

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ANÁLISIS DEL NEMABIOMA GASTROINTESTINAL DE CÁNIDOS SILVESTRES Y
DOMÉSTICOS DE COSTA RICA

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Posgrado en
Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para optar al grado y título de
Maestría académica en Microbiología

JOBY ROBLETO QUESADA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2025

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi comunidad: mi familia, amistades, amores, colegas, y activistas.

Gracias por caminar conmigo este largo trayecto.

Ubuntu: Soy porque somos

-Filosofía Zulu

AGRADECIMIENTO

Agradezco profundamente a mi padre y mi madre por su arduo sacrificio para que yo pudiese tener la carrera académica que a ellos les fue negada. También quiero agradecer a mi familia: Nana, María, Kaleb, Nuno, Tati, Vane, Andrés, y todas las personas de mi núcleo familiar que de una u otra manera me brindaron su ayuda o su compañía durante mis estudios.

Expreso también mi gratitud a la Dra. Ana Alicia Rojas Araya, por recibirme con generosidad en su grupo de trabajo, por toda la paciencia, las enseñanzas académicas y para la vida profesional. Por su cálida guía y escucha de mis problemas y necesidades. También por ser modelo que seguir de cómo hacer ciencia con pasión, disciplina y perseverancia. Ha sido un privilegio tenerle como mentora. Asimismo, agradezco a mis lectores de tesis: Kevin Lloyd y Victor Montenegro, gracias por su compañía en el trabajo de campo, su amable guía y sus múltiples enseñanzas. También externo mi gratitud a los compañeros de la sección de helmintología: Cristian Fonseca, Alberto Solano, Javier Mora y Paula Alfaro por su colaboración en el trabajo de campo y de laboratorio.

De igual forma quiero reconocer el aporte de las personas que me acompañaron y guiaron durante la recolección de muestras y el trabajo de campo: a Marvin del Parque nacional Volcán Irazú-Sector Prusia, a Victor Montalvo del ICOMVIS, a Reina Sánchez del Parque Nacional Volcán Turrialba, así como a todo el personal del SINAC que muy atentamente colaboro con este proyecto.


Este trabajo también es fruto de todas las enseñanzas de los diversos profesores y profesoras de los cursos del posgrado académico en microbiología a quienes dirijo mi más sincera gratitud. En especial al profesor José Molina y la profesora Tatiana Murillo. Quienes de forma desinteresada fueron también mis mentores y me ayudaron a resolver retos en el análisis e interpretación de datos.

Finalmente, dedico unas palabras de agradecimiento a mis colegas de facultad y a mis compañeros y compañeras de maestría. Por su comprensión y palabras de aliento que me llenaron de fortaleza y esperanza. Por compartir las alegrías y tristezas de la vida académica. A todos y todas ustedes muchas gracias.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Posgrado en Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología



Doctora Tatiana Murillo Corrales
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado



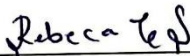
Doctora Ana Alicia Rojas Araya
Directora de Tesis



Doctor Victor Manuel Montenegro Hidalgo
Asesor



Master Kevin Jonathan Lloyd Alcock
Asesor



Doctora Rebeca Campos Sánchez
Representante
Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología



Joby Robleto Quesada
Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
TABLA DE CONTENIDO	v
RESUMEN EN ESPAÑOL	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Nemátodos gastrointestinales de cánidos	1
1.1.1. Ancylostomatídeos.....	1
1.1.2 <i>Toxocara canis</i>	3
1.1.3 <i>Spirocerca</i> spp.	4
1.1.4 <i>Trichuris vulpis</i>	6
1.1.5 <i>Strongyloides</i> spp.....	7
1.1.6 Otros nemátodos gastrointestinales	7
1.2 Perros y sus nemátodos gastrointestinales	8
1.3 Coyotes y sus nemátodos gastrointestinales	10
1.4 Epidemiología de las infecciones por nemátodos gastrointestinales en cánidos de Costa Rica	13
1.5 Nemabioma: Secuenciación de Nueva generación para el estudio de helmintos gastrointestinales en animales domésticos y silvestres.....	14
2. JUSTIFICACIÓN	18

3. HIPOTÉISIS DE TRABAJO	20
4. OBJETIVOS	20
4.1 OBJETIVO GENERAL:.....	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	20
5. METODOLOGÍA	21
5.1 Área de estudio	21
5.2 Recolección de muestras.....	22
5.2 Análisis microscópico de las muestras	25
5.3 Conservación y extracción de ADN de las muestras	25
5.4 Confirmación de la identidad de la muestra	26
5.5 Identificación de individuos de <i>Canis latrans</i> : Genotipo mediante SNPs.....	31
5.6 Preparación de bibliotecas y secuenciación del gen <i>cox1</i>	34
5.7 Construcción de Base de datos de referencia.....	35
5.8 Análisis bioinformático de la diversidad genética y estadística descriptiva de nemátodos	38
6. RESULTADOS	42
6.1 Confirmación de la especie de cánido en las muestras sospechosas de coyote	42
6.2 Parásitos identificados a partir de heces de coyotes y perros	43
6.3 Estadística descriptiva de nemátodos gastrointestinales en los cánidos estudiados ...	45
6.3.1 Frecuencia de nemátodos determinada por <i>metabarcoding</i> en la totalidad de muestras recolectadas.....	46
6.3.2 Identificación de individuos de coyotes y su efecto en la epidemiología de nemátodos gastrointestinales determinada por <i>metabarcoding</i>	51
6.3.3 Epidemiología de nemátodos gastrointestinales en perros determinada por <i>metabarcoding</i>	56

6.3.4 Epidemiología de nemátodos gastrointestinales en coyotes y perros determinada a partir de la observación microscópica	62
6.4 Variabilidad genética y genotipos de los nemátodos gastrointestinales encontrados en la población de estudio	63
6.4.1 Variabilidad genética de <i>Ancylostoma caninum</i> de coyotes y perros de Costa Rica	64
6.4.2 Variabilidad genética de <i>Toxocara canis</i> de coyotes y perros de Costa Rica	67
6.4.3 Variabilidad genética de <i>Spirocercia lupi</i> de coyotes y perros de Costa Rica	69
6.5 Análisis de diversidad ecológica de los nemátodos encontrados en cánidos de Costa Rica	71
6.5.1 Alfa diversidad de la comunidad de nemátodos en cánidos costarricenses.....	72
6.5.2 Beta diversidad de la comunidad de nemátodos en cánidos costarricenses	74
7. DISCUSIÓN	76
8. CONCLUSIONES.....	96
8.1. Perspectivas futuras	97
9. REFERENCIAS.....	98
10. ANEXOS	119
10.1 Script I: Filtros de calidad de secuencias extraídas de BOLD.....	119
10.2 Filtrado de secuencias mediante RESCRIPT.....	121
10.3 Alineamiento de primers y delimitado de la Base de datos.....	123
10.4 Derreplicación y generación de “classifier” para QIIME2	125
10.5 Formato de base de datos para usarse en LocaTT	127
10.6 Secuencias extraídas de la base GenBank para la construcción de árboles filogenéticos	129
10.7 Resultados secuenciación masiva gen 12S	134

RESUMEN EN ESPAÑOL

Gran variedad de especies de nemátodos es compartida entre perros domésticos (*Canis familiaris*) y cánidos silvestres, como los coyotes (*Canis latrans*) debido a la cercanía evolutiva entre ambos. Las parasitosis gastrointestinales en cánidos pueden tener impactos significativos en la salud humana, con especies como *Ancylostoma caninum* y *Toxocara canis* implicadas en cuadros zoonóticos. En Costa Rica, el conocimiento sobre estos parásitos en cánidos silvestres como los coyotes es limitado. El avance de las tecnologías moleculares y de secuenciación han permitido una exhaustiva identificación de organismos co-infectantes dentro de un mismo individuo, así como aquellas circulantes en poblaciones animales. Con el objetivo de caracterizar las comunidades de nemátodos gastrointestinales en perros y coyotes del Área de Conservación Central (ACC) y Guanacaste (ACG) de Costa Rica se recolectaron muestras de heces de ambos cánidos, las cuales fueron analizadas mediante observación microscópica y *metabarcoding* del gen *cox1* para identificar la diversidad de nemátodos presentes y se realizaron análisis bioinformáticos para evaluar su variabilidad genética. Unificando *metabarcoding* y microscopía se detectaron al menos nueve especies de helmintos en perros y coyotes (*A. caninum*, *T. canis*, *Trichuris vulpis*, *Toxascaris leonina*, *Spirocera lupi*, *Spirometra* sp., *Alaria* sp., *Strongyloides* sp, Taeniidae) siendo el nemátodo *A. caninum* el parásito predominante en ambos hospederos. Las especies más importantes en cuanto a porcentaje de identidad en la asignación taxonómica mediante *metabarcoding* fueron *A. caninum*, *T. canis* y *S. lupi*. Se observó una mayor riqueza de especies y diversidad genética en los perros de la ACG en comparación con el ACC y perros de hábitos domiciliarios en la comunidad de Mata de Plátano (MDP). Además, se identificó una asociación entre la presencia de nemátodos y alteraciones hematológicas como anemia, trombocitopenia y leucocitosis en los perros afectados. La mayor frecuencia de nemátodos en perros que deambulan libremente y la alta similitud genética entre los nemátodos de perros y coyotes, sugiere una circulación activa entre cánidos domésticos y silvestres.

ABSTRACT

A wide variety of nematode species are capable of infecting both domestic dogs (*Canis familiaris*) and wild canids, such as coyotes (*Canis latrans*), due to their close evolutionary relationship. Gastrointestinal parasitoses of canids can have significant impacts on human health, species like *Ancylostoma caninum* and *Toxocara canis* are common zoonotic parasites. In Costa Rica, knowledge about these parasites in wild canids such as coyotes is limited. Moreover, advances in molecular biology and sequencing technologies have enabled a detailed identification of co-infecting organisms within the same individual, as well as the description of parasites in animal populations. To characterize the gastrointestinal nematode communities of dogs and coyotes from the Central Conservation Area (ACC) and Guanacaste Conservation Area (ACG) in Costa Rica, fecal samples from both canid species were collected and analyzed using microscopic observation and cytochrome oxidase subunit 1 (*cox1*) gene *metabarcoding* to identify nematode diversity. Bioinformatic analyses were performed to assess their genetic variability. By combining *metabarcoding* and microscopy observation, nine helminth species were detected in dogs and coyotes (*A. caninum*, *T. canis*, *Trichuris vulpis*, *Toxascaris leonina*, *Spirocerca lupi*, *Spirometra* sp., *Alaria* sp., *Strongyloides* sp., and Taeniidae), with *A. caninum* being the predominant parasite in both hosts. The most relevant species in terms of identity percentage in taxonomic assignment through *metabarcoding* were *A. caninum*, *T. canis*, and *S. lupi*. Moreover a higher species richness and genetic diversity was observed in dogs from ACG compared to ACC and “indoor dogs” from Mata de Plátano (MDP) community. Furthermore, an association was identified between the presence of nematodes and hematological alterations such as anemia, thrombocytopenia, and leukocytosis in affected dogs. The higher frequency of nematodes in free-roaming dogs and the high genetic similarity of nematodes from dogs and coyotes suggest an active transmission cycle between domestic and wild canids.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Parques nacionales visitados para la recolección de muestras de coyotes	22
Cuadro 2. Comunidades visitadas para la recolección de muestras de perros.....	24
Cuadro 3. Frecuencia de muestras positivas por nemátodos en la totalidad de muestras analizadas a través del <i>metabarcoding</i> del gen <i>cox1</i>	46
Cuadro 4. <i>Odds ratio</i> de las variables cánido y área de muestro en la totalidad de las muestras positivas por nemátodo	51
Cuadro 5. Individuos de coyote y perro positivos por <i>Ancylostoma caninum</i> según determinación por <i>metabarcoding</i> del gen <i>cox1</i>	53
Cuadro 6. <i>Odds ratio</i> de las variables cánido y área de muestro en individuos de coyote y perro positivos por <i>Ancylostoma caninum</i>	54
Cuadro 7. Muestras positivas por <i>Ancylostoma caninum</i> en individuos de coyote de acuerdo con diferentes variables demográficas.....	54
Cuadro 8. <i>Odds ratio</i> de variables demográficas relacionadas a individuos de coyote positivos por <i>Ancylostoma caninum</i>	55
Cuadro 9. Frecuencia de muestras positivas por nemátodos en perros de acuerdo con diferentes variables demográficas.....	56
Cuadro 10. Frecuencia de muestras positivas por nemátodos en perros de acuerdo con diferentes variables biológicas.....	58

Cuadro 11. <i>Odds ratio</i> de variables demográficas y biológicas relacionadas a perros positivos por nemátodos.....	60
Cuadro 12. Frecuencia de muestras positivas por nemátodos en la totalidad de muestras analizadas a través de microscopía.....	62
Cuadro 13. Comparativa de estadísticas de beta diversidad de nématodos gastrointestinales según sitio de muestreo.....	74
Cuadro 14. Comparativa de estadísticas de beta diversidad de nématodos gastrointestinales según cánido hospedero.....	75
Cuadro 15. Secuencias extraídas de la base GenBank para la construcción de árboles filogenéticos de <i>Toxocara canis</i>	130
Cuadro 16. Secuencias extraídas de la base GenBank para la construcción de árboles filogenéticos de <i>Ancylostoma caninum</i>	131
Cuadro 17. Secuencias extraídas de la base GenBank para la construcción de árboles filogenéticos de <i>Spirocerca lupi</i>	132
Cuadro 18. Número de <i>reads</i> por replicado en cada una de las muestras confirmadas de <i>C. latrans</i>	135

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de áreas de conservación de Costa Rica.....	23
Figura 2. Digestión virtual de la secuencia del gen de <i>cytb</i> con la enzima TruI de distintos carnívoros presentes en Costa Rica.....	28
Figura 3. Digestión de la amplificación del gen <i>cytb</i> a través de la enzima TruI de muestras morfológicamente identificadas como de coyotes.....	43
Figura 4. Abundancia relativa de los ASVs en las muestras positivas por nemátodos en metabarcoding del <i>cox1</i> según especie de cánido.....	47
Figura 5. Abundancia relativa de los ASVs en las muestras positivas por nemátodos en metabarcoding del <i>cox1</i> según sitio de muestreo.....	48
Figura 6. Distribución geográfica de las muestras positivas por nemátodos en cánidos de Costa Rica.....	49
Figura 7. Distribución geográfica de las muestras positivas por nemátodos en cánidos de Costa Rica según especies encontradas.....	50
Figura 8. Gráfico de <i>odds ratio</i> (OR) de las variables cánido y área de muestro en la totalidad de las muestras positivas por nemátodos	51
Figura 9. Comparación de individuos de coyote y perro positivos por <i>Ancylostoma caninum</i> al <i>metabarcoding</i> del gen <i>cox1</i> según área de muestreo.....	53
Figura 10. Gráfico de <i>Odds ratio</i> de variables demográficas relacionadas a individuos de coyote positivos por <i>Ancylostoma caninum</i>	54

Figura 11. Comparación de porcentaje de muestras de perro positivas según variables demográficas.	57
Figura 12. Comparación de porcentaje de muestras de perro positivas según variables biológicas.....	59
Figura 13. Gráfico de <i>Odds ratio</i> de variables demográficas y biológicas relacionadas a perros positivos por nemátodos.....	61
Figura 14. Árbol filogenético de inferencia bayesiana de un fragmento del <i>cox1</i> de <i>Ancylostoma caninum</i>	65
Figura 15. Redes de haplotipos Templeton Crandall-Sing que muestran conexiones entre secuencias de <i>A. caninum</i>	66
Figura 16. Árbol filogenético de inferencia bayesiana de un fragmento del <i>cox1</i> de <i>Toxocara canis</i>	67
Figura 17. Árbol filogenético de inferencia bayesiana de un fragmento del <i>cox1</i> de <i>Spirocerca lupi</i>	70
Figura 18. Comparación de alfa diversidad en la comunidad de nemátodos gastrointestinales de coyotes y perros en tres diferentes áreas de muestreo en Costa Rica.....	71
Figura 19. Acercamiento árbol filogenético <i>A. caninum</i> : porción superior izquierda.....	139

Figura 20. Acercamiento árbol filogenético <i>A. caninum</i> : porción superior derecha.....	140
Figura 21. Acercamiento árbol filogenético <i>A. caninum</i> : porción inferior izquierda.....	141
Figura 22. Acercamiento árbol filogenético <i>A. caninum</i> : porción inferior derecha.....	142
Figura 23. Acercamiento árbol filogenético <i>Spirocerca lupi</i> : porción superior.....	143
Figura 24. Acercamiento árbol filogenético <i>Spirocerca lupi</i> : porción inferior izquierda.....	144
Figura 25. Acercamiento árbol filogenético <i>Spirocerca lupi</i> : porción inferior derecha.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC: Área de Conservación Central

ACG: Área de Conservación Guanacaste

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

ASV: *Amplicon Sequence Variant*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CENAT: Centro Nacional de Alta Tecnología

cox1: Gen del citocromo oxidasa subunidad 1

dNTP: deoxinucleótidos fosfato

E.U.A: Estados Unidos de América

GBS: Genotipo por secuenciación

HKY: Modelo Hasegawa-Kishino-Yano

IB: Inferencia Bayesiana

ICOMVIS: Instituto de Conservación y Manejo de Vida Silvestre

ITS: Espaciador Transcrito Interno

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

MDP: Mata de Plátano

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido hidruro

NCBI: Centro de Información en Biotecnología de los Estados Unidos

NGS: Secuenciación de Nueva Generación

OR: *Odds ratio*

OSU: Universidad Estatal de Oregon

PBS: Tampón de Fosfatos Salino

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

PID: Porcentaje de Identidad

QC: *Query coverage*

RFLP: Análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica

SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido

SPRI: Inmovilización reversible en fase sólida

TCS: Templeton-Crandall-Sing

TrN: Modelo Tamura-Nei

UNA: Universidad Nacional

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Nemátodos gastrointestinales de cánidos

Las parasitosis gastrointestinales del perro doméstico (*Canis familiaris*), son mayoritariamente producidas por helmintos y protozoarios (Adolfo González Bermúdez et al., 2015). Dentro de los helmintos parásitos de perros destacan los nemátodos como los más importantes debido a su amplia distribución y riesgo tanto para la salud animal como humana (Traversa, 2012). En los perros, las infecciones por nemátodos gastrointestinales pueden causar una diversidad de manifestaciones que destacan: anorexia, diarrea, pérdidas de sangre y proteínas plasmáticas en el tracto gastrointestinal, alteraciones en el metabolismo proteico, reducción de minerales, depresión en la actividad de algunas enzimas intestinales, entre otros (Adolfo González Bermúdez et al., 2015)(Robertson & Thompson, 2002).

Debido a su cercanía evolutiva muchos de los nemátodos que infectan perros también han sido encontrados infectando cánidos silvestres como coyotes (*C. latrans*), lobos (*Canis lupus*), zorros rojos (*Vulpes vulpes*), zorras grises (*Urocyon cinereoargenteus*), zorros andinos (*Lycalopex culpaeus*), entre otros (Di Cataldo et al., 2023; Hernández-Camacho et al., 2011; Priest et al., 2018; Segovia et al., 2001). Desde el punto de vista de “una salud” esta versatilidad de los nemátodos de perros para infectar otros cánidos es importante, pues implica que existen ciclos selváticos que podrían influir en las parasitosis de animales domésticos y eventualmente el ser humano (Dantas-Torres & Otranto, 2014).

Dentro de los nemátodos capaces de producir enfermedades zoonóticas destacan *T. canis*, *Trichuris vulpis* y *Ancylostoma caninum*, entre otros nemátodos de alta prevalencia en perros alrededor del mundo (Robertson & Thompson, 2002). En el ser humano los nemátodos de origen canino causan distintos cuadros zoonóticos que pueden afectar la piel y el tracto gastrointestinal, algunas de las afecciones más frecuentes son: *larva migrans* cutánea ocasionada por *Ancylostoma* spp. y el cuadro conocido como *larva migrans* visceral ocasionado por *Toxocara canis*.

1.1.1. Ancylostomatídeos

Ancylostomatídeos es un término popular para referirse a los individuos pertenecientes a la familia Ancylostomatidae. Esta familia de nemátodos se compone de

diversas especies que comparten una morfología y fisiología básica: son parásitos monoxenos que infectan el tracto digestivo de mamíferos, y han desarrollado una serie de estructuras bucales que les permite anclarse a la mucosa intestinal desde donde se alimentan de sangre (Loukas et al., 2016). La similitud morfológica supone uno de los retos diagnósticos pues un mismo hospedero puede albergar más de una especie de ancylostomatídeos, y los huevecillos de los ancylostomatídeos son indistinguibles morfológicamente entre sí (Illiano et al., 2023). El ciclo de vida de estos nemátodos también es bastante similar: los huevecillos son excretados en las heces de los cánidos donde la temperatura y humedad adecuada permiten el desarrollo de la larva infectante (L3). La transmisión se produce usualmente a través de la penetración de la fase larvaria infectante por vía percutánea, pero también puede ocasionarse mediante la ingestión de heces contaminadas, incluso los cachorros pueden infestarse por vía lactogénica. Posterior al ingreso, el parásito avanza por los tejidos hasta llegar al sistema cardiopulmonar. Desde los pulmones pueden ascender por los bronquios hasta llegar a la faringe, donde las larvas son deglutidas y pasan al intestino, en donde se desarrolla hasta su fase adulta (Bowman et al., 2010).

En los cánidos los ancylostomatídeos causan principalmente anemia e hipoproteinemia debido a la pérdida de sangre, sintomatología suele ser más severa en los cachorros. Los perros también pueden experimentar manifestaciones cutáneas y respiratorias, así como diarrea y enteritis eosinofílica (Illiano et al., 2023). Los nemátodos de cánidos además tienen un alto potencial zoonótico pudiendo provocar una irritación cutánea conocida como *larva migrans*, pero también se ha identificado como causantes de complicaciones de mayor gravedad como la enteritis eosinofílica y neurorretinitis unilateral subaguda difusa en humanos (Loukas et al., 2016). *A. ceylanicum* es el único ancylostomatídeo descrito que puede utilizar al ser humano como hospedero definitivo, desarrollando su forma adulta en tracto gastrointestinal y desencadenando las manifestaciones típicas de anemia y malestar gastrointestinal (Colella et al., 2021).

Los ancylostomatídeos más comunes de los cánidos son: *A. caninum*, *Ancylostoma tubaeforme*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma ceylanicum* y *Uncinaria stenocephala*. La distribución geográfica de las diferentes especies se superpone, pero en términos generales *A. caninum* es la especie más común a nivel mundial y tiene mayor frecuencia en las zonas

más cálidas del trópico infectando perros y gatos. De manera similar sucede en el caso del menos común *A. tubaeforme* (Bowman et al., 2021). *A. braziliense* de igual forma prefiere el trópico en sitios como Brasil, India, África y el sudeste asiático. *Uncinaria stenocephala* se presenta en perros y gatos en zonas templadas de América del Norte, América del Sur, Europa, Asia, Australia y Nueva Zelanda. *A. ceylanicum* ha sido reportado en Asia y Oceanía principalmente, donde además de perros y gatos también utiliza humanos como hospederos definitivos (Shepherd et al., 2018). Además, nuevos reportes han detectado *A. ceylanicum* en América, incluida Costa Rica (Zendejas-Heredia et al., 2024).

1.1.2 *Toxocara canis*

Toxocara canis es un nemátodo perteneciente a la familia Ascarididae (Henke et al., 2002). En su estado adulto tiene como hospedero definitivo al perro y otros cánidos silvestres incluidos zorros, coyotes, lobos y chacales (Holland, 2023). *T. canis* es uno de los helmintos más ampliamente distribuido a nivel mundial, se estima que más de 100 millones de perros se encuentran infectados con este parásito. La frecuencia de la toxocariasis en perros es mayor en perros de regiones tropicales y en países con bajos ingresos económicos. Además, en términos generales los perros cachorros, de hábitat callejero o forrajero, de zonas rurales y machos presentan una mayor prevalencia de infección que perros mayores, mascotas, urbanos o hembras (Rostami et al., 2020).

La hembra de *T. canis* pone alrededor de 200 000 huevecillos al día en el intestino delgado del perro, quienes dispersan huevos de *T. canis* al ambiente (Alvarado-Borja et al., 2023). Estos huevecillos no son embrionados y, por lo tanto, no son infectivos en el momento de la expulsión a través de las heces, sino que requieren desarrollarse hasta la larva infectante (L3) en el ambiente. Una vez embrionados son resistentes a cambios de pH, frío y desecación hasta entre 2 y 4 años (Fan, 2020). Es por lo que *T. canis* es considerado un geohelminto. La principal vía de infección en perros es la ingesta de huevecillos embrionados que se encuentran en el suelo, los cuales liberan las larvas cuando alcanzan el intestino y la transmisión vertical. Los cachorros se infectan en el útero de la madre por larvas somáticas reactivadas. Después del nacimiento, los cachorros también adquieren la infección a través de la ingestión de larvas en la leche (Schwartz et al., 2022). Las larvas infecciosas a nivel intestinal realizan una migración somática que empieza cuando atraviesan la pared del duodeno, alcanzando el hígado por medio de la circulación portal a través de los capilares

venosos. Más tarde, las larvas continúan el desplazamiento al corazón donde llegan al pulmón por la arteria pulmonar. Las larvas pueden ingresar a los alvéolos, continúan por los bronquiolos, la faringe, hasta llegar a la tráquea y ser deglutidas, y así completar su desarrollo en adultos en el intestino (Alvarado-Borja et al., 2023).

En hospederos paraténicos como ratones, cerdos y seres humanos, las larvas L3 de *T. canis* no mudan, tampoco crecen ni se replican y deambulan por varios órganos internos realizando migración somática. Estas larvas pueden entrar en un estado de hipobiosis y vivir en los tejidos de sus hospederos paraténicos por años. Además, las mismas pueden pasar de hospedero a hospedero mediante la depredación. Al alcanzar un cánido las larvas se reactivan y pueden desarrollarse en adultos (Bowman, 2020).

La toxocariasis afecta con mayor frecuencia a perros jóvenes menores a un año y usualmente presenta signos respiratorios como tos, debido a la migración de larvas pulmonares. También hay retraso general del crecimiento, debilitamiento del pelaje, artralgias y trastornos intestinales como diarrea, estreñimiento, abultamiento del abdomen y vómitos. Las infecciones prenatales más intensas en los cachorros pueden conducir a enfermedades graves con caquexia, y en algunos casos lleva a la muerte (Alvarado-Borja et al., 2023). Como se mencionó anteriormente, *T. canis* puede transmitirse a humanos, esto ocurre cuando se ingieren huevecillos del ambiente o larvas provenientes de hospederos paraténicos. La infección puede resultar en cuatro posibles cuadros clínicos: 1. *larva migrans* visceral o toxocariasis visceral, 2. *larva migrans* ocular o toxocariasis ocular, 3. toxocariasis encubierta y 4. neurotoxocariasis (Schwartz et al., 2022). La toxocariasis es una zoonosis de alta importancia en seres humanos, que afecta principalmente niños debido a factores de comportamiento como la geofagia y el contacto más cercano con suelo contaminado en parques públicos, áreas de juego y playas (Meriguetti et al., 2022).

1.1.3 Spirocerca spp.

Spirocerca es un género de nemátodos gastrointestinales de cánidos en el que se encuentran las especies *Spirocerca lupi* y *Spirocerca vulpis*. *S. lupi* afecta principalmente a perros y puede causar una enfermedad grave conocida como espirocercosis la cual se caracteriza por la presencia de nódulos a nivel esofágico que contienen los parásitos adultos (Alfaro-Segura et al., 2024). Los perros se infectan con *S. lupi* al consumir escarabajos

coprófagos que contienen larvas de tercer estadio (L3). En el estómago del perro, las L3 se liberan y migran a través de la pared de la aorta hacia el esófago, donde las larvas mudan hasta alcanzar la adultez. Los adultos de *S. lupi* se encuentran en nódulos que sobresalen hacia el lumen esofágico donde las hembras liberan huevecillos embrionados con larvas L1 que son deglutidos y liberados a través de las heces del perro. Luego, los escarabajos consumen los huevecillos de las heces y las larvas L1 se convierten en L3 infecciosas en el hemocele del artrópodo (Rojas et al., 2020). Las larvas L3 pueden ser consumidas y albergadas por múltiples hospederos paraténicos como aves de corral, aves silvestres, lagartos, roedores, erizos y conejos. Por medio de la ingesta de dichos hospederos los perros y otros cánidos pueden infectarse (van der Merwe, 2010).

Las manifestaciones clínicas de la espirocercosis incluyen regurgitación, vómitos, caquexia, nódulos esofágicos, espondilitis vertebral torácica, periostitis, sialorrea, disnea, aneurismas aórticos, piotórax y hemotórax que pueden provocar la muerte (Alfaro-Segura et al., 2024). Además, se estima que en el 25% de los perros los nódulos esofágicos pueden progresar a fibro, osteo o condrosarcomas que pueden metastatizar a otros órganos (Porrás-Silesky et al., 2021). El parásito puede encontrarse en todos los continentes excepto la Antártida. Además, los perros callejeros, de zonas urbanas, adultos, de razas grandes y de cacería tienen una mayor incidencia de infección en comparación con los cánidos domésticos, de razas pequeñas y cachorros (Rojas et al., 2020). Aunque el perro es el principal hospedero de *S. lupi*, este nemátodo también ha sido reportado en una serie de carnívoros silvestres incluidos coyotes (*C. latrans*), zorras grises (*U. cinereoargenteus*), perros venaderos (*Speothos venaticus*), zorros rojos (*V. vulpes*), zorros andinos (*L. culpaeus*), chacal común (*Canis aureus*) y chacal de lomo negro (*Canis mesomelas*) (Rinas et al., 2009; Rojas et al., 2020).

Estudios en la última década han revelado una alta diversidad genética dentro del género *Spirocerca*, con dos genotipos distintos de *S. lupi* identificados en perros a nivel mundial y llevando a la descripción de una nueva especie, *S. vulpis*, identificada en zorros rojos europeos (Rojas, Dvir, et al., 2018; Rojas, Sanchis-Monsonís, et al., 2018). Además, se ha sugerido que la historia evolutiva de *Spirocerca* spp. comenzó con *S. vulpis* en Eurasia que posteriormente divergió en *S. lupi* y se extendió a África, Asia y Suramérica a través de sus hospederos cánidos (Alfaro-Segura et al., 2023). Se necesitan más estudios para la

comprensión de la patología y epidemiología de *S. vulpis*, sin embargo, hasta el momento este nemátodo solo ha sido descrito en Europa donde se reporta en zorros rojos (*Vulpes vulpes*) ocasionando lesiones muy similares a las de su pariente cercano *S. lupi* con la diferencia de que no se ha evidenciado neoplasia (Martín-Pérez et al., 2022), además se ha observado predominantemente en hospederos adultos sin diferenciación por sexo (Sanchis-Monsonís et al., 2019).

1.1.4 *Trichuris vulpis*

Trichuris vulpis es un nemátodo que afecta principalmente a perros como hospederos de preferencia, sin embargo, se ha descrito también en humanos en varios casos (Elsemore & Ketzis, 2021). Este nemátodo también es capaz de infectar una serie de cánidos silvestres como coyotes, lobos, zorros rojos y chacales (Kirkova et al., 2006). Es un parásito cosmopolita con una alta prevalencia, principalmente en regiones tropicales y subtropicales. Existe una carencia de estudios epidemiológicos extensos enfocados específicamente en *T. vulpis*, pero en general, la tricurosis canina es una parasitosis ubicua, con altas tasas de infección en animales de refugios, mascotas domésticas y perros callejeros (Traversa, 2011). Además, se reporta mayor número de infecciones en animales adultos que en cachorros (Datz, 2011).

Los perros se infectan por la ingesta de huevecillos de ambientes contaminados. No ocurre transmisión perinatal y todo el desarrollo del parásito tiene lugar en los intestinos sin migración de tejidos ni estadios larvarios detenidos. La hembra adulta se ubica en el intestino grueso donde libera los huevecillos que son eliminados en las heces. Dependiendo de la temperatura y humedad, los huevecillos maduran en 1 o 2 meses hasta contener la larva infectante (L1) (Elsemore & Ketzis, 2021). Muchos animales pueden tener altas cargas de *T. vulpis* sin presentar sintomatología, sin embargo, está comprobado que *T. vulpis* causa una inflamación aguda o crónica en la mucosa del ciego y/o del colon lo que puede llevar a episodios diarreicos que se alternan con períodos de evacuación de heces normales. En las infecciones graves se produce diarrea mucosa, acuosa y a menudo hemorrágica, o incluso sangre pura, junto con pérdida de peso, letargo y anemia, causadas por la pérdida de sangre debido al daño que los tricocéfalos crean en la mucosa intestinal (Traversa, 2011).

1.1.5 Strongyloides spp.

Strongyloides stercoralis, es un helminto de la familia Strongyloididae que afecta a poblaciones humanas y caninas principalmente en áreas tropicales y subtropicales. *S. stercoralis* es la única especie del género *Strongyloides* considerada zoonótica (Thamsborg et al., 2017). A diferencia de otros geohelminetos, *Strongyloides* spp. son parásitos anfizoicos, que alternan una generación sexual de vida libre y una parásita, representada únicamente por hembras que arrojan huevecillos por partenogénesis. Los huevecillos de la generación parásita eclosionan cuando aún se encuentran en el intestino del hospedero, y la mayoría de las larvas de primer estadio (L1) eclosionadas salen en las heces y se desarrollan hasta convertirse en larvas infecciosas de tercer estadio (L3) en el suelo. Sin embargo, algunas larvas pueden desarrollarse dentro del mismo hospedero y causar autoinfección, tanto en humanos como en perros, lo que lleva a una infección asintomática crónica, a menudo de por vida (De Liberato et al., 2022).

S. stercoralis está presente en todo el mundo y su prevalencia oscila entre 0 y hasta más del 50 % en perros, con una prevalencia global del 6%; siendo más prevalente en los perros más jóvenes (Gorgani-Firouzjaee et al., 2022). La mayoría de las infecciones por *Strongyloides* en perros y gatos son asintomáticas y autolimitadas. En casos de alta carga parasitaria en perros puede ocurrir diarrea acuosa con o sin mucosidad y bronconeumonía (Thamsborg et al., 2017). Además del perro y los seres humanos, *S. stercoralis* ha sido reportado también en primates y cánidos silvestres incluidos los coyotes (Luna-Estrada et al., 2017a) y lobos (Hermosilla et al., 2017).

1.1.6 Otros nemátodos gastrointestinales

Entre otros nemátodos que pueden afectar cánidos se encuentra *Toxascaris leonina*, un parásito que afecta tanto a perros como a gatos. Esta especie es, en general, menos difundida en perros en comparación a otros nemátodos como *T. canis* o *A. caninum*, especialmente porque no se producen transmisiones a través de la placenta y las glándulas mamarias. Los animales se infectan únicamente al ingerir huevecillos larvados. *T. leonina* tiene una patogenicidad menos dramática, pero en los perros puede causar pica, alteraciones digestivas y reducción del crecimiento, mientras que en los gatos la infección puede manifestarse como una enteritis con vómitos y diarrea, incluso con sangre (Traversa, 2012).

Angiostrongylus vasorum es también un nemátodo importante a destacar, aunque no habita en el trato gastrointestinal propiamente, sus larvas son liberadas a través de las heces del perro, siendo este hallazgo una de las formas de llegar al diagnóstico. *A. vasorum* puede denominarse gusano del corazón, ya que los vermes adultos se encuentran en la arteria pulmonar, por lo que más comúnmente se denomina gusano pulmonar. Los huevecillos se alojan en las arteriolas respiratorias y las larvas eclosionadas salen a las vías respiratorias. Al final estas larvas son tosidas, deglutidas y expulsadas con las heces. Los signos clínicos asociados con la infección se deben a los efectos tanto de los gusanos adultos como de las larvas y pueden incluir tos, disnea e intolerancia al ejercicio. (Fisher, 2001). Además de los perros, este parásito también se ha encontrado en canidos silvestres como zorros rojos, lobos y coyotes (Bourque et al., 2005; Tieri et al., 2021).

1.2 Perros y sus nemátodos gastrointestinales

Los perros tienen una distribución global y poseen la más amplia diversidad de funciones de cualquier otro animal domesticado pues sirven como animales de compañía, de trabajo, en granjas, perros policía o militares, pastores, cazadores, guardianes, transporte, etc. (Rostami et al., 2020). Se estima que en el mundo existe alrededor de 700 millones de perros (Smith et al., 2019). La evidencia genética sugiere que los perros fueron domesticados a partir de lobos, y que sucesivos eventos de domesticación ocurrieron durante al menos 33,000 años. La convivencia entre humanos y perros ha dado lugar a entornos nutricionales, bacterianos y patógenos compartidos. Compartir entornos entre sí aumenta el riesgo de infección cruzada con los parásitos de cada uno. Se sabe que helmintos de los géneros *Strongyloides*, *Toxocara*, *Taenia* y *Ancylostoma* pueden transmitirse de perros a humanos y que en algunos casos se produce una transferencia bidireccional, que actúa como reservorio de reinfección (Shepherd et al., 2018). Existen parásitos que afectan tanto a los carnívoros domésticos como a los salvajes y que pueden circular entre poblaciones simpátricas de animales, facilitando así la posible propagación de las infecciones a los humanos (Otranto et al., 2015).

