolepis sp.* Se encuentra en el mercado de Huancaro, esto debido a la alta presencia de canes en sus alrededores, asociado a su vez que *Hymenolepis sp.* tiene como hospedero intermediario y definitivo en algunas especies a los canes.

Por otro lado, se visualiza que en el mercado de Casccaparo el parasito con mayor presencia es *Giardia sp.*, esto debido al alto expendio de frutas y verduras en el suelo y a que el riego de sus comestibles es con agua contaminada.

Por su parte *Entamoeba sp.* Se encuentra con mayor incidencia en el mercado Vinocanchon, lo que se podría atribuir a un mal descarte de sus residuos ya que se encuentran acumuladas en las puertas.

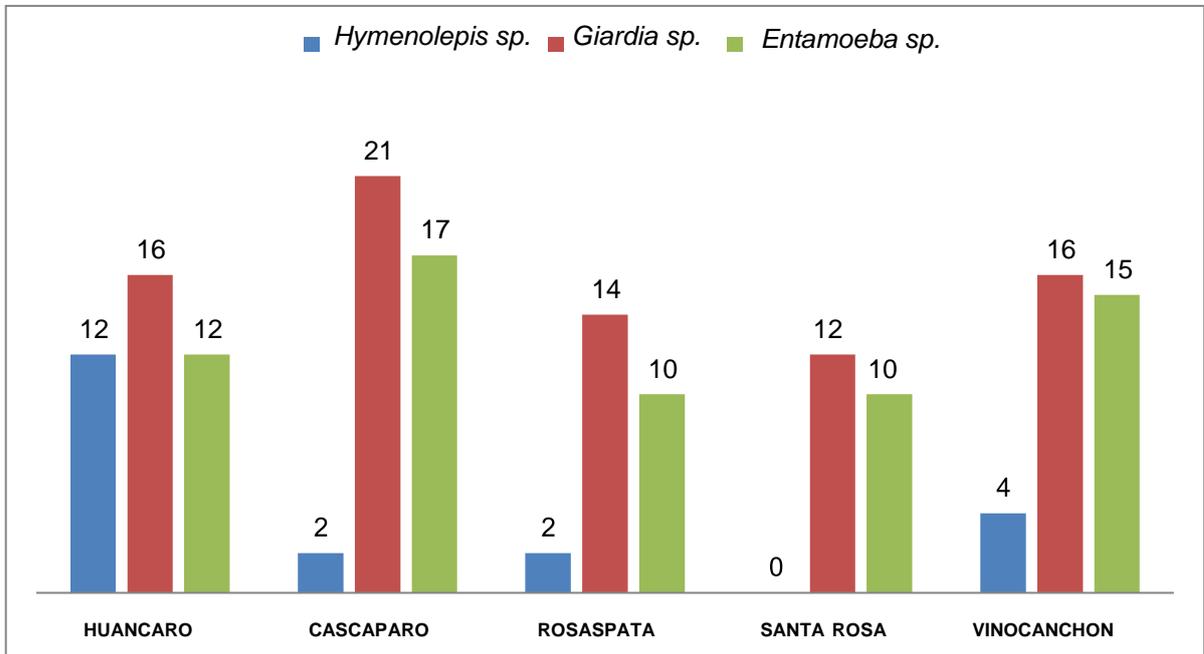


FIGURA 13 Número de ejemplares parasitados por *Hymenolepis sp.*, *Giardia sp.* y *Entamoeba sp.* según los centros de abastos en época de secas.

Del presente cuadro se evidencia la presencia en un elevado número de *Giardia sp.* ello se podría deber al uso constante de aguas con mala higiene para refrescar los productos para su expendio y el uso de aguas mal tratadas para el consumo humano.

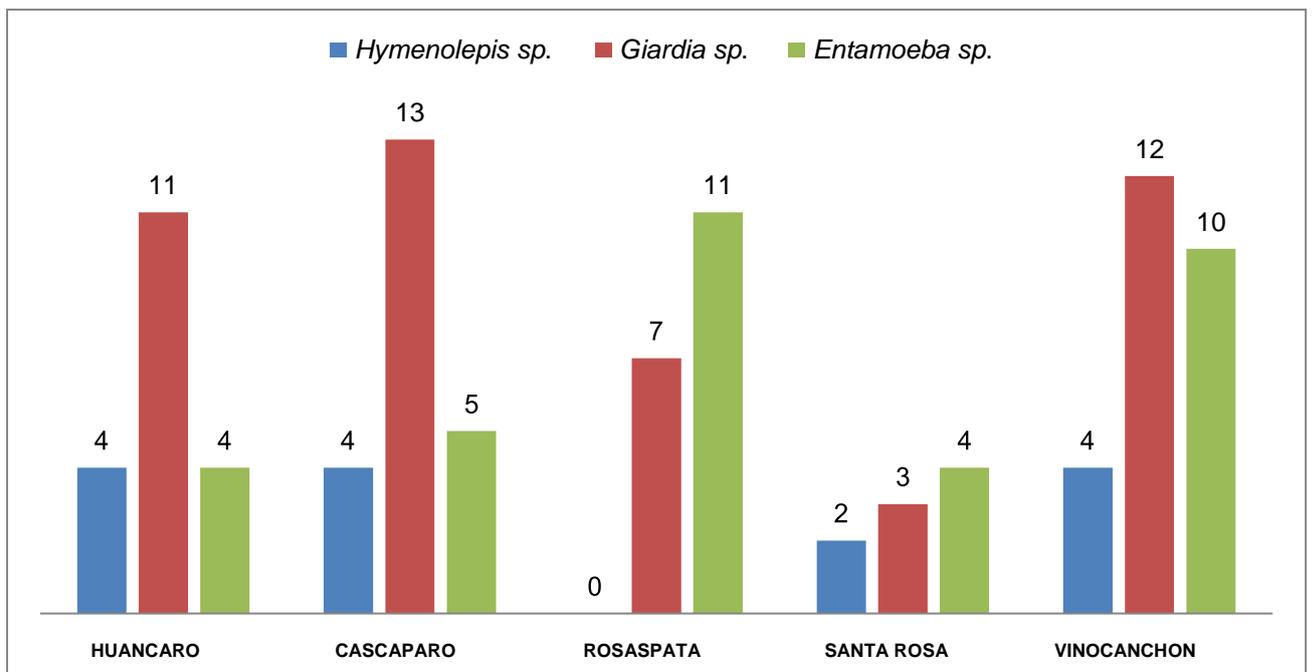


FIGURA 14 Número de ejemplares parasitados por *Hymenolepis sp.*, *Giardia sp.* y *Entamoeba sp.* según los centros de abastos en época de lluvias.

Los ejemplares que fueron hallados parasitados por examen coproparasitológico en época de lluvias demuestran que el parásito con mayor frecuencia fue *Giardia sp.*, esto debido a que las precipitaciones frecuentes se encuentran arrastrando los desechos, excretas etc. presentes en los suelos, lo que contribuye a la proliferación de estos parásitos.

3.1.4 RESULTADOS DE LA DETECCIÓN POR PCR DE LOS GENEROS DE *Giardia sp*, *Hymenolepis sp* y *Entamoeba sp.*

- **DE LA ELECTROFORESIS**

De un total de 584 muestras positivas a observación directa bajo el microscopio a 40X, se seleccionó 71 muestras aptas (por cantidad, calidad de muestra y carga parasitaria) para la extracción de ADN, que mediante el uso del Espectrofotómetro DeNovix se obtuvo los resultados cualitativos y cuantitativos de calidad de ADN, los que se encontraron dentro de los parámetros establecidos por El Banco Nacional de ADN Carlos III (Carlos III universidad de salamanca, 2019) Ver Anexo 6.

Obteniendo rangos de calidad de ADN que varían de 1.47 a 1.70 en relación

a la calidad y 30.122 – 168.656 ng/ul en relación a la concentración para *Giardia sp*, 1.31-1.99 para calidad de ADN y 956 – 75.592 ng/ul de concentración para *Entamoeba sp* y 1.58 – 1.91 para la calidad y para concentración 9.638 – 69.374 ng/ul para el género *Hymenolepis sp*. (Ver tabla 20 -22).

Los resultados de Electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % producto de amplificación mediante PCR en punto final, utilizando los siguientes cebadores (Tabla 08) se logró revelar la presencia de bandas por gel correspondientes a cada Género.

En base a los resultados de electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, utilizando los cebadores descritos en la tabla 8, se logró revelar un patrón característico de bandas correspondiendo a fragmentos de 550 pb en la escala del marcador molecular FullRanger 100 bp. para el Género *Entamoeba sp*. Para 21 muestras en gel de agarosa (Figura 14). Los resultados obtenidos se relacionan con los resultados obtenidos por Montañó et al. (2006), quienes realizaron una diferenciación entre *Entamoeba histolítica* y *Entamoeba dispar* a nivel molecular.

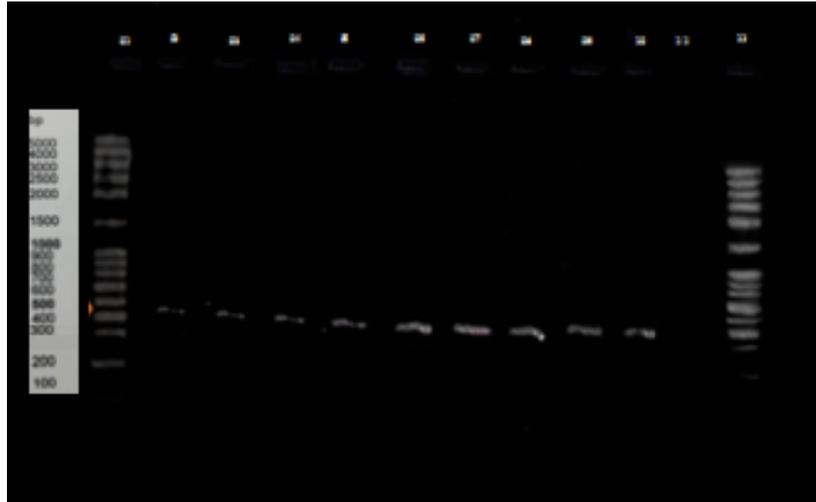


FIGURA 15 Resultados PCR. para *Entamoeba sp.*, donde el producto amplificado tiene un tamaño de 550 pb.

Leyenda:

Pozo N° 01: Marcador de Peso Molecular de 100 pb.