La composición parasitaria de los perros domésticos varía según las condiciones en que habitan, pues podemos encontrar grandes diferencias entre perros con hábitat domiciliar, perros en refugios de rescate de animales o perros forrajeros, por citar algunos ejemplos. Aproximadamente el 75% de los perros de todo el mundo encajan en esta categoría de perros que deambulan libremente (forrajeros) (Smith et al., 2019). En muchos casos, los perros

forrajeros pueden albergar más agentes infecciosos que los perros domésticos, por ejemplo, se ha identificado en el caso de *T. canis* una mayor presencia en perros forrajeros (Rostami et al., 2020). Otros factores que influyen en la prevalencia de infecciones parasitarias gastrointestinales son la edad del cánido, y en algunas ocasiones el sexo del animal. Por ejemplo, se ha reportado en diferentes estudios que las infecciones por *T. canis* son más frecuentes en cachorros, mientras que el parásito *A. caninum* afecta en mayor número perros mayores de 6 años (Rostami et al., 2020; Traversa, 2012). Se ha descrito tanto para ancylostomatídeos como para *T. canis* una mayor prevalencia de estas infecciones en perros macho que en hembras (Mohamed et al., 2009a; Rostami et al., 2020).

Independiente de las distintas condiciones en que habitan los perros es un hecho que la prevalencia de parásitos gastrointestinales, y concretamente de nemátodos en perros domésticos es alta (Dantas-Torres & Otranto, 2014). Por ejemplo, en los Estados Unidos de América (E.U.A), un estudio masivo a lo largo de todo el país concluyó que existe parasitismo por *T. canis* que va desde 5.7% hasta 15.5 %, prevalencias estimadas de parasitismo por *Ancylostoma spp.* que oscilan entre el 9.7 % y 38.5 %, y estimaciones de prevalencias de parasitismo por *T. vulpis* que van desde 9.7% al 14.5%(Mohamed et al., 2009b). En otros países del continente americano se ha reportado también una alta presencia de *T. canis*, de hasta un 71% por ejemplo en el caso de México, y de *Ancylostoma spp.* hasta 21% en Colombia (Olave-Leyva et al., 2019), mientras que, en Brasil, un estudio encontró 43% de perros infectados estaban infectados con *T. vulpis* (Yevstafieva et al., 2019). Cabe destacar que distintas técnicas son utilizadas para el diagnóstico parasitológico por lo que los resultados no son comparables directamente. Sin embargo, demuestran la alta presencia de nemátodos gastrointestinales en perros.

Es importante recalcar que la alta incidencia de nematodiasis intestinales en perros está influida también por el acercamiento del ser humano a la vida silvestre. A su vez la fauna silvestre se ve impactada por el acercamiento humano y sus animales de compañía. Como se mencionó anteriormente los nemátodos parasíticos de perros son pueden infectar la fauna silvestre, gracias a la cercanía evolutiva del perro con cánidos silvestres como coyotes (*C. latrans*). Diversas actividades humanas han resultado en la fragmentación del medio ambiente y cambios en el uso de la tierra que han favorecido consistentemente la intrusión de áreas urbanas en ambientes salvajes, causando alteración de muchos ecosistemas con

cambios en la composición de la fauna silvestre y destrucción de límites entre los ambientes domésticos y salvajes. Por lo tanto, el intercambio de parásitos de animales silvestres a domésticos y viceversa ha aumentado (Otranto & Deplazes, 2019).

1.3 Coyotes y sus nemátodos gastrointestinales

Los coyotes son una especie oportunista que se adapta con facilidad a una variedad de hábitat, desde bosques hasta áreas altamente fragmentadas por el ser humano, e incluso zonas urbanas (Lloyd, 2020). Por esta razón se han observado coyotes con mayor frecuencia cerca de asentamientos humanos, poniéndose en contacto con poblaciones de perros domésticos y aumentando el riesgo de transmisión de parásitos entre estas dos especies caninas (Liccioli et al., 2012). Los coyotes habitan únicamente en el continente americano, y gracias a su antes mencionada adaptabilidad han logrado distribuirse desde Alaska hasta Panamá, donde han sido observados incluso al sur en la región del Darién (Méndez-Carvajal & Moreno, 2014; Ramírez & León, 2015). Es un mamífero de entre 105-132 cm de altura y en promedio 122 cm de longitud (contando la cola). Un macho pesa en promedio 16 kg, su color va de gris a marrón, a veces con tintes rojizos. De orejas y hocico largos en comparación con su cabeza. Puede ser identificado por su cola espesa y ancha, a menudo llevada cerca del suelo. Vive en promedio seis años (Whitaker Jr, 1996). Es una especie sumamente adaptable tanto en hábitat como en hábitos alimenticios, a pesar de haber sido intensamente cazado, es uno de los pocos animales grandes que ha ampliado su hábitat desde la conquista de América por los europeos. Ha ocupado zonas en Norteamérica y Centroamérica donde previamente habitaban grandes depredadores como lobos (*C. lupus*), pumas (*Puma concolor*) y jaguares (*Panthera onca*) (Ramírez & León, 2015); también se ha adaptado al consumo de basura y animales domésticos en zonas urbanas. Entre sus presas hay mamíferos de tamaño variados como venados principalmente jóvenes o enfermos, pero también conejos y ratones. Además, aves, reptiles como lagartijas, invertebrados y carroña. En los páramos sus principales presas son conejos y pequeños roedores, pero también se registran en su dieta aves, carroña y frutos. Aunque a veces se reúne en manadas, es generalmente solitario (Bekoff, 1977).

En Costa Rica hay evidencia antigua de la presencia de *C. latrans* en el territorio, por medio de registros fósiles del Pleistoceno y Holoceno temprano, así como fuentes históricas de cronistas de los siglos XVI a XIX durante el tiempo de la colonia (Hidalgo-Mihart et al., 2004). En territorio costarricense se ubican principalmente en las periferias de los bosques y

ambientes fragmentados en el Valle Central y el norte de la costa pacífica. Sin embargo, más recientes estudios reportan la presencia de coyotes en el Atlántico Norte, y el Pacífico Sur (Carazo-Salazar et al., 2020; Cove et al., 2012). Siempre en Costa Rica, estudios en el Área de Conservación de Guanacaste (ACG) han observado una preferencia de los coyotes por hábitats alterados, en particular, pastizales de ganadería y pastizales sin uso específico. Entre las áreas naturales el hábitat con el índice de selectividad más alto ha sido el bosque seco abierto. Además, el desplazamiento puede llegar a ser hasta de 35 km por día (Lloyd, 2020).

Sucede similar al interior del país en el Área de Conservación Central (ACC), donde el ser humano ha ocupado al menos un 50 % del hábitat natural de los coyotes, provocando alta incidencia de registros de actividad en el bosque, potreros y sitios urbanos. Se postula entonces que *C. latrans* siempre ha estado distribuido en todo el país, pero que producto de la pérdida de cobertura forestal y defaunación ahora su presencia se hace notar aún más (Azofeifa, 2024). También existe información acerca de la dieta de los coyotes en Costa Rica, se ha descrito para el Cerro de la muerte (ACC) y el Parque Nacional Palo Verde (ACG) preferencia por chanco de monte (*Pecari tajacu*), seguido por el *Sigmodon hirsutus*, y ganado bovino (*Bos taurus*), además de algunas aves (Vaughan & Rodríguez, 1986). Estudios más recientes en la ACG describieron que la vegetación es el grupo más frecuente en la dieta de esta especie durante las dos estaciones climáticas, y la segunda preferencia más común son los mamíferos. Específicamente, existe una preferencia primaria por el nance, zacate, guaitil; y en los mamíferos el conejo, la guatusa y el venado cola blanca. Adicionalmente, se destaca el consumo de plástico, lo que refleja una tendencia al consumo de desechos humanos (Lloyd, 2020).

La gran adaptabilidad del coyote a distintos hábitats le expone a la adquisición de parasitosis de diversas fuentes. Diversos factores geográficos, demográficos, climáticos y de dieta influyen en la tasa de parasitosis en coyotes y en las especies predominantes, por esto se observan variaciones entre los estudios que se han dedicado al estudio de las parasitosis en este cánido. Es importante considerar que las metodologías de estudio también son diferentes, por lo que la comparación directa debe realizarse con cautela en vista de que las diferencias están sujetas a la capacidad de detección de cada método. Algunas de las similitudes entre los estudios dedicados a la parasitosis de coyotes es que se encuentra una frecuencia de parasitosis por lo general mayor al 50%, estudios como el de Liccioli et al.,

2012 describió un 61% de parasitosis en coyotes en un área urbana en Canadá. En E.U.A, se realizó un estudio que encontró un 56% de parasitosis en muestras de heces de coyotes, y en México, Petters et al., 2019 describieron una prevalencia de 70% de parásitos gastrointestinales. Cabe destacar que estas investigaciones utilizan diferentes métodos de concentración de parásitos y posteriormente su observación al microscopio, en ninguno de los casos se implementa el uso de herramientas de biología molecular u otros métodos similares de análisis. Además, otra de las semejanzas entre los hallazgos de estas investigaciones es que han evidenciado un predominio de las infecciones constituidas por nemátodos, destacan: *T. leonina*, *Uncinaria spp.*, *Ancylostoma spp.*, *T. canis* y *T. vulpis* (Petters et al., 2019)(Liccioli et al., 2012)(Niehaus et al., 2012). Aunque se denotan variaciones entre regiones, en un área urbana en Alberta, Canadá el parásito más prevalente fue *T. leonina* (Liccioli et al., 2012), mientras que en México en una reserva forestal la especie predominante fue *T. canis* (Petters et al., 2019); por otro lado, en zonas urbanas en New York destaca una mayor presencia de *Uncinaria stenocephala* (Gompper et al., 2003).

Otros nemátodos han sido reportados con menor frecuencia, tal es el caso de *A. vasorum* parásito que recientemente fue reportado en 4 coyotes en Canadá, confirmado a través de la secuenciación del gen de citocromo oxidasa subunidad 1 (*cox1*) (Priest et al., 2018). *S. lupi* ha sido reportado generando las lesiones esofágicas típicas con la presencia de parásitos adultos en coyotes en Texas, E.U.A (Pence & Stone, 1978). En México, se identificaron larvas morfológicamente compatibles con *S. lupi* (Petters et al., 2019). Y en Florida este parásito se describió en el intestino de coyotes (Foster et al., 2003). Además de nemátodos también se han reportado con frecuencia variable céstodos y tremátodos en coyotes. Por ejemplo, un estudio en Nebraska y Iowa, E.U.A encontró al menos una especie de céstodo en 3 de cada 4 intestinos de coyote analizados. Las especies de céstodos descritas en dicho estudio fueron *Taenia hydatigena*, *Taenia pisiformis*, *Dipylidium caninum* y *Echinococcus* spp. (W. K. Redman et al., 2016). Alta prevalencia de especies del género *Taenia* también han sido reportados en Newfoundland y Quebec, Canadá (Bridger et al., 2009). En este último 6 especies de *Taenia* (*T. hydatigena*, *T. twitchelli*, *T. crassiceps*, *T. polyacantha*, *T. krabbei*, y *T. pisiformis*) fueron identificadas utilizando secuenciación del gen *cox1* (Bouchard et al., 2021). De igual forma estudios canadienses han encontrado *Echinococcus multilocularis* y *Echinococcus canadenses* infectando *C. latrans* (Tse et al., 2019). En E.U.A

también, se describió el céstodo *Spirometra* spp. en coyotes de Nueva York (Gompper et al., 2003). Por otro lado, tremátodos del género *Alaria* fueron obtenidos de coyotes en México (Petters et al., 2019) y también en Florida, E.U.A (Foster et al., 2003).

1.4 Epidemiología de las infecciones por nemátodos gastrointestinales en cánidos de Costa Rica

En Costa Rica existe un vacío de conocimiento en cuanto a las parasitosis de coyotes y otros carnívoros silvestres. El único estudio encontrado en la literatura enfocado en el estudio de parásitos gastrointestinales de coyotes data de 2012. En esta investigación se recolectaron muestras de heces de coyotes en el Parque Nacional Volcán Irazú-Sector Prusia, y se encontró una frecuencia de parasitismo de 36.84%. El grupo de parásitos más representativo fueron los nemátodos de los cuales se encontró ancylostomatídeos en mayor cantidad, seguido de strongilidios, *T. canis* y *T. vulpis*.(Niehaus et al., 2012).

Las parasitosis gastrointestinales de perros han sido ampliamente estudiadas en Costa Rica, donde se estima que habitan 1,320,310 de perros (World Animal Protection, 2016). Varios estudios confirman que la prevalencia de los parásitos gastrointestinales en perros es elevada y que fluctúa de acuerdo con el tipo de población canina evaluada (perros forrajeros, perros domiciliarios, de refugios, etc.). Laboratorios de diagnóstico y clínicas veterinarias reportan una frecuencia de parasitosis gastrointestinales de aproximadamente 60%. (Valverde, 2010). Consistentemente se ha encontrado *Ancylostoma* spp. como el parásito más frecuente en las heces de perros, confirmando la importancia de los nemátodos como parásitos caninos. Claro ejemplo, es una investigación donde se estudiaron perros en ocho áreas recreativas de diferentes provincias del país (San José, Alajuela, Limón, Heredia y Guanacaste) en donde se encontró 87.9% de cánidos positivos por ancylostomatídeos (Saénz, 2013). Otros parásitos encontrados con una alta frecuencia son *T. canis* (principalmente en cachorros), *T. vulpis*, y *D. caninum* (Alemán, 2011; Ketzis & Lucio-Forster, 2020; Saénz, 2013; Valerio et al., 2010; Valverde, 2010). En menor medida se han encontrado en los perros costarricenses parásitos como *D. caninum*, y *S. lupi*. Cabe destacar que en algunos casos se encuentra coocurrencia de parásitos, encontrándose 2 o incluso 3 parásitos en un mismo hospedero (Saénz, 2013; Valverde, 2010).

El número y tipo de parásitos gastrointestinales encontrados en perros en Costa Rica varía de acuerdo con factores como la zona geográfica, la edad, el hábitat y las prácticas sanitarias que reciban los perros en estudio. Notablemente, perros con hábitos domiciliarios en el Gran Área Metropolitana (GAM) tienen bajas frecuencias de parasitosis gastrointestinales. Por ejemplo, un estudio encontró 14% de infección por nemátodos y 5.1% por protozoarios (Valerio et al., 2010). Los porcentajes de parasitosis son mucho mayores en perros de hábitos que les exponen en mayor medida a posibles fuentes de infección como el contacto con diferentes personas, animales y el suelo. Por ejemplo, un estudio también realizado en el GAM pero en perros de refugios encontró que hasta 39% de estos portaban al menos un parásito gastrointestinal (Alemán, 2011), casi el doble que los perros domiciliarios en la misma área de estudio. Cabe destacar que el mismo estudio también concluyó que el número de infecciones era mucho mayor en los cachorros (Alemán, 2011). También perros de áreas en riesgo social han mostrado una tendencia a altos porcentajes de parásitos gastrointestinales, encontrándose un 61% de perros infectados (Valverde, 2010). En Costa Rica se han estudiado perros callejeros y con dueño que frecuentan parques, y se encontraron parásitos en el 38% de ellos. De este estudio también destaca que uno de cada tres perros infectados portaba una infección múltiple (dos o más parásitos), y en su mayoría estas coinfecciones estaban constituidas por la mezcla de ancylostomatídeos y otro parásito (Saénz, 2013). Estos múltiples ejemplos son muestra clara de cómo las parasitosis gastrointestinales son frecuentes en perros, en especial en perros jóvenes y que tienen hábitos que les exponen a infectarse. Además, al igual que a nivel global los nemátodos son el principal grupo de parásitos gastrointestinales en perros de Costa Rica.

1.5 Nemabioma: Secuenciación de Nueva generación para el estudio de helmintos gastrointestinales en animales domésticos y silvestres

La identificación precisa de las especies es vital para comprender la evolución, la biogeografía y las enfermedades emergentes. Diferentes especies dentro de un mismo género de helmintos pueden variar en su capacidad de infectar a los animales, lo que hace que algunos parásitos tengan reservorios animales, mientras que otros sigan siendo patógenos exclusivamente humanos. Una comprensión más detallada de la estructura de la comunidad helmíntica es crucial para el adecuado abordaje de temas como la resistencia a los

antihelmínticos, las enfermedades emergentes o zoonóticas y los niveles umbral óptimos para la eliminación de enfermedades (Grant et al., 2019).

Los métodos tradicionales de diagnóstico, basados en la concentración de los huevecillos y la observación microscópica, suelen requerir mucho tiempo. Además; tienen limitaciones, principalmente en términos de su especificidad y sensibilidad. Esto es particularmente desventajoso en el caso de infecciones mixtas, pues muchas veces no es posible diferenciar a nivel de especie los huevecillos presentes en una muestra, como en el caso de los ancylostomatídeos (Roeder et al., 2013). Gracias a las técnicas moleculares y de secuenciación, la determinación de parásitos específicos en muestras de animales se ha facilitado, debido a que estos métodos ofrecen mayor sensibilidad y especificidad en comparación a los métodos tradicionales (Christoforou et al., 2017). Sin embargo, estas técnicas suelen dirigirse a especies o grupos de parásitos específicos, por lo que en el contexto de infecciones por múltiples parásitos se requiere la realización de varias reacciones adicionales para identificar correctamente las especies co-infectantes dentro de una muestra (Aivelo & Medlar, 2018). Para solventar estas dificultades, técnicas de secuenciación profunda de amplicones han sido promovidas, en las cuales mediante el uso de *primers* universales se logra identificar la composición total de un grupo de parásitos de interés presentes en una misma muestra a través de una sola reacción de secuenciación. Los estudios en rumiantes han sido pioneros en el uso de la biología molecular para el diagnóstico de parasitosis por helmintos. La secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés) permite en una sola prueba la identificación específica de especies y el análisis de resistencia a antihelmínticos, lo que ha sido clave para avanzar en el entendimiento de la diversidad, epidemiología y la resistencia a antimicrobianos en ganado (Antonopoulos et al., 2024).

Dentro de las técnicas de NGS utilizadas para el estudio de helmintiasis destaca el *metabarcoding*, la cual es una técnica desarrollada para caracterizar la biodiversidad en muestras ambientales complejas que implica la amplificación de una región específica del ADN, como el ARN ribosomal 18S o 28S para una clasificación taxonómica amplia; o el *cox1* para la discriminación a nivel de especie (Bucklin et al., 2016; Sudermann et al., 2024). Este método permite evaluar rápidamente la salud de los ecosistemas en términos de diversidad de especies. De esta manera se facilita la estimación del impacto del cambio

climático y las actividades humanas en la reducción de especies y diversidad genética. También permite identificar especies no reportadas con anterioridad en una región geográfica y/o describir especies crípticas (Bucklin et al., 2016). Otras ventajas en el campo de la parasitología de las técnicas de secuenciación profunda o *metabarcoding* son la capacidad de identificar especies a partir de individuos en cualquier estadio del ciclo de vida (huevecillos, larvas, adultos, etc.) y el reconocimiento de especies crípticas, es decir, especies morfológicamente indistinguibles, pero genéticamente distintas (Aivelo & Medlar, 2018).

A pesar de sus múltiples ventajas el *metabarcoding* enfrenta desafíos, como el sesgo de los *primers* en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la necesidad de bases de datos de referencia integrales (Elbrecht & Leese, 2015; Taberlet et al., 2012). Si bien existe una correlación positiva entre la biomasa y la abundancia de lecturas de secuencias, la eficiencia de los *primers* varía significativamente entre especies, lo que limita las evaluaciones cuantitativas a través de este método (Elbrecht & Leese, 2015). En cuanto a las bases de datos integrales, las mismas se refieren a una base de datos que sea extensa, completa y bien curada apropiadamente. Se espera que contenga una amplia y diversa colección de secuencias de referencia, metadatos y anotaciones. Además, es importante que tenga secuencias de alta calidad y que estas secuencias se ajusten a la región del ADN en estudio para minimizar errores en la identificación (Keck et al., 2023).

Los avances futuros podrían eliminar el paso de amplificación por PCR y mejorar las bibliotecas de referencia, aumentando el potencial del *metabarcoding* en la investigación de la biodiversidad (Taberlet et al., 2012). A pesar de estas limitaciones, el *metabarcoding* sigue siendo una herramienta poderosa para el análisis a gran escala de la biodiversidad (Bucklin et al., 2016; Sudermann et al., 2024). A través de esta metodología se ha conseguido describir comunidades de nemátodos en diferentes hospederos, destaca por ejemplo el caso de los primates no humano; en los cuales se han descrito nemátodos típicos del intestino de vertebrados como oxiuros (Oxyurida; *Trypanoxyuris*), tricocéfalos (Enoplea; *Trichuris* sp.) (Mann et al., 2020) y geohelminintos como *Necator* spp. y *Oesophagostomum* spp. (Sirima et al., 2021). También se suelen detectar muchas especies de nemátodos que no son residentes intestinales y que probablemente fueron ingeridas o corresponden a taxones ambientales adquiridos tras la deposición de las heces. Es importante entonces considerar en los análisis de *metabarcoding* de muestras de heces colectadas en el ambiente que la señal eucariótica

intestinal no puede separarse de manera confiable de la contaminación dietética o ambiental a nivel comunitario, por lo que los análisis posteriores a la asignación taxonómica se deben enfocar en especies conocidas de nemátodos intestinales (Mann et al., 2020).

Una de las recientes aplicaciones del *metabarcoding* ha sido la descripción de grupos de nemátodos gastrointestinales infectantes en mamíferos, a lo que se le ha denominado “nemabioma” (Avramenko et al., 2015). Hasta la fecha algunos de los mamíferos en los cuales se ha efectuado el estudio del nemabioma son: ovejas domésticas (*Ovis spp.*) (Avramenko et al., 2017)(E. Redman et al., 2019), Canguros rojos (*Macropus rufus*)(Lott et al., 2015), bisontes (*Bison spp.*) (Avramenko et al., 2018) y renos (*Rangifer tarandus*) (Davey et al., 2021).

La descripción del nemabioma es un tipo de análisis reciente, y ha sido aplicado mayoritariamente en ungulados, y otros herbívoros. A nivel mundial existen diversos estudios que describen la composición de nématodos gastrointestinales de cánidos a través de métodos tradicionales. Sin embargo, a la fecha no se encontraron registros de aplicación de secuenciación profunda de amplicones para el estudio de los nemátodos intestinales de cánidos. En este estudio se pretende describir la composición de nemátodos gastrointestinales (nemabioma) de los cánidos *C. latrans* y *C. familiaris* de Costa Rica, haciendo uso de la metodología de secuenciación profunda de amplicones.

2. JUSTIFICACIÓN

Se estima que el perro doméstico puede albergar al menos 51 especies de nemátodos parasíticos, de los cuales aproximadamente un 66% provienen de animales silvestres como coyotes, zorros, ratas, ungulados o mapaches (Weinstein & Lafferty, 2015). Este intercambio de parásitos con la vida silvestre ha sido potenciado por el ser humano, el cual ha transformado de manera drástica la mayor parte de los ecosistemas, introduciéndose cada vez más en los bosques y llevando consigo animales domésticos como los perros. Como resultado de estos cambios, muchas especies silvestres, principalmente grandes depredadores, han sido eliminadas de sus áreas de distribución original. Sin embargo, la distribución de especies oportunistas como el coyote se ha ampliado con la desaparición o disminución de las poblaciones de grandes depredadores como el jaguar (*P. onca*) y el puma (*P. concolor*) (Ramírez & León, 2015). Es por esto que cobra importancia evaluar cualitativa y cuantitativamente las comunidades de parásitos circulantes en los coyotes, con el fin de dilucidar el riesgo de transmisión de nemátodos a cánidos domésticos. Lo anterior permitiría además estimar la distribución diferenciada de especies y genotipos dentro de los hospederos caninos y en sus respectivos rangos geográficos, tal como se ha descrito para otros nemátodos de perros, por ejemplo *S. lupi* (Rojas, Dvir, et al., 2018) y el agente zoonótico *Onchocerca lupi* (Rojas et al., 2021). Cabe destacar, que una clara caracterización de los agentes parasíticos de estas especies parásitas caninas y su distribución permitirá estimar de manera indirecta el riesgo de infección por agentes zoonóticos a seres humanos.

En Costa Rica se conoce muy poco acerca de las infecciones parasitarias que afectan a animales silvestres como el coyote, y los estudios desarrollados a la fecha (Niehaus et al., 2012) han abordado el tema a través de metodologías tradicionales de parasitología. El abordaje de este tema a través de técnicas de secuenciación de nueva generación permitirá un grado mayor de especificidad y sensibilidad en la detección de las especies de nemátodos que afectan a los cánidos costarricenses, así como la obtención de datos de diversidad genética parasitaria.

Este proyecto atiende las necesidades nacionales e internacionales de conservación de vida silvestre y las políticas de “Una Salud” planteadas por la Organización Mundial de la Salud, con el fin de garantizar la salud óptima de todos sus componentes y prevenir brotes infecciosos por agentes zoonóticos emergentes y reemergentes (Regional Office for Europe,

2022). A través de una colaboración transdisciplinaria y multisectorial del estudio de los parásitos que afectan la vida humana, animales domésticos y silvestres, se analizará el impacto de la interconexión entre personas, animales y sus ambientes compartidos.

3. HIPOTÉISIS DE TRABAJO

Existe una alta diversidad de especies y genotipos de nemátodos gastrointestinales en los coyotes y perros que habitan Costa Rica.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar las comunidades de nemátodos gastrointestinales en perros (*Canis familiaris*) y coyotes (*Canis latrans*) del Área de Conservación Central y Guanacaste, Costa Rica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar las especies de nemátodos gastrointestinales presentes en perros y coyotes del área de conservación central y Guanacaste de Costa Rica, respectivamente.
2. Estimar la frecuencia de los nemátodos gastrointestinales en los coyotes y perros de las Áreas de Conservación Guanacaste y Central de Costa Rica.
3. Evaluarla relación de variables demográficas y biológicas con la frecuencia de nemátodos gastrointestinales en coyotes y perros
4. Analizar la variabilidad genética y los genotipos de cada especie de nemátodo gastrointestinal encontrado.
5. Comparar la diversidad ecológica de nemátodos gastrointestinales de acuerdo con sitio de muestreo y especie de cánido hospedero

5. METODOLOGÍA

5.1 Área de estudio

El Área de Conservación Central (ACC) se ubica en la parte central del país y abarca la totalidad de la Reserva de Biosfera Cordillera Volcánica Central (declarada en 1988) y parcialmente las Reservas de Biosfera La Amistad (1982), Agua y Paz (2007) y Savegre (2017). Es una cadena montañosa en la que sobresalen siete macizos volcánicos, siendo el de mayor altura el Volcán Irazú con 3432 metros sobre el nivel del mar (Sistema nacional de áreas de conservación de Costa Rica(SINAC), 2025). Las variaciones en topografía, precipitación y temperatura hacen de esta área una región de gran diversidad biológica, con tipos de vegetación que varían desde el bosque húmedo tropical, pasando por el bosque pluvial montano bajo; hasta el pluvial subalpino o páramo de vegetación de baja estatura en el Volcán Irazú. Cabe destacar que las áreas protegidas dentro de la ACC son las áreas naturales más cercanas y accesibles al Valle Central, y con ello a la mayoría de la población del país (Magalli Castro-Álvarez, 2019). En este estudio se visitaron los siguientes parques nacionales de la ACC:

- Parque Nacional Volcán Irazú-Sector Cráteres
- Parque Nacional Volcán Irazú-Sector Prusia
- Parque Nacional Tapantí Macizo de la Muerte-Sector La Esperanza
- Parque Nacional Volcán Turrialba

El Área de Conservación Guanacaste (ACG) se ubica al noroeste de Costa Rica en la provincia de Guanacaste entre el mar Pacífico y la Cordillera de Guanacaste. El ACG comprende varias áreas silvestres protegidas con una extensión de 163,000 ha., las cuales incluyen el Parque Nacional Santa Rosa, Parque Nacional Guanacaste, Parque Nacional Rincón de la Vieja, Refugio Nacional de Vida Silvestre Junquillal y la Estación Experimental Forestal Horizontes (United Nations Educational, 2025).

El ACG contiene cuatro diferentes ecosistemas: marino/costero bosque seco, bosque tropical, bosque nuboso y bosque lluvioso (Sistema Nacional de Área de Conservación (SINAC), 2016) . Destacan los bosques secos, pues en la ACG son la mayor y única muestra

de este tipo de bosque que se encuentra desde México hasta Panamá (United Nations Educational, 2025). El clima es cálido con dos estaciones, un periodo seco que va de diciembre a abril y un periodo lluvioso ubicado entre mayo a noviembre. Presenta una gran biodiversidad encontrándose aproximadamente 335.000 especies de organismos terrestres, lo que equivaldría a un 2.6 % de la biodiversidad mundial (United Nations Educational, 2025) Alrededor de 500 especies de aves, 40 especies de murciélago y cuatro de las seis especies de felinos que se encuentran en Costa Rica. Adicionalmente, abarca una biodiversidad extraordinaria de invertebrados, con 20 000 especies de escarabajos, 13 000 especies de hormigas, abejas y avispa y 8000 especies de mariposas (Janzen & Hallwachs, 2019) . En esta investigación se visitaron para la colecta de muestras de coyotes el Parque Nacional Santa Rosa y Parque Nacional Guanacaste.

5.2Recolección de muestras

La recolección de muestras fecales de coyotes se realizó de marzo a diciembre del año 2021, en diferentes parques nacionales del ACG y el ACC de Costa Rica. La recolección de muestras contó con la colaboración del Instituto de Conservación y Manejo de Vida Silvestre (ICOMVIS) y los guardaparques de las áreas silvestres protegidas. Los sitios de muestreo se listan en el Cuadro 1:

Cuadro 1. Parques nacionales visitados para la recolección de muestras de coyotes

Área Silvestre	Coordenadas	Área de Conservación
Parque Nacional Volcán Irazú-Sector Cráteres	9.97691, -83.84959	ACC
Parque Nacional Volcán Irazú-Sector Prusia	9.95376, -83.88082	ACC
Parque Nacional Tapantí Macizo de la Muerte-Sector La Esperanza	9.68535, -83.87586	ACC
Parque Nacional Volcán Turrialba	10.01689, -83.76329	ACC
Parque Nacional Santa Rosa-Sector Santa Rosa	10.83816, -85.70458	ACG
Parque Nacional Guanacaste	10.96572, -85.47422	ACG

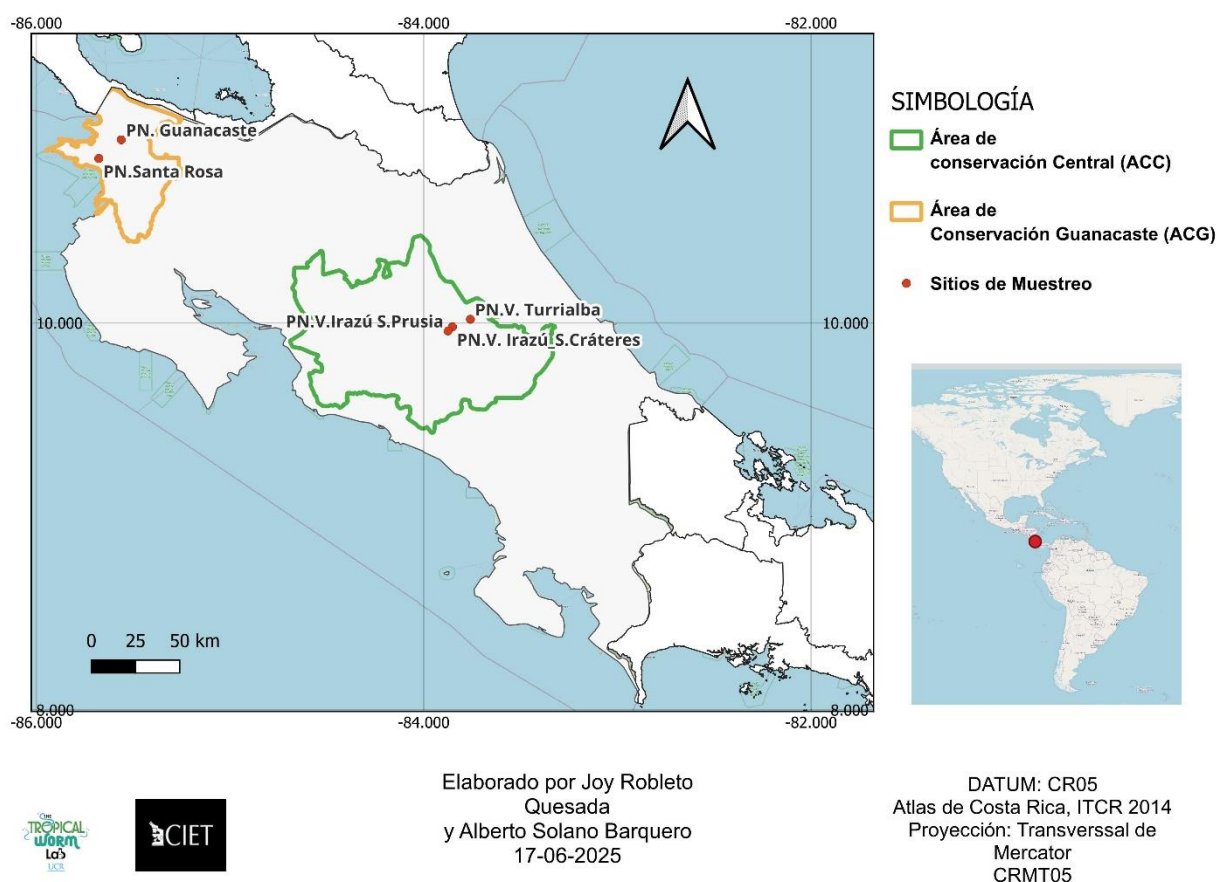


Figura 1. Mapa de sitios visitados para el muestreo de heces de coyote. Se observa en amarillo el Área de Conservación Guanacaste (ACG) y en verde el Área de Conservación Central (ACC). Los puntos rojos indican cada uno de los parques nacionales visitados, con su respectivo nombre.

Cada una de las áreas silvestres protegidas fue visitada al menos una vez durante el período de estudio. La identificación y selección de los senderos para la recolección de heces se basó en registros previos de presencia de coyotes, por ejemplo, avistamientos, documentación con cámaras trampa y huellas. Debido a que en los sitios de muestreo coexisten otros depredadores como zorros grises (*U. cinereoargenteus*) y ocelotes (*Leopardus pardalis*), e incluso perros en algunas ocasiones, la inclusión de cada muestra se basó en criterios morfológicos previamente descritos en la literatura para la identificación de heces de coyote, tales como: forma cónica, diámetro entre 2 y 3 cm, longitud entre 8 y 10

cm, y restos de pelo, plumas o fragmentos óseos (Lukasik & Alexander, n.d.; Niehaus et al., 2012). Las heces altamente resacas o con escaso material fecal fueron consideradas no aptas para el análisis genético y fueron descartadas. Las muestras aptas para el análisis se recolectaron en recipientes estériles, y se rotularon con la fecha y sitio de recolección. Posteriormente, las muestras fueron transportadas al laboratorio en un periodo de menos de 24 horas y congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

La recolección de muestras de perros domésticos fue realizada con el apoyo por parte del grupo de trabajo del Laboratorio de Parasitología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (UNA). En las comunidades visitadas se identificaron perros con hábitos forrajeros, es decir, que deambularan libremente pero que tuvieran vínculo con una persona. A los propietarios de los respectivos perros se les solicitó el consentimiento para realizar una toma de muestra sanguínea (obtenida por los médicos veterinarios de la UNA) y se les recolectó información básica como el sexo y edad aproximada del perro. Para las muestras de heces, se les entregó a los dueños el frasco estéril para que los propietarios pudieran recolectar una muestra recién defecada en un plazo de 24 horas. En los casos en que no fue posible recolectar una muestra reciente, se les pidió indicar la ubicación de heces frescas con menos de 24 horas de dicho perro para coleccionar. Las comunidades visitadas se listan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Comunidades visitadas para la recolección de muestras de perros

Área Silvestre	Coordenadas	Área de Conservación
Bagatzi	10.40242, -85.31308	ACG
Quebrada Grande	10.430889, -84.94486	ACG
Cuajiniquil	10.94319, -85.68531	ACG
Finca Rosa María	10.7943, -85.5556	ACG
Colonia Bolaños	10.97637, -85.63693	ACG
Guarumos de Turrialba	10.0046, -83.77724	ACC
San Rafael de Irazú	9.95655, -83.7952	ACC
Mata de Plátano	9.95178, -84.02123	ACC*

* A pesar de que administrativamente la comunidad de Mata de Plátano pertenece al ACC, para efectos de este estudio será considerada como un sitio de muestreo independiente. Esto debido a que los perros muestreados en este sitio tenían hábitos domiciliarios, permaneciendo dentro de las viviendas en comparación a las otras comunidades. No obstante, en esta comunidad también se han observado coyotes, por lo cual se recolectaron del ambiente muestras que cumplieran con las características descritas en anterioridad para la identificación morfológica de heces de coyote.