Pozo N° 02: ADN de muestra con código 02S.

Pozo N° 03: ADN de muestra con código 09S.

Pozo N° 04: ADN de muestra con código 12S.

Pozo N° 05: ADN de muestra con código 15S.

Pozo N° 06: ADN de muestra con código 19S.

Pozo N° 07: ADN de muestra con código 24S.

Pozo N° 08: ADN de muestra con código 25S.

Pozo N° 09: ADN de muestra con código 32S.

Pozo N° 10: ADN de muestra con código 33S.

Pozo N° 11: Control negativo (Agua libre de nucleasas).

Pozo N° 12: Marcador de Peso Molecular de 100 pb.

Los resultados de electroforesis en geles de agarosa, para el género *Hymenolepis sp.*, se logró revelar un patrón de bandas característico correspondiendo a fragmentos de 209 pb en el campo establecido con el Marcador de Peso Molecular (Fullranger 100 pb.) para 11 muestras en gel de agarosa. Los resultados obtenidos se relacionan con los resultados obtenidos por (Rodriguez et al., 2011), quienes realizaron trabajos de PCR para la detección de diferentes tenías (*Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana* e *Hymenolepis diminuta*).



FIGURA 16 Resultados PCR. para *Hymenolepis sp.*, donde el producto amplificado tiene un tamaño de 209 pb.

Leyenda:

Pozo N° 01: Marcador de Peso Molecular de 100 pb.

Pozo N° 02: ADN de muestra con código 03S.

Pozo N° 03: ADN de muestra con código 05S.

Pozo N° 04: ADN de muestra con código 13S.

Pozo N° 05: ADN de muestra con código 21S.

Pozo N° 06: ADN de muestra con código 27S.

Pozo N° 07: ADN de muestra con código 30S.

Pozo N° 08: ADN de muestra con código 41L.

Pozo N° 09: ADN de muestra con código 43L.

Pozo N° 10: ADN de muestra con código 49L.

Pozo N° 11: ADN de muestra con código 59L.

Pozo N° 12: ADN de muestra con código 64L.

Pozo N° 13: Control negativo (Agua libre de nucleasas).

Pozo N° 14: Marcador de Peso Molecular de 100 pb.

En base a los resultados de electroforesis en geles de agarosa, para el Género *Giardia sp.*, se logró revelar un patrón de bandas correspondiendo a fragmentos de 63 bp en la escala del marcador molecular FullRanger 50 bp. para 39 muestras en tres geles de agarosa. Los resultados obtenidos se relacionan con los obtenidos por (Molina, 2009) en trabajos realizados de PCR para la detección de genotipos de *Giardia lamblia*.



FIGURA 17 Resultados PCR. para *Giardia sp.*, donde el producto amplificado tiene un tamaño de 63 pb.

Leyenda:

Pozo N° 01: Marcador de Peso Molecular de 50 pb.

Pozo N° 02: ADN de muestra con código 01S.

Pozo N° 03: ADN de muestra con código 04S.

Pozo N° 04: ADN de muestra con código 06S.

Pozo N° 05: ADN de muestra con código 07S.

Pozo N° 06: ADN de muestra con código 08S.

Pozo N° 07: ADN de muestra con código 10S.

Pozo N° 08: ADN de muestra con código 11S.

Pozo N° 09: ADN de muestra con código 14S.

Pozo N° 10: ADN de muestra con código 16S.

Pozo N° 11: ADN de muestra con código 17S.

Pozo N° 12: ADN de muestra con código 18S.

Pozo N° 13: ADN de muestra con código 20S.

Pozo N° 14: Control negativo (Agua libre de nucleasas).

3.1.5 RESULTADOS DE LA DETECCION POR PCR E IDENTIFICACION POR MICROSCOPIA CONVENCIONAL

De las 71 muestras analizadas, por microscopia convencional y seleccionada por cantidad y calidad de ADN, así como por su carga parasitaria, para el examen molecular de PCR, se obtuvo los siguientes datos al contrastar los resultados obtenidos de las dos técnicas utilizadas en el presente trabajo de investigación. Figura 18

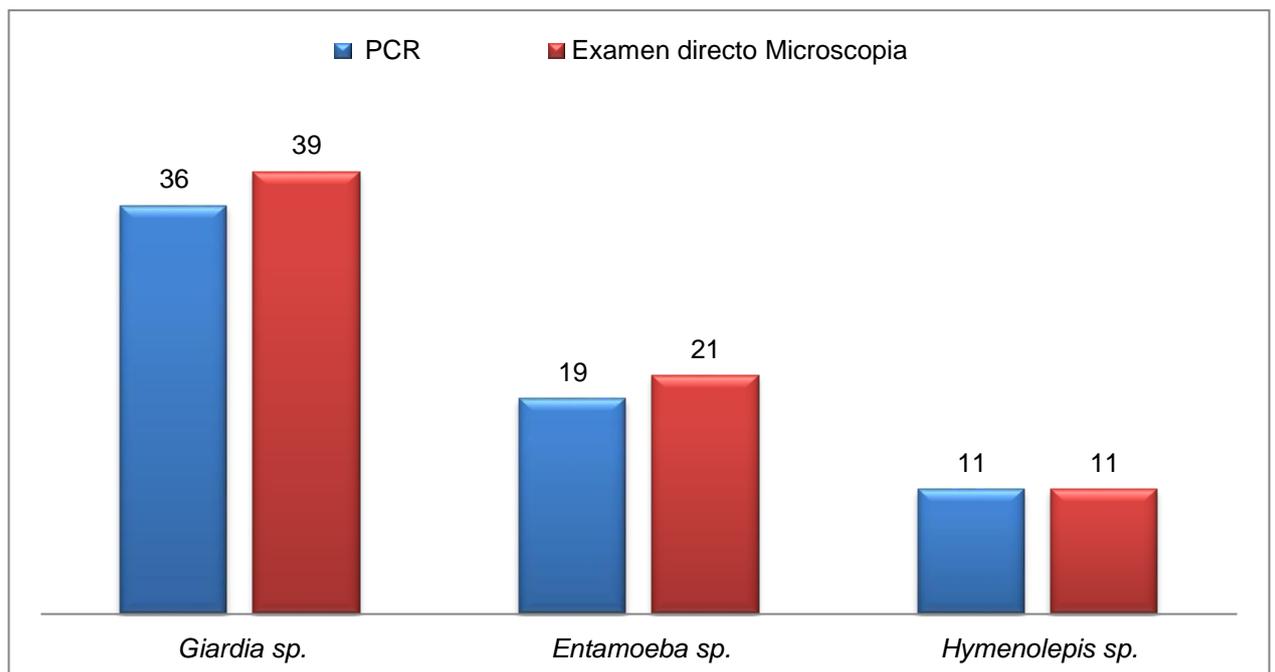


FIGURA 18 Comparación de resultados entre la Técnica Molecular de PCR y resultados de Técnica Microscópica

Tabla 17 Resultados de positividad en detección molecular por PCR para *Giardia sp.*, *Hymenolepis sp.*, y *Entamoeba sp.* en 71 muestras de excretas de cucarachas.

	EXAMEN DIRECTO		EXAMEN PCR	
	N°	N°	Positivo %	% de detección molecular
<i>Hymenolepis sp.</i>	11	11	15.49%	100%
<i>Giardia sp.</i>	39	36	50.70%	92.3%
<i>Entamoeba sp.</i>	21	19	26.76%	94.0%
Negativos	-	5	7.05%	
TOTAL	71	71	100%	

En estos resultados reportan que los métodos de observación al microscopio fueron menos eficientes, comparados con el diagnóstico molecular utilizando amplificación génica por PCR., se puede demostrar la sensibilidad y especificidad de los primers para la detección de *Giardia sp.*, *Entamoeba sp.*, e *Hymenolepis sp.*, recordando que la sensibilidad nos expresa en 100% para los tres géneros la presencia de resultados positivos.

3.2 DISCUSIONES

En el presente estudio, se demostró la presencia de parásitos entéricos de interés médico-zoonótico en un elevado porcentaje (>95%) de ejemplares de las cucarachas sinantrópicas *Periplaneta americana* y *Blatella germanica* capturados en diversas áreas de los centros de abastos estudiados; por ello, estos resultados permiten sugerir que estos insectos representan un peligro potencial para la adquisición de enfermedades de origen parasitario, en las familias de los concurrentes a estos centros de abastos en la ciudad del Cusco, Perú. Sin embargo, es necesario señalar que la ocurrencia o aislamiento de un parásito intestinal o de cualquier otro microorganismo, en un insecto u otra clase de artrópodo solo es un indicativo de su presencia, y se debe demostrar que el mismo es capaz de transmitirlo (Bejar et al., 2006; Lemos, et al., 2006).

Por otra parte, el solo hecho de la ocurrencia de cucarachas y de enteroparásitos en su tegumento y excretas, es un indicador de salubridad deficiente en estos recintos con materia orgánica en descomposición (e.g., heces fecales, alimentos), y que utilizan las ninfas y adultos de las cucarachas para alimentarse, representando de esta manera una fuente potencial de contaminación (Cochran, 1999) (Graczyk et al., 2005).

El protozoo *Giardia sp.*, agente causal de diarrea muy importante en el humano (Botero & Restrepo, 2012), resultó ser el taxón de enteroparásito más frecuentemente detectado en *Periplaneta americana*, por examen coproparasitológico con el 21.3% de ocurrencia esto resulta menor que las cifras obtenidas en Ica para esta especie de cucaracha doméstica (49%) (Fernández et al., 2001), debido principalmente a la diferencia de temperaturas que favorecería el consumo de agua poco tratada. Por otro lado, el resultado Coproparasitológico para *Giardia sp.* guarda relación con el estudio realizado en Etiopia en *Blatella germanica* (Hamu et al., 2014). Al encontrar en las cucarachas estudiadas un 25.8% de *Giardia sp.*

Asu vez podemos evidenciar 36 muestras positivas (92.3%) para *Giardia sp.* por PCR en relación a las 39 muestras positivas para *Giardia sp.* por examen

Coproparasitológico, este resultado demuestra la sensibilidad de los primers utilizados que corresponden a un 100% y su especificidad de 81%, lo que nos indica que la diferencia de muestras positivas se puede deber a falsos negativos tal como indica la especificidad del primer, así como a la falta de homogeneidad de carga parasitaria en la muestra o a la discriminación de artefactos por la PCR.

En las cucarachas capturadas durante este estudio se logró identificar los quistes de *Entamoeba sp.*, en un porcentaje de 16.9%, guardando relación con los resultados documentados en Ica (Fernández et al., 2001; Hamu et al., 2014) con un 20% de este parasito en los mercados centrales de esta ciudad.

Por otro lado, por la Técnica de PCR se evidencia un 94% (19) de resultados favorables de un total de 21 muestras positivas para examen coproparasitológico para este protozooario, donde los primers nos brindan una sensibilidad del 100% y una especificidad de 83%, demostrando de esta manera la sensibilidad de la técnica de PCR sobre la técnica microscópica que se encuentra sujeta a mayor grado de error en la identificación morfológica parasitaria tal como lo menciona Rivero et al., (2008) y Rodríguez et al., (2011).

Los hymenolepidos hallados en el presente trabajo (5.8%), varían con el resultado hallado en Ica, donde no se evidenciaron estos cestodos (Fernández et al., 2001), por el contrario si se hallaron en proporciones pequeñas en el estudio realizado en Nigeria (11.6%) (Adedotun, 2018), donde la diferencia se debe principalmente a la concentración térmica e inadecuado tratamiento de residuos de desecho, como lo menciona el autor, y en el caso del presente estudio la prevalencia se debería a la alta presencia de canes y roedores que se encuentran próximos a los centros de abastos, donde cohabitan con las cucarachas.

En relación a los resultados obtenidos por PCR con un 100% de compatibilidad con el examen coproparasitológico para 11 muestras estudiadas podemos afirmar que la sensibilidad es de un 100%, tal como lo menciona el primer, con un 83% de especificidad, que en este estudio no fue de relevancia para la detección molecular, lo que indica un correcto proceso de extracción y evaluación de la cantidad de ADN.

Estos resultados sugieren que estas cucarachas sinantrópicas pudieran estar jugando un papel importante en la epidemiología de los parásitos transmitidos por el suelo, ya que son capaces de recorrer hasta 5 kilómetros en una hora de un sitio a otro (Cochran, 1999; Graczyk et al., 2005).

Con la aplicación del Análisis de Correspondencia se visualizó que la mayoría de las taxa enteroparasitarias identificadas en *Periplaneta americana*, especialmente las de mayor ocurrencia, no mostraron una asociación acentuada con los centros de abastos estudiados de la ciudad de Cusco, lo que podría deberse a que estas especies sinantrópicas posee una inusitada habilidad para habitar cualquier lugar de los ambientes urbanos.

Tal como se demostró en el presente trabajo, *Periplaneta americana* y *Blattella germanica* poseen la potencialidad de transportar agentes parasitarios de interés médico-zoonótico. Por lo tanto, se hace necesario realizar campañas sanitarias con vigilancia epidemiológica, para reducir y controlar las poblaciones de estas especies de cucarachas sinantrópicas, con especial énfasis en los centros de abastos, lo que podría disminuir la expansión de estas enfermedades infecciosas de origen parasitario.

CONCLUSIONES

1. Se detectó mediante la técnica de PCR la presencia de tres géneros de parásitos correspondientes a *Giardia sp.*, *Hymenolepis sp.* y *Entamoeba sp.*, a partir de 71 muestras obtenidas de las excretas de cucarachas en cinco centros de abastos de la ciudad del Cusco, los cuales corresponden al 50.70%, 26,76% y 15.49% respectivamente.
2. A partir de 613 ejemplares colectados en cinco centros de abastos públicos de la ciudad del Cusco mediante las claves dicotómicas. Se determinó dos especies de cucarachas presentes en los centros de abastos muestreados, correspondientes a *Periplaneta americana* un total de 69,5% y *Blatella germánica* 30,5% respectivamente.
3. Mediante examen directo se identificó que el 95% de las muestras estudiadas, se encontraban parasitadas, siendo el parásito más abundante *Giardia sp.* con un 21.3% de positividad, siendo Ccascaparo el centro de abastos con mayor presencia de este parásito, en el caso de *Entamoeba sp.* con un 16,9 % de positividad en las muestras, donde Vinocanchon es el centro de abastos más afectado y para *Hymenolepis sp.* con una positividad de 5.8% el centro de abastos de Huancaro es el más perjudicado.
4. La detección de *Entamoeba sp.* de *Giardia sp.* e *Hymenolepis sp.* en las 71 muestras estudiadas se hizo mediante la utilización de los primers Forward GTTGATCCTGCCAGTATTATATG y Reverse CACTATTGGAGCTGGAATTAC, Forward GACGGCTCAGGACAACGGTT y Reverse TTGCCAGCGGTGTCCG, Forward CTGTTAGGTTTGAGGCTTGTTTC y Reverse CCCACTAACCAATTCTCTCTCAG respectivamente, teniendo cada uno de ellos una sensibilidad de 100% de sensibilidad y una especificidad 83%, 81% y 83% de especificidad para los géneros de *Entamoeba sp.*, *Giardia sp.*, *Hymenolepis sp.* respectivamente, en relación con los resultados obtenidos por examen Coproparasitologico se obtuvo un 94%, 92,3% y 100% de correspondencia con la detección molecular.

RECOMENDACIONES

1. Realizar trabajos futuros para la identificación a nivel de especies mediante técnicas moleculares de PCR para *Giardia sp*, *Hymenolepis sp*. y *Entamoeba sp*.
2. Reproducir el presente estudio considerando diferentes centros de abastos ajenos al presente estudio, para la identificación de diferentes especies de cucarachas.
3. Repetir el estudio en búsqueda de otros parásitos con carácter patogénico humano.

BIBLIOGRAFIA

- Adam, R. (2000). El genoma de *Giardia lamblia*. *Parasitol*, 84-475.
- Adedotun, A. M. (2018). Cucarachas domiciliarias como portadoras de parásitos intestinales humanos en la metrópolis de Lagos, suroeste de Nigeria. Implicaciones para la salud pública, 141-151.
- Adenusi, A., Akinyemi, M., & Akinsanya, D. (2018). Domiciliary cockroaches as carriers of human intestinal parasites in Lagos Metropoli, Southwest Nigeria: Implications for public health. *J Arthropod-Borne Dis*, 12(2): 141-151.
- Al-bayati, N., Al-ubaidi, A., & Al-ubaidi, I. (2011). Riesgos asociados a la cucaracha *Periplaneta americana* como transmisora de agentes patógenos. *Divala*, 91-97.
- Almannonil, Pupoll, RodríguezIII, & Cordoví. (2008). Manifestación cutánea de la Giardiasis, Sobredimensión de un problema de salud. *Cubana de medicina tropical*, 60 - 89.
- Apt Barouch, W. (2013). *Parasitología Humana*. Mexico: McGraw Hill Interamericana Educate. Apt Baruch, W. (2013). *Parasitología Humana*. MEXICO: McGraw Hill Interamericana Education.
- ASOCAE ONGD. (2017). Asociación Española para la Cultura, el Arte y la Educación. Obtenido de Los artrópodos generalidades.: <https://natureduca.com/zoologia-invertebrados-los-artropodos-generalidades.php>
- Atiokeng, R., Tsila, H., & Wabo, J. (2017). J Medically important parasites carried by cockroaches in Melong Subdivision. *Hindawi Journal of Parasitology Research*, 2017, 50-54. Obtenido de <https://doi.org/10.1155/2017/796732>

- Atis Muehlenbachs, M. P., Julu Bhatnagar, P., A. C., Agudelo, M. A., Hidron, M., Mark L: Eberhard, P. Maureen G. Metcalfe, M. D. (2015). Transformación maligna de *Hymenolepis nana* en un huésped humano. *The New England Journal of Medicine*, 1845-1852.
- Barbara, A. (2000). *American Cockroach Periplaneta americana* (Linnaeus) (Insecta:Blattodea:Blattidae). Florida: University of Florida/ IFAS.
- Bejar, V., Chumpitaz, J., Pareja, E., Valencia, E., Huamán, A., & Sevilla, C. (2006). *Musca domestica* como vector mecánico de bacterias enteropatógenas en mercados y basurales de Lima y Callao. *Perú Med. Exper. Salud Púb*, 39-43.
- Bejar, V & Mendoza, Y. (2017). Parasitosis escolar en pre- escolares en la zona urbana del Cusco. *Perú Med. Exper. Salud Púb*, 1- 14.
- Bell, W., & Adiyodi, K. (1981). *The American cockroach*. London: Chapman and Hall.
- Botero & Restrepo. (2012). *Parasitosis humanas*. (5ta ed.). Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Bruckner, D. (1992). Amebiasis. *Clin Microbiol*, 356-369.
- Caceres, I., & Guillen de Tantelean, Z. (1972). Insectos de Lima relacionados con el cisticercoide de *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1819), (Cestoda: Hymenolepididae). *Per. entom*, 142-147.
- Campos, & Vazquez. (2009). Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*, 75-90.
- Carlos III universidad de salamanca. (10 de 11 de 2019). <http://www.bancoadn.org/control-de-calidad.html>. Obtenido de Banco Nacional de ADN Carlos III: <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>

- Carneiro, H. L., Bandyopadhyay, K., Bandea, R., Saramago, R., Peralta, J. M., & Januário Da Silva, A. (2013). una nueva tecnología para la identificación simultánea de cinco *Entamoeba spp.* que se encuentra comúnmente en las heces humanas. PubMed, 6-69.
- Cavalier, & Smith. (2013). Erly evolution of eukaryote feeding modes, cell structural diversyti, and classification of the protozoan phyla loukooza, sulcozoa and choanozoa.
- Cavalier-Smith. (2013). Early evolution of eukaryote feeding modes, cell structural diversity, and classification of the protozoan phyla Loukooza, Sulcozoa, and Choanozoa. European. Journal of Protistology, 49(2), 115-178.
- Cazorla, D., Acosta, M., Zárraga, A., & Morales, P. (2006). Estudio clínico-epidemiológico de enterobiasis en preescolares y escolares de Taratara, Estado Falcón, Venezuela. Parasitol Latinoam, 43-53.
- Cazorla, D; Morales, P; Navas, P. (Diciembre de 2015). Aislamiento de parasitos intestinales en la cucaracha americana (*Periplaneta americana*) en coro,estado Falcón, Venezuela. Boletín de Malariología y Salud Ambiental.
- Cheng, T., Liu, G.-H., Hui-Qun, Rui-Qing, L., & Xing-Quan, Z. (2016). El genoma mitocondrial completo de la tenia enana *Hymenolepis nana*, un helminto zoonótico desatendido. Parasitol, 1253-1262.
- Chester, P., Clifton, R., & Wayne, E. (1990). Parasitologia Clinica . 52-53.
- Choate, P., Burns, S., Olsen, L., Richman, D., Perez, O., Patnaude, M., . . . Pluke, R. (2008). A Dichotomous Key For The Identification of the Cockroach fauna. Entomologist, 612-617.
- Cochran. (1979). A genetic determination of insemination frecuency and sperm precedence in the German cockroach. Entomol, 259- 266.