5.2 Análisis microscópico de las muestras

Antes del procesamiento, las muestras de heces fueron retiradas del congelador y se procedió inmediatamente a raspar en distintas zonas de cada muestra. Se utilizó un bisturí para desprender fragmentos de la muestra hasta alcanzar 0.250 g, los cuales fueron colocados en tubos de 2 ml para posteriormente realizar la extracción de ADN. El resto de la muestra fue descongelada, y con una paleta de madera se tomó aproximadamente la mitad del contenido, el cual fue homogeneizado en 30 ml de Tampón de Fosfatos Salino (PBS), por sus siglas en inglés) estéril. Seguidamente se procedió a filtrar la muestra utilizando una gaza, para así obtener la materia fecal en solución, separada de los restos óseos y de pelaje.

A partir de esta solución de la materia fecal se realizó sedimentación por centrifugación. La suspensión de heces se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm, se descartó el sobrenadante y se tomaron unas gotas del sedimento con un palillo de madera que se mezclaron con una gota solución salina en un portaobjetos y Lugol. Finalmente, se colocaron un cubreobjetos a ambas gotas y se observaron al microscopio bajo los objetivos de 10X y 40X (Castro & Guerrero, 2010).

5.3 Conservación y extracción de ADN de las muestras

Como se describió anteriormente, aproximadamente 0.250 g de cada muestra de heces fueron colocados en un tubo de 2 ml y congelados a -20 °C. A partir de este material se realizó la extracción de ADN total con el kit “QIAamp DNA Stool mini”® (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) modificado:

Inicialmente, se agregó 1 ml del reactivo Inhibex al tubo que contenía la muestra, y se mezcló en vortex. Se incubó durante 15 minutos a 95°C, y enseguida se mezcló en vortex.

Luego, se incorporaron cinco perlas de vidrio estériles a cada tubo y se sometieron a agitación continua en vórtex durante 10 minutos ininterrumpidos, con el objetivo de facilitar la ruptura mecánica de los huevecillos de helmintos, como se recomienda en Waeyenberge et al. (2019)(Waeyenberge et al., 2019). Posteriormente se centrifugaron los tubos a máxima velocidad (15,000 rpm aproximadamente) durante 1 minuto. Se tomaron 200 µl del sobrenadante del paso anterior y se mezclaron con 200 µl de Buffer AL, y 15 µl de proteinasa K, incubando esta a 70 °C durante 10 minutos. Al finalizar la incubación, se agregó 200 µl de etanol absoluto, se mezclaron y el contenido total fue colocado en la columna provista por el kit. Se centrifugó a 15000 rpm por un minuto y el eluido fue descartado. Se realizaron dos pasos de lavado, para el primero se agregaron 500 µl de Buffer AW1 a la columna, y se centrifugó por un minuto, luego se descartó el eluido. El segundo lavado se realizó agregando 500 µl de Buffer AW2 a la columna centrifugando por un minuto y descartando el eluido. Finalmente, para la elución del ADN, se agregaron 100 µl de Buffer AE a la columna, se incubó por dos minutos y se centrifugó. Este paso fue repetido una vez más, para obtener un eluido total de 200 µl de solución que contenía el ADN extraído. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de ADN y se evaluaron los índices de pureza a través del equipo Nanodrop. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta la continuación de los análisis.

5.4 Confirmación de la identidad de la muestra

Para confirmar que las muestras recolectadas de las áreas de conservación efectivamente eran muestras provenientes de coyotes se realizó un procedimiento combinado que incluyó dos técnicas, un análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP por sus siglas en inglés) y posteriormente una secuenciación de un fragmento del gen 12S del ARN ribosomal.

Para ejecutar la técnica de RFLP se amplificó una región del gen citocromo B (*cytb*) de 234 pares de bases (pb) mediante una PCR, siguiendo el protocolo descrito por (Bidlack et al., 2007). Se utilizaron 2 µl de ADN diluido a una razón de 1:50, en una reacción total de 20 µl. La reacción total se compuso además de 10 µl de DreamTaq HotStart PCR Master Mix (Thermo Fisher, Massachussets, E.U.A), 6 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl del primer CanidL1 y 1 µl del primer HCarn200, para una concentración final de 0.5 µM de cada primer. Dichos primers amplifican fragmentos del *cytb* de un grupo de carnívoros norteamericanos

entre los que se encuentran coyotes, zorras grises y pumas. El programa de PCR consistió en un ciclo de 94 °C durante 2 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C durante 1 min, 54 °C por 1 min y 72 °C por 2 min. Todas las reacciones de PCR incluyeron al menos un control negativo para monitorear la contaminación. Y un control de muestras conocida de coyote y perro respectivamente.

Para verificar la correcta amplificación del ADN se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1%, agregando el fluoróforo GelRed (Biotium, San Francisco, E.U.A) en una razón de 1 µl por cada 10 ml de solución de agarosa. La corrida se efectuó a 90 V durante 30 minutos. Además, se utilizó un marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher, Massachussets, E.U.A) en cada corrida.

Se consideraron amplificaciones exitosas aquellas en la que el control negativo se encontrase sin amplificación, y las bandas correspondientes a los amplicones presentaran el tamaño esperado (234 pb). Seguidamente se realizó la digestión de los productos amplificados, tomando 9 µl del amplificado y agregando 0.5 µl del Buffer R (Thermo Fisher, Massachussets, E.U.A) y 0.5 µl de la enzima TruII (Thermo Fisher, Massachussets, E.U.A) a una concentración de 10 U/µl. Dicha reacción se colocó en el termociclador para ser incubada a 65 °C durante 8 horas. Posteriormente se realizó una electroforesis de los productos digeridos en geles al 2% de agarosa, agregando el fluoróforo GelRed (Biotium, San Francisco, E.U.A) en una razón de 1 µl por cada 10 ml de solución de agarosa. La corrida en este caso se llevó a cabo a 100 V durante 1 hora. Además de los productos digeridos, se colocó en el gel un marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher, Massachussets, E.U.A) en cada corrida.

Dado que en el artículo de Bidlack et al., 2007 se emplea una enzima distinta a TruII, y considerando que el ensayo fue desarrollado para carnívoros norteamericanos, se realizó el ensayo *in silico* a través de la herramienta en línea Benchling, utilizando secuencias de carnívoros que podrían encontrarse en los sitios de muestreo y que potencialmente podrían confundirse sus excretas con las de coyotes. Para este proceso se utilizaron las secuencias del genoma mitocondrial, o en su defecto secuencias que contuvieran el gen *cytb*, obtenidas en GenBank la base de datos del Centro de Información en Biotecnología de los Estados Unidos (NCBI por sus siglas en inglés). Luego, se modeló en el programa la unión de los primers a dichas secuencias y posteriormente se procedió a realizar la digestión virtual de los productos

amplificados usando la enzima TruII. En este ensayo se utilizaron las siguientes secuencias: *C. latrans* (accesión: NC_008093.1), *U. cinereoargenteus* (accesión: NC_026723.1), *C. familiaris* (NC_002008.4), *L. pardalis* (NC_028315.1), *P. concolor* (NC_016470.1), *P. onca* (NC_022842.1). Como se observa en la figura 2 una vez modelado el ensayo se obtuvieron los siguientes patrones de bandas: para el caso de *C. latrans* la enzima realiza un corte de 15 pb, resultando además un fragmento de 219pb. En *U. cinereoargenteus* ocurre de igual manera a *C. latrans*, la secuencia de *C. familiaris* es cortada en un fragmento de 177pb uno de 42 pb, y uno de 15 pb. El producto digerido del amplicón de ocelote (*L. pardalis*) tiene una banda de 192 pb, una de 33 pb y una de 9 pb; el puma (*P. concolor*) resulta en un patrón igual al de *C. familiaris* (177 pb, 42 pb, y 15 pb); y por último para los jaguares (*P. onca*) se obtiene un patrón con una banda de 122 pb y otra de 112 pb.



Figura 2. Digestión virtual de la secuencia del gen de *cytb* con la enzima TruII de distintos carnívoros presentes en Costa Rica. De izquierda a derecha: Escalera, 1. *C. latrans* 2. *U. cinereoargenteus* 3. *C. familiaris*. 4. *L. pardalis* 5. *P. concolor* 6. *P. onca*

Es de notar que para coyotes y zorras grises se obtiene un mismo resultado con el ensayo RFLP, por lo que la identificación morfológica a la hora de la colecta es de vital importancia. De esta manera, al tomar en cuenta los parámetros de tamaño y características de las heces de coyotes se evita incluir en el estudio las heces de animales más pequeños como lo son las zorras grises y que por ende tendrán un tamaño de heces con un diámetro y longitud menor. Además, se realizó la secuenciación masiva del gen del 12S del ARN ribosomal de vertebrados, con el objeto de confirmar la identificación de especie. Mediante el uso de un análisis de *metabarcoding* del gen 12S se puede identificar no solo la dieta del carnívoro sino también se confirma la especie hospedera al obtener una mayoría de secuencias de este (Roffler et al., 2021). De esta manera se logra identificar muestras provenientes de *U. cinereoargenteus* y otros carnívoros como los antes mencionados (pumas, jaguares, ocelotes, entre otros). Sin embargo, este ensayo tiene la limitante de que no puede discernir entre las diferentes especies del género *Canis*, por lo cual no se puede prescindir del estudio mediante RFLP para la identificación de la especie hospedera o se correría el riesgo de identificar muestras provenientes de perros como coyotes, y viceversa.

Para el estudio del gen del 12S se utilizaron los primers y protocolos descritos en (Roffler et al., 2021) y (Massey et al., 2021). Se realizó una PCR para amplificar un fragmento de aproximadamente 100 pb del gen del ARN 12S del ribosoma. Cada muestra fue amplificada por triplicado, y cada réplica recibió un índice único constituido por 8 pb incluidas en el primer forward y reverse. Se incluyeron además tres controles negativos por cada placa de 96 pocillos. El PCR se realizó en reacciones de 20 μ l que consistieron en 10 μ l de Amplitaq Gold 360 Master Mix (Thermo Fisher, Massachusetts, E.U.A), 2.5 μ l de cada primer (concentración final de 0.25 μ mol/L), 4 μ l de agua libre de nucleasas y 2 μ l de los respectivos extractos de ADN y controles negativos de PCR, según correspondiese. El perfil térmico utilizado consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 98°C durante 20 s, 58 °C durante 15 s, 72 °C durante 30 s y una última extensión a 72°C por 1 min. Terminado el PCR se cuantificó la concentración de ADN de los productos amplificados de cada pocillo usando un ensayo fluorescente con un lector de microplacas con AccuBlue dsDNA Kit de cuantificación (Biotium, Hayward, California, E.U.A), a continuación, se normalizó cada muestra de manera que todos los pocillos tuviesen la misma concentración de ADN que el promedio. Después de la normalización, 3 μ l de cada muestra

por placa de 96 pocillos se combinó en un tubo Eppendorf de 0.65 ml. Seguidamente se utilizó el kit NEBNext Ultra IKit de preparación de bibliotecas (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, E.U. A) para adecuar las mezclas (llamadas usualmente *pools*) de productos de PCR en una sola biblioteca de secuenciación Illumina. En este paso se agregó a cada biblioteca un índice único de 6 pb.

Seguidamente las bibliotecas fueron mezcladas en un solo tubo, el cual fue purificado utilizando inmovilización reversible en fase sólida (SPRI *por sus siglas en inglés*) utilizando perlas paramagnéticas (Aline Biosciences, Woburn, Massachusetts, EE. UU.). Luego el producto fue cuantificado mediante un fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), y normalizado antes de ser enviado para secuenciación tipo “pair-end”, de 150 pb en un Illumina Next Seq 2000 en el Centro para la Investigación Genómica y Biocomputación, de la Universidad Estatal de Oregón (OSU *por sus siglas en inglés*). En este centro se verificó el tamaño de la biblioteca final a través de electroforesis capilar “High Sensitivity D5000 DNA ScreenTape assay” en el equipo Agilent TapeStation 4200 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) y luego, se mezclaron las bibliotecas por corrida junto con el control interno PhiX (25% *spike in*) y se corrieron en el secuenciador utilizando un kit P1 (300 ciclos, 100 millones de *reads*, Illumina) según indicaciones del fabricante.

Una vez obtenidas las secuencias sin procesar se analizaron utilizando PEAR (Paired-End reAd merger, por sus siglas en inglés) (Zhang et al., 2014), una herramienta bioinformática diseñada para emparejar lecturas *forward* y *reverse*, recortar y “demultiplexar”, es decir, identificar cada réplica de PCR en función de su correspondiente índice de 8 pb. Las secuencias de cada muestra que tuviesen 100% de similitud se agruparon y se asignaron taxonómicamente a la especie correspondiente usando la herramienta BLAST para comparar contra secuencias del 12S de vertebrados en la base de datos *GenBank*, esto mediante la herramienta bioinformática LocaTT (Goodwin & Levi, 2024). De manera similar a los pasos utilizados por (De Barba et al., 2014) se llevó a cabo una serie de medidas de filtrado y control de calidad en las secuencias asignadas taxonómicamente. Para este ensayo no se tomaron en cuenta los taxones correspondientes a la dieta del cánido en estudio, sino únicamente las secuencias que se identificaron como *C. latrans* o en su defecto del carnívoro

correspondiente a la muestra. Además, las secuencias detectadas en menos de 1% del total de secuencias por muestra fueron considerados contaminación.

5.5 Identificación de individuos de *Canis latrans*: Genotipo mediante SNPs

Las muestras recolectadas en las áreas de conservación y confirmadas como provenientes de *C. latrans* mediante el método descrito en la sección 5.4 fueron incluidas en el estudio, mientras que aquellas provenientes de otros carnívoros fueron excluidas. A las muestras de *C. latrans* se les realizó los análisis de su composición de nemátodos gastrointestinales.

Asumir que cada muestra corresponde a un individuo implica un sesgo de sobremuestreo. Esto debido a que al ser muestras recolectadas del ambiente podría suceder que un mismo coyote haya defecado en el área más de una vez, incluso en diferentes días, por lo que al momento de la recolecta se estarían incluyendo varias muestras de un mismo individuo. Para disminuir los efectos de este sesgo, las muestras confirmadas como *C. latrans* fueron sometidas a un análisis de genotipo por secuenciación (GBS *por sus siglas en inglés*) el cual utiliza múltiples polimorfismos de un solo nucleótido (SNP *por sus siglas en inglés*) secuenciados en una plataforma de secuenciación de nueva generación.

El protocolo seguido fue el descrito por Eriksson et al., 2020; y comenzó con una reacción de PCR que tuvo como objetivo amplificar 48 regiones de 120 pb en las cuales se ha identificado un SNP, y un par de *primers* adicionales que flanquean una región del gen SRY que permite determinar el sexo del individuo en estudio. Para la ejecución de la reacción primeramente se colocaron 2 μ l (concentración final de 0.2-0.3 μ M) de cada par de *primers* específico para flanquear los distintos locus donde existan los SNPs. Se agregaron también 10 μ L de Amplitaq Gold Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, E.U.A), 7 μ L de agua y 1 μ L de ADN de cada muestra respectivamente, para un volumen total de 20 μ l. Las condiciones de termociclado de la PCR utilizadas fueron: Una desnaturalización inicial de 10 min a 95°C, luego 45 ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, seguido de una extensión final de 7 min a 72 °C. Se realizaron triplicados de cada reacción de PCR y se incluyeron tres controles negativos de PCR por cada placa de 96 pozos. Además, se procesó también un control de extracción, es decir un tubo al que se le realizó todo el proceso de extracción, pero en vez de utilizar una muestra se colocó agua libre de nucleasas,

esto con el fin de evaluar la posible contaminación cruzada entre muestras durante el proceso de extracción de ADN. Los productos de PCR se limpiaron con perlas paramagnéticas utilizando PCRClean DX (Aline Biosciences, Woburn, Massachusetts, E.U.A) en un volumen de reacción de 1.8x, con el objetivo de eliminar cualquier secuencia de menos de 120 pb (dímeros de *primers*, deoxinucleótidos fosfato- dNTP no incorporados). Los productos de PCR limpios se eluyeron en 40 μL de agua libre de nucleasas, causando una dilución doble pues el volumen de la reacción de PCR fue de 20 μl .

A partir de los productos purificados se ejecutó una segunda PCR, en la cual se utilizaron 11 μL de los productos purificados de la primera PCR como molde para las nuevas reacciones. Esta segunda PCR tuvo un volumen total de 27.5 μL con 2 μL (concentración final de 0.7 μM) de cada uno de los primers que forman una combinación única de los índices P7 y P5, lo que permite identificar cada reacción, y finalmente se agregaron 12.5 μL de polimerasa de ADN Q5 (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, E.U.A). El perfil térmico utilizado en este caso fue de 98°C durante 30s, 8 ciclos de 98 °C durante 10 s, 55 °C durante 30 s, 65 °C durante 30 s, y una extensión final de 5 min a 65°C.

Para garantizar una profundidad de secuenciación uniforme en todas las muestras, se cuantificó la concentración de ADN utilizando un lector de microplacas de fluorescencia con el kit de cuantificación AccuBlue dsDNA (Biotium, Hayward, California, E.U.A) y se normalizó cada muestra en consecuencia. Después de la normalización, 3 μL de cada muestra por placa de 96 pocillos se agrupó en un único tubo Eppendorf de 0.65 ml. Luego se realizó una segunda ronda de limpieza con perlas paramagnéticas. Posterior a la limpieza se cuantificó cada tubo usando un fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, California, E.U.A), se normalizó entre cada tubo y se agruparon los tubos en una sola biblioteca final, la cual fue enviada para secuenciación tipo “pair-end” de 150 pb en un Illumina NextSeq 2000, en el Centro para la Investigación Genómica y Biocomputación de OSU. En este centro se verificó el tamaño de la biblioteca final a través de electroforesis capilar “High Sensitivity D5000 DNA ScreenTape assay” en el equipo Agilent TapeStation 4200 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, E.U.,A) y luego, se mezclaron las bibliotecas por corrida junto con el control interno PhiX (25% *spike in*) y se procesaron en el secuenciador utilizando un kit P1 (300 ciclos, 100 millones de reads, Illumina) según indicaciones del fabricante.

Una vez obtenidas las secuencias se procedió a realizar el análisis bioinformático de las mismas, el cual comenzó asignando las lecturas de secuenciación sin procesar o “raw reads” a las muestras individuales correspondientes en función de su combinación de índices únicos (P5 y P7), lo que se llevó a cabo utilizando en el software Illumina (bcl2fastq). Seguidamente se utilizó un *script* con las indicaciones para que a través de la línea de comandos de Linux se lograra asignar un locus a cada secuencia en función de la secuencia del primer *forward*, y luego se hizo coincidir cada secuencia con una sonda *in-silico* específica dirigida a una región que rodea inmediatamente al SNP (6 pb en ambas direcciones). Solo las secuencias que incluyeron tanto el primer *forward* como la sonda *in-silico* fueron tomadas en cuenta para producir los genotipos. Aquellas muestras en las que se perdiese más del 80% de los loci en este paso fueron descartadas. Luego de aplicado este filtro, se contó el número de secuencias que contenían cualquiera de los alelos, y se obtuvo la proporción del alelo 1 frente al alelo 2, para cada locus, y con la proporción obtenida para los 48 locus se construyeron los genotipos, esto mediante el software GTseq_Genotyper_v3.pl. En breve, los parámetros que utiliza este software son: una proporción mayor a 10 se denomina homocigoto para el alelo 1, mientras que una proporción menor a 0.1 sería homocigoto para el alelo 2 y una proporción menor a 2 y mayor a 0.1 se denomina heterocigota.

Previo a generar la identificación de individuos se aplicaron ciertos filtros de calidad a los diferentes SNPs, primero se eliminaron aquellos SNPs que tuviesen un nivel de fallo en las muestras mayor que un umbral establecido por 2 desviaciones estándar por encima del promedio de fallo de todos los SNPs y también se eliminaron SNPs monomórficos (SNPs en los cuales se presentó el mismo genotipo en todos los coyotes). Con los SNPs que cumplieron los criterios anteriores se construyeron genotipos consenso para cada muestra en base a los tres replicados. Para ello se establece que un genotipo es heterocigoto si estuvo presente en al menos dos de las tres repeticiones, y en las tres repeticiones para un genotipo homocigoto. Se conservaron aquellas muestras donde hubiese al menos 30 loci que produjeran un genotipo consenso entre los tres replicados. Finalmente se utilizó el paquete de R “allelematch” para identificar individuos únicos a partir de los genotipos obtenidos (Eriksson et al., 2020).

5.6 Preparación de bibliotecas y secuenciación del gen *cox1*

Para describir la composición parasitaria se utilizó el gen del *cox1* como marcador genético. Para ello se realizó la amplificación mediante una PCR usando los primers JB3 (*primer forward*) (Bowles et al., 1992) y JB5 (*primer reverse*) (Derycke et al., 2010). Estos primers fueron modificados a partir de un par de primers originalmente descritos para la identificación de *Echinococcus spp.* (Bowles et al., 1992), pero que a lo largo de los años han sido ampliamente usados para la identificación de nématodos. Usar *cox1* como marcador genético ofrece la ventaja de ser un marcador que posee la suficiente variación genética para la identificación a nivel de especie. Además, existe una gran cantidad de secuencias disponibles en la base de datos de GenBank, lo que favorece la clasificación taxonómica. Otra ventaja del *cox1* es que es haploide, por lo que los haplotipos se pueden determinar inequívocamente. También es ventajoso que al ser ADN mitocondrial no se recombina, lo que simplifica el análisis (Bowles et al., 1992; Chan et al., 2021).

Este análisis fue ejecutado en la totalidad de las muestras, es decir, tanto las muestras de *C. familiaris* como las muestras de *C. latrans*. El PCR utilizó 1 μ L (concentración final de 0.5 μ M) de cada uno de los primer JB3 y JB5, respectivamente; 10 μ L de Amplitaq Gold Máster Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, E.U.A), 7 μ L de agua y 1 μ L de ADN de cada muestra respectivamente, para un volumen total de 20 μ l. Se procesan además tres controles negativos por cada placa de 96 pocillos, y también un control de extracción para evaluar la posible contaminación cruzada entre muestras durante el proceso de extracción de ADN. Las muestras fueron procesadas por duplicado. Los *primers* utilizados en este paso contienen los adaptadores de Illumina i5 e i7, los cuales no se unen a la secuencia a amplificar sino que quedan colgando en los extremos del producto amplificado, y sirven de base para unir los primers que contienen los índices que identifican las muestras en una segunda PCR. El programa consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, 5 ciclos de 94°C por 30 s; 54°C por 30 s y temperatura decreciente con 1°C por cada ciclo; 72°C durante 30 s, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s; 50°C por 30 s; 72°C por 30 s, y una extensión final de 10 min a 72°C (Derycke et al., 2010).

A continuación, se realizó una limpieza con perlas paramagnéticas de cada placa de PCR utilizando PCRClean DX (Aline Biosciences, Woburn, Massachusetts, E.U.A) en un volumen de reacción de 1.8x. Los productos PCR limpios se eluyeron en 40 μ L de agua libre

de nucleasas. Seguidamente a partir de los productos de purificado se ejecutó una segunda PCR, en la cual se utilizaron 11 μL de los productos purificados de la primera PCR como molde para las nuevas reacciones. Esta segunda PCR tuvo como volumen total 27.5 μL que contenían 2 μL (concentración final de 0.7 μM) de cada uno de los *primers* que forman una combinación única de los índices P7 y P5, lo que permite identificar cada reacción, y finalmente se agregaron 12.5 μL de polimerasa de ADN Q5 (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, E.U.A). El perfil térmico que se utilizó consistió en una desnaturalización inicial de 98°C durante 30s, 8 ciclos de 98 °C durante 10 s, 55 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, y una extensión final de 5 min a 65°C.

En el siguiente paso se cuantificó la concentración de ADN utilizando un lector de microplacas de fluorescencia con el kit de cuantificación AccuBlue dsDNA (Biotium, Hayward, California, E.U.A) y se normalizó cada muestra en consecuencia. Después de la normalización, 3 μL de cada muestra por placa de 96 pocillos se agruparon en un único tubo Eppendorf de 0.65 ml. Luego se realizó una segunda ronda de limpieza con perlas paramagnéticas. Posterior a la limpieza se cuantificó cada tubo usando un fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, California, E.U.A), se normalizó entre cada tubo y se agruparon los tubos en una sola biblioteca, la cual fue enviada para secuenciación tipo “pair-end” de 300 pb en un Illumina MiSeq, en el Centro para la Investigación Genómica y Biocomputación de OSU. En este centro se verificó el tamaño de la biblioteca final a través de electroforesis capilar “High Sensitivity D5000 DNA ScreenTape assay” en el equipo Agilent TapeStation 4200 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, E. U. A) y luego, se mezclaron las bibliotecas por corrida junto con el control interno PhiX (25% spike in) y se procesaron en el equipo utilizando un cartucho Miseq v3. (500 ciclos, 25 millones de reads, Illumina) según recomendaciones del fabricante.

5.7 Construcción de Base de datos de referencia

Los parásitos identificados en un análisis de secuenciación profunda de amplicones están determinados en gran parte por la base de datos usada como referencia de comparación. Por lo tanto, se necesitan bases de datos robustas y con altos estándares de calidad que se adecúen a los análisis. En esta investigación se cuenta con el antecedente de otros nematobios descritos en mamíferos, sin embargo, en dichos ensayos el marcador genético

utilizado fue principalmente el ITS1 (Avramenko et al., 2015, 2018; E. Redman et al., 2019) mientras que en esta investigación se utilizó el *cox1*. Además, los nemátodos estudiados en otros nemabiomas corresponden principalmente a estrombilídeos y especies de nemátodos pertenecientes al clado V (Avramenko et al., 2018; E. Redman et al., 2019), muy diferente a lo que se espera en el caso de coyotes y perros. Además, realizar la asignación taxonómica contra una base no depurada (Ej: BOLD o Genbank completa) generaría una serie de coincidencias no deseadas de especímenes que pueden encontrarse en la muestra y ser amplificados por los primers, pero que no son nuestro objeto de estudio, como es el caso de nemátodos de vida libre, plantas y especies del reino Fungi (Sikder et al., 2020). Debido a esto, se generó una base de datos personalizada para la asignación taxonómica de las secuencias halladas.

La construcción de una base de datos personalizada se realizó adaptando el procedimiento descrito por Robeson et al., 2021; comenzando con la recopilación de datos accesibles públicamente a partir de la base *Barcode of Life Data System* (BOLD por sus siglas inglés) en su versión 4 (BOLD v4). Los datos fueron obtenidos utilizando el *script* para el lenguaje de programación R titulado “bold_datapull_byGroup.R” (O’Rourke et al., 2021). Este *script* permitió seleccionar y obtener todos los registros públicos *cox1* de BOLD que coincidiesen con una o varias categorías taxonómicas asignadas, en este caso se obtuvieron todos los registros correspondientes a especies en las categorías “Acanthocephala”, “Nematoda”, “Platyhelminthes”; de esta manera se obtuvieron todos los datos correspondientes a helmintos. Cabe destacar que este *script* solo extrae secuencias que posean su descripción taxonómica completa (dominio, reino, filo, clase, orden, familia, género, especie). El resultado de este *script* en R, es un par de archivos para cada grupo, que contienen:

- La secuencia de ADN e información taxonómica (usada para crear un archivo formato .fasta).
- Metadatos que incluyen los registros del identificador de secuencia, el número de accesos de Genbank, el país de origen y la institución de origen, entre otros.

Los respectivos archivos de secuencia y metadatos fueron unificados en un solo documento, obteniéndose así un único par de documentos con la información de los 3 grupos

(filos). A continuación, mediante un *script* en R (Anexo 10.1) se realizaron algunos controles de calidad al archivo de secuencias y datos taxonómicos:

- Se verificó que en el proceso de importado de BOLD no se obtuvieran ID duplicados. Estos son datos que contienen exactamente las mismas secuencias, y exactamente la misma asignación taxonómicas, pero diferencias en algunos metadatos.
- Se eliminaron caracteres no aprobados por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) en las secuencias. Estos caracteres pueden provocar fallos en pasos posteriores. El *script* busca en cada secuencia y determina si contiene o no un carácter fuera del conjunto de caracteres IUPAC aceptado. Luego se descarta cualquier secuencia que contenga esas secuencias incorrectas y se genera un archivo final. Específicamente, los caracteres válidos son el conjunto: ('T', 'H', 'A', 'D', 'G', 'R', 'C', '!', 'S', 'M', 'B', 'N', '-', 'W', 'V', 'K', 'Y')

Una vez aplicados estos filtros de calidad el archivo con las secuencias resultantes fue importado al aplicativo QIIME2 (Bolyen et al., 2019). Los siguientes pasos consisten en la aplicación de filtros sensibles a estas secuencias en QIIME2 mediante las funciones del *plugin* RESCRIPT (Robeson et al., 2021) (ver *script* en Anexo 10.2):

- Eliminar secuencias con un alto número de secuencias ambiguas (N)
- Eliminar secuencias con un número excesivo de homopolímeros
- Eliminar secuencias extremadamente cortas o grandes (< 200 y >1600 pb)
- Eliminar secuencias redundantes (derreplicación)

Posteriormente la base de datos se recortó aún más hasta los límites que corresponden a las secuencias de los primers JB3 y JB5. El objetivo fue identificar las coordenadas donde los *primers* se alinean con las secuencias de referencia, luego se elimina cualquier nucleótido corriente arriba o corriente abajo fuera del par de *primers* de interés. Este recorte se realiza utilizando MAFFT (Katoh & Standley, 2013) (ver *script* en Anexo 10.3) en tres etapas: primero, el total de secuencias de referencia fue utilizado para crear un alineamiento de alta calidad con 'mafft—auto'; segundo, los *primers* se alinearon con este archivo de alineamiento con 'mafft—multipair—addfragments'; tercero, utilizando el archivo generado por el recurso '-mapout' se recortaron las secuencias alineadas con los *primers* dejando únicamente la región delimitada por los mismos. A continuación, se eliminaron los espacios vacíos (*gaps*) de las secuencias alineadas y luego se filtraron las secuencias por longitud nuevamente.

El archivo producido fue importado nuevamente a QIIME2 y allí se aplica una segunda estrategia de derreplicación, esto es necesario pues es posible que dos secuencias previamente diferentes sean idénticas dentro del límite recortado por los *primers*. El proceso de construcción de base de datos comenzó con 11829 secuencias de helmintos y su respectiva clasificación taxonómica completa, descargadas desde BOLD, y a este punto quedaron un total de 5035 secuencias de helmintos recortadas de acuerdo con el alineamiento de los *primers* específicos utilizados. De estas se filtró solo las secuencias del filo nematoda para los fines de esta tesis, para una base final de 396 secuencias de nemátodos. Finalmente, en QIIME2 se crea el archivo tipo “classifier” necesario para la asignación taxonómica (ver *script* en Anexo 10.4). Adicionalmente la base de datos generada también fue adaptada al formato necesario para realizar la comparación mediante BLAST con las secuencias obtenidas del *metabarcoding* del *cox1* a través de la herramienta LocaTT (ver *script* en Anexo 10.5)

5.8 Análisis bioinformático de la diversidad genética y estadística descriptiva de nemátodos

El análisis bioinformático fue realizado con computadoras locales y con el apoyo del cluster Kabré del Centro Nacional de Alta Tecnología (CENAT) para la operacionalización de las variables asociadas a la diversidad de los nemátodos presentes en las muestras de heces. Primero, las secuencias correspondientes a los tres replicados de cada muestra fueron concatenados en un único archivo por cada muestra. Seguidamente los archivos fueron importados a QIIME2, plataforma en la cual se realizó la mayoría del procesamiento bioinformático. En breve, utilizando el *plugin* “q2-demux” las lecturas de secuenciación sin procesar o “raw reads” fueron asignadas a las muestras correspondientes en función de su combinación de índices únicos, y se verificó la calidad de las lecturas obtenidas de cada muestra y de los controles por medio de la función “--qiime demux summarize”. Debido a un bajo nivel de calidad en las lecturas *reverse* se continuó trabajando únicamente con las secuencias *forward*. Para el *trimming* y control de calidad se cortaron las secuencias a partir de un Q score ≥ 30 , quedando así un corte en 226 pb. Posteriormente, el aplicativo DADA2 (v1.24) (Callahan et al., 2016) se utilizó para el filtrado, la derreplicación, la identificación

de quimeras, la concatenación y el agrupamiento de las secuencias en *Amplicon Sequence Variants* (ASV por sus siglas en inglés) (Kuczynski et al., 2011).

Solo las muestras con al menos 500 lecturas de uno o más ASVs fueron consideradas como amplificaciones verdaderas, el resto fueron separadas del análisis y consideradas como negativas por parásitos. Se verificó que todos los controles negativos estuvieran dentro de este grupo de “no amplificadas”. Seguidamente, se filtraron aquellos ASVs que se encontraban en cantidades que representasen menos del 1% de total de ASVs en la respectiva muestra, estos ASVs son considerados contaminantes por lo que son descartados (Roffler et al., 2021). Los ASVs que pasaron los filtros anteriormente descritos fueron utilizados para la asignación taxonómica, para lo cual las secuencias representativas de cada ASV se compararon contra la base de datos personalizada con el uso de la herramienta BLAST (Altschul et al., 1990) a través de la aplicación LocaTT. A cada ASV se le asignó una especie determinada cuando la identidad fue mayor o igual al 98% y el *query coverage* (QC) mayor a 99%. Aquellas secuencias que tuvieron una identidad menor o coincidencias con más de una especie se clasificaron como “Género sp.” o familia, dependiendo del caso. Además, para un panorama más amplio de los resultados los ASV filtrados también fueron comparados contra todas las secuencias públicamente accesibles en GenBank a la fecha (junio, 2024), de igual forma esta comparación fue hecha mediante BLAST en la aplicación LocaTT.

También se realizó la clasificación taxonómica en QIIME2 mediante el *plugin* “q2-feature-classifier” (2024.10.0) (Bokulich et al., 2018) y el *classifier* Naive Bayes pre-entrenado a partir de la base de datos personalizada. Todas las ASVs se alinearon con MAFFT (Kato, 2002) a través del *plugin* “q2-alignment” y se utilizaron para construir una filogenia con FastTree2 (Price et al., 2010) a través del *plugin* “q2-phylogeny”. Utilizando el *plugin* “q2-diversity” se calcularon las siguientes métricas de alfa diversidad: diversidad filogenética de Faith (Faith, 1992), equidad de Pielou (Herrmann et al., 2022) y diversidad de Shannon (Beck & Schwanghart, 2010). Mediante “q2-diversity” también se analizaron las métricas de diversidad beta: UniFrac ponderado (C. A. Lozupone et al., 2007), UniFrac no ponderado (C. Lozupone & Knight, 2005), y disimilitud de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957). Para las tres métricas las muestras fueron rarefactadas con el método “-core-metrics-phylogenetic” que submuestreó sin reemplazo a 500 secuencias por muestra. Para los análisis de alfa diversidad se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis pareada para la comparación entre

grupos (Kruskal & Wallis, 1952). En el caso de beta diversidad para comprobar si las distancias entre muestras dentro de un grupo (muestras del mismo cánido o del mismo sitio de muestreo), fueron más similares entre sí que con respecto a las muestras de otros grupos, se utiliza una prueba PERMANOVA (Anderson, 2001).

La filogenia de las secuencias encontradas para cada especie fue estudiada, para ello todas las secuencias fueron divididas por especie (*A. caninum*, *T. canis* y *S. lupi*) y fueron inspeccionadas y recortadas utilizando el software MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>) (Kumar et al., 2016). Las secuencias *cox1* de cada especie se alinearon junto con otras secuencias de su correspondiente especie provenientes de otras partes del mundo recuperadas de la base de datos GenBank (para ver lista de secuencias y metadatos utilizados en cada especie: Anexo 10.6). utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Las secuencias *cox1* se analizaron mediante inferencia bayesiana (IB) con un algoritmo filogenético. Primero, los mejores modelos de sustitución de nucleótidos se calcularon utilizando los criterios de IB en MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016) . Se seleccionó el modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (Hasegawa et al., 1985) para las secuencias de *A. caninum*, el modelo Tamura-Nei con sitios invariantes (TrN+I) (Tamura & Nei, 1993) para *T. canis* y el modelo HKY con distribución gamma (HKY+G) (Hasegawa et al., 1985) para *S. lupi*.

Los árboles filogenéticos se generaron utilizando el paquete *Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees* (BEAST v2.5) (Bouckaert et al., 2019), y el archivo de entrada en formato .xml se creó con *Bayesian Evolutionary Analysis Utility* (BEAUti v2.5) (Bouckaert et al., 2019) con 10^7 generaciones de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), un muestreo de cada 10^3 árboles y una longitud de *burn-in* del 10%. Se verificaron los *priors* del árbol con Tracer v1.7.2 (Rambaut et al., 2018), y los árboles fueron resumidos utilizando el software TreeAnnotator v1.10.4 (Helfrich et al., 2018.) y posteriormente visualizados con el programa FigTree 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Con el fin de evaluar las diferencias en el número de genotipos y especies en las dos especies de cánidos muestreados (coyote, y perro doméstico) y los diferentes hábitats (perros forrajeros y perros domiciliarios), así como para evaluar las diferencias por la zona geográfica de muestreo, se construyó una red de haplotipos Templeton-Crandall-Sing (TCS) para

determinar las relaciones filogenéticas del gen *cox1* en las diferentes ASVs encontrados para *A. caninum*, con un límite de conexión del 95%, utilizando el software PopArt (Leigh & Bryant, 2015).