- Cochran, D. (1999). Cockroaches: their biology,. En W. H. Organization, WHO/CDS/CPC/WHOPES/99.3 (pág. 83). Ginebra, Suiza.World: Health Organization Switzerland. WHO/ CDS/CPS/WHOPES/.
- De La Cruz, B., & Tantaleán, M. (1980). Estudio de algunos nemátodos de “cucarachas” del Perú. Bol.Peruano Parasit, 51-56.
- Dellaporta, S., Wood, J., & Hicks, J. (1983). A plant DNA minipreparation version II. Plant Molecular Biology reporter., 61-64.
- Diaz-Limay, E., Escalante, H., & Jara, C. (2007). Prevalencia de infeccion por protozoarios y helmintos intestinales en la poblacion escolar de Santa Elena, Viru, La Libertad-Peru. REBIOL.EDULP, 241.
- Fernández, M., Martínez, D., M, T., & Martínez, R. (2001). Parásitos presentes en *Periplaneta americana* Linnaeus “cucaracha doméstica” de la ciudad de Ica. Per. Biol, 105-113.
- Ferreira, M., & Grattapaglia, D. (1995). ntrodução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.Brasilia: EMBRAPA-CENARGEN.
- Fraga, M., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada,al, e. (2005). La pérdida de acetilación en Lys16 y trimetilación en Lys20 de la histona H4 es una característica común del cáncer humano. PubMed, 391-400.
- Furness, B., Beach, M., & Roberts, J. (2000). Giardiasis Surveillance. United States.
- Gallego, J. (2006). Manual de Parasitología: Morfología y Biología de los parasitos de interes sanitario (I ed.). Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Garate, I., & Naupay, A. (1993). Acantocefalos nematodos y artrópodos de importancia en parasitología.Modelo para su estudio. LIMA: UNMSM.
- Gonzales, E., & Medina, R. (2001). On the application of static equilibrium bay formulations to natural and man-made beachesu. Coastal: Elseiver.

- Graczyk, T., Knight, R., & Tamang, L. (2005). Mechanical transmission of human protozoan. *Microbiol.* , 128-132.
- Hamu, H., Debalke, S., Zemene, E., Birlie, B., Mekonnen, Z., & Yewhalaw, D. (2014). Isolation of intestinal parasites of public health importance from cockroaches (*Blattella germanica*) in Jimma Town, Southwestern Ethiopia. *Parasitol*, 1-5.
- Hamza, H., & Mahdi, M. (2010). Parasites of cockroach *Periplaneta americana* (L.) in Al-Diwaniya province, Iraq. *J.Thi-Qar* , 1-12.
- Herveg, J. P., Montaña, C. P., & Iriarte, M. (2006). Deteccion Y Diferenciacion de *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* Mediante Reaccion en Cadena de la Polimerasa (PCR) Usando DNA Extraido de quistes presentes en muestras de heces fecales humanas. *Gaceta Médica B*.
- INEI, I. N. (2017). Censo Nacional de Mercados de Abastos 2016. Lima-PERÚ: INEI. Obtenido de https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitaless/Est/Lib1448/libro.pdf
- Iwashita. (2002). Distribucion of entero parasitic infections in the Peruvian Highland study carried out in six rural communities of the departament of Puno,Peru. *Gastroenterol*, 22.
- Jaramillo, Gonzales, & Pizuelo. (2009). Resistencia adeltrametina de cepas de *Blatella germanica* (dyptyopectera: Blatellidae) en la Ciudad de Cali Colombia. *Cubana Tropical*, 61-2013.
- Joshi, S., Ranjekar, P., & Gupta, V. (1999). Marcadores Moleculares en el analisis del Genoma Vegetal. *Sci.77*, 230-240.

- Kakumanu, M., Maritz, J., Carlton, M., & Schala, C. (2018). Overlapping community compositions of gut and fecal microbiomes in Lab-reared and field-collected german cockroaches . En *Applied and environmental microbiology* (Vol. 84, págs. 17-18).
- Kettle, S. (1984). *Medical and Veterinary Entomology*. Inglaterra: Croam Helm.
- Kunstler, J. (1882). Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. *CR Soc Biol Paris*, 347-349.
- Lahitte, H., Hurrell, J., Belgrano, M., Jankowski, L., Mehlreter, K., Haloua, P., & Canda, G. (1997). *Plantas de la Costa. Las plantas nativas y naturalizadas más comunes de las costas del Delta del Paraná, Isla Martín García y Ribera Platense*. Buenos Aires: L.O.L.A. (Literature of Latin América).
- Lanteri, A., Fernández, L., & Gallardo, F. (2004). *Nomenclatura Biológica*. En A.
- Lanteri, & M. Cigliano, *Sistemática Biológica: fundamentos teóricos y ejercitaciones* (págs. 21-33). Buenos Aires: EDULP.
- Leber, A., & Novak, S. (1999). Intestinal and Urogenital Amebae, Flagelates an Ciliates. En P. Murray, E. Baron, M. Pfaller, F. Tenoer, & R. Tenover, *Manual of Clinical Microbiology* (7th ed., págs. 1391- 1405). Washington DC: ASM, Press Washington DC.
- Lemos, A., Lemos, J., Prado, M., Pimenta, F., Gir, E., & Silva, H. (2006). Cockroaches as carriers of fungi of medical importance. *Mycoses*, 23-25.
- López, D., Sagaro, E., Valdés, M., Fragoso, T., Albizu, J., & Campos, L. (1996). Enteropathogenic agents isolate in persistent diarrhoea. *Gastroenterol*, 214-221.
- Mariño, E. (2011). Fósiles vivientes: Cucarachas. *CONABIO. Biodiversitas*, 97.

Martínez, & Ticona. (2016). Prevalencia y factores de riesgo del parasitismo intestinal en escolares del distrito de Cabanaconde, Provincia de Caylloma, Arequipa, Perú. *Neotropical Helminthology*, 151-161.

Matsumura, F., & Ghiasuddin, S. (1983). *J. Environ. Health B*, 18.

Meloni, B., Thompson, R., Hopkins, T., Reynoldson, J., & Gracey, M. (1993). The prevalence of Giardia and other intestinal parasites in children and aboriginal communities in the Kimberley. *Med.J.Aust.*, 50- 62.

Mestres, A., & Torres, M. (7 de Marzo de 2008). Algunas pautas para la elaboración de claves dicotómicas y árboles de clasificación. Obtenido de <http://jornadasceyn.fahce.unlp.edu.ar/III-2012>:
<http://webpages.ull.es/users/apice/pdf/411-002.pdf>.

Ministerio de la Produccion. (23 de mayo de 2016). Obtenido de Ministerio de Produccion Web site:
<http://www2.produce.gob.pe/dispositivos/publicaciones/rm196-2016-roduce.pdf>

Miriam, B. (07 de Junio de 2017). El Blog De Rentokil. Obtenido de <https://www.rentokil.es/blog/las-cucarachas-transmiten-enfermedades/>

Molina. (2009). Epidemiología molecular de Giardia lamblia en comunidades urbanas y rurales de Buenos Aires, Mendoza y Argentina. *COLBIO*, 23-35.

Montaño, A., & Herverg, P. (2006). Detección y Diferenciación de Entamoeba Dispar y Entamoeba hystolitica por PCR. *Gaceta Medica Boliviana*, 5-10.

Mota, M., Bautista, J., & Cruz, M. (2016). *Biología molecular y Citogenética*.

Navarro, Estrada, Robledo, & Velasquez. (2017, Diciembre 15). From Artropodos y Salud: http://artropodosysalud.com/Publicaciones/No8-Dic2017/6Biologia_Blatella_germanica.pdf

- Nkouawa, A., Haukisalmi, V., Li, T., Nakao, M., Lavikainen, A., Chen, X., . . . Ito, A. (2016). Cryptic diversity in hymenolepidid tapeworms infecting humans. *Parasitology Internacional*, 93.
- Nolan, M., Unger, M., Stephenson, J., Yeap, Y.-T., & Rogers, E. (2017). Caracterización molecular de parásitos protistas en personas habitadas gorilas de montaña (*Gorilla beringei beringei*), humanos y ganado, del Parque Nacional impenetrable de Bwindi, Uganda. *Vectores de Parasito*, 10-40.
- Nowak, R. M., Jastrzębski, a. P., Kuśmirek, W., Salamatin, R., Rydzanicz, M., Sobczyk-Kopciot, A., Tkach, V. (2019). Ensamblaje híbrido de novo de genoma completo y anotación de la tenia modelo *Hymenolepis diminuta*. *Scientific Data*, 6-302.
- Pechal, J., Austin, J., Szalanski, A., Gold, R., & Tomberlin, J. (2009). Genetic analysis of *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) in Central Texas using the ITS1 region. *Urban Entomol.*, 179-191.
- Pedrosa, A. (2018). Reaccion en Cadena de la Polimerasa. *Archivo Medico de Camaguey*, 32.
- Ponce, G., Cantú, P., Flores, A., Badii, M., Barragán, A., Zapata, R., & Fernández, I. (2005). Cucarachas: Biología e importancia en salud pública. *Revista de Salud Pública y Nutrición*, 6.
- Pratt, H. (1988). nnotated checklist of the cockroaches (Dyctyoptera) of Nort America. *Annals of the Entomological Society of America.*, 78-92.
- Ramirez, P. (1989). La cucaracha como vector de agentes Patogenos. Panama: Oficina San.
- Ravdin. (2000). Amebiasis. *Pasvol, G and Hoffman*, 186.
- Ravdin, J. (1995). Amebiasis. State of the Art clinical article. *Clin Infect.* , 20.

- Rivero, Z., Bracho, Á., Calchi, M., Díaz, I., Acurero, E., Maldonado, A., & Corzo, G. (2008). Detección y diferenciación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* mediante reacción en cadena de la polimerasa en individuos de una comunidad del estado Zulia, Venezuela. *Cadernos de Saúde Pública*, 25, 151-159.
- Robinson, W. (2005). Urban insects and arachnids. *Handbook of urban entomology*, 75.
- Rodriguez, H. S., Urresta, D., Celia, M., Costa, C., & Benitez. (2011). Comparacion de dos metodos de diagnostico de *Taenia solium* y *Taenia saginata* e *Hymenolepis nana* en muestras fecales humanas. *Parasitol.*
- Rosenstreich, D., Eggleston, P., & Kattan, M. (1997). El papel de la alergia a las cucarachas y la exposicion al alergeno de las cucarachas como causa de morbilidad entre los niños con asma de los barrios marginales. *La Revista de Medicina de Nueva*, 336 (19).
- Rozendaal, F. (1997). Vector control methods for use by individuals and communities. *World Health Organization*, 288–301.
- Ruiz. A., Chavez, P. (2015). Presencia de Enterobacterias en partes extremas del estadio adulto de las cucarachas capturadas en el Mercado modelo de Iquitos. *Urban Entomol.*, 110-117.
- Salehzadeh, A., Tavacol, P., & Mahjub, H. (2007). Contaminacion bacteriana, fungica y parasitaria de cucarachas en hospitales publicos de Hamadan, Iran. *Pubmed*, 105-110.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (3 ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Santoro, M., D'Alessio, N., Cerrone, A., Lucibelli, M., Borriello, G., Aloise, G., . . . Galiero, G. (2017). La nutria Euroasiatica (*Lutra lutra*) como huesped potencial de patogenos. PubMed, 12-95.

SENAMHI. (Enero de 2019).

<https://www.senamhi.gob.pe/main.php?dp=cusco&p=estudios>.

Siegfried, B., & Scott, J. G. (1991). Mechanisms responsible for Propoxur resistance in the German cockroach, *B. germanica* (L.). Pestic, 133- 146.

Stensvold, C. R., Winięcka-Krusnell, J., Lier, T., & Lebbad, M. (2018). Evaluation of a PCR method for detection of *Entamoeba polecki*, with an overview of its molecular epidemiology. Journal of clinical microbiology, 56(5).

Steven, & Jacobs. (2016, setiembre 26). Pennstate Extension. From <https://extension.psu.edu/>: <https://extension.psu.edu/cucarachas-americanas>

Steven, B., & Jacobs. (26 de Setiembre de 2016). PennState Extension web. Obtenido de extension.psu.edu: <https://extension.psu.edu/cucarachas>

Stevens, D. (1982). Host pathogen biology. Infect. Dis., 851-852.

Surzycki, S. (1999). Basic Techniques in Molecular Biology. Berlin: Springer. Bloomington.

Talgi, T., & Anwar, Y. (2016). Determinación de la presencia de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en cucarachas *Periplaneta americana* que habitan en el Mercado Colón de la Ciudad de Guatemala Obtenido de <http://www.repositorio.usac.edu.gt>: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/id/eprint/5781>

(2005). Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 14-18.

- Tananta, I., Chávez, A., Casas, E., Suárez, F., & Serrano, E. (2018). Presencia de entero-parásitos en lechuga (*Lactuca sativa*) en establecimientos de consumo público de alimentos en el Cercado de Lima. *Investig Vet Peru*, 157-162.
- Tanveer, S., Fayaz Ahmad, A., Sheikh, B., Mohi Ud Din, S., M, K., & Fazili. (2015). CROMOSOMAS Y CITOGENÉTICA DE HELMINTOS (TURBELLARIA, TREMATODA, CESTODA, NEMATODAYACANTHOCEPHALA). *Neotropical Helminthology*, 113-162.
- Torres, F. (2015). Clase insecta: orden blattodea. *Revista IDEA-SEA*, 48.
- Unbhattacharya, Satish, & Bagchi, U. (2015). El Genoma de Entamoeba. *Parasitol*, 401-410.
- Universidad de Pennsylvania State. (2013). *Notas Entomologicas*. Pennsylvania: Universidad de Pennsylvania State.
- Upton, S. (1997). In vitro cultivation. En R. Fayer, *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis* (págs. 181-207).CRC Press.
- Uribe, M., Valdivia, R., & Carrasco, E. (1997). Gastrointestinal symptoms in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): a review of one hundred cases at “Arzobispo Loayza” Hospital. *Gastroenterol*, 214-221.
- Valle, E., Chinchilla, L., Pinel, G., Pinto, L., Martínez, A., Dubón, A., . . . Herrera, E. (2020). Incidencia de parasitosis intestinal en escolares que residen en los bordos de San Pedro Sula, Cortés, Honduras. *Enf Inf Microbiol*, 40(2):47-5.
- Vargas Mejia, M. (2013). Identificación Genética de un Organismo Devastador. *Ciencia*, 50-59.

Velazco, R. (2005). Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 14-18.

Werner, B. (2014). Infecciones por parásitos más comunes y su manejo. Condes, 485-528.

WHO. (2000). Amoebiasis for *Entamoeba histolytica*. Bull Who, 78.

WHO, M. (1998). Amoebiasis and its control. Bull Who, 417.

Zavala Castro, J. (2014). Técnicas moleculares para el estudio de parásitos (4 ed.). New York: McGraw-Hill. Zerpa, R., & Huicho, L. (1994). Childhood cryptosporidial diarrhea associated with identification of *Cryptosporidium* in the cockroach *Periplaneta americana*. Ped. Inf. Dis, 546-548.

ANEXOS

ANEXO 1. TABLAS DE RESULTADOS

MUESTREO DE ESPECIMENES CORRESPONDIENTE A EPOCA DE SECAS

Tabla 18 Muestreo de especímenes correspondiente a épocas de secas

MERCADOS	CODIGOS	Hymenolepis sp.	Giardia sp.	Entamoeba sp.	Blastocystis sp.	Ascaris sp.	Enterobius sp.	Negativo	P. americana	B. germanica
H U A N C A R O	01SHh		x						1	
	02SHh			x	x				1	
	03SHh			x	x				1	
	04SHh			x			x		1	
	05SHh					x			1	
	06SHh	x							1	
	07SHh			x					1	
	08SHh						x			1
	09SHh			x		x			1	
	10SHh	x		x						1
	11SHh							x		1
	12SHh			x						1
	13SHh				x		x			1
	14SHh					x		x		1
	15SHh	x				x				1
	16SHh						x			1
	17SHh				x		x			1
	18SHh							x		1
	19SHh							x		1
	20SHh					x				1
	21SHh			x			x			1
	22SHh	x				x				1
	23SHc					x	x			1
	24SHc					x				1
	25SHc			x						1
	26SHc			x		x				1
	27SHc			x						1
	28SHc						x			1
	29SHc				x		x			1
	30SHc							x		1
	31SHc					x				1
	32SHc					x	x			1
	33SHc							x		1

34SHc				x		1
35SHc				x		1
36SHc			x	x		1
37SHc		x		x		1
38SHc			x			1
39SHc		x		x		1
40SHc					x	1
41SHc					x	1
42SHc	x		x			1
43SHc				x		1
44SHc				x	x	1
45SHc		x	x			1
46SHc				x		1
47SHc			x	x		1
48SHc					x	1
49SHc			x		x	1
50SHc				x		1
51SHc	x					1
52SHc		x			x	1
53SHc					x	1
54SHc		x		x		1
55SHf					x	1
56SHf		x			x	1
57SHf				x		1
58SHf					x	1
59SHf				x		1
60SHf		x		x		1
61SHf	x			x		1
62SHf			x	x		1
63SHf			x			1
64SHf	x		x			1
65SHf					x	1
66SHf			x			1
67SHf					x	1
68SHf	x			x		1
69SHf					x	1
70SHf			x		x	1
71SHv					x	1
72SHv				x		1
73SHv			x			1
74SHv				x		1
75SHv			x	x		1
76SHv			x	x		1
77SHv	x					1

	78SHv	x		x					1				
	79SHv						x		1				
	80SHv				x		x		1				
	81SHv	x			x				1				
	82SHv							x	1				
CASCCAPARO	83SCh			x					1				
	84SCh						x		1				
	85SCh				x		x		1				
	86SCh							x	1				
	87SCh				x				1				
	88SCh						x		x	1			
	89SCh								x	1			
	90SCh			x				x		1			
	91SCh					x				1			
	92SCh							x		1			
	93SCh							x		x	1		
	94SCh				x						1		
	95SCh							x			x	1	
	96SCh								x			1	
	97SCh				x						x	1	
	98SCh								x			1	
	99SCh				x						x	1	
	100SCh										x	1	
	101SCh										x	1	
	102SCh										x	1	
	103SCj										x	1	
104SCj										x	1		
105SCj										x	1		
106SCj										x	x	1	
107SCj										x		1	
108SCj										x		1	
109SCj										x		1	
110SCj										x		1	
111SCj										x		1	
112SCj										x		1	
113SCj										x		1	
114SCj										x		1	
115SCj												x	1
116SCj										x			1
117SCj										x			1
118SCj										x			1
119SCj										x			1
120SCj										x			1
121SCj										x			1

122SCj				x				1
123SCj			x		x			1
124SCj							x	1
125SCj					x			1
126SCc		x			x			1
127SCc	x							1
128SCc	x				x			1
129SCc					x	x		1
130SCc			x		x			1
131SCc			x					1
132SCc		x						1
133SCc						x		1
134SCc			x			x		1
135SCc		x						1
136SCc							x	1
137SCc						x		1
138SCc			x					1
139SCc						x		1
140SCc					x			1
141SCc					x	x		1
142SCc			x			x		1
143SCc		x				x		1
144SCc							x	1
145SCc						x	x	1
146SCc					x			1
147SCc					x	x		1
148SCf			x			x		1
149SCf							x	1
150SCf							x	1
151SCf			x		x			1
152SCf		x			x			1
153SCf						x		1
154SCf							x	1
155SCf			x				x	1
156SCf			x				x	1
157SCf						x		1
158SCf			x		x			1
159SCf		x			x	x		1
160SCf					x			1
161SCf		x				x		1
162SCf			x			x		1
163SCv					x			1
164SCv						x		1
165SCv						x	x	1
166SCv							x	1