Para la descripción de la estadística descriptiva de las infecciones por nemátodos se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics (v20) (IBM Corp, 2011) para el cálculo *odds ratio* para relacionar diferentes variables con la presencia de nemátodos en heces en perros y coyotes, y para los resultados obtenidos de los análisis microscópicos y el *metabarcoding* del *cox1*. Este paquete también fue utilizado para la construcción de gráficos que ilustraran la estadística descriptiva. Además, se utilizó el lenguaje de programación estadística R y el paquete “forestploter”(https://cran.r-project.org/package=forestploter) (Alimu, 2024) para la construcción de gráficos tipo *forestplot* donde se muestran los diferentes OR y sus respectivos intervalos de confianza al 95%.

6. RESULTADOS

6.1 Confirmación de la especie de cánido en las muestras sospechosas de coyote

En esta investigación se recolectaron un total de 164 muestras identificadas morfológicamente como heces de coyotes y 149 muestras de perros en las comunidades aledañas a las áreas protegidas donde se recolectaron las muestras de coyote, para un total de 313 muestras de cánidos. Las 164 muestras sospechosas de coyotes fueron sometidas al análisis mediante RFLP del *cytb* y el *metabarcoding* del gen 12S para así poder identificar el cánido que las excretó y asegurar que fueran de coyote. Mediante este análisis se logró confirmar la especie *C. latrans* como cánido excretor de 135 muestras (82.4%), 5 (3%) muestras sufrieron fallo de amplificación al no obtener suficientes lecturas para asignar un cánido en específico, y otras 5 muestras fueron clasificadas como “indeterminadas” debido a que en el ensayo RFLP se observó un patrón mixto, con las bandas esperadas para *C. latrans/ U. cinereoargenteus* (219 pb) y *C. familiaris* (177pb). En la figura 3 se observan resultados de RFLP y en el anexo 10.7 puede observarse el número de secuencias del gen 12S asignadas al género *Canis* para cada una de las 135 muestras confirmadas como *C. latrans*.

Los 19 restantes muestras correspondían a excretas de otros animales que fueron inicialmente confundidas como de coyote debido a sus características macroscópicas. De estas muestras previamente sospechosas de coyote se confirmó que 13 (7.9%) pertenecían a zorras grises (*U. cinereoargenteus*), tres (1.8%) pertenecientes a perros (*C. familiaris*), dos (1.2%) a gatos (*Felis catus*), y una (0.6%) a un bovino (*Bos taurus*). A partir de este hallazgo se separaron del ensayo las muestras pertenecientes a cánidos diferentes de coyotes, y se continuó trabajando el *metabarcoding* del gen *cox1*, y el genotipo de las 135 muestras confirmadas de coyote. Asimismo, se reportaron los resultados de la observación microscópica únicamente de estas muestras confirmadas y las muestras tomadas de perros domésticos.



Figura 3. Digestión de un fragmento del gen *cytb* a través de la enzima *TruI* de muestras morfológicamente identificadas como de coyotes. De izquierda a derecha: E: Escalera. 1-5, y 7: muestras coincidentes con el patrón esperado para *C. latrans/U. cinereoargenteus*. 6, 9 y 10: Muestras no amplificadas. 8: Muestra indeterminada. 11 muestra con patrón esperado para *C. familiaris* o felinos. 12: control positivo *C. familiaris*. 13, 14: Blanco. 15 a 18: pocillos vacíos

6.2 Parásitos identificados a partir de heces de coyotes y perros

Como se indicó anteriormente, todas las muestras recolectadas en este trabajo se les realizó sedimentación por centrifugación y posteriormente observación al microscopio de luz. Esto permitió identificar diferentes nemátodos en estas muestras. La lista de nemátodos encontrados se amplió posteriormente gracias a los resultados del análisis de *metabarcoding* del gen *cox1* de las muestras confirmadas de coyotes y las muestras de perros. Además de nemátodos, se identificaron otras especies de parásitos (protozoarios y otros helmintos), que, aunque no son el enfoque de este trabajo, se incluyen debido a la importancia de esta información a nivel de salud animal y humana.

En las muestras de heces de perros se logró identificar, mediante sedimentación y microscopía, huevecillos de ancylostomatídeos, *T. canis* y *T. vulpis*. También se encontraron huevecillos pertenecientes a céstodos de la familia Taeniidae y a protozoarios de la familia Coccidia. El análisis microscópico de las muestras de coyotes reveló los mismos grupos de

nemátodos (ancylostomatídeos, *T. canis* y *T. vulpis*) y, adicionalmente, se observaron huevecillos de *T. leonina* en 2 muestras. Asimismo, en los perros se identificaron huevecillos de grupos parasíticos diferentes a nemátodos, concretamente céstodos de la familia Taeniidae y del género *Spirometra*.

El análisis de *metabarcoding* del gen *cox1* y la asignación taxonómica a partir de nuestra base BOLD curada permitió identificar con 100% de PID al parásito *S. lupi*, el cual fue encontrado en 2 muestras provenientes de perros. Dicho ensayo también permitió afinar la identificación de ancylostomatídeos hasta nivel de especie, confirmando la presencia de *A. caninum* tanto en perros como coyotes, con más de 99% de PID. Asimismo, se identificó a *T. canis* con más de 99% PID. En síntesis, asignando taxonomía de acuerdo con la base de datos personalizada se describe con alto porcentaje de confianza los nemátodos *A. caninum*, *S. lupi* y *T. canis*.

Además, al utilizar la base de datos Genbank sin curar, se pudo identificar también la especie *T. pisiformis* en 6 muestras de coyotes del ACC, con un PID del 93.4%, lo que refuerza lo observado al microscopio. Además, la comparación con GenBank también permitió detectar dos parásitos adicionales en coyotes, al encontrar coincidencias de secuencias con *Alaria* sp. y *Strongyloides* sp. con PIDs que van del 90 al 94%. *Alaria* sp. se encontraba en 3 muestras del ACG y una del ACC, mientras *Strongyloides* sp. se encontró en 5 muestras del ACC.

Al acoplar la información de la microscopía y de secuenciación profunda de amplicones, se generó una lista completa de 10 parásitos gastrointestinales (nueve helmintos y un protozooario) identificados en heces de coyotes y perros del Área Central y Guanacaste de Costa Rica durante este trabajo: *A. caninum*, *T. canis*, *T. vulpis*, *T. leonina* y *S. lupi*. Así como *Spirometra* sp., *Alaria* sp., *Strongyloides* sp., miembros de la familia Taeniidae y del grupo Coccidia.

6.3 Estadística descriptiva de nemátodos gastrointestinales en los cánidos estudiados

En este estudio se recolectaron y procesaron 135 muestras de coyotes y 149 de perros. Las muestras de coyote la mayoría provenían del ACC (85), seguido de MDP (28) y por último del ACG (22). En el caso de los perros, también predominaron las muestras adquiridas en alrededores de la ACC (57), de seguido la ACG (50) y por último MDP (42).

Se calcularon frecuencias de los diferentes nemátodos encontrados según el sitio de recolección, el cánido en el que se detectaron, la estación climática, entre otros factores, a partir de los resultados de la secuenciación profunda de amplicones del gen *cox1* y la microscopía

6.3.1 Frecuencia de nemátodos determinada por *metabarcoding* en la totalidad de muestras recolectadas

Cuadro 3. Frecuencia de muestras positivas por nemátodos en la totalidad de muestras analizadas a través de *metabarcoding* del gen *cox1*.

<i>Ancylostoma caninum</i>				<i>Toxocara canis</i>			<i>Spirocerca lupi</i>			Total	
Variable y grupo	N analizado	Positivas	%	N analizado	Positivas	%	N analizado	Positivas	%	Total positivas	%
Cánido											
Perro	149	41	27.52	149	8	5.37	149	2	1	44*	29.53
Coyotes	135	30	22.22	135	0	0.00	135	0	0	30	22.22
Total cánido	284	71	25.00	284	8	2.82	284	2	0.70	74	26.06
Área muestreo											
ACC	142	15	10.56	142	1	0.70	142	0	0	16	11.27
ACG	72	41	56.94	72	7	9.72	72	2	3	43*	59.72
MDP	70	15	21.43	70	0	0.00	70	0	0	15	21.43
Total área muestreo	284	71	25.00	284	8	2.82	284	2	0.70	74	26.06

*Grupos que presentan coinfecciones haciendo que el total no corresponda a la suma de las muestras positivas por cada una de las especies detectadas.

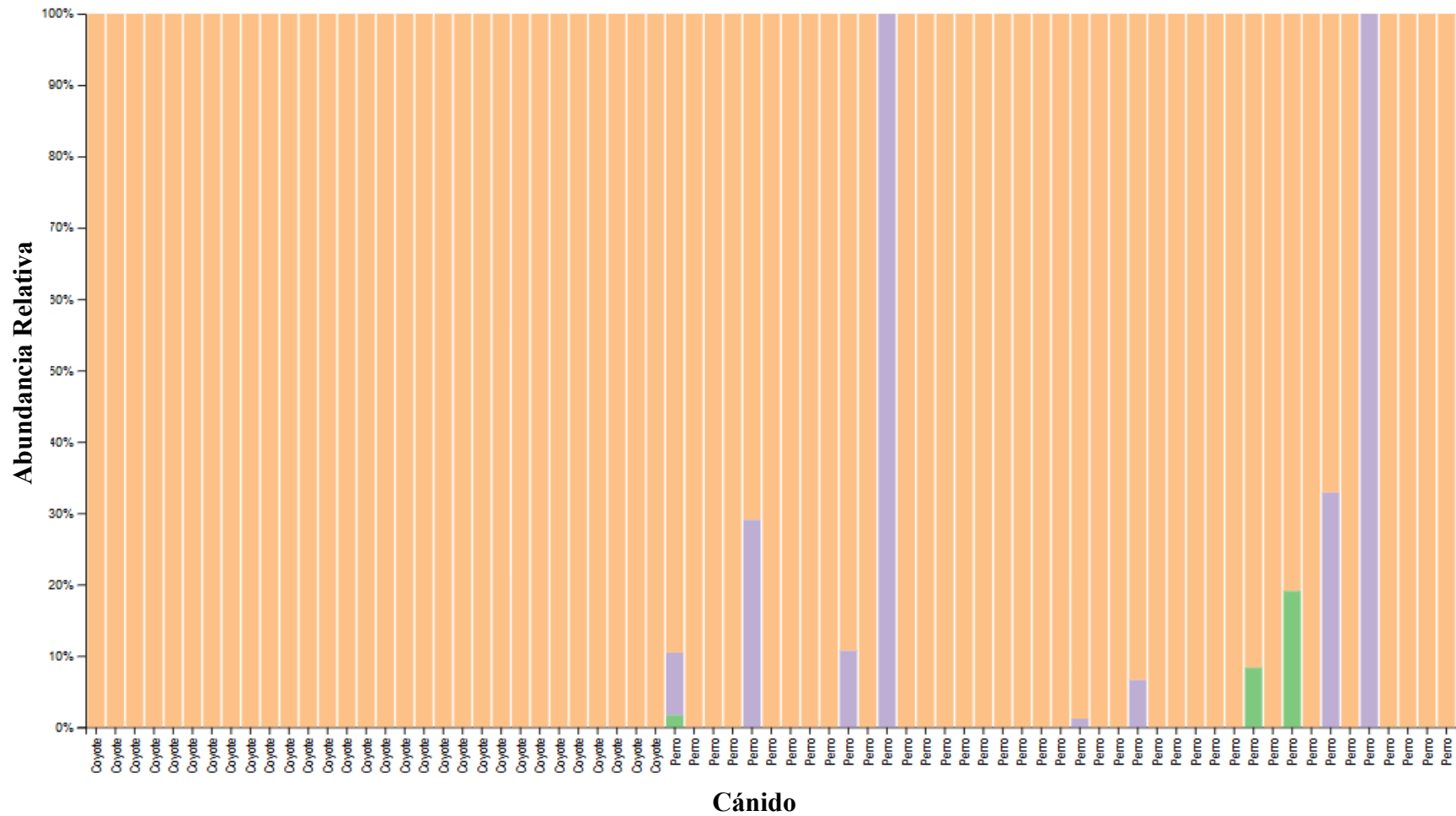


Figura 4. Abundancia relativa de los ASVs en las muestras positivas por nemátodos en *metabarcoding* del *cox1* según especie de cánido . Cada barra representa la composición de nemátodos de una muestra, muestras rotuladas según especie de cánido

Se observa un predominio de *A. caninum* en coyotes y perros, y en el ACG y ACC. En las muestras con más de una especie de nemátodo predomina de igual manera el porcentaje ASVs correspondientes a *A. caninum*.

En las siete muestras positivas por *T. canis* y en las dos positivas por *S. lupi* se encontró también *A. caninum* y una muestra contenía los tres nemátodos. Se observa en estas muestras coinfectadas también el predominio de *A. caninum* como el parásito más abundante. Estas coinfecciones son la razón por la cual el número total de muestras de perros positivas no corresponde a la sumatoria de muestras positivas en cada una de las especies detectadas. Un patrón similar sucedió en el caso de la ACG, que fue la única de las áreas de muestreo en donde se encontraron coinfecciones. Se puede observar entonces como las siete muestras que contenían más de un parásito provenían de perros del ACG. De las seis muestras con poliparasitismo, tres correspondían a perros menores de dos años y tres a perros mayores de dos años.

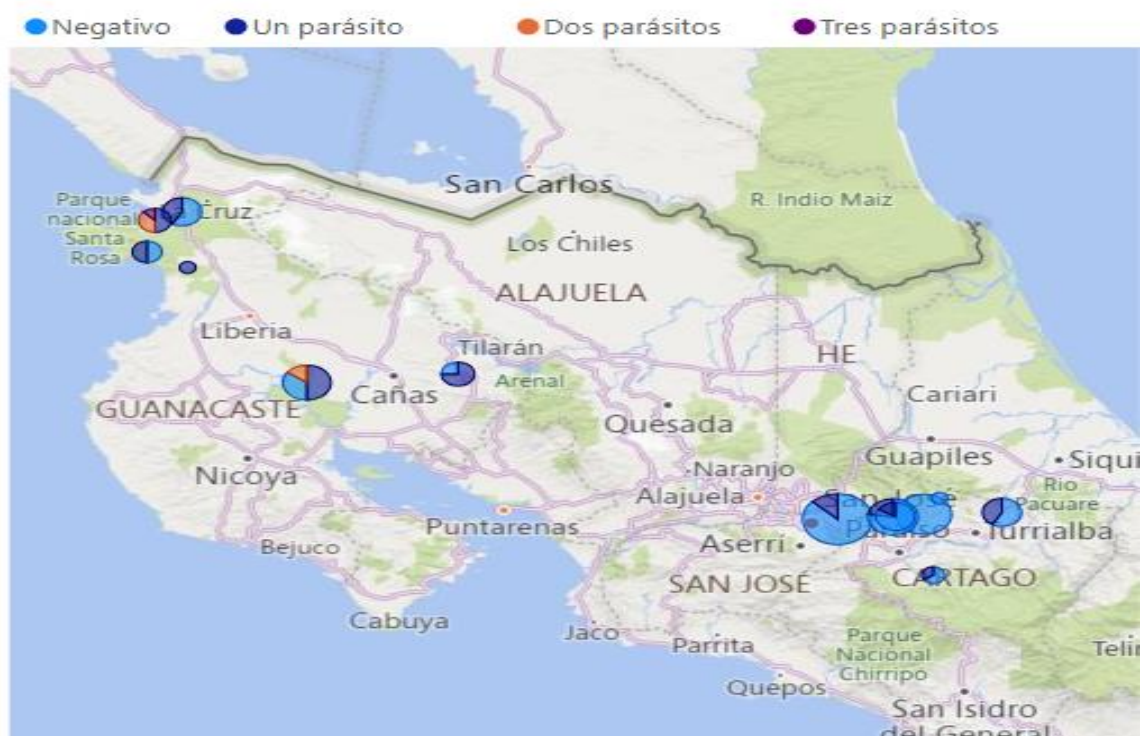


Figura 6. Distribución geográfica de las muestras positivas por nemátodos en cánidos de Costa Rica. Sitios geográficos y proporciones en que se encontraron coinfecciones. Cada gráfico de pastel tiene un tamaño proporcional al número de muestras colectadas. La

proporción de cada color en los gráficos de pastel corresponde al porcentaje de muestras positivas por infecciones únicas, dobles o triples

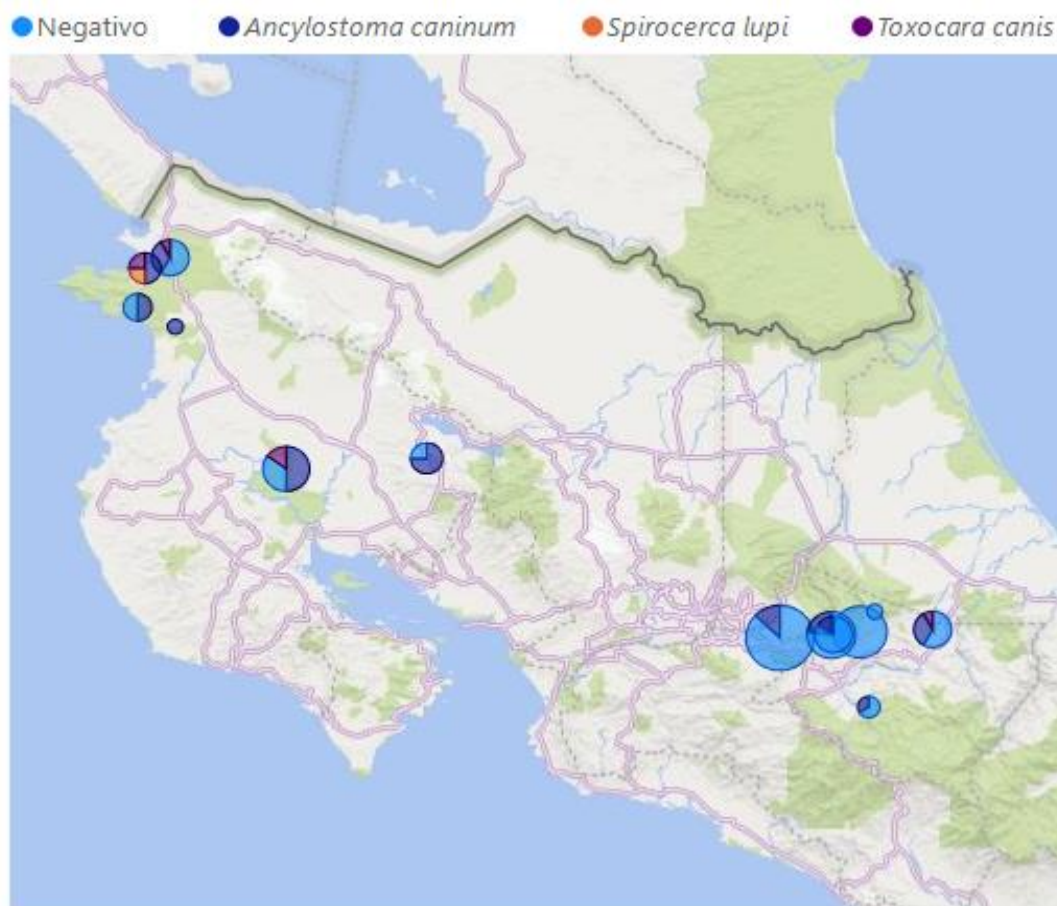


Figura 7. Distribución geográfica de las muestras positivas por nemátodos en cánidos de Costa Rica según especies encontradas. Cada gráfico de pastel tiene un tamaño proporcional al número de muestras colectadas. La proporción de cada color en los gráficos de pastel corresponde al porcentaje de muestras positivas por cada respectivo nemátodo.

Para evaluar el efecto de las diferentes áreas de muestreo y cánidos sobre la frecuencia de nemátodos en el total de muestras recolectadas, con el objetivo de identificar posibles grupos de riesgo, se calcularon *odds ratios* (OR por sus siglas en inglés). Los resultados se resumen en el Cuadro 4 :

Cuadro 4. Odds ratio de las variables cánido y área de muestro en la totalidad de las muestras positivas por nemátodos

Variable	Numerador (Factor riesgo)	Denominador	OR	95% Intervalo de confianza	
				Inferior	Superior
Cánido	Perro	Coyote	1.420	0.828	2.433
Área de Muestreo	ACG	Mata de Plátano	5.133*	2.453	10.744
Área de Muestreo	ACG	ACC	11.025*	5.474	22.203
Área de Muestreo	Mata de Plátano	ACC	2.148	0.992	4.649

*OR estadísticamente significativo (Intervalo de confianza que no incluye el “1”)

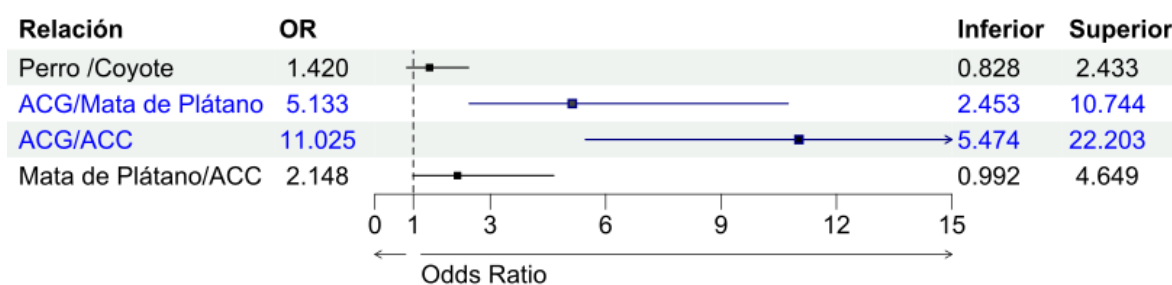


Figura 8. Gráfico de odds ratio (OR) de las variables cánido y área de muestro en la totalidad de las muestras positivas por nemátodos. El punto en cada gráfico representa el valor de OR calculado para cada respectiva relación, mientras que la línea denota la amplitud del intervalo de confianza al 95%, del límite inferior al superior. Los gráficos marcados en azul corresponden a aquellos OR estadísticamente significativos.

6.3.2 Identificación de individuos de coyotes y su efecto en la epidemiología de nemátodos gastrointestinales determinada por *metabarcoding*

En la sección anterior se presentaron las frecuencias y los valores de riesgo relativo calculados a partir de la totalidad de las muestras recolectadas. En el caso de los coyotes, estos datos brindan información únicamente acerca del efecto de la matriz (heces de coyotes) y de la diversidad total de parásitos en este cánido. Sin embargo, no refleja adecuadamente la epidemiología real de la presencia de nemátodos en coyotes al existir la posibilidad de tener múltiples muestras de un mismo coyote. Para distinguir individuos de coyote se realizó

GBS de 48 loci y el gen *SRY* del cromosoma Y en las 135 muestras de coyotes. El primer paso para obtener los individuos de coyotes fue eliminar muestras que tuvieran una baja calidad de amplificación (más de 80% de loci fallidos). Este paso llevó a la eliminación de 50 de las 135 muestras (36%), quedando 85 muestras viables. Seguidamente, los SNP fueron reevaluados y se eliminaron aquellos que tuvieran un nivel de fallo en las muestras mayor que un umbral de 2 desviaciones estándar por encima del promedio general de fallo en todos los SNPs. También se eliminaron SNPs monomórficos, lo que llevó a la eliminación de 4 SNPs, quedando 44 restantes. Finalmente, se consideraron exitosas aquellas muestras que tuvieran al menos 30 de 44 SNPs genotipados resultando en 49 muestras exitosamente genotipadas de las 85 seleccionadas previamente como viables para un rendimiento de genotipo de 55%.

Las 49 muestras genotipadas exitosamente fueron utilizadas para construir genotipos consenso y así identificar individuos. Se consideró que 2 muestras correspondían al mismo individuo si presentaba 2 o menos loci discordantes, lo que resultó en la identificación de 31 individuos. Con estos datos se puede calcular una razón de individuos recolectados en la cual $49/31 = 1.58$. Es decir, por cada tres muestras recolectadas, se muestrearon aproximadamente dos individuos distintos y uno repetido. Por otro lado, el análisis del gen *SRY* mostró que 18 de los 31 individuos eran machos y 13 hembras. Las muestras múltiples o repetidas de un mismo individuo coincidieron en todos los casos en cuanto a la ubicación geográfica (ACG, ACC o Mata de Plátano), así como en los nemátodos detectados a través del *metabarcoding* del gen *cox1*. Con excepción de un único individuo para el cual se recolectó una muestra positiva para *A. caninum* durante la época seca, y posteriormente una muestra negativa durante la época lluviosa. Los detalles de los resultados de la presencia de nemátodos en coyotes individuales se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Individuos de coyote y perro positivos por *Ancylostoma caninum* según determinación por *metabarcoding* del gen *cox1*

Variable y grupos	N.º Muestras procesadas	N.º Positivas	Porcentaje (%)
Cánido			
Perro	149	41	27.52
Coyote	31	12	38.71
Total Cánido	180	53	29.44
Área de muestreo			
ACC	77	11	14.29
ACG	56	36	64.29
Mata de plátano	47	6	12.77
Total Área de Muestreo	180	53	29.44

A. caninum fue la única especie de nemátodo detectada en el *metabarcoding* de los 31 individuos de coyotes determinados por genotipeo, razón por la cual en el cuadro 5 y las demás figuras de esta sección se hará referencia únicamente a este parásito.

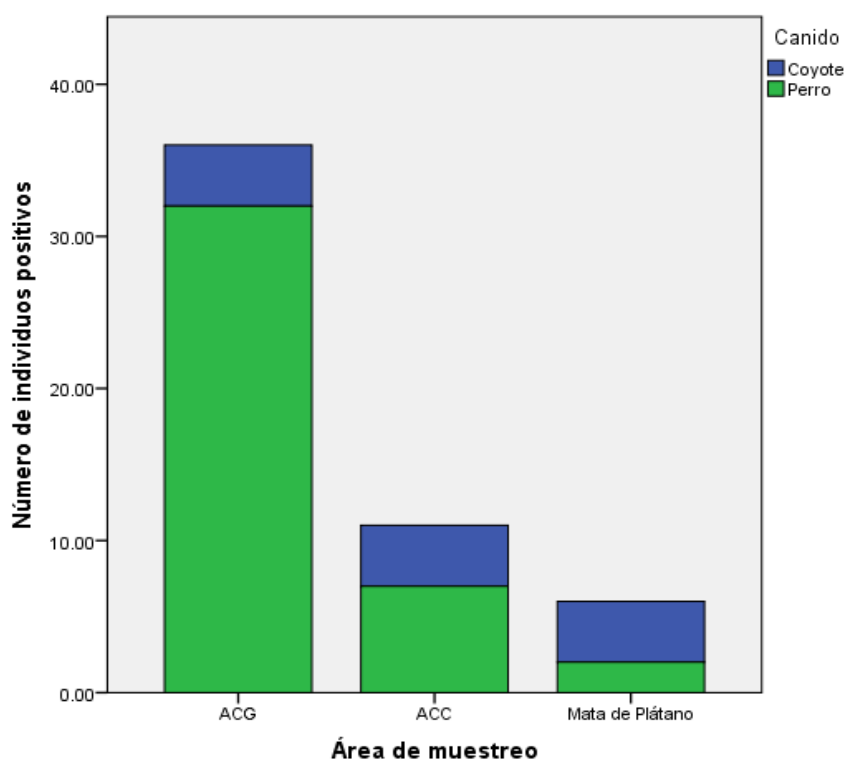


Figura 9. Comparación de individuos de coyote y perro positivos por *Ancylostoma caninum* al *metabarcoding* del gen *cox1* según área de muestreo.

Cuadro 6. Odds ratio de las variables cánido y área de muestreo en individuos de coyote y perro positivos por *Ancylostoma caninum*

Factor	Numerador (Factor de riesgo)	Denominador	OR	95% Intervalo de confianza	
				Inferior	Superior
Cánido	Coyote	Perro	1.664	0.742	3.729
Área de Muestreo	ACG	ACC	10.800*	4.661	25.026
Área de Muestreo	ACG	Mata de Plátano	12.300*	4.452	33.982
Área de Muestreo	ACC	Mata de Plátano	1.139	0.391	3.315

*OR estadísticamente significativo (Intervalo de confianza que no incluye el “1”)

Cuadro 7. Muestras positivas por *Ancylostoma caninum* en individuos de coyote de acuerdo con diferentes variables demográficas

Variable y Grupo	N.º Muestras procesadas	N.º Positivas	Porcentaje (%)
Área de muestreo			
ACC	20	4	20.00
ACG	6	4	66.67
Mata de plátano	5	4	80.00
Total Área de Muestreo	31	12	38.71
Época de Muestreo			
Seca	4	3	75.00
Lluviosa	27	9	33.33
Total Época de Muestreo	31	12	38.71
Sexo			
Macho	18	9	50.00
Hembra	13	3	23.08
Total Sexo	31	12	38.71
Método análisis			
Microscopía	31	7	22.58
Metabarcoding	31	12	38.71

Cuadro 8. Odds ratio de variables demográficas relacionadas a individuos de coyote positivos por *Ancylostoma caninum*

Variable	Numerador (Factor de riesgo)	Denominador	OR	95% Intervalo de confianza	
				Inferior	Superior
Área de Muestreo	Mata de Plátano	ACG	2.000	0.125	31.975
Área de Muestreo	Mata de Plátano	ACC	16.000*	1.381	185.405
Área de Muestreo	ACG	ACC	8.000*	1.061	60.324
Época de Muestreo	Seca	Lluviosa	6.000	0.544	66.169
Sexo	Macho	Hembra	3.333	0.682	16.295

*OR estadísticamente significativo (Intervalo de confianza que no incluye el “1”)

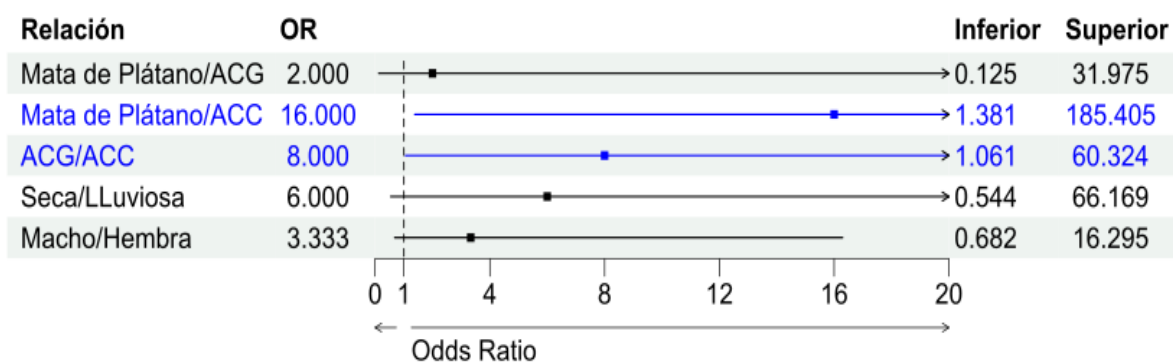


Figura 10. Odds ratio de variables demográficas relacionadas a individuos de coyote positivos por *Ancylostoma caninum*. El punto en cada gráfico representa el valor de OR calculado para cada respectiva relación, mientras que la línea denota la amplitud del intervalo de confianza al 95%, del límite inferior al superior. Los gráficos marcados en azul corresponden a aquellos OR estadísticamente significativos.

6.3.3 Epidemiología de nemátodos gastrointestinales en perros determinada por *metabarcoding*

Los resultados de *metabarcoding* del gen *cox1* de nemátodos de los perros estudiados, junto con los datos demográficos y biológicos obtenidos a través de entrevistas a los dueños/cuidadores de estos cánidos fueron compilados en una serie de cuadros y figuras que se presentan en esta sección.

Cuadro 9. Frecuencia de muestras positivas por nemátodos en perros de acuerdo con diferentes variables demográficas

Factor y Grupo	<i>Ancylostoma caninum</i>			<i>Toxocara canis</i>			<i>Spirocera lupi</i>			Total	
	N.º Muestras procesadas	N.º Positivas	Porcentaje (%)	N.º Muestras procesadas	N.º Positivas	Porcentaje (%)	N.º Muestras procesadas	N.º Positivas	Porcentaje (%)	Total muestras positivas	Porcentaje muestras positivas (%)
Área de muestreo											
ACC	57	7	12.28	57	1	1.75	57	0	0.00	8	14.04
ACG	50	32	64.00	50	7	14.00	50	2	4.00	33	66.00
MDP	42	2	4.76	42	0	0.00	42	0	0.00	2	4.76
Totales área de muestreo	149	41	27.52	149	8	5.37	149	2	1.34	43	34.2
Sitio de muestreo											
Bagatzi	20	13	65.00	20	3	15.00	20	0	0.00	13	65
P.N. Santa Rosa	1	0	0.00	1	0	0.00	1	0	0.00	0	0
Prusia	14	3	21.43	14	0	0.00	14	0	0.00	3	21
Mata Plátano	42	2	4.76	42	0	0.00	42	0	0.00	2	5
Cuajinicuil	8	8	100.00	8	3	37.50	8	2	25.00	8	100
Guarumos Turrialba	12	4	33.33	12	1	8.33	12	0	0.00	5	42
Quebrada Grande	8	6	75.00	8	0	0.00	8	0	0.00	6	75
Finca Rosa María	1	1	100.00	1	0	0.00	1	0	0.00	1	100
Colonia Bolaños	12	4	33.33	12	1	8.33	12	0	0.00	5	42
P.N. Irazú cráteres	3	0	0.00	3	0	0.00	3	0	0.00	0	0
San Rafael Irazú	28	0	0.00	28	0	0.00	28	0	0.00	0	0
Totales sitio de muestreo	149	41	27.52	149	8	5.37	149	2	1.34	43	34.2
Época de Muestreo											
Lluviosa	119	22	18.49	119	4	3.36	119	0	0.00	23	19
Seca	30	19	63.33	30	4	13.33	30	2	6.67	20	67
Totales Época de muestreo	149	41	27.52	149	8	5.37	149	2	1.34	43	34

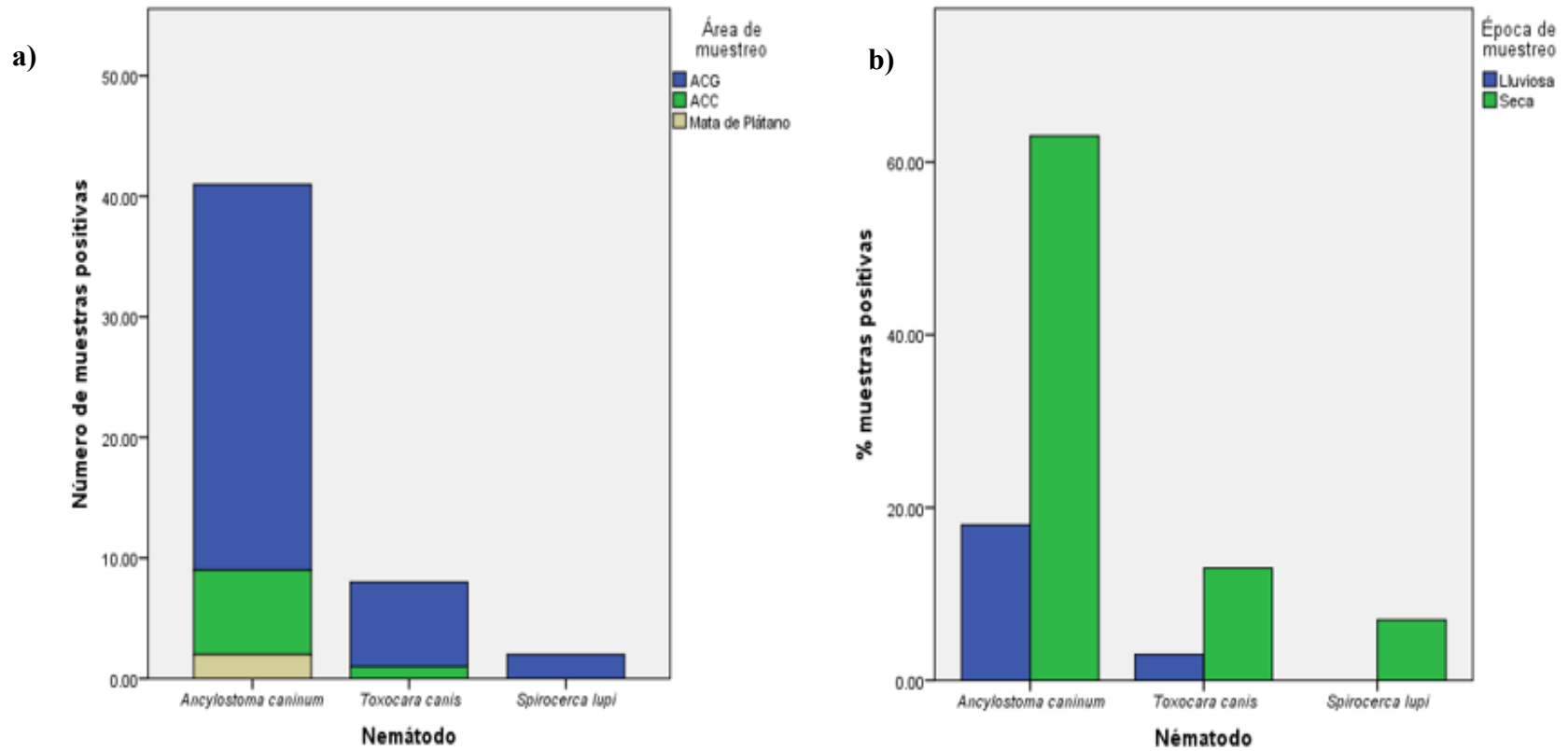


Figura 11. Comparación de porcentaje de muestras de perro positivas según variables demográficas. a) comparación según área de muestreo. b) Comparación según época en que fue recolectada la muestra.