167SCv				x	1	
168SCv	x				1	
169SCv				x	1	
170SCv		x	x		1	
171SCv			x		1	
172SCv				x	1	
173SCv		x		x	1	
174SCv	x				1	
175SCv			x		1	
176SCv		x			1	
177SCv		x			1	
178SCv			x		1	
179SCv				x	1	
180SCv				x	1	
ROSASPATA	181SRh			x	1	
	182SRh	x		x	1	
	183SRh			x	1	
	184SRh	x			1	
	185SRh	x		x	1	
	186SRh				x	1
	187SRh		x		x	1
	188SRh		x		x	1
	189SRh	x		x		1
	190SRh			x		1
	191SRh	x				1
	192SRh				x	1
	193SRj		x		x	1
	194SRj				x	1
	195SRj		x			1
196SRj					x	1
197SRj	x			x		1
198SRj					x	1
199SRj				x		1
200SRj		x	x			1
201SRj			x			1
202SRj					x	1
203SRj					x	1
204SRj			x			1
205SRj	x					1

206SRj				x		1
207SRj			x			1
208SRj		x	x			1
209SRj					x	1
210SRj		x				1
211SRj			x			1
212SRj					x	1
213SRj		x	x			1
214SRj			x	x		1
215SRj			x			1
216SRj					x	1
217SRj		x			x	1
218SRj					x	1
219SRj		x				1
220SRj				x		1
221SRc		x				1
222SRc					x	1
223SRc	x		x			1
224SRc			x			1
225SRc					x	1
226SRc	x					1
227SRc			x			1
228SRc		x			x	1
229SRc				x		1
230SRc				x		1
231SRc	x		x			1
232SRc				x		1
233SRc			x	x		1
234SRc				x	x	1
235SRc					x	1
236SRc		x				1
237SRc			x			1
238SRc					x	1
239SRc		x	x			1
240SRc				x		1
241SRf					x	1
242SRf			x		x	1
243SRf					x	1
244SRf		x			x	1
245SRf				x		1
246SRf				x		1
247SRf				x		1
248SRf					x	1

	249SRf			x			1	
	250SRf		x			x		1
	251SRf					x	1	
	252SRf				x		1	
	253SRf			x				1
	254SRf	x	x					1
	255SRf					x		1
	256SRf					x		1
	257SRf						x	1
	258SRf		x				x	1
	259SRv					x		1
	260SRv			x			x	1
	261SRv						x	1
	262SRv	x				x		1
	263SRv			x				1
	264SRv					x		1
	265SRv					x		1
	266SRv							1
	267SRv	x						1
	268SRv					x		1
	269SRv			x		x		1
	270SRv					x		1
SANTA ROSA	271SSh		x			x		1
	272SSh						x	1
	273SSh			x			x	1
	274SSh							1
	275SSh					x		1
	276SSh			x		x		1
	277SSh						x	1
	278SSh	x	x					1
	279SSh			x				1
	280SSh			x				1
	281SSh				x			1
	282SSh	x	x				x	1
	283SSh						x	1
	284SSh							x
285SSh	x							1
286SSj		x				x		1
287SSj						x		1
288SSj							x	1
289SSj		x						1
290SSj				x		x		1
291SSj							x	1
292SSj			x			x		1
293SSj	x							1
294SSj							x	1

	295SSj			x		x		1
	296SSj		x					1
	297SSj					x		1
	298SSj	x		x				1
	299SSc					x		1
	300SSc					x	x	1
	301SSc	x					x	1
	302SSc					x		1
	303SSc		x					1
	304SSc					x		1
	305SSc	x		x				1
	306SSc	x	x					1
	307SSc	x						1
	308SSc					x		1
	309SSf					x	x	1
	310SSf						x	1
	311SSf	x		x				1
	312SSf					x		1
	313SSf					x		1
	314SSf			x				1
	315SSf	x	x					1
	316SSf	x		x				1
	317SSv						x	1
	318SSv			x		x		1
	319SSv		x	x				1
	320SSv					x		1
	321SSv						x	1
VINOCANCHON	322SVh						x	1
	323SVh		x			x		1
	324SVh		x			x		1
	325SVh			x		x		1
	326SVh					x		1
	327SVh	x					x	1
	328SVh	x				x		1
	329SVh							1
	330SVh					x		1
	331SVh		x					1
	332SVh						x	1
	333SVh	x						1
	334SVh	x					x	1
	335SVh			x			x	1
	336SVh			x			x	1
	337SVh					x		1
	338SVh					x		1
	339SVh			x				1

340SVh	x			x				1
341SVh				x				1
342SVj							x	1
343SVj	x			x				1
344SVj							x	1
345SVj							x	1
346SVj	x			x				1
347SVj							x	1
348SVj							x	1
349SVj							x	1
350SVj							x	1
351SVj	x			x				1
352SVj				x				1
353SVj							x	1
354SVj							x	1
355SVj	x	x						1
356SVj							x	1
357SVj	x			x				1
358SVj							x	1
359SVj								1
360SVj				x				1
361SVj		x					x	1
362SVj							x	1
363SVj				x				1
364SVj							x	1
365SVj							x	1
366SVj		x					x	1
367SVj							x	1
368SVj				x			x	1
369SVc	x						x	1
370SVc	x			x				1
371SVc	x	x						1
372SVc	x							1
373SVc		x		x				1
374SVc	x						x	1
375SVc							x	1
376SVc		x					x	1
377SVc				x			x	1
378SVc							x	1
379SVc							x	1
380SVc	x						x	1
381SVc				x				1
382SVc							x	1

383SVc			x	x		1
384SVc					x	1
385SVc	x	x				1
386SVc			x			1
387SVc				x		1
388SVc			x	x		1
389SVc			x			1
390SVc		x	x			1
391SVc					x	1
392SVc			x			1
393SVc					x	1
394SVc			x			1
395SVc			x	x		1
396SVc				x		1
397SVc					x	1
398SVc			x			1
399SVf			x	x		1
400SVf	x		x	x		1
401SVf					x	1
402SVf					x	1
403SVf				x		1
404SVf		x			x	1
405SVf					x	1
406SVf						1
407SVf				x		1
408SVf			x		x	1
409SVf	x			x		1
410SVf			x			1
411SVf					x	1
412SVf			x		x	1
413SVf	x					1
414SVv				x		1
415SVv				x		1
416SVv			x			1
417SVv				x		1
418SVv				x		1
419SVv		x	x			1
420SVv				x		1
421SVv			x			1
422SVv					x	1
423SVv	x					1
424SVv				x		1
425SVv		x				1
426SVv		x				1
427SVv			x			1

428SVv	x		1	
429SVv		x	1	
430SVv		x	1	
TOTAL			290	140

ANEXO 02

Tabla 19 Muestreo de especímenes en época de lluvias

<i>MUESTREO DE ESPECIMENES CORRESPONDIENTE A EPOCA DE LLUVIAS</i>										
<i>MERCADOS</i>	<i>CODIGOS</i>	<i>Hymenolepis sp.</i>	<i>Giardia sp.</i>	<i>Entamoeba sp.</i>	<i>Blastocystis sp.</i>	<i>Ascaris sp.</i>	<i>Enterobius sp.</i>	<i>Negativo</i>	<i>P. americana</i>	<i>B. germanica</i>
HUANCARO	431LHh		x		x				1	
	432LHh							x	1	
	433LHh							x	1	
	434LHh		x						1	
	435LHh				x				1	
	436LHh	x			x					1
	437LHh					x			1	
	438LHh					x	x		1	
	439LHh		x			x			1	
	440LHh		x					x	1	
	441LHc							x	1	
	442LHc		x		x				1	
	443LHc		x						1	
	444LHc					x				1
	445LHc	x								1
	446LHc						x			1
	447LHc		x	x					1	
	448LHc						x		1	
	449LHc						x		1	
	450LHc	x		x					1	
	451LHc						x		1	
	452LHc						x			1
	453LHc		x						1	
	454LHc				x			x	1	
	455LHc							x	1	
	456LHc	x					x		1	
	457LHc					x			1	
	458LHc					x			1	
	459LHf				x		x		1	
	460LHf						x		1	
	461LHf		x			x			1	
	462LHf						x		1	
	463LHf						x		1	
464LHf							x		1	
465LHf		x						1		

	466LHv			x		1	
	467LHv			x	x	1	
	468LHv		x			1	
	469LHv				x	1	
	470LHv			x		1	
	471LHv		x			1	
	472LHv	x			x	1	
CASCAPARO	473LCh	x				1	
	474LCh		x			1	
	475LCh	x				1	
	476LCh	x	x			1	
	477LCh					x	1
	478LCh	x					1
	479LCh	x					1
	480LCh	x					1
	481LCj				x		1
	482LCj	x			x		1
483LCj					x	1	
484LCj			x			1	
485LCj		x				1	
486LCj						x	1
487LCj						x	1
488LCj			x	x			1
489LCj			x				1
490LCj		x					1
491LCe	x		x				1
492LCe	x						1
493LCe	x			x			1
494LCe			x				1
495LCe						x	1
496LCe			x				1
497LCe	x		x				1
498LCe	x			x			1
499LCe				x			1
500LCe	x		x				1
501LCe					x		1
502LCf	x						1
503LCf		x		x			1
504LCf				x			1
505LCf			x				1
506LCf		x		x			1
507LCf				x			1
508LCf					x		1
509LCf				x			1
510LCf				x			1

	511LCf				x	1	
	512LCf	x				1	
	513LCf	x				1	
	514LCv		x	x		1	
	515LCv		x	x		1	
	516LCv				x	1	
	517LCv				x	1	
	518LCv			x		1	
ROSASPATA	519LRh		x			1	
	520LRh	x			x	1	
	521LRh		x			1	
	522LRh		x	x		1	
	523LRh		x			1	
	524LRj	x				1	
	525LRj				x	1	
	526LRj				x	1	
	527LRj		x			1	
	528LRj				x	1	
	529LRj		x		x	1	
	530LRj				x	x	1
	531LRj				x	x	1
	532LRc		x		x		1
	533LRc					x	1
	534LRc	x			x		1
	535LRc	x	x				1
	536LRc				x		1
	537LRc	x					1
	538LRc		x		x		1
539LRc	x			x		1	
540LRf					x	1	
541LRf		x				1	
542LRf					x	1	
543LRf		x				1	
544LRf					x	1	
545LRf					x	1	
546LRv					x	1	
547LRv					x	1	
548LRv					x	1	
549LRv		x			x	1	
SANTA ROSA	550LSh				x	1	
	551LSh			x	x	1	
	552LSh				x	1	
	553LSh		x		x	1	
	554LSh				x	1	
	555LSh				x	1	