Cuadro 10. Frecuencia de muestras positivas por nemátodos en perros de acuerdo con diferentes variables demográficas y biológicas

Factor y Grupo	<i>Ancylostoma caninum</i>			<i>Toxocara canis</i>			<i>Spirocera lupi</i>			Total muestras positivas	Porcentaje muestras positivas
	N.º Muestras procesadas	N.º Positivas	Porcentaje	N.º Muestras procesadas	N.º Positivas	Porcentaje	N.º Muestras procesadas	N.º Positivas	Porcentaje		
Hábitat											
Domiciliar	42	2	4.76	42	0	0.00	42	0	0.00	2	5
Forrajero	107	39	36.45	107	8	7.48	107	2	1.87	41	38
Totales Época de muestreo	149	41	27.52	149	8	5.37	149	2	1.34	43	34
Edad											
<9 Meses(M)	15	3	20.00	15	1	6.67	15	0	0.00	4	27
9M-2años	39	16	41.03	39	3	7.69	39	1	2.56	16	41
2-5años	36	12	33.33	36	2	5.56	36	1	2.78	12	33
>5 Años	33	7	21.21	33	1	3.03	33	0	0.00	7	21
Totales área de muestreo	123	38	30.89	123	7	5.69	123	2	1.63	39	31.7
Sexo											
Hembra	12	8	66.67	12	2	16.67	12	1	8.33	8	67
Macho	27	17	62.96	27	4	14.81	27	1	3.70	17	63
Totales sexo	39	25	64.10	39	6	15.38	39	2	5.13	25	64.10
Talla											
Pequeña	21	9	42.86	21	3	14.29	21	0	0.00	9	43
Mediana	40	10	25.00	40	1	2.50	40	1	2.50	10	25
Grande	20	8	40.00	20	2	10.00	20	1	5.00	9	45
Totales talla	81	27	33.33	81	6	7.41	81	2	2.47	28	34.57
Hematología											
Leucocitosis	26	8	30.77	26	3	11.54	26	1	3.85	8	31
Leucopenia	3	3	100.00	3	0	0.00	3	0	0.00	3	100
Anemia	7	5	71.43	7	0	0.00	7	0	0.00	5	71
Trombocitopenia	30	21	70.00	33	6	18.18	33	2	6.06	21	64
Total Cambios hematológicos	37	23	62.16	37	6	16.22	37	2	5.41	31	84
Total Normal	33	2	6.06	33	0	0.00	33	0	0.00	2	6

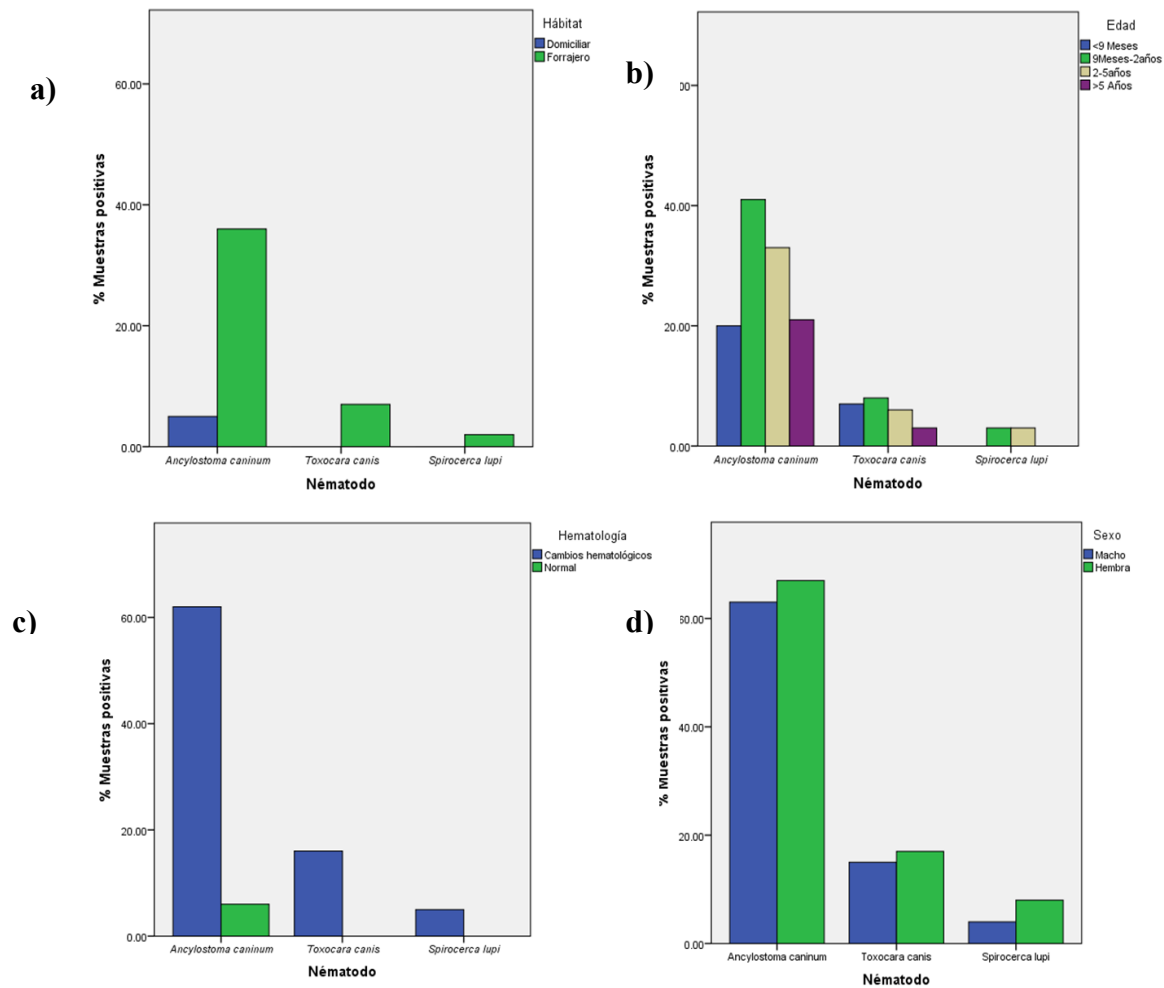


Figura 12. Comparación de porcentaje de muestras de perro positivas según variables demográficas y biológicas. a) comparación según hábitat b) Comparación según edad del perro c) Comparación según estado hematológico d) Comparación según sexo

Cuadro 11. Odds ratio de variables demográficas y biológicas relacionadas a perros positivos por nemátodos

Factor	Numerador	Denominador	OR	95% Intervalo de confianza	
				Inferior	Superior
Área de muestreo	ACG	ACC	11.890*	4.602	30.718
Área de muestreo	ACG	Mata de Plátano	38.824*	8.357	180.364
Área de muestreo	ACC	Mata de Plátano	3.265	0.656	16.251
Sitio de muestreo**	Quebrada Grande	Guarumos	6.000	0.812	44.351
Época de muestreo	Seca	Lluviosa	8.349*	3.445	20.227
Hábitat	Forrajero	Domiciliar	12.424*	2.849	54.179
Edad	Menos 2 años	Más 5 años	2.185	0.803	5.944
Edad	Menos 2 años	2-5 años	1.086	0.446	2.644
Edad	9 meses-2años	Menos 9 meses	2.783	0.675	11.477
Edad	2-5 años	Menos 9 meses	2.000	0.473	8.462
Edad	Más 5 años	Menos 9 meses	1.077	0.237	4.902
Sexo	Hembra	Macho	1.176	0.281	4.926
Talla	Pequeña	Grande	1.091	0.318	3.748
	Pequeña	Mediana	2.250	0.733	6.911
	Grande	Mediana	2.000	0.636	6.289
	Cambios				
Hematología	hematológicos	Normal	80.083*	14.986	427.955
Hematología	Anemia	Normal	38.750*	4.399	341.323
Hematología	Trombocitopenia	Normal	36.167*	7.092	184.449
Hematología	Leucocitocis	Normal	6.889*	1.317	36.042

*OR estadísticamente significativo (Intervalo de confianza que no incluye el “1”).

**Para el factor “sitio de muestreo” se realizó solo una de las múltiples comparaciones posibles entre variables dado que la subdivisión en cada sitio de muestreo lleva a un N muy pequeño en cada caso, reduciendo el poder estadístico al comparar cada uno de los sitios. La comparación colocada en esta tabla sirve de ejemplo: se observa cómo se obtiene un intervalo de confianza sin significancia estadística (valor 1 incluido) a pesar de haber un porcentaje mayor de perros positivos en Quebrada grande que en Guarumos .

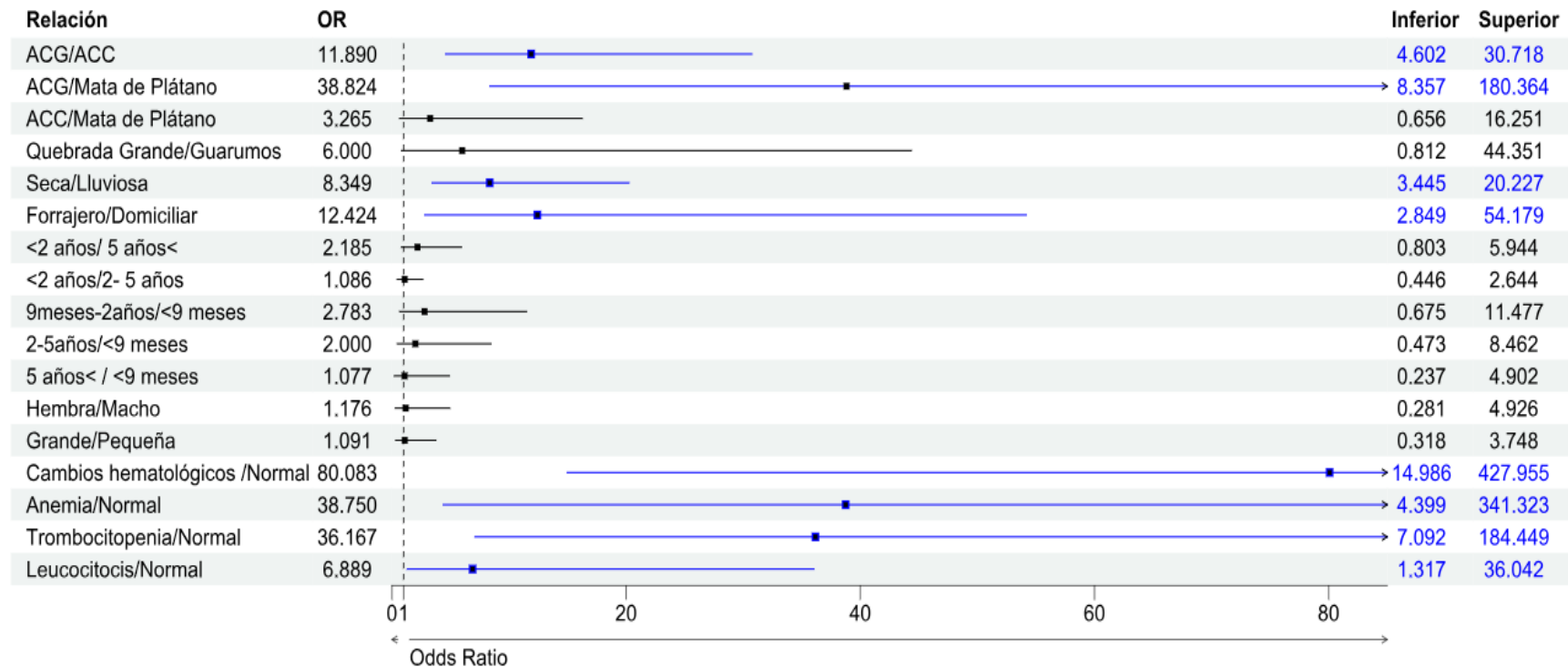


Figura 13. Gráfico de *odds ratio* de variables demográficas y biológicas relacionadas a perros positivos por nemátodos. El punto en cada gráfico representa el valor de OR calculada para cada respectiva relación, mientras que la línea denota la amplitud del intervalo de confianza al 95%, del límite inferior al superior. Los gráficos marcados en azul corresponden a aquellos OR estadísticamente significativos.

6.3.4 Epidemiología de nemátodos gastrointestinales en coyotes y perros determinada a partir de la observación microscópica

Como se mencionó anteriormente, el primer ensayo de laboratorio realizado a las muestras de este estudio fue una sedimentación por centrifugación y una posterior observación al microscopio de luz para la búsqueda de parásitos. Las frecuencias de los parásitos encontrados mediante esta técnica y su relación con las diferentes variables demográficas se muestran a continuación:

Cuadro 12. Frecuencia de muestras positivas por nemátodos en la totalidad de muestras analizadas a través de microscopía

Factor y Grupo	N.º Muestras procesadas	Ancylostomatidae		<i>Toxocara canis</i>		<i>Toxascaris leonina</i>		<i>Trichuris vulpis</i>		Taeniidae		Coccidia		<i>Spirometra</i> sp		Total	
		N.º Positivas	%	N.º Positivas	%	N.º Positivas	%	N.º Positivas	%	N.º Positivas	%	N.º Positivas	%	N.º Positivas	%	Total muestras positivas	%
Cánido																	
<i>Canis familiaris</i>	149	34	22.82	6	4.03	0	0.00	2	1.34	1	0.67	4	2.68	0	0	39*	26.85
<i>Canis latrans</i>	135	23	17.04	1	0.74	2	1.48	1	0.74	2	1.48	0	0	5	3.70	32*	24.44
Total Cánido	284	57	20.07	7	2.46	2	0.70	3	1.06	3	1.06	4	2.68	5	3.70	71*	25.00
Área de muestreo																	
ACC	142	14	9.86	4	2.82	2	1.41	1	0.70	3	2.11	4	2.82	4	0.70	26*	19.72
ACG	72	32	44.44	3	4.17	0	0.00	2	2.78	0	0.00	0	0	1	5.56	34*	51.39
Mata de plátano	70	11	15.71	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0	11	15.71
Total Área de Muestreo	284	57	20.07	7	2.46	2	0.70	3	1.06	3	1.06	4	1.41	5	1.76	71*	25.00

*Grupos que presentan coinfecciones haciendo que el total no sea la suma de las muestras positivas por cada una de las especies detectadas.

Los resultados de la microscopía, al igual que los del *metabarcoding*, evidencian coinfecciones. Se detectaron 7 infecciones múltiples en el total de muestras usando *metabarcoding*, mientras que se identificaron nueve muestras coinfectadas utilizando microscopía. Una diferencia importante es que, a través de la secuenciación masiva se detectaron coinfecciones únicamente en el ACG, pero en la observación microscópica se detectaron 6 coinfecciones en el ACC: 3 dadas por la presencia de *T. canis* y ancylostomatídeos, 2 dadas por ancylostomatídeos y coccidios, y una por la concomitancia de *T. canis* y *Spirometra* sp. En su contraparte, en el ACG se encontraron 3 coinfecciones: 2 de ellas constituidas por la presencia simultánea de ancylostomatídeos y *T. canis*, y una muestra que contenía 3 parásitos: *T. vulpis*, ancylostomatídeos y *T. canis*.

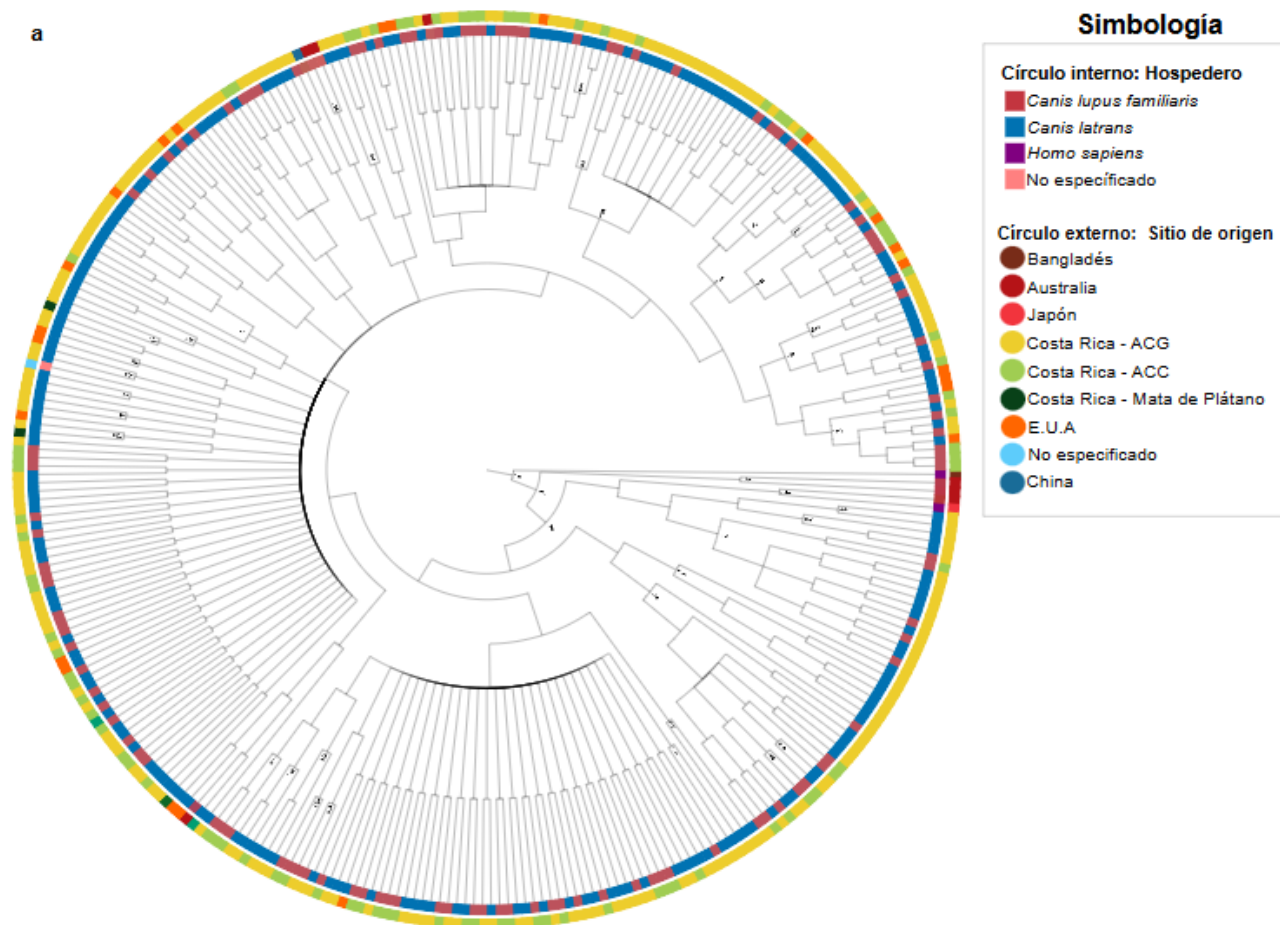
Dos de las muestras con múltiples parásitos pertenecían a coyotes, concretamente la muestras que contenían *T. canis* y *Spirometra* sp., y una de las muestras con toxocariasis y coccidiosis. Las otras 7 coinfecciones se reportaron en perros. Desafortunadamente, se carece del dato de edad de estos perros, excepto en un caso que tenía menos de 2 años.

6.4 Variabilidad genética y genotipos de los nemátodos gastrointestinales encontrados en la población de estudio

En un análisis de secuenciación masiva de amplicones como el realizado para el *cox1* de nemátodos, se generan decenas, incluso cientos de secuencias (ASVs) diferentes de un mismo nemátodo en cada muestra. Para entender mejor la dinámica de transmisión de nemátodos entre cánidos de la misma y diferente especie, se estudió la variabilidad genética de las 3 especies de nemátodos descritas con alta confiabilidad a partir del *metabarcoding*: *A. caninum*, *T. canis* y *S. lupi*. A lo largo de la sección 6.4, se muestran una serie de figuras (figuras 14, 15, 16 y 17) que ilustran esta variabilidad genética de los nemátodos encontrados en las muestras estudiadas

6.4.1 Variabilidad genética de *Ancylostoma caninum* de coyotes y perros de Costa Rica

Se obtuvieron 292 ASVs de *A. caninum* a partir de las 71 muestras positivas. De estas, 108 de estas secuencias correspondieron a 30 muestras de perro y 184 obtenidas de las 41 muestras de coyote positivas por este nemátodo. Esta gran cantidad de secuencias asignadas taxonómicamente como *A. caninum* fueron estudiadas mediante la construcción de un árbol filogenético (figura 14) y una red de haplotipos (figura 15).



acuerdo con ubicación geográfica u hospedero de los especímenes/muestras de *A. caninum*

Figura 14. Árbol filogenético de inferencia bayesiana de un fragmento del *cox1* de *Ancylostoma caninum*. Los valores numéricos en los nodos corresponden a las probabilidades posteriores, se muestran aquellas mayores a 0.6. Se usó una secuencia de *Necator americanus* como grupo externo. En el círculo interior se describe el hospedero del cual se extrajo el parásito o la respectiva muestra, El círculo exterior indica el sitio de origen de las secuencias, aquellas derivadas de este estudio se indican con los colores amarillo, anaranjado o verde oscuro (según corresponda). Acercamientos a este árbol para mayor detalle se encuentran en el Anexo 10.8. No se observa agrupamiento de

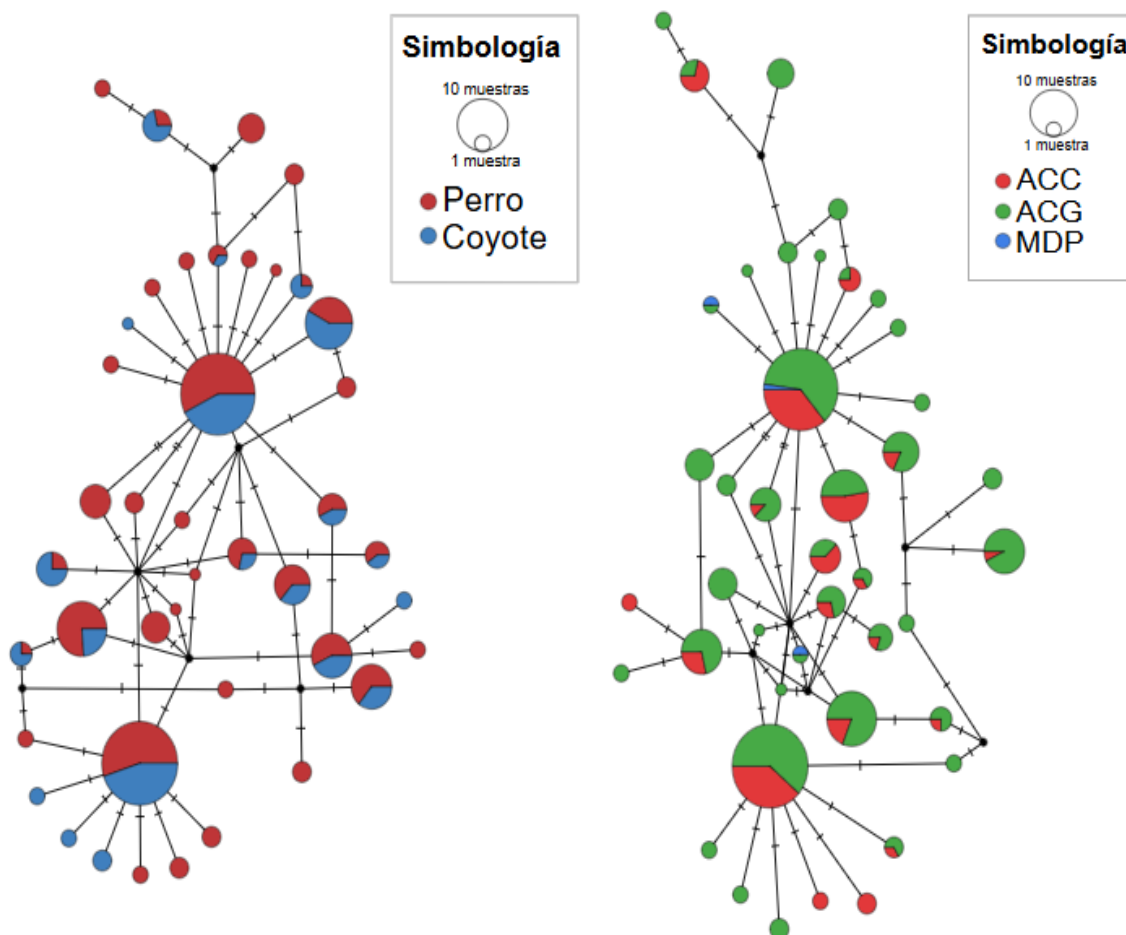


Figura 15. Redes de haplotipos Templeton Crandall-Sing (TCS) que muestran conexiones entre secuencias de *A. caninum*. El tamaño del círculo es proporcional al número de secuencias que comparten el mismo haplotipo. Las marcas perpendiculares a las líneas representan mutaciones entre haplotipos y los círculos negros haplotipos hipotéticos. **A. Análisis según cánido. **B.** Análisis según sitio de recolección de la muestra.**

A partir de las 292 secuencias de *A. caninum*, se identificaron 42 haplotipos diferentes, y no se observó agrupamiento de estos haplotipos por especie de cánido (coyotes y perros) o por sitio de muestreo (ACC, ACG y MDP).

6.4.2 Variabilidad genética de *Toxocara canis* de coyotes y perros de Costa Rica

Se obtuvieron 12 ASVs de *T. canis* en 8 muestras de perro. El árbol filogenético realizado a partir de estas secuencias se observa en la Figura 16.

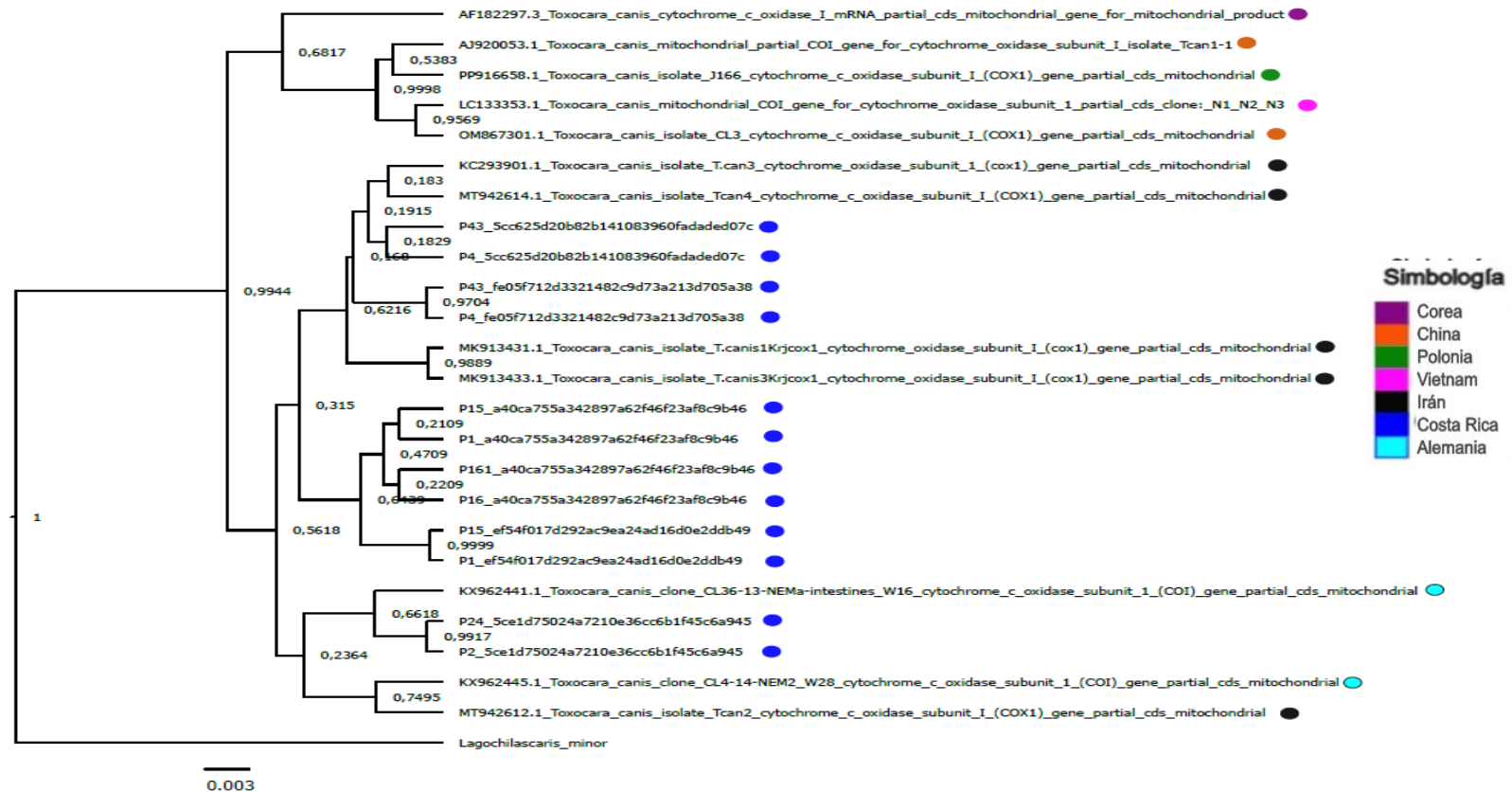


Figura 16. Árbol filogenético de inferencia bayesiana de un fragmento del *cox1* de *Toxocara canis*. Los valores de probabilidad posteriores son proporcionales al tamaño y color del nodo. Se utiliza *Lagochilascaris minor* como grupo externo. Los nombres de cada

secuencia tienen un color distinto correspondiente al país en donde se detectó el parásito. Todas las secuencias fueron obtenidas a partir de especímenes infectantes de perros. Las secuencias de Costa Rica corresponden a las secuencias de este estudio (nombres de secuencias en azul).

No se observa agrupamiento continental, pero las secuencias se dividen en dos grandes grupos: las secuencias de Costa Rica agrupando junto a las de Irán y Alemania, mientras que por otro lado se agrupan las secuencias de Corea, China y Polonia (probabilidad posterior de 0.994)

Toxocara canis fue detectado únicamente en muestras de perro y casi exclusivamente en heces recolectadas en la ACG (7 de 8 muestras). Por esta razón, no se realizó una red de haplotipos pues no sería posible detectar diferencias entre áreas o cánidos, perdiéndose el valor de dicho análisis.

6.4.3 Variabilidad genética de *Spirocerca lupi* de coyotes y perros de Costa Rica

Se encontraron 5 ASVs en las dos muestras de perro positivas por *S. lupi*. Estas secuencias fueron utilizadas para construir el árbol filogenético en la Figura 17. Las secuencias de Costa Rica se agruparon junto a especímenes de Israel y Sudáfrica (genotipo 1) con una probabilidad posterior de 0.99, y se encuentran separadas de los especímenes de Croacia y Hungría (genotipo 2). Similar a lo sucedido con *T. canis*, no se realizó red de haplotipos ya que todas las muestras provenían de perros en la ACG.

6.5 Análisis de diversidad ecológica de los nemátodos encontrados en cánidos de Costa Rica

Se calcularon varias métricas de diversidad alfa, con el objetivo de evaluar las posibles diferencias en especies de cánidos, sus proporciones, y su abundancia entre muestras, así como entre los diferentes cánidos y sitios de muestreo. Debido a que la mayoría de las métricas de diversidad son sensibles a diferentes profundidades de muestreo, se seleccionó una profundidad de muestreo uniforme (rarefacción) de 500 secuencias. Es decir, se realizó un submuestreo aleatorio de los ASVs en cada muestra para que cada una tuviese un recuento total de 500 secuencias. Muestras con menos de 500 ASVs fueron excluidas del análisis, quedando un total de 71 muestras retenidas: 30 muestras de coyotes y 41 de perros, distribuidas en 16 muestras del ACC, 42 del ACG y 13 de MDP, de acuerdo con el sitio de muestreo.

6.5.1 Alfa diversidad de la comunidad de nemátodos en cánidos costarricenses

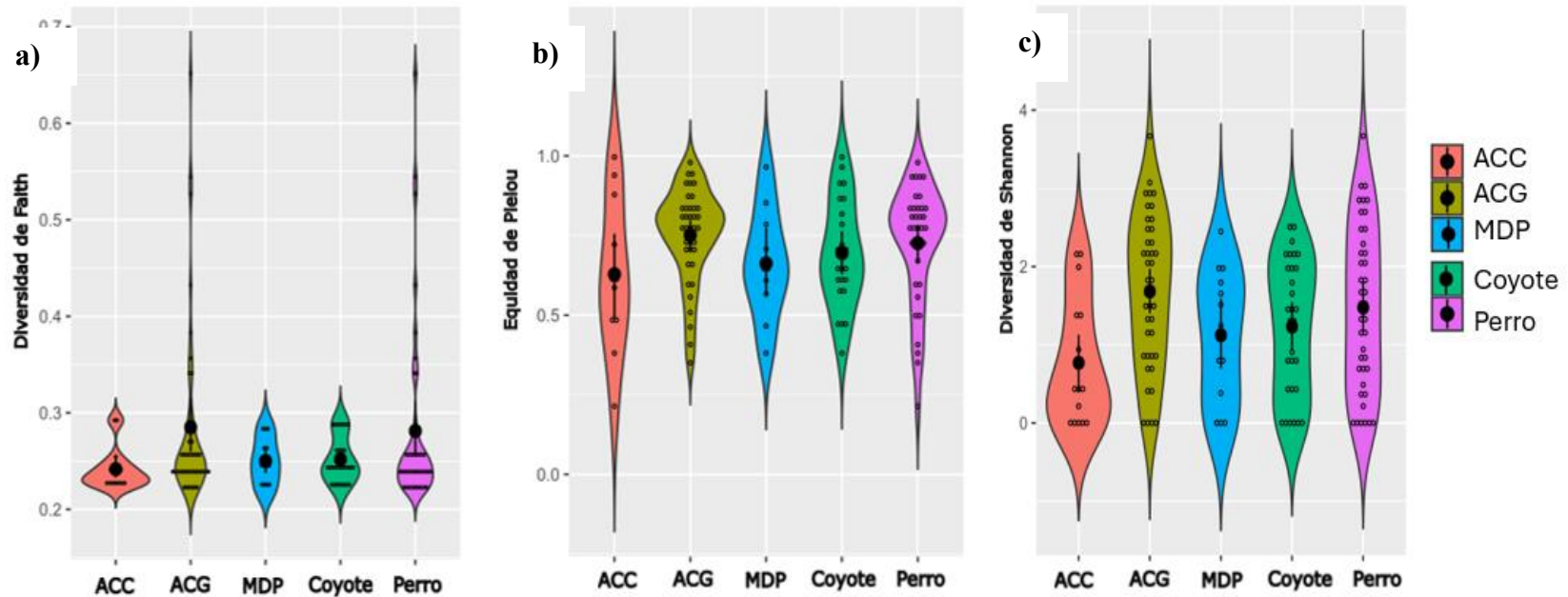


Figura 18. Comparación de alfa diversidad en la comunidad de nemátodos gastrointestinales de coyotes y perros en tres diferentes áreas de muestreo en Costa Rica. a) La medida de la diversidad alfa a través del índice de diversidad de Faith. Se encontraron

diferencias entre el promedio para ACG (0.28) y ACC (0.24) (Kruskal-Wallis con $p=0.024$). Entre las otras áreas no se encontraron diferencias con significancia estadística: ACG (0.28) y MDP (0.25) con un $p=0.532$; ACC y MDP ($p=0.38$). En la comparación entre coyotes (0.25) y perros (0.28), tampoco se encontraron diferencias significativas ($p=0.977$). **b)** La medida de la diversidad alfa a través de equidad de Pielou. No se observaron diferencias significativas entre áreas de muestreo, el promedio de equidad de Pielou para ACG (0.75) vs ACC (0.63) mostró en la prueba Kruskal-Wallis un $p=0.114$, ACG (0.75) vs MDP (0.66) con $p=0.115$, y ACC (0.63) vs MDP (0.66) con $p=0.751$. Tampoco se observaron diferencias entre los cánidos estudiados, coyotes (0.69) y perros (0.73), con un $p=0.291$ **c)** La medida de la diversidad alfa a través del índice de diversidad de Shannon. Se encontraron diferencias significativas entre el promedio para ACG (1.68) y ACC (0.77) (Kruskal-Wallis con $p=0.002$), entre las otras áreas no se encontraron diferencias con significancia estadística: ACG y MDP (1.12) ($p=0.068$); ACC y MDP ($p=0.308$). En la comparación entre coyotes (1.23) y perros (1.48), tampoco se encontraron diferencias significativas ($p=0.354$).