556LS <i>h</i>				<i>x</i>		<i>1</i>	
557LS <i>j</i>		<i>x</i>	<i>x</i>			<i>1</i>	
558LS <i>j</i>					<i>x</i>	<i>1</i>	
559LS <i>j</i>			<i>x</i>			<i>1</i>	
560LS <i>j</i>					<i>x</i>	<i>1</i>	
561LS <i>c</i>			<i>x</i>			<i>1</i>	
562LS <i>c</i>				<i>x</i>		<i>1</i>	
563LS <i>c</i>	<i>x</i>		<i>x</i>	<i>x</i>		<i>1</i>	
564LS <i>c</i>	<i>x</i>			<i>x</i>		<i>1</i>	
565LS <i>f</i>				<i>x</i>		<i>1</i>	
566LS <i>f</i>				<i>x</i>		<i>1</i>	
567LS <i>v</i>				<i>x</i>		<i>1</i>	
568LS <i>v</i>				<i>x</i>		<i>1</i>	
569LS <i>v</i>					<i>x</i>	<i>1</i>	
VINOCANCHON	570LV <i>h</i>		<i>x</i>	<i>x</i>		<i>x</i>	<i>1</i>
	571LV <i>h</i>		<i>x</i>			<i>x</i>	<i>1</i>
	572LV <i>h</i>	<i>x</i>					<i>1</i>
	573LV <i>h</i>			<i>x</i>	<i>x</i>		<i>1</i>
	574LV <i>h</i>				<i>x</i>		<i>1</i>
	575LV <i>h</i>	<i>x</i>			<i>x</i>		<i>1</i>
	576LV <i>h</i>					<i>x</i>	<i>1</i>
	577LV <i>h</i>		<i>x</i>		<i>x</i>		<i>1</i>
	578LV <i>h</i>				<i>x</i>		<i>1</i>
	579LV <i>h</i>				<i>x</i>		<i>1</i>
	580LV <i>h</i>		<i>x</i>			<i>x</i>	<i>1</i>
	581LV <i>h</i>	<i>x</i>					<i>1</i>
	582LV <i>j</i>					<i>x</i>	<i>1</i>
	583LV <i>j</i>		<i>x</i>				<i>1</i>
	584LV <i>j</i>			<i>x</i>	<i>x</i>		<i>1</i>
	585LV <i>j</i>				<i>x</i>		<i>1</i>
586LV <i>j</i>			<i>x</i>	<i>x</i>		<i>1</i>	
587LV <i>j</i>					<i>x</i>	<i>1</i>	
588LV <i>j</i>		<i>x</i>				<i>1</i>	
589LV <i>j</i>					<i>x</i>	<i>1</i>	
590LV <i>c</i>	<i>x</i>					<i>1</i>	
591LV <i>c</i>			<i>x</i>	<i>x</i>		<i>1</i>	
592LV <i>c</i>		<i>x</i>		<i>x</i>		<i>1</i>	
593LV <i>c</i>	<i>x</i>					<i>1</i>	
594LV <i>c</i>		<i>x</i>				<i>1</i>	
595LV <i>c</i>	<i>x</i>		<i>x</i>			<i>1</i>	
596LV <i>c</i>				<i>x</i>		<i>1</i>	
597LV <i>c</i>		<i>x</i>		<i>x</i>		<i>1</i>	
598LV <i>c</i>			<i>x</i>			<i>1</i>	
599LV <i>c</i>			<i>x</i>			<i>1</i>	
600LV <i>f</i>				<i>x</i>		<i>1</i>	

601LVf	x	x			1		
602LVf			x		1		
603LVf			x		1		
604LVf				x	1		
605LVf	x	x			1		
606LVf			x	x		1	
607LVv				x		1	
608LVv					x	1	
609LVv			x			1	
610LVv		x		x		1	
611LVv	x					1	
612LVv				x		1	
613LVv		x		x		1	
TOTAL					136	47	183

ANEXO 03

Tabla 20 Concentración y calidad de ADN para *Giardia sp.*

Giardia sp.		
MUESTRA	CONCENTRACION	CALIDAD DE
	DE ADN ng/ul	ADN 260/280
01S	168,656	1,56
04S	76,467	1,61
06S	44,442	1,54
07S	75,045	1,53
08S	35,444	1,45
10S	49,123	1,50
11S	30,423	1,51
14S	36,250	1,55
16S	96,545	1,55
17S	42,387	1,53
18S	22,806	1,58
20S	54,229	1,52
22S	42,896	1,50
23S	58,000	1,53
24S	36,910	1,55
26S	58,803	1,47
28S	52,021	1,49
31S	30,122	1,70

34S	25,672	1,49
35S	44,173	1,54
37S	35,111	1,59
39S	28,649	1,43
40L	66,730	1,55
42L	57,733	1,53
44L	42,232	1,54
45L	21,685	1,41
46L	47,112	1,43
48L	37,815	1,50
50L	54,061	1,47
52L	57,709	1,61
54L	20,026	1,45
57L	102,977	1,52
58L	102,372	1,50
60L	26,986	1,56
62L	102,325	1,47
65L	32,571	1,49
67L	45,883	1,56
68L	17,794	1,50
70L	22,001	1,36
<i>Giardia sp.</i> TOTAL = 39 Muestras		

ANEXO 04

Tabla 21 CUANTIFICACION DEL ADN para *Entamoeba sp.*

MUESTRA	CONCENTRACION DE ADN ng/ul	CALIDAD DE ADN 260/280
Entamoeba SP.		
02S	30,804	1,68
09S	35,184	1,46
12S	48,900	1,55
15S	43,487	1,61
19S	45,473	1,52
25S	75,592	1,78
24S	26,672	1,99
32S	68,351	1,56
33S	22,956	1,31
36S	29,920	1,44
38S	42,416	1,63
40S	36,742	1,61
47L	37,102	1,66
51L	36,681	1,57
53L	31,923	1,67
55L	28,014	1,52
56L	26,182	1,46
61L	47,098	1,65

63L	40,425	1,46
-----	--------	------

66L	26,635	1,47
-----	--------	------

69L	53,176	1,58
-----	--------	------

Entamoeba sp. TOTAL = 21 Muestras

ANEXO 05

Tabla 22 CUANTIFICACION de ADN para *Hymenolepis sp.*

HYMENOLEPIS SP.		
MUESTRA	CONCENTRACION DE	CALIDAD DE
	AND ng/ul	ADN 260/280
03S	9,638	1,89
05S	26,828	1,91
13S	22,084	1,89
21S	28,612	1,76
27S	18,115	1,91
30S	12,348	1,83
41L	51,117	1,80
43L	32,602	1,69
49L	40,097	1,69
59L	69,374	1,63
64L	26,714	1,58
<i>Hymenolepis sp.</i> TOTAL = 11 Muestras		

ANEXO 06

Tabla 23 Relación y concentración de ADN

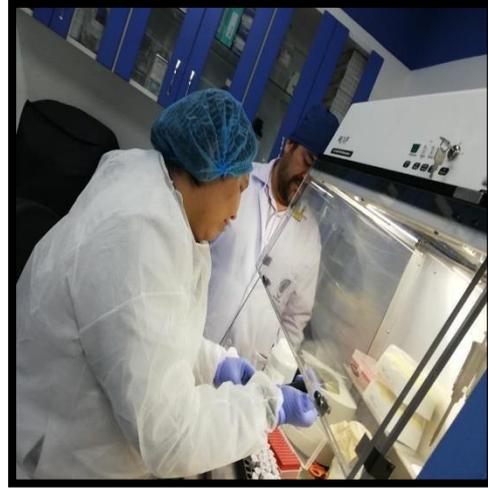
Ratio	Valor	pureza
	1.8 – 2	ADN de pureza óptima.
	1.6- 1.8	ADN de pureza aceptable.
260/280	< 1.6	Presencia de compuestos aromáticos.
	>2.1	Contaminación con ARN.
A 260/230	< 1.5	Contaminación con sales, carbohidratos, fenoles.

(Carlos III universidad de salamanca, 2019)

La relación A 260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza optima tiene un valor entre 1.8 – 2.0 un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A 260/280 >1.6. un valor A 260/280 < 1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un radio A260/280 >2.1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra.

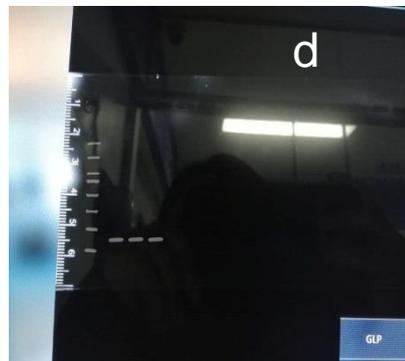
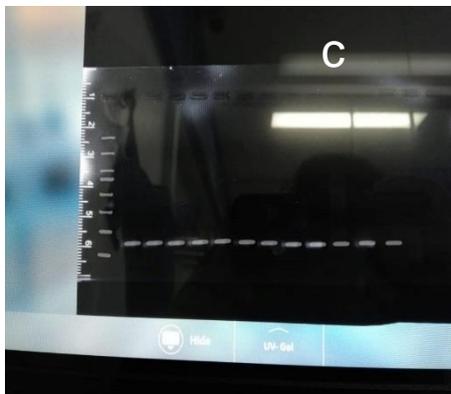
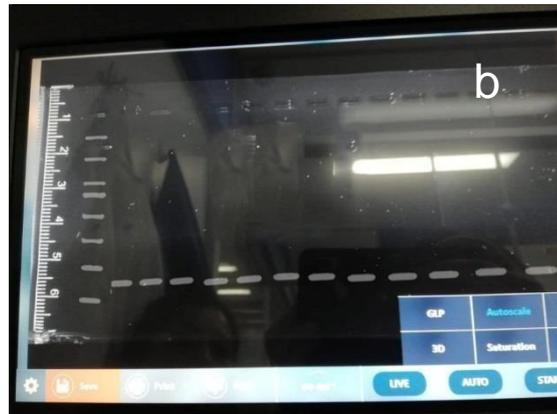
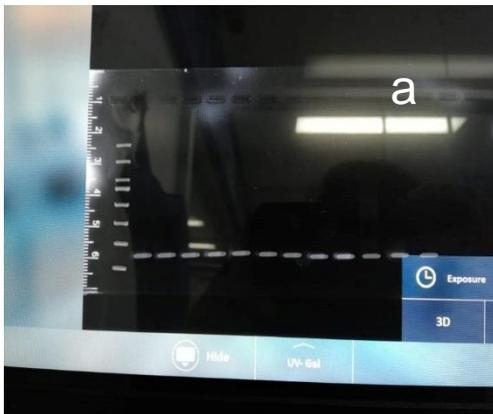
A 230 nm absorben contaminantes como sales caotropicas, fenoles o carbohidratos. En general, se considera que el ADN es puro cuando el radio A 260/230 se sitúa en torno 1.5 –un radio < de 1.5 indicara presencia de contaminante en la muestra. no obstante, esta relación resulta mucho más variable que la relación A 260/280 dependiendo de factores como la concentración de ADN o de la composición del tampón de resuspencion de la muestra.