6.5.2 Beta diversidad de la comunidad de nemátodos en cánidos costarricenses

Similar a lo realizado para las métricas de diversidad alfa, al calcular índices de beta diversidad se realizó un submuestreo aleatorio de los ASVs en cada muestra para que cada una tuviese un recuento total de 500 secuencias. Muestras con menos de 500 ASVs fueron excluidas del análisis, quedando un total de 71 muestras retenidas. Para comprobar si las distancias entre muestras dentro de un grupo (muestras provenientes del mismo cánido o del mismo sitio de muestreo), fueron más similares entre sí que con respecto a las muestras de otros grupos, se utiliza una prueba PERMANOVA (Anderson, 2001) con un total de 999 permutaciones. Los resultados muestran que hay gran similitud entre las muestras de diferentes áreas de muestreo si se utiliza UniFrac que considera las relaciones filogenéticas (Cuadro 13). Mientras que al evaluar diversidad en términos de abundancia mediante el índice de Bray-Curtis se observan diferencias entre áreas de muestreo (Cuadro 13). Por el contrario al evaluar la diversidad por tipo de cánido muestreado se observan diferencias influidas principalmente por las relaciones filogenéticas pero que en términos de abundancia son similares (Cuadro 14).

Cuadro 13. Comparativa de estadísticas de beta diversidad de nemátodos gastrointestinales según sitio de muestreo

Métrica utilizada	Grupo 1	Grupo 2	N.º Muestras	p General	p individual	Significancia
UniFrac no ponderado	ACC	ACG	58	0.081	0.218	No significativo
	ACC	Mata de Plátano	29		0.158	No significativo
	ACG	Mata de Plátano	55		0.049	Limitrofe
UniFrac ponderado	ACC	ACG	58	0.771	0.612	No significativo
	ACC	Mata de Plátano	29		0.927	No significativo
	ACG	Mata de Plátano	55		0.707	No significativo
Disimilitud de Bray-Curtis	ACC	ACG	58	0.003	0.080	No significativo
	ACC	Mata de Plátano	29		0.022	Significativo
	ACG	Mata de Plátano	55		0.003	Significativo

Cuadro 14. Comparativa de estadísticas de beta diversidad de nématodos gastrointestinales según especie de cánido hospedero

Métrica utilizada	Valor de p	Significancia
UniFrac no ponderado	0.005	Significativo
UniFrac ponderado	0.194	No significativo
Disimilitud de Bray-Curtis	0.111	No significativo

Los grupos comparados por cánido hospedero fueron los mismos en los tres casos: perros vs coyote.

7. DISCUSIÓN

Descripción general del nemabioma de coyotes y perros

La mayoría de las muestras recolectadas en parques nacionales provenían de coyotes. Este alto porcentaje de identificación acertada refleja que la morfología sumada a la información sobre avistamientos y zonas de tránsito de coyotes permiten identificar en la mayoría de los casos las heces de estos cánidos. Es esperable la confusión de heces de coyote con las de otros depredadores con los que comparten de forma natural la misma área de uso como es el caso de *U. cinereoargenteus* (Rodríguez-Luna et al., 2024) así como con depredadores que habitan las mismas áreas producto de la actividad humana como en el caso de *F. catus*. Las heces de estos mamíferos pueden presentar similitudes en morfología y composición, pues al ser carnívoros también pueden presentar restos de pelaje, huesos, uñas, entre otros (Lukasik & Alexander, 2012). Por lo tanto, se demostró que esta metodología tiene aplicabilidad para el estudio no invasivo a partir de heces de cánidos silvestres en nuestra región.

La lista completa de 10 parásitos descritos en este trabajo son especies que se han reportado en anterioridad en sus respectivos hospederos, ya sean perros o coyotes, en Costa Rica (Alemán, 2011; Niehaus et al., 2012; Valverde, 2010). Sin embargo, en este trabajo se utilizaron herramientas de biología molecular que permiten la identificación específica de parásitos como *A. caninum*. Esta es la primera vez que se reporta esta especie de ancylostomatídeo en coyotes en Costa Rica. Previamente, se había sugerido que el parásito circulaba en el país ya que había sido descrito múltiples veces en perros. Es importante esta descripción a nivel de especie para conocer a profundidad la ecología del parasitismo gastrointestinal en cánidos costarricenses, y para evitar falsos positivos, dado a que recientemente se encontró también *A. ceylanicum* en coyotes costarricenses (Zendejas-Heredia et al., 2024), el cual como otros ancylostomatídeos, es indistinguible de *A. caninum* a través la observación microscópica de sus huevecillos.

Entre la lista de especies de parásitos encontrados también destaca el hallazgo de huevecillos correspondientes a individuos de la familia Taeniidae en coyotes. Al microscopio los huevecillos de los céstodos de los géneros *Taenia* y *Echinococcus* son difíciles de distinguir, razón por la cual se asignó la clasificación taxonómica a nivel de

familia. En el análisis de *metabarcoding* se obtuvieron secuencias congruentes con *T. pisiformis*, sin embargo, el porcentaje de identidad (90-94%) no fue suficientemente alto para asignar una clasificación taxonómica a nivel de especie. Además se debe tomar en cuenta que este hallazgo se obtuvo al comparar con la base de datos de Genbank completa, sin ningún procesamiento para adecuar las secuencias contenidas a las delimitadas por nuestros *primers*, ni otro tipo de filtrado de las secuencias allí contenidas. Aún con estas limitaciones el obtener secuencias similares a *T. pisiformis* tiene relevancia en un sentido ecológico. Se sabe que una de las principales presas de los coyotes son los roedores, y en Costa Rica existen datos que demuestran que el conejo (*Sylvilagus floridanus*) es la presa de preferencia de coyotes (Lloyd, 2020). *Taenia pisiformis* es un parásito que usa conejos como hospederos intermediarios en su ciclo de vida, lo cual aumenta la posibilidad de que la identificación por *metabarcoding* haya sido certera. En el pasado otros autores también encontraron huevecillos de Taeniidae en coyotes del sector Prusia del parque Nacional Volcán Irazú de Costa Rica. En dicha investigación se clasificó taxonómicamente estos parásitos como *T. pisiformis* (Niehaus et al., 2012).

Similar al caso de *T. pisiformis* ocurre con el nemátodo *Strongyloides* sp., parásito que fue detectado mediante *metabarcoding*, con un bajo PID y comparando contra una base de datos no específica (Genbank). Aunque falta evidencia para dictaminar una especie puntual, la mejor sospecha apunta hacia *S. stercoralis*, especie detectada en coyotes en el pasado a través de microscopía en Costa Rica (Niehaus et al., 2012). En el mismo sentido llama la atención el caso de *Alaria* sp., especie que se detectó solamente a través de biología molecular en esta investigación pero no se observaron sus huevecillos en el microscopio, al igual que en el caso de *Strongyloides* sp. que no se observaron larvas en heces. Especies del género *Alaria* han sido descritas en perros y coyotes en América principalmente en Canadá, Oklahoma en el norte de E.U.A y Florida en el sur del mismo país (Johnson et al., 2017; Luna-Estrada et al., 2017b; Pence et al., 1988). Sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado este parásito en coyotes costarricenses. Para ampliar la evidencia disponible y llegar a confirmar estas identificaciones presuntivas, en el futuro se podrían utilizar marcadores biológicos adicionales como por ejemplo los marcadores nucleares ITS-1 e ITS-2, o los marcadores mitocondriales 12S y 18S. Estos marcadores han demostrado alta eficiencia en

la identificación de especies de helmintos sobre todo al utilizar múltiples marcadores al mismo tiempo (Chan et al., 2021).

Epidemiología de las infecciones por nemátodos en cánidos de Costa Rica: Coyotes

Se identificaron los parásitos *A. caninum*, *T. canis* y *S. lupi* con 99% o más de confianza utilizando *metabarcoding* y la base de datos personalizada (Cuadro 3). Es importante recalcar que esta información se refiere a los resultados en la totalidad de las muestras de coyotes sin genotipar. Teniendo esto en cuenta, se observa como hubo porcentajes de muestras positivas similares en coyotes y perros (22% vs 29% respectivamente), aunque levemente mayor porcentaje de parasitismo en las muestras de perro. El cálculo de OR entre estos dos grupos no es concluyente ya que el intervalo de confianza incluye al valor 1, lo que hace que no se pueda afirmar que existe más riesgo de infección por nemátodos en perros que en coyotes.

Las muestras de coyotes recolectadas presentaron varias diferencias con respecto a las de perro. Primeramente, las muestras de coyotes suelen tener un número mayor de materia orgánica no digerida como pelos, huesos, uñas o materia vegetal. A diferencia de las de perro que por lo general se componen de materia fecal mayoritariamente (Lukasik & Alexander, 2011). Esto podría influir en la extracción de ADN, pues en el peso utilizado para la extracción se estaría considerando estos detritos que probablemente poco aportan de carga parasitaria. Además, las muestras de perro fueron recolectadas por sus dueños con un tiempo máximo de 24 horas, mientras que las de coyote fueron recolectadas en los parques nacionales sin conocimiento certero del tiempo que pudieron estar expuestas al ambiente. Esta situación, junto al efecto de la temperatura, la radiación solar y el crecimiento microbiano pudieron afectar la amplificación del ADN parasitario (Murphy et al., 1973). A pesar de esto, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el número de muestras positivas entre ambos cánidos. Además, el porcentaje de *A. caninum* encontrado en coyotes fue similar al descrito en el estudio llevado a cabo por Niehaus et al., (2012) en Costa Rica (26.8%) (Niehaus et al., 2012) y estudios como el de Redman, realizado en Iowa, Estados Unidos (31%) (W. K. Redman et al., 2016).

Resaltan diferencias cualitativas entre la detección de nemátodos en muestras de perros y coyotes, por lo cual, solo en perros se detectaron los nemátodos *S. lupi* y *T. canis*. Estas diferencias cualitativas podrían estar influenciadas por los factores intrínsecos de la muestra ya mencionados para el caso de los coyotes. También es posible que este fenómeno esté asociado al método de diagnóstico utilizado, pues podemos observar cómo a través de la observación microscópica el número de especies descritas es mayor tanto para coyotes como para perros. Sobre este fenómeno se profundizará más adelante. Cabe recalcar, que el número de muestras de coyote colectadas en el ACG fue mucho menor que en la ACC, lo que también podría incidir en la diversidad de especies encontrada, dado a que la ACG resultó tener más número de muestras de coyote positivas, pero todas por *A. caninum*. Estudiar más muestras de coyotes en el ACG aumentaría las probabilidades de encontrar especies adicionales como se consiguió en el caso de los perros con *T. canis* y *S. lupi*. Cabe mencionar que a pesar de estas diferencias cualitativas evidentes no se encontraron diferencias cuantitativas de significancia estadística.

En cuanto a áreas de muestreo se observa un mayor número de muestras positivas en el ACG vs el ACC, esto tomando en cuenta el total de muestras (Cuadro 3). El OR para área de muestreo de la totalidad de muestras indica que es hasta 11 veces más probable encontrar una muestra positiva en el ACG que en el ACC, y hasta 5 veces más probable que en la comunidad de Mata de Plátano (Cuadro 4). El intervalo de confianza mayor a 1 para ambos casos (Figura 8) brinda validez estadística a esta relación de riesgo. Esta relación se mantiene al analizar únicamente las muestras de coyotes genotipados, donde porcentualmente el número de individuos de coyotes positivos por *A. caninum* es mayor en el ACG (67%) que en el ACC (20%), con un OR estadísticamente significativo (Figura 10), y esto también ocurre al analizar los individuos de perros. En otras palabras, al analizar individuos tanto de coyotes como de perros la prevalencia de nemátodos es mayor en el ACG, que en ACC y que en la comunidad de Mata de Plátano (Figura 9). Es importante destacar que además de tener una mayor prevalencia de nemátodos, el ACG también presentó la totalidad de individuos con parasitosis múltiples.

Guanacaste es una zona rural “fragmentada” debido a que se encuentran extensiones de bosque seco tropicales taladas por fincas ganaderas y plantaciones de caña y arroz.

Muestra de ello son el Parque Nacional Guanacaste y el Parque Nacional Santa Rosa que tiene una matriz compleja a través del paisaje. En la cual los diferentes hábitats naturales están mezclados con los que son alteradas, donde coexisten diferentes animales, tanto de vida silvestre como domésticos, como caballos, vacas, burros y perros (Lloyd, 2020). Esto es importante, pues la prevalencia de nemátodos en los cánidos de la ACG está dada mayoritariamente en perros (Figura 9). Los perros en el ACG tienen entonces mayores fuentes de infección por nemátodos al estar en contacto con otros animales domésticos, y con otros perros también. A la vez, las actividades humanas cerca de áreas silvestres aumentan el intercambio de parásitos con animales silvestres (Otranto & Deplazes, 2019); lo que podría estar llevando a un mayor intercambio de parásitos con sus parientes cercanos los coyotes. Considerando que Guanacaste es el sitio en Costa Rica dónde hay registros más antiguos de coyotes (Vaughan, 1983) una posibilidad es que las comunidades de nemátodos y el ciclo de transmisión ha tenido más tiempo para establecerse en coyotes de esta área. Caso contrario en áreas colonizadas recientemente como el Valle central, dónde se presenta menor frecuencia de nemátodos.

A través del genotipo de coyotes, se mitiga el sesgo por sobremuestreo de un mismo individuo en estos cánidos, lo que permite tener datos más fidedignos del parasitismo por nemátodos en coyotes. El porcentaje total de individuos de coyote positivos por nemátodos en este estudio fue de 38.71% (Como se observa en el Cuadro 5), y cabe recalcar que la única especie descrita con alto porcentaje de confianza a través del metabarcoding fue *A. caninum*. En el estudio realizado por Niehaus et al., (2012) en 2012 se encontró un 10% de parasitismo por uncinarias en muestras de coyotes recolectadas en el Parque Nacional Irazú (Prusia) (Niehaus et al., 2012), es decir porcentualmente se encontró un parasitismo 4 veces menor al del presente estudio. Esto podría explicarse por la técnica utilizada, pues en el estudio de 2012 se utilizaron técnicas de concentración y la posterior observación microscópica. El *metabarcoding* tiene la ventaja sobre la microscopia en el hecho de que no necesita de los huevecillos intactos para poder detectar la presencia de nemátodos, basta con que haya ADN amplificable, lo que aumenta su sensibilidad (Christoforou et al., 2017). Esto es especialmente ventajoso en muestras ambientales como las heces de coyote.

Estudios en el extranjero también han reportado porcentajes variables de positividad por *A. caninum* en coyotes: en 2019 un estudio en un parque nacional en Chihuahua, México obtuvo porcentajes menores de infección (21%), utilizando técnicas de concentración-flotación y observación microscópica (Petters et al., 2019). Por el contrario, estudios en áreas urbanas o fragmentadas han obtenido niveles mucho mayores de infecciones por *A. caninum*, como ejemplo en Carolina del Norte, E.U.A se obtuvo 16 de 17 coyotes infectados (94%) al estudiar parásitos obtenidos directamente del intestino de carcasas de coyotes (Brzeski et al., 2015). Por lo que es notable que *A. caninum* es una especie común en coyotes, pero su prevalencia está determinada por el área en el que se encuentren dichos cánidos y por la metodología de estudio. Dentro de este estudio podemos observar diferencias en el número de coyotes positivos por sitio de muestreo, siendo Mata de Plátano el sitio con la mayor prevalencia de *A. caninum*, seguido de la ACG y con la menor prevalencia se encuentra la ACC (Cuadro 7), que dista por mucho de los otros 2 sitios. Se obtuvo que el área urbana fue la región con la mayor prevalencia, seguido el área fragmentada y por el último el área protegida más conservada. A partir de los OR entre Mata de Plátano y ACC, así como ACG vs ACC (Cuadro 8 y figura 10) podemos observar cómo es mucho más probable encontrar un coyote infectado por *A. caninum* en Mata de Plátano que en la ACC. De igual forma es muchas veces más riesgosa la ACG que la ACC en cuanto a la parasitosis de este nemátodo en coyotes. Otros factores parecen no tener mayor relevancia. Si bien se encontró una mayor prevalencia en los coyotes machos y aquellos muestreados en época seca, los intervalos de confianza de los OR de época y sexo incluyen el valor 1, haciendo su interpretación no concluyente. La literatura acerca de la influencia del sexo en las infecciones por *A. caninum* es escasa. Sin embargo, algunas investigaciones apuntan a que en perros y coyotes adultos los machos son más susceptibles a las infecciones que las hembras (Anene et al., 1996; Miller, 1965; Roche & Patrzek, 1966; Wirsing et al., 2007). En cuanto a la época, tendría sentido encontrar mayor parasitismo en época seca dado que se ha reportado en Costa Rica un aumento en el consumo de mamíferos y un descenso en el consumo de vegetales en los coyotes durante la época seca (Lloyd, 2020), y se sabe que diferentes mamíferos y pequeños vertebrados pueden actuar como hospederos paraténicos de *A. caninum* (Mehlhorn, 2020) Se necesitaría obtener más muestras para establecer con mayor robustez estadística si la época de muestreo o el sexo tienen algún efecto en la prevalencia de nemátodos. También estudios

prospectivos donde se habilite la captura y recaptura de coyotes (uso de collares) y toma de muestras frescas podría ayudar a evaluar con mayor detalle la dinámica de las infecciones por época y por sexo.

Epidemiología de las infecciones por nemátodos en cánidos de Costa Rica: Perros

Los nemátodos encontrados en perros en este estudio coinciden con lo reportado previamente en la literatura nacional: *A. caninum* como el parásito más frecuente en perros, seguido de *T. canis* y *S. lupi* en menor número (Alemán, 2011; Valverde, 2010). En cuanto a los porcentajes de parasitismo, la prevalencia total de nemátodos en perros determinados por *metabarcoding* (34,%, ver cuadro 9) se asemeja a lo encontrado en 2011 por el grupo de Alemán y colaboradores, quienes describieron un 39.1% de parasitismo total en perros de refugios; utilizando técnicas de concentración y microscopía (Alemán, 2011). Otros estudios han descrito prevalencias aún mayores de parasitismo gastrointestinal, como el caso de un estudio de 2010 donde en 158 perros de lugares en riesgo social en las provincias de Heredia, Alajuela, Limón y Puntarenas; y se describió un 57.6% de prevalencia (Valverde, 2010). Estas diferencias posiblemente se deben a las características de la población estudiada, las cuales están determinadas principalmente por el sitio y las condiciones en las que viven los perros estudiados.

En esta investigación se observan diferencias marcadas entre áreas de muestreo. En la figura 11a se observa el ACG, el número de perros positivos por alguno de los 3 nemátodos es mucho mayor que en la ACC y en la comunidad de Mata de Plátano. De acuerdo al estudio de Valverde et al., (2010), la prevalencia de nemátodos en el ACG se acerca bastante a lo descrito para Costa Rica (Valverde, 2010). Incluso, observamos localidades dentro de Guanacaste que tienen un nivel de positividad por nemátodos que alcanza el 100% como el caso de Cuajiniquil, región, en donde además de encontrar todas las muestras positivas, se encontraron 3 coinfecciones entre *A. caninum* y *T. canis*, y 2 entre *A. caninum* y *S. lupi*. Como se mencionó anteriormente, Guanacaste es zona rural fragmentada donde existen zonas boscosas cercanas a comunidades humanas, ganadería y plantaciones extensivas donde hay una alta cercanía de animales domésticos y silvestres, así como la presencia de actividades humanas. Al igual que en el caso de los coyotes, esta es posiblemente la principal causa de mayor prevalencia de nemátodos en esta área. Además no hay que perder de vista que todos

los perros muestreados en el ACG tenían hábitos forrajeros por lo que eran cánidos expuesto al ambiente y sus diferentes fuentes de infección. Es por lo que también se observa una marcada mayor prevalencia en perros de ACG que los perros con hábitat domiciliar de la comunidad de Mata de Plátano (Figura 12a), siendo 38 veces más probable encontrar un perro positivo por nemátodos en el ACG que en Mata de Plátano (Cuadro 11). Este riesgo aumentado de infección por nemátodos en perros con hábitos forrajeros está relacionado con sus hábitos, pues al moverse libremente aumentan su contacto con múltiples fuentes de infección como diferentes personas, animales domésticos, y terrenos. Este contacto con la tierra juega un papel fundamental considerando que la mayor cantidad de infecciones está dada por *A. caninum* y *T. canis*, dos geohelminths. De igual forma estos perros tienen más posibilidad de depredar roedores u otros pequeños animales silvestres, lo que aumenta su riesgo de infección (Tull et al., 2022). A esto se suma a que en las zonas rurales los perros suelen tener un nivel menor de atención veterinaria y consecuentemente una tasa menor de administración de antihelmínticos (Valverde, 2010). Otros estudios en Costa Rica han encontrado también alta frecuencia de infecciones por más de un nemátodo. Por ejemplo, en 2013 un estudio en perros que frecuentan parques y áreas recreativas describió un 13% de perros coinfectados por ancylostomatídeos y *T. vulpis*, un 3%% de perros que portaban al mismo tiempo ancylostomatídeos y *T. canis*, y al menos una muestra que contenía simultáneamente ancylostomatídeos, *T. canis* y *T. vulpis* (Saénz, 2013).

Diferentes variables biológicas y demográficas relacionadas a los perros fueron estudiadas, lo que permite observar que además de la asociación entre área (ACG) y hábitos forrajeros con infecciones por nemátodos, también parece haber una asociación entre la prevalencia de nemátodos y la época seca. De igual forma parece que la existencia de cambios hematológicos en el hemograma (Cuadro 11) está relacionado con la presencia de una infección por nemátodos gastrointestinales. Es decir, es más probable encontrar perros parasitados por nemátodos gastrointestinales en época seca, y si hay un cambio hematológico en el hemograma (Figura 13). Por el contrario no hay una asociación clara entre la prevalencia de nemátodos y la edad de los perros, la talla (pequeño, mediano o grande) o el sitio específico de muestreo. Esto se puede deducir al observar la figura 13 donde vemos que las relaciones entre edad, talla y sitios de muestreo poseen rangos de confianza que atraviesan

el valor 1, haciendo la interpretación poco concluyente (no se puede definir como de riesgo o protector).

Estudios en América, Europa y África han mostrado que *A. caninum* y *T. canis* son más frecuentes en cánidos menores a un año, así como perros con hábito forrajero (Ketzis & Lucio-Forster, 2020; Mohamed et al., 2009a; Savilla et al., 2011). En este estudio el tipo de hábitat de los perros tuvo mayor influencia en la presencia de parásitos que la edad del animal. Por otro lado, los cambios hematológicos son altamente esperables, se observó mayor frecuencia de anemia en perros infectados. Esto concuerda con la fisiopatología de la infección por ancylostomatídeos como *A. caninum*, ya que los nemátodos adultos se alimentan de sangre llevando a anemia y por tanto cambios en la homeostasis sanguínea. Consecuentemente, estudios han comprobado una fuerte asociación entre la presencia de anemia, trombocitopenia y/o leucocitosis con infecciones por *Ancylostoma* spp. (De Andrade Silva et al., 2010).

De igual forma, *T. canis* y *S. lupi* durante su tránsito, desarrollo y estadía en el tracto digestivo provocan secuelas en los perros tales como anorexia, pérdida de sangre y proteínas en el tracto gastrointestinal (por alimentación de los parásitos), alteraciones en el metabolismo proteico o reducción de minerales, entre otros (Adolfo González Bermúdez et al., 2015). Lo anterior también puede reflejarse a través de cambios en el hemograma. En el caso de *S. lupi* se ha documentado anemia microcítica hipocrómica, leucocitosis, neutrofilia, y en casos severos trombocitopenia (Pazzi et al., 2014). En cuanto a *T. canis* se reporta igualmente anemia, leucocitosis y también se ha observado frecuentemente eosinofilia (Abdelkareem et al., 2022).

Comparación entre la detección por microscopía y el uso de herramientas moleculares

Mediante *metabarcoding* del *cox1* se encontró un número mayor de muestras positivas (71/284) que mediante microscopía (57/284) (Cuadro 3). En particular, *S. lupi* no fue detectado con el método tradicional pero sí en 2 muestras a través de la secuenciación profunda de amplicones. Ha sido demostrado que las técnicas moleculares y en especial la secuenciación masiva de amplicones posee una sensibilidad mayor que las técnicas tradicionales con observación microscópica (Avramenko et al., 2015; Gordon et al., 2011).

La sensibilidad de los métodos tradicionales es baja debido a que depende de la pericia técnica del analista al observar, distinguir e identificar los huevecillos y formas larvales, además porque parásitos como *S. lupi* pueden presentar deposición intermitente de huevecillos (van der Merwe et al., 2008).

La variedad de especies detectada mediante la microscopía fue mayor a la obtenida a través de la secuenciación. Es importante considerar que uno de los mayores retos de las técnicas de *metabarcoding* es la selección o desarrollo de “*primers* universales” capaces de detectar la mayor cantidad de taxones posibles (Aivelo & Medlar, 2018). Por ejemplo, el parásito *T. vulpis* fue observado al microscopio pero no detectado en el *metabarcoding*. Desafortunadamente, en BOLD no se encontraron secuencias de *cox1* para este parásito mientras que en la base de datos Genbank existen únicamente 4 secuencias de fragmentos de *cox1* provenientes únicamente del estudio por Callejón et al., (2013a). (Callejón et al., 2013a) Por lo tanto, la ausencia de *T. vulpis* se debe con mayor probabilidad a la falta de referencias adecuadas. Sin embargo, no se descarta un posible fallo en la amplificación. Otras especies detectadas en microscopía (*T. leonina*, *Spirometra sp.* y *Taeniidae*) lograron ser detectados por el método molecular, pero no con la confiabilidad deseada debido a su bajo porcentaje de identidad con las secuencias en la base de referencia. Además, cabe destacar que solo fueron detectados al comparar contra una base de datos poco depurada como lo es la base completa de Genbank. Esta limitación se debe a la alta diversidad de los helmintos y la dificultad de establecer un solo marcador que abarque varios taxones dentro de un mismo filo.

Para superar esta dificultad otros estudios de *metabarcoding* en macroinvertebrados han utilizado “cócteles” de *primers* dirigidos contra diferentes marcadores genéticos (Chan et al., 2022; Robinson et al., 2022). También se ha implementado el uso de múltiples *primers* contra un mismo marcador genético como lo hicieron Prosser y compañía en 2013 cuando diseñaron una mezcla de *primers* para estudiar el *cox1* de helmintos parasíticos (Prosser et al., 2013). Otra limitación de la metodología utilizada en este estudio fue el uso de muestras de coyote presentes en el ambiente, lo cual aumenta la posibilidad de encontrar ADN degradado impidiendo su amplificación (Rojas et al., 2024). Estudios que utilizan collares para captura de individuos de coyote y toma de muestras frescas han detectado parásitos hasta en el 94% de muestras utilizando técnicas tradicionales (Brzeski et al., 2015), por lo que esta

podría ser una medida que mejore el rendimiento también en técnicas de secuenciación profunda de amplicones. Sin embargo, implicaría la sedación y posterior estrés del animal.

El *metabarcoding* mejoró la asignación taxonómica de los helmintos presentes en las muestras a pesar de que la diversidad biológica fue reducida. Por ejemplo, a través de microscopía solo pudo reportarse la observación de individuos de la familia “Ancylostomatiidae” pero con el uso del *metabarcoding* se logró delimitar a la especie *A. caninum*. Es por esto que las técnicas de secuenciación profunda de amplicones poseen una mayor resolución taxonómica (Chan et al., 2021). Además, el número de coinfecciones encontradas en microscopía y *metabarcoding* fue similar, ya que en ambos métodos casi la totalidad de las coinfecciones estuvieron dadas por la presencia de ancylostomatídeos con otro helminto. No obstante, dos muestras de coyotes presentaron *T. canis* con *Spirometra* sp. o coccidios.

Las coinfecciones más comunes en otras ubicaciones geográficas son generadas por ancylostomatídeos y otro helminto, por lo general geohelminthos como *T. canis* y estrongilídeos. Esto probablemente se deba a que estas especies se transmiten por la misma vía de infección (Dubie et al., 2023; Pumidonming et al., 2016), como se ha observado en coyotes de Norteamérica (Petters et al., 2019; W. K. Redman et al., 2016). En otros estudios se ha logrado identificar que la edad y los hábitos forrajeros son factores de riesgo a la poliparasitemia en perros (Enriquez et al., 2019; Macpherson et al., 2023). Los perros más jóvenes usualmente tienen mayor riesgo a tener infecciones por múltiples helmintos ligado a la transmisión intrauterina, transmamaria y a la inmadurez del sistema inmune (Enriquez et al., 2019). Por otro lado, los hábitos forrajeros aumentan el número de contactos de los perros con posibles fuentes de infección como otros perros y animales silvestres, así como contacto con personas y con diferentes terrenos que podrían ser fuente de infección (Macpherson et al., 2023)

Existe un vacío de información acerca de los mecanismos de las coinfecciones helmínticas en cánidos. Sin embargo, en otros mamíferos se han estudiado *in vitro* e *in vivo* las dinámicas de las relaciones inter-especie y con el hospedero. Es así como se ha determinado que existe una sinergia entre nématodos que coinfectan seres humanos. Por ejemplo, se ha determinado una relación positiva para el poliparasitismo por *Ascaris lumbricoides* y ancylostomatídeos, también para ancylostomatídeos-*Trichuris trichiura*

(Donohue et al., 2019). Además, en conejos silvestres *Oryctolagus cuniculu* se logró determinar un efecto positivo de *Cittotaenia. denticulata* en la intensidad de la infección por *Trichostrongylus retortaeformis* cuando ambas especies se encuentran en el mismo individuo (Lello et al., 2004). Algunos de los mecanismos que intervienen en el desempeño de una coinfección son la competencia por recursos, la interacción con la microbiota y la capacidad de modular el sistema inmune del hospedero (Lello et al., 2004). Sin embargo, aún es un área que necesita de mayor exploración y debe estudiarse individualmente cada caso de poliparasitismo en su respectivo hospedero.

Variabilidad genética de nemátodos de perros y coyotes de Costa Rica

Las secuencias analizadas de *A. caninum* demostraron que existe una alta variabilidad genética en esta especie. De acuerdo con los análisis filogenéticos (Figura 14), hubo pocas diferencias entre los especímenes que infectan coyotes y perros, y no se observó un agrupamiento de acuerdo con el sitio de colecta (ACG, ACCy Mata de Plátano). Las secuencias de Costa Rica se agruparon indistintamente con las de Asia (China, Bangladesh), Oceanía (Australia) y América (E.U.A). De igual forma las redes de haplotipos TCS no mostraron agrupamientos según el área de colecta ni el cánido del cual se obtuvieron. La falta de agrupamiento por cánido o sitio de colecta refuerza la hipótesis de *A. caninum* circular entre coyotes y perros, y que no se han encontrado aún haplotipos que tengan preferencia por un cánido u otro. Existe poca información genética de especímenes extraídos de seres humanos, al ser afecciones dérmicas dónde rara vez se obtiene el espécimen (Mega Ayunita Suprpto et al., 2024). Sin embargo dado el conocido potencial zoonótico de *A. caninum*, la existencia de este parásito en coyotes y su circulación a perros domésticos resalta el riesgo que representa para la salud humana.

Los estudios enfocados en la diversidad genética de *A. caninum* son escasos. Sin embargo, en otras investigaciones se ha observado que los individuos de *A. caninum* extraídos de distintos hospederos presentan una alta homología genética. Por ejemplo, en el sur de China, se determinó que los gatos son el principal hospedero de *A. caninum* y que las secuencias de *cox1* extraídas de especímenes de gatos se colocaban en el mismo nodo con secuencias de perros al elaborar árboles filogenéticos (Y. Liu et al., 2013). Una investigación reciente por Quintana et al., (2023), lograron identificar 35 haplotipos al estudiar secuencias

de especímenes de E.U.A, Brasil, Australia y China; no obstante, existe una subrepresentación importante al no incluirse secuencias de especímenes africanos o europeos. Cabe destacar que 25 de estos 35 haplotipos se encuentran en E.U.A lo que evidencia una alta diversidad genética de *A. caninum* en este país (Quintana et al., 2023). En contraste, en el presente estudio no se logran identificar haplotipos asociados a áreas específicas dentro del país (ACG,ACC o MDP), esto posiblemente debido al número de muestras analizadas y al área considerablemente menor de Costa Rica comparada contra E.U.A. Por lo tanto, nuestros resultados se asemejan a lo obtenido en estudios anteriores.

Al analizar la filogenética de *T. canis* encontramos similitudes con lo encontrado en *A. caninum*. No se observó un agrupamiento por continente, sin embargo, se detectó que las secuencias de Costa Rica agruparon con las de Irán y Alemania, mientras que por otro lado se agrupan las secuencias de Corea, China y Polonia (Figura 16). Otros autores han encontrado hallazgos similares. Por ejemplo, en el 2023 se analizaron secuencias del gen *cox1* y de aminoácidos de *T. canis* provenientes de E.U.A, Australia, Brasil, China, Japón, Portugal, Dinamarca, Rusia, Irán, Polonia y Países Bajos (Martin et al., 2023), que demostraron que no existe un agrupamiento de acuerdo con la ubicación geográfica. A nivel interno del país tampoco fue posible determinar si existen diferencias genéticas entre los individuos de *T. canis* que infectan cánidos en el ACG y el ACC, esto debido a que todas las muestras positivas por *T. canis* provinieron de ACG, a excepción de una que provenía de ACC. Igualmente, no se estudiaron diferencias genéticas por cánido hospedero dado que todas las muestras positivas fueron de perro. Se necesitaría obtener un número mayor de muestras positivas por *T. canis* en diferentes localidades del país, e incluir muestras de coyotes y perros, para poder evaluar a cabalidad la variedad genética de este parásito y las variables que influyen en esta.

Las secuencias obtenidas de *S. lupi* de perros de la ACG agrupan en un mismo nodo con secuencias tomadas de parásitos adultos de especímenes obtenidas de perros en Costa Rica, y México (Figura 17), y cercanas a las de especímenes de Israel y Sudáfrica. Se han descrito dos genotipos de *S. lupi* utilizando los marcadores genéticos ITS1, *cox1* y 18S rDNA: el primer genotipo incluye especímenes de Australia, India, Israel y Sudáfrica, mientras que el segundo genotipo especímenes de Hungría e Italia (Rojas, Dvir, et al., 2018). Se determinó que las secuencias derivadas de este estudio agruparon en el genotipo 1, lo cual

coincide con un estudio reciente, donde se infirió que los especímenes de *S. lupi* provenientes de América (E.U.A, Perú y Costa Rica) pertenecen al genotipo 1 y están estrechamente relacionados con especímenes de Israel (Alfaro-Segura et al., 2023).

Para poder evaluar a mayor profundidad la variabilidad genética de *S. lupi* y obtener datos acerca de posibles diferencias a lo interno del país y en otros hospederos potenciales coyotes se necesitan de estudios más amplios con un mayor número de muestras. Hasta la fecha no hay publicaciones científicas que reporten *S. lupi* en coyotes en Costa Rica. No obstante, *S. lupi* ha sido reportado en México y el sur de E.U.A. Sin embargo, las descripciones no han profundizado sobre las lesiones, estadios del parásito o los métodos utilizados para confirmar que se trataba de *S. lupi* verdaderamente (Foster et al., 2003; Luna-Estrada et al., 2017). Los coyotes y perros tienen mayor cercanía debido al acercamiento de seres humano a zonas silvestres. Esto aumenta el riesgo de transmisión de especies de nemátodos gastrointestinales que pueden infectar a ambos cánidos, como se ha destacado a lo largo de este trabajo.

Análisis de diversidad ecológica de los nemátodos gastrointestinales de cánidos de Costa Rica

Los análisis de diversidad alfa se enfocan en evaluar la diversidad de especies o unidades taxonómicas (en este caso representadas por ASVs distintos) dentro de una sola comunidad o muestra (Jurburg et al., 2022). En este estudio el análisis de alfa diversidad, medido por el índice de diversidad de Faith y el de Shannon, reveló una mayor diversidad en las muestras de la ACG que en las de la ACC. Por el contrario, el índice de Equidad de Pielou no encontró diferencias estadísticamente significativas entre estas dos áreas de muestreo (Figura 18). El índice de diversidad de Faith toma en cuenta tanto la riqueza de especies (número de especies diferentes) en una muestra, así como las relaciones filogenéticas de estas especies (Faith, 1992). Un índice de Faith mayor significa entonces que la comunidad de nemátodos en las muestras de la ACG es más diversa en términos de número diferente de ASVs presentes en cada muestra y la distancia evolutiva de dichos ASVs. En la Figura 18a se observaron unas muestras del ACG con un valor de Faith entre 0.3 y 0.7, mientras que los demás *violin plots* concentran sus valores entre 0.2 y 0.3. El índice de Shannon por su parte, evalúa las muestras según su riqueza y uniformidad. Con uniformidad

se refiere a qué tan equitativamente están distribuidas esas especies (ASVs) en la comunidad (muestra), si hay mayor dominancia de unas pocas ASV quiere decir que hay una baja uniformidad (Herrmann et al., 2022). El índice de Shannon mayor en ACG confirma que este sitio de muestreo presenta mayor riqueza de ASV, y además indica que estas ASVs están mejor distribuidas. El índice de Shannon de las muestras de la ACG se concentra entre 2 y 4 en el *violin plot*, mientras que para la ACC valores iguales o cercanos a 0. En otras palabras, la comunidad de nématodos gastrointestinales en el ACC se compone de menos ASVs y hay mayor dominancia de algunos ASVs específicos.