ANEXO 07 FLUJO DE ACTIVIDADES PARA LA DETECCION MOLECULAR



Selección de muestras b) Purificación de muestras c) y d) Cuantificación de ADN
e) Preparación del gel para electroforesis, f) Preparación para la corrida en gel de agarosa

ANEXO 08 : IMÁGENES DE GELES DE AGAROSA



a)b)c)d) Geles correspondientes a la corrida de 39 muestras de *Giardia sp.*

e)f) Geles correspondientes a 21 muestras de *Entamoeba sp.*

g) Gel de Agarosa correspondiente a la corrida de 11 muestras de *Hymenolepis sp.*

ANEXO 09 DESCRIPCION DE OOTECAS

ESPECIE	FOTO	CARACTERISTICAS DE LA OOTECA
<i>Periplaneta americana</i> (L.)		<ul style="list-style-type: none"> • Mayor 0.6 cm de longitud. • Segmentos inaparentes. • Sin muescas laterales. • Simétrica. • Longitud inferior a dos veces la anchura. • Color rojizo a café oscuro.

ESPECIE	FOTO	CARACTERISTICAS DE LA OOTECA
<i>Blatella germánica</i> (L.)		<ul style="list-style-type: none"> • Menor 0.4 cm de longitud. • Sub segmentos aparentes. • Con cerca de 16 sub segmentos. • Longitud de más del doble de ancho. • Color café amarillezca.

ANEXO 10 DESCRIPCION DE ESPECIE

CUCARACHA AMERICANA (*Periplaneta americana*)

FOTOS

CARACTERÍSTICAS



Margen del pronoto color café o amarillento

Pronoto de *Periplaneta americana*



Sonde color café rojizo.

Tegmina de *Periplaneta americana*



Margen ventroposterior de los fémures medio y posterior con una hilera de espinas; las cuales son casi de la misma longitud a lo largo de la fila.

Hilera de espinas de los fémures anteriores



4

Placa subgenital de la hembra dividida longitudinalmente y valvulada.

Placa sub genital hembra *P.americana*



5

Placa subgenital del macho simétrica, estilos elongados, rectos, delgados, simétricos.

Placa sub genital macho *Periplaneta americana*



6

Alas completamente desarrolladas
Alas membranosas
Tamaño del adulto de 34 a 55mm

Adulto de *Periplaneta americana*

Cucaracha alemana (*Blatella germánica*)

FOTO

CARACTERISTICAS



Ninfa de *Blatella germánica*

Las ninfas presentan áreas pigmentadas en el abdomen, las cuales no están arregladas a manera de hileras de puntos en la sección media del abdomen.



Placa subgenital de macho de *Blatella germánica*

El macho presenta placa subgenital asimétrica, estilos relativamente cortos y simétricos.



Hembra de *Blatella germánica*

Durante el estado reproductivo, la hembra cubre aproximadamente la mitad de la ooteca con sus alas.

ANEXO 11. CLAVES DICOTOMICAS PARA IDENTIFICACION DE CUCARACHAS

Tamaño que van desde los 34 a los 53 mm de largo.....	Ir a (6)
Color rojizo-marrón.....	Ir a (6)
Forma ovalada algo aplanada	Ir a (6)
Patas espinosa.....	Ir a (3)
Antenas filamentosas de color marrón.....	Ir a (1)
Antenas son tan largas o más que el cuerpo.....	Ir a (1)
Dos pares de alas	Ir a (2)
Alas completamente desarrolladas.....	Ir a (2)
Alas posteriores membranosas	Ir a (2)
Margen del pronoto color café o amarillento	Ir a (1)
Tegminas de color café rojizo.....	Ir a (2)
Fémures medio y posterior con una hilera de espinas	Ir a (3)
Placa sugenital de la hembra dividida y valvulada.	Ir a (4)
Placa subgenital del macho simétrica	Ir a (5)
Estilos elongados, rectos,simétricos.....	Ir a (5)

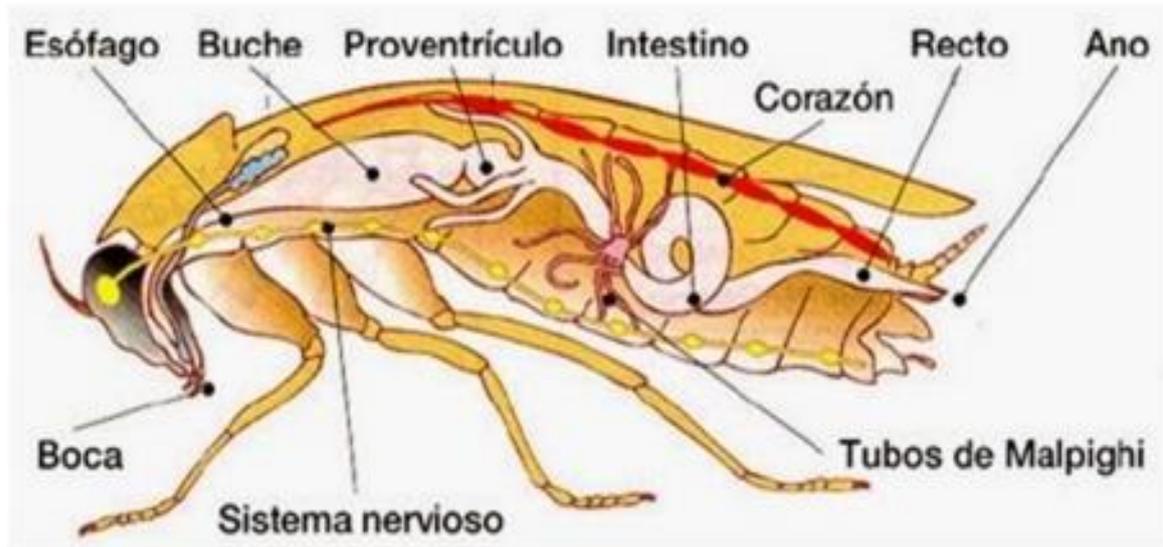
Periplaneta americana

Mide de 12 a 15 mm de longitud	Ir a(1)
Color bronceado a marrón claro.....	Ir a (3)
Dos bandas oscuras en el tórax	Ir a (1)
Alas igual de largas que el cuerpo	Ir a (3).
Presentan áreas pigmentadas en el abdomen	Ir a (1)
Placa subgenital asimétrica	Ir a (2)
Estilos relativamente cortos y simétricos.....	Ir a (2)
Hembra cubre la mitad de la ooteca con su alas.....	Ir a (3)

Blatella germánica

(Pratt, 1988; Lahitte, 1997)

ANEXO 12. Estructura interna de la cucaracha.



ANEXO 13 Certificado de Identificación de especies de Cucarachas.



MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL EN SALUD PÚBLICA
LABORATORIO DE ENTOMOLOGIA

INSTITUCION: DIRECCION REGIONAL DE SALUD CUSCO **SOLICITANTE:** Bach. RAQUEL ALEXANDRA VELASQUEZ ESQUIVEL
 Bach. SHALLY MOREANO BRICEÑO

FECHA DE INGRESO: 11/11/2019

1. ASPECTO EVALUADO: DIAGNOSTICO TAXONOMICO DE MUESTRAS ENTOMOLOGICAS

N°	FECHA	CODIGO INS	DISTRITO	LOCALIDAD	TIP COLEC	COLECTOR	ESTADIO	IDENTIFICACION TAXONOMICA	TOTAL
1		11-00250-19	CUSCO	CUSCO	En Mercado	No Indica	Adulto	<i>Blattella germanica</i>	1
2		11-00250-19	CUSCO	CUSCO	En Mercado	No Indica	Adulto	<i>Periplaneta americana</i>	1
TOTAL :									2

2. COMENTARIO TECNICO:
 Estos invertebrados, son reservorio de parásitos y transmisores de enfermedades, Representan riesgo para la Salud Humana.

3. RECOMENDACIONES:
 Escribir los datos completos de colecta como fecha de colecta y nombre del colector.

RESPONSABLE:
DIRECCION REGIONAL DE SALUD CUSCO
Dirección Regional de Salud Cusco
 Bigo. **Hugo Váñez-Trujillano**
CSB. E.S.P.

Fecha de emisión 11/11/2019

Yo Bigo. HENRY HUGO YAÑEZ TRUJILLANO, con CBP N° 4328, y con especialidad en el área de Entomología, a petición verbal de las interesadas.

CERTIFICO

Que se identificó las especies de *Blatella germanica* y *Periplaneta americana* en la colecta de invertebrados, realizada por:

Bach. Shally Moreno Briceño

Bach. Raquel Alexandra Veásquez Esquivel.

Dicha identificación taxonómica se realizó el día 11 de Noviembre del 2019 a solicitud de las interesadas, para contribuir en un trabajo de investigación realizado por las solicitantes, donde se realizó la siguiente recomendación:

- 1.- Escribir los datos completos de colecta como fecha de colecta y nombre del colector.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad, pudiendo las interesadas hacer uso del presente documento en lo que estimaren conveniente.

Cusco 21 de Setiembre del 2020

DIRECCION REGIONAL DE SALUD CUSCO
División de Promoción y Control

Bigo. Henry H. Yañez Trujillano
COORDINADOR DE POLICIA ENTOMOLOGICA
CBP. 4328

Bigo. Henry Hugo Yañez Trujillano
CBP:4328