El índice de Pielou mide uniformidad de forma independiente de la riqueza de especies, y es una métrica derivada del índice de Shannon (Herrmann et al., 2022). En este trabajo, la equidad de Pielou no mostró diferencias significativas entre la ACG y ACC, lo cual sugiere que la forma en que los ASVs están distribuidos en ambas comunidades es similar. Como se observa en la Figura 18b, la equidad de Pielou promedio de ACG y ACC fue mayor a 0.5, y se observó que estos valores se concentran por encima de 0.5 para las dos áreas de muestreo y ambos cánidos estudiados. Esto sugiere que las muestras estudiadas tienen una distribución equitativa de sus ASV (Herrmann et al., 2022).

En síntesis, en la ACG se encontró mayor riqueza, y número de ASVs diferentes por muestra que en la ACC (según los índices de Faith y Shannon). Además, esos ASVs tuvieron mayor distancia evolutiva entre sí que los ASVs de la ACC (índice de Faith). Sin embargo, la distribución (la abundancia relativa de las especies por muestra) es similar entre ambas comunidades, y esto se debe al gran número de ASVs de *A. caninum* que predomina tanto en coyotes como perros (Figura 4). Las características socio geográficas de la ACG pueden jugar un rol importante que explica el mayor número y diversidad de especies y/o ASVs en la zona, pues el predominio de zonas rurales fragmentadas donde existen zonas boscosas cercanas a comunidades humanas y presencia de animales domésticos y silvestres interactuando de forma cercana ha facilitado la transmisión de parásitos (Lloyd, 2020). Cabe recalcar la posible influencia también de un factor temporal, pues la ACG tiene reportes de coyotes más antiguos que el resto de Costa Rica (Vaughan, 1983). Por lo que el contacto de coyotes con seres humanos y con perros en Guanacaste tiene una historia mucho más larga, pudiendo influir en la diversidad genética encontrada. Por otro lado, no se observaron diferencias

significativas entre perros y coyotes, por lo que al agrupar por cánido las comunidades tienen valores de alfa diversidad (riqueza, abundancia relativa y distancia filogenética) similares.

Los análisis de diversidad beta sirven para medir cuán diferentes son las comunidades de microorganismos entre distintos grupos. Para lograrlo se compararon la cantidad, abundancia o las relaciones filogenéticas de las especies o unidades taxonómicas (ASVs, OTUs) que componen cada grupo (Calderón-Patrón et al., 2012). El índice de disimilitud de Bray-Curtis determinó diferencias significativas entre sitios de muestreo, concretamente entre Mata de Plátano y las otras dos áreas (ACC y ACG) (Cuadro 13). Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas entre las comunidades de nemátodos por área de muestreo de acuerdo con el Unifrac ponderado y no ponderado. Integrar estos resultados permite inferir que la comunidad de Mata de Plátano contiene los mismos ASVs o muy similares filogenéticamente a los que existen en la ACC y ACG, pero las proporciones (abundancias relativas) de estos ASVs son diferentes en esta área de muestreo.

Para entender esta afirmación es importante recordar que la disimilitud de Bray-Curtis solo analiza las diferencias en la abundancia de especies, sin importar la filogenia (Bray & Curtis, 1957) mientras que el Unifrac (tanto ponderado como no ponderado) compara la composición de especies entre comunidades considerando sus relaciones filogenéticas (C. Lozupone & Knight, 2005). Las diferencias en la abundancia relativa entre sitios de muestreo también pueden observarse en la Figura 5. El análisis de diversidad beta por cánido, se observa en el Cuadro 14 demostró que las diferencias significativas se encuentran en Unifrac no ponderado y no en los otros dos índices. Es decir, el nemabioma de perros y coyotes presenta diferencias en las especies (ASVs) que contiene, pero las especies más abundantes son similares en ambas comunidades.

Como se mencionó anteriormente los coyotes de este estudio solamente produjeron ASVs con alto nivel de PID para *A. caninum*, mientras que los perros además presentaron ASVs para *T. canis* y *S. lupi*. No obstante, la especie más predominante con un número muy alto de muestras positivas y ASVs detectados fue *A. caninum* tanto en perros como coyotes. A la luz de lo anterior, es de esperar que solamente la disimilitud de Bray-Curtis (que considera únicamente abundancia) no encontrara diferencias, mientras que Unifrac no ponderado que pone mayor peso a las diferencias filogenéticas si lo hiciera. Es importante mantener presente que la mayoría de las muestras de coyote incluidas en este estudio

proviene del ACC, por lo que estudiar más muestras de coyotes en otros sitios del país permitiría evitar posibles sesgos y tener un panorama más exacto claro de las diferencias y similitudes del nemabioma de perros y coyotes en Costa Rica.

Nemabioma: Retos de las tecnologías de secuenciación de nueva generación

Es de suma importancia considerar que los taxones descritos en un análisis de secuenciación profunda de amplicones están determinados en gran parte por la base de datos usada como referencia de comparación. Es así como observamos que al comparar los ASVs obtenidos contra la base de datos personalizada obtenemos asignaciones taxonómicas altamente fiables, con un 99% de PID y 100% de QC, sin embargo, solo se identificaron 3 parásitos. Por el contrario, al utilizar la base de datos GenBank, una base sumamente amplia, se obtuvo un número mayor de especies, con tres especies de helmintos adicionales: *T. pisiformis*, *Alaria* sp. y *Strongyloides* sp. Esto se debe a que la base personalizada solo contiene secuencias correspondientes a especies del filo Nematoda mientras que en GenBank se encuentran secuencias de especies del Reino animal. Además, GenBank no es una base de datos curada y personalizada para adaptarse a los *primers* utilizados en este análisis, por lo que las congruencias encontradas presentan menor fiabilidad y no son reproducibles. Falsos positivos y asignaciones taxonómicas erróneas podrían darse al comparar nuestros ASVs contra GenBank.

En este sentido, el poseer datos de observación al microscopio permite tener una validación adicional de lo detectado a través del ensayo molecular, como es el caso del hallazgo de huevecillos de la familia Taeniidae, los cuales se hallaron a través de la comparación con la base GenBank y no con la base de datos personalizada. Sin embargo, su observación a través del microscopio brinda respaldo a este hallazgo que podría considerarse poco fiable pues se hizo mediante una base no curada y con bajo porcentaje de identidad. La necesidad de bases de datos robustas y con altos estándares de calidad ha sido expresado por la comunidad científica. Algunas de las consecuencias al comparar secuencias con una base de datos tan grande y que recibe información de tantas fuentes incluyen: etiquetado incorrecto, conflicto de secuencia (secuencias muy distintas asignadas al mismo taxón), conflicto taxonómico (una misma secuencia identificada con 2 o más taxones distintos), baja

resolución taxonómica, taxones faltantes y variantes intraespecíficas faltantes, entre otras (Keck et al., 2023).

Otro de los desafíos del *metabarcoding* es la selección de “*primers universales*”, es decir *primers* que amplifiquen el ADN del mayor número de taxones posibles. Los *primers* utilizados en este ensayo detectaron un número amplio de especies, incluso especies fuera del filo Nematoda, como los céstodos de la familia Taeniidae y *Spirometra* spp., y de tremátodos como *Alaria* sp. Sin embargo, algunas especies observadas en el microscopio no fueron detectadas, como es el caso de *T. vulpis* y *T. leonina*. El número de apareamientos incorrectos (discrepancias o *mismatches* en inglés) entre bases de los *primers* y el ADN de las especies blanco influye en la relación entre la biomasa de las especies y la abundancia de lecturas en la secuenciación. La tasa de éxito de amplificación difiere de acuerdo con el número de genes ribosómicos y mitocondriales entre especies, en la composición de la comunidad resultante de acuerdo al método de extracción de ADN, los *primers* utilizados y tipo de secuenciación. Dependiendo de los pasos de amplificación o secuenciación, puede haber diferentes tasas de error en los amplicones lo que lleva a que en el control de calidad se descarten proporcionalmente más amplicones de ciertas especies (Aivelo & Medlar, 2018).

La aplicación del *metabarcoding* a las helmintiasis de animales es reciente y hacen falta más estudios que profundicen en el sesgo de amplificación de los *primers*. Sin embargo, estudios en artrópodos han comparado el rendimiento del gen 16S y el *cox1* y han demostrado que existe una correlación significativa entre la biomasa de las especies y la abundancia de lecturas para el 16S, pero no para *cox1*, el cual suele tener más *mismatches* en sus *primers* (M. Liu et al., 2023). Diferentes modelos han confirmado que el tipo y número de *mismatches* influyen en el sesgo de amplificación al realizar estudios de secuenciación profunda de amplicones tales como el *metabarcoding* (Piñol et al., 2015).

En esta investigación se observó una predominancia de *A. caninum*, siendo el parásito más frecuente y abundante tanto en perros como en coyotes y en todos los sitios de muestreo. Podría existir un sesgo de amplificación que haga que los *primers* amplifiquen preferencialmente las secuencias de este parásito. Una forma de evaluar el impacto de este sesgo sería la elaboración de muestras control o “*mock samples*”, similar a lo realizado en los ensayos de nemabioma en ganado (Avramenko et al., 2015). Las *mock samples* se

elaboran colocando múltiples especies de nemátodos en una solución estéril, en cantidades conocidas, de manera que al secuenciar se esperaría que el número de ASVs de cada nemátodo siga la misma proporción que el número de huevecillos o larvas colocados en la muestra *mock*. Sin embargo, realizar un control similar puede ser retador en el caso de cánidos, dado que el número e identidad de los nemátodos infectantes de coyotes y perros suele ser variable entre individuos; a diferencia por ejemplo del ganado ovino en donde se ha identificado al menos 10 especies principales que suelen estar presentes en todas las ovejas (E. Redman et al., 2019).

Alternativamente, se podría utilizar *primers* para diferentes marcadores genéticos. Como se mencionó anteriormente, algunos parásitos como *T. vulpis* no se pudieron amplificar con los *primers* utilizados, y fue detectada únicamente mediante microscopía. Existen pocos registros en bases de datos de secuencias de *cox1* de *T. vulpis*, y los existentes han utilizado *primers* distintos a los seleccionados para este ensayo. Por el contrario, estudios moleculares en este parásito han logrado detectar en diferentes hospederos a través del marcador nuclear ITS1 y el ARN ribosomal 18S (Callejón et al., 2013b; Cutillas et al., 2007). Los genes mitocondriales, como la subunidad 1 del citocromo oxidasa (*cox1*), el citocromo b (*cytb*) y la subunidad 1 de la nicotinamida adenina dinucleótido hidruro (NADH) deshidrogenasa (*nad1*), y el ARNr mitocondrial 12S y 16S tienen alto poder de resolución para niveles taxonómicos inferiores (es decir, identificación a nivel de género y especie) y permiten resolver filogenias a nivel de especie debido a su alto grado de variación.

De manera similar, los espaciadores transcritos internos (ITS) 1 y 2 del ADN nuclear ribosómico también muestran un alto grado de variación de secuencia, con el desafío de que algunos nemátodos pueden tener múltiples copias de este gen, dificultando su análisis (Mejías-Alpizar et al., 2024). Por el contrario, el gen del ARNr nuclear 18S está altamente conservado dentro de las especies y tiene una baja variabilidad interespecífica, pero se ha empleado para caracterizar comunidades de nemátodos en niveles taxonómicos superiores. En conjunto, la variabilidad de cada marcador genético ofrece una resolución diferente para los análisis filogenéticos y permitiría la caracterización de comunidades de nemátodos complejas (Chan et al., 2021).

Además de las estrategias mencionadas para el aumento de la sensibilidad y poder de resolución del nemabioma en cánidos, también debe considerarse la implementación de

estrategias que permitan recolectar muestras frescas. Dado que el tiempo en el ambiente no fue posible determinar en este ensayo y podría ser un factor influyente en la calidad del ADN extraído a partir de las heces. Una posibilidad es el uso de estrategias de atrapamiento de individuos, sedación y obtención de la muestra por acceso rectal. Sin embargo, esta es una estrategia metodológica invasiva, que causa cierta afectación al tratarse de vida silvestre. Alternativamente podrían considerarse el uso de protocolos moleculares menos sensibles a la calidad e integridad del ADN, como lo son las tecnologías de secuenciación de nueva generación independientes de amplificación (Chang et al., 2024; Plewnia et al., 2024).

8. CONCLUSIONES

- Se identificaron al menos 9 especies distintas de helmintos en coyotes y perros de Costa Rica a través del *metabarcoding* de *cox1*, siendo las especies más importantes en cuanto a porcentaje de identidad en la asignación taxonómica *A. caninum*, *T. canis* y *S. lupi*.
- *A. caninum* fue el parásito gastrointestinal más frecuente y abundantemente encontrado tanto en coyotes de parques nacionales en ACG y ACC como en los perros de comunidades aledañas.
- El ACG presentó mayor número de individuos de coyotes y perros infectados por nemátodos gastrointestinales.
- Se detectaron infecciones múltiples dadas por *A. caninum* y otro(s) nemátodo(s) como *T. canis* o *S. lupi* en perros de la ACG .
- Se determinó un mayor riesgo de infección por nemátodos gastrointestinales en perros con hábitos forrajeros que en aquellos con hábitos domiciliarios.
- Se observó una asociación significativa entre la presencia de nemátodos gastrointestinales en perros y la presencia de cambios hematológicos como anemia, trombocitopenia y/o leucocitosis.
- El análisis genético reveló que los mismos genotipos de *A. caninum* circulan entre coyotes y perros lo que sugiere un vínculo entre el ciclo selvático y el doméstico
- Se observó una mayor riqueza de especies y secuencias (ASV) distintas de nemátodos en perros de la ACG que en ACC o la comunidad de Mata de Plátano

8.1. Perspectivas futuras

- Incluir otros marcadores genéticos para aumentar el poder de detección y mejorar la resolución a nivel taxonómico del nemabioma y posiblemente el “helmintoma” de cánidos.
- Construir “mock communities” que incluyan cantidades conocidas de los diferentes nemátodos que pueden hallarse en perros y coyotes para determinar posibles sesgos de amplificación del nemabioma.
- Implementar metodologías libres de amplificación o estrategias de captura no invasivas para la obtención de muestras frescas con el fin de aumentar el éxito de amplificación.
- Obtener carcasas o tejido disectado de coyotes y perros que permitan la obtención de nemátodos adultos y su estudio genético para la validación de la existencia de transmisión entre ciclo selvático y doméstico.

9. REFERENCIAS

- Abdelkareem, M., Abdel-Raheem, A.-R. A., & Mohamed, A. E. A. (2022). Hemato-Biochemical changes in dogs infected with *Toxocara canis* in Hurghada and Luxor governorate. *SVU-International Journal of Veterinary Sciences*, 5(1), 56–67. <https://doi.org/10.21608/svu.2022.90894.1143>
- Adolfo González Bermúdez, G., Alfaro Campos, K., & Trejos Trejos, J. (2015). *R E S U M E N* (Vol. 29, Issue 2).
- AIVELO, T., & MEDLAR, A. (2018). Opportunities and challenges in metabarcoding approaches for helminth community identification in wild mammals. *Parasitology*, 145(5), 608–621. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000610>
- Aivelo, T., & Medlar, A. (2018). Opportunities and challenges in metabarcoding approaches for helminth community identification in wild mammals. In *Parasitology* (Vol. 145, Issue 5, pp. 608–621). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000610>
- Alemán, J. (2011). *Prevalencia de parásitos gastrointestinales en siete refugios de perros abandonados del Valle Central, Costa Rica* [Tesis]. Universidad Nacional.
- Alfaro-Segura, P., Baneth, G., & Rojas, A. (2024). *Spirocerca lupi*. *Trends in Parasitology*, 40(8), 763–764. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2024.04.014>
- Alfaro-Segura, P., Robleto-Quesada, J., Montenegro-Hidalgo, V. M., Molina-Mora, J. A., Baneth, G., Verocai, G. G., Rodríguez-Vivas, R. I., & Rojas, A. (2023). Elucidating *Spirocerca lupi* spread in the Americas by using phylogenetic and phylogeographic analyses. *Frontiers in Parasitology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fpara.2023.1249593>
- Alimu, D. (2024). *Forestploter* (1.1.2).
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alvarado-Borja, V., Valladares-Carranza, B., Ortega-Santana, C., Rivero-Pérez, N., Bañuelos-Valenzuela, R., Zaragoza-Bastida, A., Delgadillo-Ruiz, L., & Velázquez-Ordoñez, V. (2023). Infección por *Toxocara canis* y su importancia en la salud animal

- y en la salud pública: una revisión. *Salud y Tecnología Veterinaria*, 11(2), 51–66. <https://doi.org/10.20453/stv.v11i2.5134>
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26(1), 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>
- Anene, B. M., Nnaji, T. O., & Chime, A. B. (1996). Intestinal parasitic infections of dogs in the Nsukka area of Enugu State, Nigeria. *Preventive Veterinary Medicine*, 27(1–2), 89–94. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(95\)00527-7](https://doi.org/10.1016/0167-5877(95)00527-7)
- Antonopoulos, A., Gilleard, J. S., & Charlier, J. (2024). Next-generation sequencing technologies for helminth diagnostics and surveillance in ruminants: shifting diagnostic barriers. *Trends in Parasitology*, 40(6), 511–526. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2024.04.013>
- Avramenko, R. W., Bras, A., Redman, E. M., Woodbury, M. R., Wagner, B., Shury, T., Liccioli, S., Windeyer, M. C., & Gilleard, J. S. (2018). High species diversity of trichostrongyle parasite communities within and between Western Canadian commercial and conservation bison herds revealed by nemabiome metabarcoding. *Parasites and Vectors*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2880-y>
- Avramenko, R. W., Redman, E. M., Lewis, R., Bichuette, M. A., Palmeira, B. M., Yazwinski, T. A., & Gilleard, J. S. (2017). The use of nemabiome metabarcoding to explore gastrointestinal nematode species diversity and anthelmintic treatment effectiveness in beef calves. *International Journal for Parasitology*, 47(13), 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.06.006>
- Avramenko, R. W., Redman, E. M., Lewis, R., Yazwinski, T. A., Wasmuth, J. D., & Gilleard, J. S. (2015). Exploring the gastrointestinal “nemabiome”: Deep amplicon sequencing to quantify the species composition of parasitic nematode communities. *PLoS ONE*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143559>
- Azofeifa, Y. (2024). Áreas de actividad y dieta del *Canis latrans* en el contexto etnoecológico de los bosques tropical seco-transición húmedo, bosque muy húmedo, premontano, montano y subalpino en Costa Rica. *Technical Report*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.14858.64965>

- Beck, J., & Schwanghart, W. (2010). Comparing measures of species diversity from incomplete inventories: an update. *Methods in Ecology and Evolution*, *1*(1), 38–44. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2009.00003.x>
- Bekoff, M. (1977). *Canis latrans*. *Mammalian Species*, *79*, 1–9. <https://doi.org/10.2307/3503817>
- Bidlack, A. L., Reed, S. E., Palsbøll, P. J., & Getz, W. M. (2007). Characterization of a western North American carnivore community using PCR-RFLP of cytochrome b obtained from fecal samples. *Conservation Genetics*, *8*(6), 1511–1513. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9285-3>
- Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, *6*(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bouchard, É., Schurer, J. M., Kolapo, T., Wagner, B., Massé, A., Locke, S. A., Leighton, P., & Jenkins, E. J. (2021). Host and geographic differences in prevalence and diversity of gastrointestinal helminths of foxes (*Vulpes vulpes*), coyotes (*Canis latrans*) and wolves (*Canis lupus*) in Québec, Canada. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *16*, 126–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.09.002>
- Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., Jones, G., Kühnert, D., De Maio, N., Matschiner, M., Mendes, F. K., Müller, N. F., Ogilvie, H. A., du Plessis, L., Poppinga, A., Rambaut, A., Rasmussen, D., Siveroni, I., ... Drummond, A. J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLOS Computational Biology*, *15*(4), e1006650. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>

- Bourque, A., Whitney, H., & Conboy, G. (2005). Angiostrongylus vasorum infection in a coyote (*Canis latrans*) from Newfoundland and Labrador, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(4), 816–819. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.4.816>
- Bowles, J., Blair, D., & Mcmanus, D. P. (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. In *Molecular and Biochemical Parasitology* (Vol. 54).
- Bowman, D. D. (2020). *The anatomy of the third-stage larva of Toxocara canis and Toxocara cati* (pp. 39–61). <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.03.002>
- Bowman, D. D., Lucio-Forster, A., & Lee, A. C. Y. (2021). Hookworms. In *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat* (pp. 1436–1443). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-50934-3.00113-0>
- Bowman, D. D., Montgomery, S. P., Zajac, A. M., Eberhard, M. L., & Kazacos, K. R. (2010). Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. In *Trends in Parasitology* (Vol. 26, Issue 4, pp. 162–167). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.005>
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Bridger, K. E., Baggs, E. M., & Finney-Crawley, J. (2009). Endoparasites of the Coyote (*Canis latrans*), a Recent Migrant to Insular Newfoundland. In *Journal of Wildlife Diseases* (Vol. 45, Issue 4). http://meridian.allenpress.com/jwd/article-pdf/45/4/1221/2239552/0090-3558-45_4_1221.pdf
- Brzeski, K. E., Harrison, R. B., Waddell, W. T., Wolf, K. N., Rabon, D. R., & Taylor, S. S. (2015). Infectious disease and red Wolf conservation: Assessment of disease occurrence and associated risks. *Journal of Mammalogy*, 96(4), 751–761. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyv080>
- Bucklin, A., Lindeque, P. K., Rodriguez-Ezpeleta, N., Albaina, A., & Lehtiniemi, M. (2016). Metabarcoding of marine zooplankton: prospects, progress and pitfalls. *Journal of Plankton Research*, 38(3), 393–400. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbw023>
- Calderón-Patrón, J. M., Moreno, C. E., & Zuria, I. (2012). La diversidad beta: medio siglo de avances. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83(3), 879–891. <https://doi.org/10.7550/rmb.25510>

- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Callejón, R., Nadler, S., De Rojas, M., Zurita, A., Petrášová, J., & Cutillas, C. (2013a). Molecular characterization and phylogeny of whipworm nematodes inferred from DNA sequences of *cox1* mtDNA and 18S rDNA. *Parasitology Research*, *112*(11), 3933–3949. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3584-z>
- Callejón, R., Nadler, S., De Rojas, M., Zurita, A., Petrášová, J., & Cutillas, C. (2013b). Molecular characterization and phylogeny of whipworm nematodes inferred from DNA sequences of *cox1* mtDNA and 18S rDNA. *Parasitology Research*, *112*(11), 3933–3949. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3584-z>
- Carazo-Salazar, J., Haroutiounian, T., Artavia, A., Bone-Guzmán, R., & Paniagua, D. (2020). Ampliación del ámbito de distribución del coyote en la Península de Osa, Costa Rica. *Revista Mexicana de Mastozoología (Nueva Epoca)*, *10*(2), 17. <https://doi.org/10.22201/ie.20074484e.2020.10.2.303>
- Castro, A., & Guerrero, O. (2010). *Técnicas de diagnóstico parasitológico* (2ed ed.). Editorial UCR.
- Chan, A. H. E., Chaisiri, K., Saralamba, S., Morand, S., & Thaenkham, U. (2021). Assessing the suitability of mitochondrial and nuclear DNA genetic markers for molecular systematics and species identification of helminths. *Parasites and Vectors*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04737-y>
- Chan, A. H. E., Saralamba, N., Saralamba, S., Ruangsittichai, J., Chaisiri, K., Limpanont, Y., Charoennitawat, V., & Thaenkham, U. (2022). Sensitive and accurate DNA metabarcoding of parasitic helminth mock communities using the mitochondrial rRNA genes. *Scientific Reports*, *12*(1), 9947. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14176-z>
- Chang, J. J. M., Ip, Y. C. A., Neo, W. L., Mowe, M. A. D., Jaafar, Z., & Huang, D. (2024). Primed and ready: nanopore metabarcoding can now recover highly accurate consensus barcodes that are generally indel-free. *BMC Genomics*, *25*(1), 842. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10767-4>

- Christoforou, M., Orford, M., & Tsaltas, D. (2017). Molecular Diagnostic Tools for Nematodes. In *Nematology - Concepts, Diagnosis and Control*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69075>
- Colella, V., Bradbury, R., & Traub, R. (2021). *Ancylostoma ceylanicum*. In *Trends in Parasitology* (Vol. 37, Issue 9, pp. 844–845). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.04.013>
- Cove, M. V, Pardo, L. E., Spínola, R. M., Jackson, V. L., & Sáenz, J. C. (n.d.). *Canis latrans expansion in northeastern Costa Rica COYOTE Canis latrans (CARNIVORA: CANIDAE) RANGE EXTENSION IN NORTHEASTERN COSTA RICA: POSSIBLE EXPLANATIONS AND CONSEQUENCES*. www.teamnetwork.org
- Cutillas, C., de Rojas, M., Ariza, C., Ubeda, J. M., & Guevara, D. (2007). Molecular identification of *Trichuris vulpis* and *Trichuris suis* isolated from different hosts. *Parasitology Research*, 100(2), 383–389. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0275-z>
- Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2014). Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: Opening the black box. In *Parasites and Vectors* (Vol. 7, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-22>
- Datz, C. (2011). Parasitic and Protozoal Diseases. In *Small Animal Pediatrics* (pp. 154–160). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-4889-3.00019-X>
- Davey, M. L., Utaaker, K. S., & Fossoy, F. (2021). Characterizing parasitic nematode faunas in faeces and soil using DNA metabarcoding. *Parasites & Vectors*, 14(1), 422. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04935-8>
- De Andrade Silva, B. J., A. Freire, I. M., Da Silva, W. B., & G. DoAmarante, E. E. V. (2010). AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS NAS INFECÇÕES POR HELMINTOS E PROTOZOÁRIOS EM CÃES (CANIS LUPUS FAMILIARIS, LINNAEUS, 1758). *Neotropical Helminthology*, 4(1), 37–48. <https://doi.org/10.24039/rnh2010411090>
- De Barba, M., Miquel, C., Boyer, F., Mercier, C., Rioux, D., Coissac, E., & Taberlet, P. (2014). DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet. *Molecular Ecology Resources*, 14(2), 306–323. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12188>

- De Liberato, C., Iatta, R., Scarito, M. A., Grifoni, G., Dante, G., & Otranto, D. (2022). Strongyloides stercoralis in a dog litter: Evidence suggesting a transmammary transmission. *Acta Tropica*, 231, 106465. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106465>
- der Merwe L, van L. (2010). *REVIEW: CHALLENGES IN DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CANINE SPIROCERCOSIS* (Vol. 5, Issue 1).
- Derycke, S., Vanaverbeke, J., Rigaux, A., Backeljau, T., & Moens, T. (2010). Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. *PLoS ONE*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013716>
- Di Cataldo, S., Cevidanes, A., Sepúlveda-García, P., Alvarado-Rybak, M., Lia, R. P., Otranto, D., Terio, K., Müller, A., & Millán, J. (2023). Spirocercosis in the stomach of two Andean foxes (*Lycalopex culpaeus*) from Chile. *Parasitology Research*, 122(6), 1261–1269. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07825-3>
- Donohue, R. E., Cross, Z. K., & Michael, E. (2019). The extent, nature, and pathogenic consequences of helminth polyparasitism in humans: A meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(6), e0007455. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007455>
- Dubie, T., Sire, S., Fentahun, G., & Bizuayehu, F. (2023). Prevalence of Gastrointestinal Helminths of Dogs and Associated Factors in Hawassa City of Sidama Region, Ethiopia. *Journal of Parasitology Research*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/6155741>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Elsemore, D. A., & Ketzis, J. K. (2021). Whipworms. In *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat* (pp. 1444–1454). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-50934-3.00114-2>
- Enriquez, G. F., Macchiaverna, N. P., Argibay, H. D., López Arias, L., Farber, M., Gürtler, R. E., Cardinal, M. V., & Garbossa, G. (2019). Polyparasitism and zoonotic parasites in dogs from a rural area of the Argentine Chaco. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 16, 100287. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100287>
- Eriksson, C. E., Ruprecht, J., & Levi, T. (2020). More affordable and effective noninvasive single nucleotide polymorphism genotyping using high-throughput amplicon

- sequencing. *Molecular Ecology Resources*, 20(6), 1505–1516. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13208>
- Faith, D. P. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity. In *Biological Conservation* (Vol. 61).
- Fan, C.-K. (2020). *Pathogenesis of cerebral toxocariasis and neurodegenerative diseases* (pp. 233–259). <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.008>
- Fisher, M. (2001). Endoparasites in the dog and cat 1. Helminths. In *In Practice* (Vol. 23, Issue 8, pp. 462–471). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/inpract.23.8.462>
- Foster, G. W., Main, M. B., Kinsella, J. M., Dixon, L. M., Terrell, S. P., & Forrester, D. J. (2003). Parasitic Helminths and Arthropods of Coyotes (*Canis latrans*) from Florida, U.S.A. *Comparative Parasitology*, 70(2), 162–166. <https://doi.org/10.1654/4081>
- Gompper, M. E., Goodman, R. M., Kays, R. W., Ray, J. C., Fiorello, C. V., & Wade, S. E. (2003). A survey of the parasites of coyotes (*Canis latrans*) in New York based on fecal analysis. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(3), 712–717. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.3.712>
- Goodwin, K., & Levi, T. (2024). *Local Taxa Tool (LocaTT): Geographically-conscious taxonomic assignment for DNA metabarcoding* (R package version 1.1.2).
- Gordon, C. A., Gray, D. J., Gobert, G. N., & McManus, D. P. (2011). DNA amplification approaches for the diagnosis of key parasitic helminth infections of humans. *Molecular and Cellular Probes*, 25(4), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.05.002>
- Gorgani-Firouzjaee, T., Kalantari, N., Chehrazi, M., Ghaffari, S., & Shahdin, S. (2022). Global prevalence of *Strongyloides stercoralis* in dogs: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Helminthology*, 96, e11. <https://doi.org/10.1017/S0022149X21000808>
- Grant, J. R., Pilotte, N., & Williams, S. A. (2019). A Case for Using Genomics and a Bioinformatics Pipeline to Develop Sensitive and Species-Specific PCR-Based Diagnostics for Soil-Transmitted Helminths. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00883>
- Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22(2), 160–174. <https://doi.org/10.1007/BF02101694>

- Helfrich, P., Rieb, E., Abrami, G., Ucking, A. L. ", & Mehler, A. (n.d.). *TREEANNOTATOR: Versatile Visual Annotation of Hierarchical Text Relations*. <https://www.sencha.com/products/extjs/#overview>
- Henke, S. E., Pence, D. B., & Bryant, F. C. (2002). EFFECT OF SHORT-TERM COYOTE REMOVAL ON POPULATIONS OF COYOTE HELMINTHS. In *Journal of Wildlife Diseases* (Vol. 38, Issue 1). http://meridian.allenpress.com/jwd/article-pdf/38/1/54/2236846/0090-3558-38_1_54.pdf
- Hermosilla, C., Kleinertz, S., Silva, L. M. R., Hirzmann, J., Huber, D., Kusak, J., & Taubert, A. (2017). Protozoan and helminth parasite fauna of free-living Croatian wild wolves (*Canis lupus*) analyzed by scat collection. *Veterinary Parasitology*, 233, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.11.011>
- Hernández-Camacho, N., Pineda-López, R., López-González, C. A., & Jones, R. W. (2011). Nematodes parasites of the gray fox (*Urocyon cinereoargenteus* Schreber, 1775) in the seasonally dry tropical highlands of central Mexico. *Parasitology Research*, 108(6), 1425–1429. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2191-5>
- Herrmann, B., Cerbule, K., Brčić, J., Grimaldo, E., Geoffroy, M., Daase, M., & Berge, J. (2022). Accounting for Uncertainties in Biodiversity Estimations: A New Methodology and Its Application to the Mesopelagic Sound Scattering Layer of the High Arctic. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.775759>
- Hidalgo-Mihart, M. G., Cantú -Salazar, L., González-Romero, A., López-González, C. A., Salvador, E., & Rica, C. (n.d.). *Historical and present distribution of coyote (Canis latrans) in Mexico and Central America*. www.blackwellpublishing.com/jbi
- Holland, C. V. (2023). A walk on the wild side: A review of the epidemiology of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* in wild hosts. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 22, 216–228. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.10.008>
- IBM Corp. (2011). *IBM SPSS Statistics for Windows* (20). IBM Corp.
- Illiano, S., Ciuca, L., Maurelli, M. P., Pepe, P., Caruso, V., Bosco, A., Pennacchio, S., Amato, R., Pompameo, M., & Rinaldi, L. (2023). Epidemiological and molecular updates on hookworm species in dogs from southern Italy. *BMC Veterinary Research*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03765-3>

- Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2019). Área de Conservación Guanacaste, northwestern Costa Rica: Converting a tropical national park to conservation via biodevelopment. *Biotropical*, 1–13.
- Johnson, E. M., Nagamori, Y., Duncan-Decocq, R. A., Whitley, P. N., Ramachandran, A., & Reichard, M. V. (2017). Prevalence of Alaria infection in companion animals in north central Oklahoma from 2006 through 2015 and detection in wildlife. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 250(8), 881–886. <https://doi.org/10.2460/javma.250.8.881>
- Jurburg, S. D., Buscot, F., Chatzinotas, A., Chaudhari, N. M., Clark, A. T., Garbowski, M., Grenié, M., Hom, E. F. Y., Karakoç, C., Marr, S., Neumann, S., Tarkka, M., van Dam, N. M., Weinhold, A., & Heintz-Buschart, A. (2022). The community ecology perspective of omics data. In *Microbiome* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01423-8>
- Katoh, K. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Keck, F., Couton, M., & Altermatt, F. (2023). Navigating the seven challenges of taxonomic reference databases in metabarcoding analyses. *Molecular Ecology Resources*, 23(4), 742–755. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13746>
- Ketzis, J. K., & Lucio-Forster, A. (2020). *Toxocara canis* and *Toxocara cati* in domestic dogs and cats in the United States, Mexico, Central America and the Caribbean: A review. In *Advances in Parasitology* (Vol. 109, pp. 655–714). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.027>
- Kirkova, Z., Georgieva, D., & Raychev, E. (2006). STUDY ON THE PREVALENCE OF TRICHUROSIS IN DIFFERENT CATEGORIES OF DOGS AND WILD CARNIVORES. In *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* (Vol. 9, Issue 2).

- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583–621. <https://doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2011). Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Current Protocols in Bioinformatics*, SUPPL.36. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1007s36>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Lello, J., Boag, B., Fenton, A., Stevenson, I. R., & Hudson, P. J. (2004). Competition and mutualism among the gut helminths of a mammalian host. *Nature*, 428(6985), 840–844. <https://doi.org/10.1038/nature02490>
- Liccioli, S., Catalano, S., Kutz, S. J., Lejeune, M., Verocai, G. G., Duignan, P. J., Fuentealba, C., Hart, M., Ruckstuhl, K. E., & Massolo, A. (2012). Gastrointestinal parasites of coyotes (*Canis latrans*) in the metropolitan area of Calgary, Alberta, Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 90(8), 1023–1030. <https://doi.org/10.1139/Z2012-070>
- Liu, M., Burridge, C. P., Clarke, L. J., Baker, S. C., & Jordan, G. J. (2023). Does phylogeny explain bias in quantitative DNA metabarcoding? *Metabarcoding and Metagenomics*, 7. <https://doi.org/10.3897/mbmg.7.101266>
- Liu, Y., Zheng, G., Alsarakibi, M., Zhang, X., Hu, W., Lu, P., Lin, L., Tan, L., Luo, Q., & Li, G. (2013). Molecular Identification of *Ancylostoma caninum* Isolated from Cats in Southern China Based on Complete ITS Sequence. *BioMed Research International*, 2013, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2013/868050>
- Lloyd, K. (2020). *Uso del espacio, selección y uso de hábitat, actividad diaria y dieta del coyote (Canis latrans) en el área de conservación Guanacaste*. Universidad Nacional.

- Lott, M. J., Hose, G. C., & Power, M. L. (2015). Parasitic nematode communities of the red kangaroo, *Macropus rufus*: richness and structuring in captive systems. *Parasitology Research*, *114*(8), 2925–2932. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4494-z>
- Loukas, A., Hotez, P. J., Diemert, D., Yazdanbakhsh, M., McCarthy, J. S., Correa-Oliveira, R., Croese, J., & Bethony, J. M. (2016). Hookworm infection. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.88>
- Lozupone, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T., & Knight, R. (2007). Quantitative and Qualitative β Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors That Structure Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(5), 1576–1585. <https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06>
- Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(12), 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>
- Lukasik, V. M., & Alexander, S. M. (n.d.). Spatial and Temporal Variation of Coyote (*Canis latrans*) Diet in Calgary, Alberta. In *Cities and the Environment* (Vol. 4).
- Luna-Estrada, M., Mosqueda-Cabrera, M. Á., & Servín, J. (2017a). Nuevos registros de helmintos en coyote *Canis latrans impavidus* (Carnivora: Canidae) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *88*(1), 250–252. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.01.003>
- Luna-Estrada, M., Mosqueda-Cabrera, M. Á., & Servín, J. (2017b). Nuevos registros de helmintos en coyote *Canis latrans impavidus* (Carnivora: Canidae) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *88*(1), 250–252. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.01.003>
- Macpherson, M. L. A., Zendejas-Heredia, P. A., Sylvester, W., Gasser, R. B., Traub, R. J., Colella, V., & Macpherson, C. N. L. (2023). Zoonotic helminths of dogs and risk factors associated with polyparasitism in Grenada, West Indies. *Parasitology*, *150*(8), 754–759. <https://doi.org/10.1017/S0031182023000495>
- Magalli Castro-Álvarez. (2019). Área de Conservación Central: promoviendo conectividad estructural y funcional a través de corredores biológicos interurbanos en Costa Rica. *Ambientico*, *272*(ISSN 1409-214X.), 19–27.
- Mann, A. E., Mazel, F., Lemay, M. A., Morien, E., Billy, V., Kowalewski, M., Di Fiore, A., Link, A., Goldberg, T. L., Tecot, S., Baden, A. L., Gomez, A., Sauther, M. L., Cuozzo, F. P., Rice, G. A. O., Dominy, N. J., Stumpf, R., Lewis, R. J., Swedell, L., ... Wegener

- Parfrey, L. (2020). Biodiversity of protists and nematodes in the wild nonhuman primate gut. *The ISME Journal*, *14*(2), 609–622. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0551-4>
- Martin, K. A., Jesudoss Chelladurai, J. R. J., Bsrat, A., Pulaski, C., Lee, A. C. Y., Starkey, L. A., & Brewer, M. T. (2023). Haplotypic analysis of *cox1* from *Toxocara canis* demonstrates five distinct clades that are not geographically defined. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *17*(10 October). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011665>
- Martín-Pérez, M., Gómez-Gordo, L., Galapero, J., Pérez-Martín, J. E., Bravo-Barriga, D., Calero-Bernal, R., & Frontera, E. (2022). CHARACTERIZATION OF LESIONS INDUCED BY SPIROCERCA VULPIS (SPIRURIDAE: SPIROCERCIDAE) IN RED FOXES (VULPES VULPES). *Journal of Wildlife Diseases*, *58*(1). <https://doi.org/10.7589/JWD-D-20-00162>
- Massey, A. L., Roffler, G. H., Vermeul, T., Allen, J. M., & Levi, T. (2021). Comparison of mechanical sorting and DNA metabarcoding for diet analysis with fresh and degraded wolf scats. *Ecosphere*, *12*(6). <https://doi.org/10.1002/ecs2.3557>
- Mega Ayunita Suprpto, Linda Astari, & Musofa Rusli. (2024). Cutaneous Larva Migrans: A comprehensive review of pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, *24*(3), 1719–1722. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2024.24.3.3799>
- Mehlhorn, S. E. H. (n.d.). Volume 13. In *Parasitology Research Monographs*. <http://www.springer.com/series/8816>
- Mejías-Alpizar, M. J., Porrás-Silesky, C., Rodríguez, E. J., Quesada, J., Alfaro-Segura, M. P., Robleto-Quesada, J., Gutiérrez, R., & Rojas, A. (2024). Mitochondrial and ribosomal markers in the identification of nematodes of clinical and veterinary importance. *Parasites & Vectors*, *17*(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-06113-4>
- Méndez-Carvajal, P., & Moreno, R. (2014). Mammalia, Carnivora, Canidae, *Canis latrans* (Say, 1823): Actual distribution in Panama. *Check List*, *10*(2), 376. <https://doi.org/10.15560/10.2.376>
- Meriguetti, Y. F. F. B., Giuffrida, R., Silva, R. C. da, Kmetiuk, L. B., Santos, A. P. Dos, Biondo, A. W., & Santarém, V. A. (2022). Dog and Cat Contact as Risk Factor for Human Toxocariasis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Public Health*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.854468>

- Miller, T. A. (1965). Influence of Age and Sex on Susceptibility of Dogs to Primary Infection with *Ancylostoma caninum*. *The Journal of Parasitology*, 51(5), 701. <https://doi.org/10.2307/3276142>
- Mohamed, A. S., Moore, G. E., & Glickman, L. T. (2009a). Prevalence of intestinal nematode parasitism among pet dogs in the United States (2003–2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(5), 631–637. <https://doi.org/10.2460/javma.234.5.631>
- Mohamed, A. S., Moore, G. E., & Glickman, L. T. (2009b). Prevalence of intestinal nematode parasitism among pet dogs in the United States (2003–2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(5), 631–637. <https://doi.org/10.2460/javma.234.5.631>
- Murphy, M. A., Waits, L. P., & Kendall, K. C. (1973). Quantitative Evaluation of Fecal Drying Methods for Brown Bear DNA Analysis. In *Bulletin* (Vol. 28, Issue 4). Winter. <https://about.jstor.org/terms>
- Niehaus, C., Valerio, I., Blanco, K., & Chinchilla, M. (2012). [Parasitic infections of coyote, *Canis latrans* (Carnivora: Canidae) in a Costa Rican National Park and a surrounding agricultural area]. *Revista de Biología Tropical*, 60(2), 799–808.
- Olave-Leyva, J., García, P., Martínez, V., Figueroa, J., Luqueño, C., & Avila, R. (2019). Prevalencia de helmintos gastrointestinales en perros procedentes del servicio de Salud de Tulancingo, Hidalgo. *Abanico Veterinario*, 9(1). <https://doi.org/10.21929/abavet2019.930>
- O'Rourke, D. R., Mangan, M. T., Mangan, K. E., Bokulich, N. A., MacManes, M. D., & Foster, J. T. (2021). Lord of the Diptera (and Moths and a Spider): Molecular Diet Analyses and Foraging Ecology of Indiana Bats in Illinois. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.623655>
- Otranto, D., Cantacessi, C., Pfeiffer, M., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Deplazes, P., Genchi, C., Guberti, V., & Capelli, G. (2015). The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. *Veterinary Parasitology*, 213(1–2), 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.022>

- Otranto, D., & Deplazes, P. (2019). Zoonotic nematodes of wild carnivores. In *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* (Vol. 9, pp. 370–383). Australian Society for Parasitology. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.12.011>
- Pazzi, P., Goddard, A., Kristensen, A. T., & Dvir, E. (2014). Evaluation of Hemostatic Abnormalities in Canine Spirocerosis and Its Association with Systemic Inflammation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(1), 21–29. <https://doi.org/10.1111/jvim.12220>
- Pence, D. B., Knowlton, F. F., & Windberg, L. A. (1988). Transmission of *Ancylostoma caninum* and *Alaria marcianae* in Coyotes (*Canis latrans*). *Journal of Wildlife Diseases*, 24(3), 560–563. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-24.3.560>
- Pence, D. B., & Stone, J. E. (1978). Visceral Lesions in Wild Carnivores Naturally Infected with *Spirocerca lupi*. *Veterinary Pathology*, 15(3), 322–331. <https://doi.org/10.1177/030098587801500306>
- Petters, J., Vital-Garcia, C., Batista, L., Gatica-Colima, A., Martínez-Calderas, J., Abarca-De Hoyos, N., Quezada, A., & Escárcega-Ávila, A. (2019). WINTER PREVALENCE AND PARASITIC LOAD IN *Canis latrans* (COYOTE) FECES FROM THE PROTECTED NATURAL AREA MÉDANOS DE SAMALAYUCA MEXICO. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 9(2), 11–17. <https://doi.org/10.18004/compend.cienc.vet.2019.09.02.11-17>
- Piñol, J., Mir, G., Gomez-Polo, P., & Agustí, N. (2015). Universal and blocking primer mismatches limit the use of high-throughput <scp>DNA</scp> sequencing for the quantitative metabarcoding of arthropods. *Molecular Ecology Resources*, 15(4), 819–830. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12355>
- Plewnia, A., Krehenwinkel, H., & Heine, C. (2024). *Towards low-cost and PCR free field-based community metabarcoding*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-5500332/v1>
- Porrás-Silesky, C., Mejías-Alpízar, M. J., Mora, J., Baneth, G., & Rojas, A. (2021). *Spirocerca lupi* proteomics and its role in cancer development: An overview of spirocerosis-induced sarcomas and revision of helminth-induced carcinomas. In *Pathogens* (Vol. 10, Issue 2, pp. 1–16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020124>

- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE*, 5(3), e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Priest, J. M., Stewart, D. T., Boudreau, M., Power, J., & Shutler, D. (2018). First report of *Angiostrongylus vasorum* in coyotes in mainland North America. *Veterinary Record*, 183(24), 746. <https://doi.org/10.1136/vr.105097>
- Prosser, S. W. J., Velarde-Aguilar, M. G., León-Règagnon, V., & Hebert, P. D. N. (2013). Advancing nematode barcoding: A primer cocktail for the cytochrome *c* oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. *Molecular Ecology Resources*, 13(6), 1108–1115. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12082>
- Pumidonming, W., Salman, D., Gronsang, D., Abdelbaset, A. E., Sangkaeo, K., Kawazu, S. I., & Igarashi, M. (2016). Prevalence of gastrointestinal helminth parasites of zoonotic significance in dogs and cats in lower Northern Thailand. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(12), 1779–1784. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0293>
- Quintana, T. A., Johnson, W. L., Ritchie, D., Smith, V., Martin, K. A., McMahan, K., Brewer, M. T., & Jesudoss Chelladurai, J. R. J. (2023). Genetic characterization of the zoonotic parasite *Ancylostoma caninum* in the central and eastern United States. *Journal of Helminthology*, 97, e37. <https://doi.org/10.1017/S0022149X23000159>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Ramírez, J., & León, L. (2015). DISTRIBUCIÓN DEL COYOTE (*CANIS LATRANS*) EN EL CONTINENTE AMERICANO. *Biocenosis*, 29(1–2), 67–73.
- Redman, E., Queiroz, C., Bartley, D. J., Levy, M., Avramenko, R. W., & Gilleard, J. S. (2019). Validation of ITS-2 rDNA nemabiome sequencing for ovine gastrointestinal nematodes and its application to a large scale survey of UK sheep farms. *Veterinary Parasitology*, 275. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108933>
- Redman, W. K., Bryant, J. E., & Ahmad, G. (2016). Gastrointestinal helminths of Coyotes (*Canis latrans*) from Southeast Nebraska and Shenandoah area of Iowa. *Veterinary World*, 9(9), 970–975. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.970-975>

- Regional Office for Europe, W. (2022). *A health perspective on the role of the environment in One Health*. <http://apps.who.int/bookorders>.
- Rinas, M. A., Nesnek, R., Kinsella, J. M., & DeMatteo, K. E. (2009). Fatal aortic aneurysm and rupture in a neotropical bush dog (*Speothos venaticus*) caused by *Spirocerca lupi*. *Veterinary Parasitology*, *164*(2–4), 347–349. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.006>
- Robertson, I. D., & Thompson, R. C. (2002). *Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats*. www.elsevier.com/locate/micinf
- Robeson, M. S., O'Rourke, D. R., Kaehler, B. D., Ziemski, M., Dillon, M. R., Foster, J. T., & Bokulich, N. A. (2021). RESCRIPT: Reproducible sequence taxonomy reference database management. *PLOS Computational Biology*, *17*(11), e1009581. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009581>
- Robinson, C. V., Porter, T. M., McGee, K. M., McCusker, M., Wright, M. T. G., & Hajibabaei, M. (2022). Multi-marker DNA metabarcoding detects suites of environmental gradients from an urban harbour. *Scientific Reports*, *12*(1), 10556. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13262-6>
- Roche, M., & Patrzek, D. (1966). The Female to Male Ratio (FMR) in Hookworm. *The Journal of Parasitology*, *52*(1), 117. <https://doi.org/10.2307/3276401>
- Rodríguez-Luna, C. R., Valenzuela-Galván, D., Servín, J., & List, R. (2024). Unified analysis of niche overlap between coyotes (*Canis latrans*) and gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*). *Mammal Research*. <https://doi.org/10.1007/s13364-024-00773-y>
- Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013). Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. In *Biotechnology Advances* (Vol. 31, Issue 8, pp. 1135–1152). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.008>
- Roffler, G. H., Allen, J. M., Massey, A., & Levi, T. (2021). Metabarcoding of fecal DNA shows dietary diversification in wolves substitutes for ungulates in an island archipelago. *Ecosphere*, *12*(1). <https://doi.org/10.1002/ecs2.3297>
- Rojas, A., Dvir, E., & Baneth, G. (2020). Insights on *Spirocerca lupi*, the Carcinogenic Dog Nematode. In *Trends in Parasitology* (Vol. 36, Issue 1, pp. 52–63). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.004>

- Rojas, A., Dvir, E., Farkas, R., Sarma, K., Borthakur, S., Jabbar, A., Markovics, A., Otranto, D., & Baneth, G. (2018). Phylogenetic analysis of *Spirocerca lupi* and *Spirocerca vulpis* reveal high genetic diversity and intra-individual variation. *Parasites and Vectors*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3202-0>
- Rojas, A., Germitsch, N., Oren, S., Sazmand, A., & Deak, G. (2024). Wildlife parasitology: sample collection and processing, diagnostic constraints, and methodological challenges in terrestrial carnivores. *Parasites & Vectors*, *17*(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06226-4>
- Rojas, A., Morales-Calvo, F., Salant, H., Otranto, D., & Baneth, G. (2021). Zoonotic Ocular Onchocercosis by *Onchocerca lupi*. In *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE* (Vol. 94). www.biorender.com.
- Rojas, A., Sanchis-Monsonís, G., Alić, A., Hodžić, A., Otranto, D., Yasur-Landau, D., Martínez-Carrasco, C., & Baneth, G. (2018). *Spirocerca vulpis* sp. nov. (Spiruridae: Spirocercidae): Description of a new nematode species of the red fox, *Vulpes vulpes* (Carnivora: Canidae). *Parasitology*, *145*(14), 1917–1928. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000707>
- Rostami, A., Riahi, S. M., Hofmann, A., Ma, G., Wang, T., Behniafar, H., Taghipour, A., Fakhri, Y., Spotin, A., Chang, B. C. H., Macpherson, C. N. L., Hotez, P. J., & Gasser, R. B. (2020). Global prevalence of *Toxocara* infection in dogs. In *Advances in Parasitology* (Vol. 109, pp. 561–583). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.017>
- Saénz, C. (2013). *Parásitos gastrointestinales con carácter zoonótico y evaluación de algunos parámetros del estado de salud en perros de áreas recreativas de Costa Rica*. Universidad Nacional, Costa Rica.
- Sanchis-Monsonís, G., Fanelli, A., Tizzani, P., & Martínez-Carrasco, C. (2019). First epidemiological data on *Spirocerca vulpis* in the red fox: A parasite of clustered geographical distribution. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *18*, 100338. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100338>
- Savilla, T. M., Joy, J. E., May, J. D., & Somerville, C. C. (2011). Prevalence of dog intestinal nematode parasites in south central West Virginia, USA. *Veterinary Parasitology*, *178*(1–2), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.034>

- Schwartz, R., Bidaisee, S., Fields, P. J., Macpherson, M. L. A., & Macpherson, C. N. L. (2022). The epidemiology and control of *Toxocara canis* in puppies. *Parasite Epidemiology and Control*, *16*, e00232. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2021.e00232>
- Segovia, J. M., Torres, J., Miquel, J., Llaneza, L., & Feliu, C. (2001). Helminths in the wolf (*Canis lupus*) from north-western Spain. *Journal of Helminthology*, *75*(2), 183–192. <https://doi.org/10.1079/JOH200152>
- Shepherd, C., Wangchuk, P., & Loukas, A. (2018). Of dogs and hookworms: Man's best friend and his parasites as a model for translational biomedical research. In *Parasites and Vectors* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2621-2>
- Sikder, Md. M., Vestergård, M., Sapkota, R., Kyndt, T., & Nicolaisen, M. (2020). Evaluation of Metabarcoding Primers for Analysis of Soil Nematode Communities. *Diversity*, *12*(10), 388. <https://doi.org/10.3390/d12100388>
- Sirima, C., Bizet, C., Hamou, H., Červená, B., Lemarcis, T., Esteban, A., Peeters, M., Mpoudi Ngole, E., Mombo, I. M., Liégeois, F., Petrželková, K. J., Boussinesq, M., & Locatelli, S. (2021). Soil-transmitted helminth infections in free-ranging non-human primates from Cameroon and Gabon. *Parasites & Vectors*, *14*(1), 354. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04855-7>
- Sistema Nacional de Área de Conservación (SINAC). (2016). *Plan de Turismo Sostenible Parque Nacional Santa Rosa*.
- Sistema nacional de áreas de conservacion de Costa Rica(SINAC). (2025). *Área de Conservación Central (ACC)*. <https://www.sinac.go.cr/ES/Ac/Accvc/Paginas/Default.aspx>.
- Smith, L. M., Hartmann, S., Munteanu, A. M., Villa, P. D., Quinnell, R. J., & Collins, L. M. (2019). The effectiveness of dog population management: A systematic review. In *Animals* (Vol. 9, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani9121020>
- Sudermann, M. A., Foster, Z. S. L., Chang, J. H., & Grünwald, N. J. (2024). Metabarcoding for plant pathologists. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *46*(2), 142–160. <https://doi.org/10.1080/07060661.2023.2290041>
- TABERLET, P., COISSAC, E., POMPANON, F., BROCHMANN, C., & WILLERSLEV, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding.

- Molecular Ecology*, 21(8), 2045–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Thamsborg, S. M., Ketzis, J., Horii, Y., & Matthews, J. B. (2017). Strongyloides spp. infections of veterinary importance. In *Parasitology* (Vol. 144, Issue 3, pp. 274–284). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001116>
- Tieri, E. E., Saletti, M. A., D'Angelo, A. R., Parisciani, G., Pelini, S., Cocco, A., Di Teodoro, G., Di Censo, E., D'Alterio, N., Latrofa, M. S., Otranto, D., & Pascucci, I. (2021). Angiostrongylus vasorum in foxes (Vulpes vulpes) and wolves (Canis lupus italicus) from Abruzzo region, Italy. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 15, 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.05.003>
- Traversa, D. (2011). Are we paying too much attention to cardio-pulmonary nematodes and neglecting old-fashioned worms like Trichuris vulpis? In *Parasites and Vectors* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-32>
- Traversa, D. (2012). *Pet roundworms and hookworms: A continuing need for global worming*. <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/91>
- Tse, C., Bullard, J., Rusk, R., Douma, D., & Plourde, P. (2019). Surveillance of Echinococcus tapeworm in coyotes and domestic dogs in Winnipeg, Manitoba. *Canada Communicable Disease Report*, 45(7/8), 171–176. <https://doi.org/10.14745/ccdr.v45i78a01>
- Tull, A., Valdmann, H., Rannap, R., Kaasiku, T., Tammeleht, E., & Saarma, U. (2022). Free-ranging rural dogs are highly infected with helminths, contaminating environment nine times more than urban dogs. *Journal of Helminthology*, 96. <https://doi.org/10.1017/S0022149X22000116>
- United Nations Educational, S. and C. O. (UNESCO). (2025). *Área de Conservación Guanacaste*. <https://Whc.Unesco.Org/En/List/928>.
- Valerio, I., Ulate, R., Soto, M., & Chinchilla, M. (2010). Hallazgo de parásitos oportunistas en perros (Canis familiaris) del área metropolitana de Costa Rica. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.*, 1(69), 52–69.

- Valverde, M. (2010). *Diagnóstico de parásitos gastrointestinales de caninos de áreas de riesgo social: impacto en la salud pública y salud animal* [Tesis]. Universidad Nacional.
- van der Merwe, L. L., Kirberger, R. M., Clift, S., Williams, M., Keller, N., & Naidoo, V. (2008). Spirocerca lupi infection in the dog: A review. *The Veterinary Journal*, 176(3), 294–309. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.02.032>
- Vaughan, C. (1983). Coyote range expansion in Costa Rica and Panama. *Brenesia*, 21, 27–32.
- Vaughan, C., & Rodríguez, M. (1986). Comparación de los hábitos alimentarios del coyote (*Canis latrans*) en dos localidades de Costa Rica. *Vida Silvestre Neotropical*, 6–11.
- Weinstein, S. B., & Lafferty, K. D. (2015). How do humans affect wildlife nematodes? *Trends in Parasitology*, 31(5), 222–227. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.01.005>
- Whitaker Jr, J. O. (1996). . *Field Guide to North American Mammals* (National Audubon Society, Ed.). National Audubon Society .
- Wirsing, A. J., Azevedo, F. C. C., Larivière, S., & Murray, D. L. (2007). PATTERNS OF GASTROINTESTINAL PARASITISM AMONG FIVE SYMPATRIC PRAIRIE CARNIVORES: ARE MALES RESERVOIRS? *Journal of Parasitology*, 93(3), 504–510. <https://doi.org/10.1645/GE-1067R.1>
- World Animal Protection. (2016). *Encuesta nacional de tenencia de perros* (p. 1).
- Yevstafieva, V., Kravchenko, S. O., Gutyj, B. V., Melnychuk, V. V., Kovalenko, P. N., & Volovyk, L. B. (2019). Morphobiological analysis of *Trichuris vulpis* (Nematoda, Trichuridae), obtained from domestic dogs. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 10(2), 165–171. <https://doi.org/10.15421/021924>
- Zendejas-Heredia, P. A., Robleto-Quesada, J., Solano, A., Rojas, A., & Colella, V. (2024). Zoonotic *Ancylostoma ceylanicum* Infection in Coyotes from Guanacaste Conservation Area, Costa Rica, 2021. *Emerging Infectious Diseases*, 30(6). <https://doi.org/10.3201/eid3006.231618>
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., & Stamatakis, A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30(5), 614–620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>

10. ANEXOS

10.1 Script I: Filtros de calidad de secuencias extraídas de BOLD

```
#!/bin/bash
#SBATCH --job-name=Import_sequences
#SBATCH --output=resultimporting.txt
#SBATCH --partition=dribe
#SBATCH --ntasks=1
#SBATCH --time=72:00:00

## getting the line numbers of the bad sequences
grep -v '^>' bold_allrawSeqs.fasta | grep [^THADGRC\SMBNWVKY-] -n > badseqs.txt

## reformatting these line numbers to delete
for val in $(cut -f 1 badseqs.txt -d ':'); do
myvar1=$(( $val * 2 ))
myvar2=$(( $myvar1 - 1 ))
echo $myvar2 "d"
echo $myvar1 "d"
done | tr '\n' ';' | sed 's/.$//' > droplines.txt

## deleting these line numbers
myval=$(cat droplines.txt)
sed -e $myval bold_allrawSeqs.fasta > cleaned_bold_allrawSeqs.fasta

## Next make the taxonomy file
grep '^>' cleaned_bold_allrawSeqs.fasta | sed 's/^> //' | \
awk '{for(i=1;i<2;i++)sub(";",",\t")}1' > bold_rawTaxa_forQiime.tsv
```

```
module load seqkit/0.7.1
seqkit seq cleaned_bold_allrawSeqs.fasta -g -o degappedSeqs.fasta
cat ./degap_tmpdir/ degappedSeqs.fasta | paste - - | \
awk -v OFS="\t" '{gsub(/^[N]+/, "", $2); print}' | \ ## removes prefix N's
rev | sed 's/^N*//' | \ ## removes suffix N's
rev | tr '\t' '\n' > bold_outerNtrimmed.fasta
```

10.2 Filtrado de secuencias mediante RESCRIPT

```
#!/bin/bash

#SBATCH --job-name=RESCRIPT_sequences
#SBATCH --output=RESCRIPT.txt
#SBATCH --partition=dribe
#SBATCH --ntasks=1
#SBATCH --time=72:00:00

module load miniconda/ qiime2 2020.8

qiime tools import \
  --input-path bold_outerNtrimmed.fasta \
  --output-path bold_outerNtrimmed.qza \
  --type 'FeatureData[Sequence]'

## import taxonomy data
qiime tools import \
  --type 'FeatureData[Taxonomy]' \
  --input-format HeaderlessTSVTaxonomyFormat \
  --input-path bold_rawTaxa_forQiime.tsv \
  --output-path bold_rawTaxa.qza

qiime rescript cull-seqs \
  --i-sequences bold_outerNtrimmed.qza \
  --p-num-degenerates 5 \
  --p-homopolymer-length 12 \
  --o-clean-sequences bold_ambi_hpoly_filtd_seqs.qza
```

```
qiime rescript filter-seqs-length \  
--i-sequences bold_ambi_hpoly_filtd_seqs.qza \  
--p-global-min 200 \  
--p-global-max 1600 \  
--o-filtered-seqs bold_ambi_hpoly_length_filtd_seqs.qza \  
--o-discarded-seqs bold_ambi_hpoly_length_discarded_seqs.qza
```

```
qiime rescript dereplicate \  
--i-sequences bold_ambi_hpoly_length_filtd_seqs.qza \  
--i-taxa bold_rawTaxa.qza \  
--p-mode 'super' \  
--p-derep-prefix \  
--p-rank-handles 'greengenes' \  
--o-dereplicated-sequences bold_derep1_seqs.qza \  
--o-dereplicated-taxa bold_derep1_taxa.qza
```

10.3 Alineamiento de primers y delimitado de la Base de datos

```
#!/bin/bash
```

```
#SBATCH --job-name= DataBaseAligning
```

```
#SBATCH --output=DataBaseAligning.txt
```

```
#SBATCH --partition=dribe
```

```
#SBATCH --ntasks=1
```

```
#SBATCH --time=72:00:00
```

```
module load miniconda/ qiime2 2020.8
```

```
qiime tools export --input-path bold_derep1_seqs.qza --output-path tmpdir_boldFullSeqs
```

```
qiime tools export --input-path bold_derep1_taxa.qza --output-path tmpdir_boldFullTaxa
```

```
seqkit seq --min-len 200 --max-len 1600 -w 0 ./tmpdir_boldFullSeqs/dna-sequences.fasta >
```

```
boldFull_lengthFilted_seqs.fasta
```

```
grep -c '^>' boldFull_lengthNtaxaFilted_seqs.fasta
```

```
module load mafft/7.397
```

```
module load seqkit/0.7.1
```

```
## ALINEAR TODO A LOS PRIMERS
```

```
mafft --auto --thread -1 boldFull_lengthNtaxaNambigFilted_seqs.fasta > reference_MSA4
```

```
mafft --multipair --addfragments JB3_JB5_primers.fasta --keeplength --thread -1 --mapout -  
-reorder reference_MSA4 > giant_alignment2
```

```
## El mapout que salga de aquí se va a llamar JB3_JB5_primers.fasta.map
```

```
mv JB3_JB5_primers.fasta.map GiantJB3_JB5_primers.fasta.map
```

```
## Fijarse en las posiciones a utilizar para el trimming (en este caso 871 y 1218)
```

```
seqkit seq --min-len 871 --max-len 1218 -w 0 giant_alignment2 >  
bold_derepl_helminth_tmp2.fasta
```

10.4 Derreplicación y generación de “classifier” para QIIME2

```
#!/bin/bash

#SBATCH --job-name= DerrepNClassifier
#SBATCH --output= DerrepNClassifier.txt
#SBATCH --partition=dribe
#SBATCH --ntasks=1
#SBATCH --time=72:00:00

module load miniconda/ qiime2 2020.8

qiime tools import \
  --input-path bold_derep1_helminth.fasta \
  --output-path bold_derep1_helminth_seqs_aligned.qza \
  --type 'FeatureData[AlignedSequence]'

qiime rescript degap-seqs \
  --i-aligned-sequences bold_derep1_helminth_seqs_aligned.qza \
  --p-min-length 170 \
  --o-degapped-sequences bold_derep1_helminth_seqs_nogaps.qza

qiime rescript dereplicate \
  --i-sequences bold_derep1_helminth_seqs_nogaps.qza \
  --i-taxa bold_rawTaxa.qza \
  --p-mode 'super' \
  --p-derep-prefix \
  --p-rank-handles 'greengenes' \
  --o-dereplicated-sequences bold_helminth_seqs.qza \
  --o-dereplicated-taxa bold_helminth_taxa.qza
```

```
qiime feature-classifier fit-classifier-naive-bayes \  
--i-reference-reads bold_helminth_database.qza \  
--i-reference-taxonomy bold_helminth_taxa.qza \  
--o-classifier classifier.qza
```

10.5 Formato de base de datos para usarse en LocaTT

```
#####
### Create a BLAST Reference Database from BOLD ##
#####

# Load LocaTT.
library(LocaTT)

# Set working directory.
# CHANGE THIS TO YOUR WORKING DIRECTORY.
setwd("/Users/kenengoodwin/Desktop/Other/Seasonal_Work/GeneticsLab/ReturnToLLT/For_Joy/For_Joy4")

# Read in reference FASTA file (Base_Taxa_Locate.fasta).
reference<-LocaTT::read.fasta(file="Base_Taxa_Locate.fasta")

# Remove the first line, which contains no information.
reference<-reference[-1,]

# Replace the leading "tax=" with "###root;" in the header lines.
reference$Name<-sub(pattern="^tax=",replacement="###root;",x=reference$Name)

# Remove the level identifiers.
reference$Name<-gsub(pattern=";[:alpha:]]__",replacement=";",x=reference$Name)

# Add an arbitrary numeric identifier to the taxonomic levels (these are expected
# in MIDORI format, but are removed when formatting the reference database).
reference$Name<-gsub(pattern=";",replacement="_1;",x=reference$Name)

# Complete the addition of a numeric identifier to the last taxonomic level.
```

```
reference$Name<-paste0(reference$Name,"_1")

# Write out FASTA file in MIDORI format.
LocaTT::write.fasta(names=reference$Name,
                    sequences=reference$Sequence,
                    file="BOLD_MIDORI_Format.fasta")
# Format reference database.
LocaTT::format_reference_database(
  path_to_input_reference_database="BOLD_MIDORI_Format.fasta",
  path_to_output_BLAST_database="BLASTBase_Taxa_Locate.fasta",
  input_reference_database_source="MIDORI")
# Done!
```

10.6 Secuencias extraídas de la base GenBank para la construcción de árboles filogenéticos

Cuadro 15. Secuencias extraídas de la base GenBank para la construcción de árboles filogenéticos de *Toxocara canis*

Número de accesoión GenBank	Lugar de Origen
AF182297.3	Korea
AJ920053.1	China
KC293901.1	Irán
KX962441.1	Alemania
KX962445.1	Alemania
LC133353.1	Vietnam
MK913431.1	Irán
MK913433.1	Irán
MT942612.1	Irán
MT942614.1	Irán
OM867301.1	China

Cuadro 16. Secuencias extraídas de la base GenBank para la construcción de árboles filogenéticos de *Ancylostoma caninum*

Número de accesoión GenBank	Lugar de Origen
ON980673.1	USA
ON980666.1	USA
ON980656.1	USA
AJ407963.1	Australia
ON980669.1	USA
ON980668.1	USA
ON980667.1	USA
ON980664.1	USA
ON980655.1	USA
ON980651.1	USA
ON980650.1	USA
AP017673.1	Japón
ON980674.1	USA
ON980672.1	USA
ON980660.1	USA
ON980658.1	USA
ON980653.1	USA
ON980652.1	USA
AJ407964.1	Australia
ON980671.1	USA
ON980661.1	USA
ON980659.1	USA
ON980657.1	USA
NC_012309.1	China
AJ407961.1	Australia
ON980662.1	USA
AB751617.1	Japón

ON980670.1	USA
ON980663.1	USA
ON980654.1	USA
AJ407965.1	USA
MN215971.1	China
AJ407966.1	Australia
AJ407962.1	Australia
OR810954.1	Bangladesh

Cuadro 17. Secuencias extraídas de la base GenBank para la construcción de árboles filogenéticos de *Spirocerca lupi*

Número de accesoión GenBank	Lugar de Origen
KY634870.1	Perú
KY634868.1	Perú
KY634869.1	Perú
MH634001.1	Israel
MH633999.1	Israel
MH633998.1	Israel
MH633997.1	Israel
MH633996.1	Israel
MH633995.1	Israel
MH634000.1	Israel
MH634005.1	Sudáfrica
HQ674752.1	Sudáfrica
NC_021135.1	China
HQ674751.1	Sudáfrica
MK922357.1	Sudáfrica

HQ674753.1	Sudáfrica
HQ674759.1	Sudáfrica
MH634010.1	India
MH634009.1	India
MH634008.1	India
MH634007.1	India
MH634006.1	India
LC597865.1	Vietnam
LC597864.1	Vietnam
LC597863.1	Vietnam
LC597862.1	Vietnam
LC597861.1	Vietnam
LC597860.1	Vietnam
HQ674760.1	Sudáfrica
HQ674756.1	Sudáfrica
MH634002.1	Sudáfrica
LC731326.1	Vietnam
LC731325.1	Vietnam
MH634004.1	Sudáfrica
MH634003.1	Sudáfrica
OQ335956.1	Costa Rica
OQ335955.1	Costa Rica
OQ335962.1	México
KY495495.1	Sudáfrica
HQ674755.1	Sudáfrica
HQ674754.1	Sudáfrica
OP476447.1	Chile
KY495494.1	Sudáfrica
KY495493.1	Sudáfrica
HQ674761.1	Sudáfrica

HQ674758.1	Sudáfrica
MH634011.1	Hungría
KY495496.1	Sudáfrica
OP476451.1	Chile
OP476450.1	Chile
OP476449.1	Chile
OP476448.1	Chile
KY495503.1	Sudáfrica
KY495502.1	Sudáfrica
KY495501.1	Sudáfrica
KY495500.1	Sudáfrica
KY495499.1	Sudáfrica
KY495497.1	Sudáfrica
HQ674757.1	Sudáfrica
MH634013.1	Hungría
MH634012.1	Hungría
KY495505.1	Sudáfrica
KY495504.1	Sudáfrica
KY495498.1	Sudáfrica
PP930795	México
KX265049.1_DI	Croacia

10.7 Resultados secuenciación masiva gen 12S

Cuadro 18. Número de *reads* por replicado en cada una de las muestras confirmadas de *C. latrans*

Muestras	Replicado A	Replicado B	Replicado C
CY1	15434	20888	13906
CY100	18542	12698	13934
CY101	16852	17196	17554
CY102	24	72	0
CY104	34262	31052	37700
CY104	27068	21668	29662
CY105	7054	6748	4784
CY105	36640	44144	33634
CY106	11800	18284	17864
CY106	13604	20094	13832
CY107	6658	9040	6008
CY107	24302	21850	21014
CY108	7022	8050	6476
CY109	4604	3298	4854
CY111	4584	2216	2452
CY112	19544	16472	17682
CY113	2536	4192	2550
CY114	6834	2192	3118
CY115	2276	2132	0
CY116	606	1146	680
CY117	10546	7824	14496
CY118	1226	2958	2042
CY119	12804	18074	17468
CY12	34152	53476	53140

CY121	16904	14372	17536
CY122	16300	13946	12488
CY123	2274	1112	0
CY124	1924	2154	1594
CY126	14288	12522	13346
CY127	1622	1834	1746
CY128	18286	4774	12610
CY129	4966	7672	0
CY13	1380	1134	1164
CY13	1242	1468	0
CY131	26770	19192	17950
CY132	24	44	0
CY133	25040	19378	16404
CY134	40	112	0
CY135	8	88	0
CY136	22	38	0
CY137	14	868	0
CY138	384	112	0
CY139	716	952	890
CY141	25532	18790	6280
CY142	542	168	0
CY143	28168	24270	32888
CY145	1680	2134	3450
CY147	4906	5366	17388
CY148	464	2068	0
CY149	22376	16888	31192
CY15	110	168	522
CY150	690	866	7666
CY151	344	960	0
CY152	820	3834	9036

CY153	34	328	0
CY154	110	502	0
CY155	19966	18964	28932
CY156	1032	822	4208
CY157	19454	21010	19258
CY158	5562	2592	0
CY158	110	26	0
CY159	5616	1372	7640
CY16	5936	3856	9702
CY16	31556	29994	52928
CY160	52	56	0
CY163	1740	3040	1740
CY164	276	376	282
CY165	1586	1744	874
CY166	1197	23	0
CY167	88	210	0
CY168	410	90	0
CY173	50	248	0
CY175	36	10	0
CY176	260	128	0
CY178	2892	2584	1806
CY179	82	146	0
CY182	116	126	38
CY183	12	44	0
CY184	554	996	300
CY185	150	266	0
CY186	120	74	0
CY187a	358	984	0
CY187a	98	164	0
CY189	3218	6200	3306

CY19	34180	42878	11864
CY190	666	1294	2074
CY191	36	10	0
CY194	25612	31918	47726
CY195	5562	2592	0
CY195	110	26	0
CY196	5616	1372	7640
CY198	52	56	0
CY2	38	102	0
CY20	2780	1222	284
CY20	12728	18820	4160
CY202	1740	3040	1740
CY205	88	210	0
CY205	410	90	0
CY210	50	248	0
CY212	260	128	0
CY214	2892	2584	1806
CY215	82	146	0
CY216	116	126	38
CY217	12	44	0
CY218	554	996	300
CY219	150	266	0
CY220	120	74	0
CY221	358	984	0
CY221	98	164	0
CY223	3218	6200	3306
CY23	590	202	0
CY3	11284	14834	0
CY4	26830	424	192
CY48	25612	31918	47726

CY5	2254	1240	0
CY6	16840	78	0
CY7	6164	2866	0
CY71	440	1002	2062
CY74	7378	8254	13098
CY79	1304	2052	1348
CY8	208	70	0
CY82	1054	1204	0
CY83	416	222	420
CY86	5638	8806	8542
CY87	17638	13336	27914
CY88	2368	1608	2972
CY89	1280	3078	878
CY9	22	458	200
CY9	898	9632	8070
CY93	156	150	82
CY94	214	620	1346
CY96	10252	8876	12220
CY97	274	374	280
CY98	13586	10744	8784
CY99	468	524	468

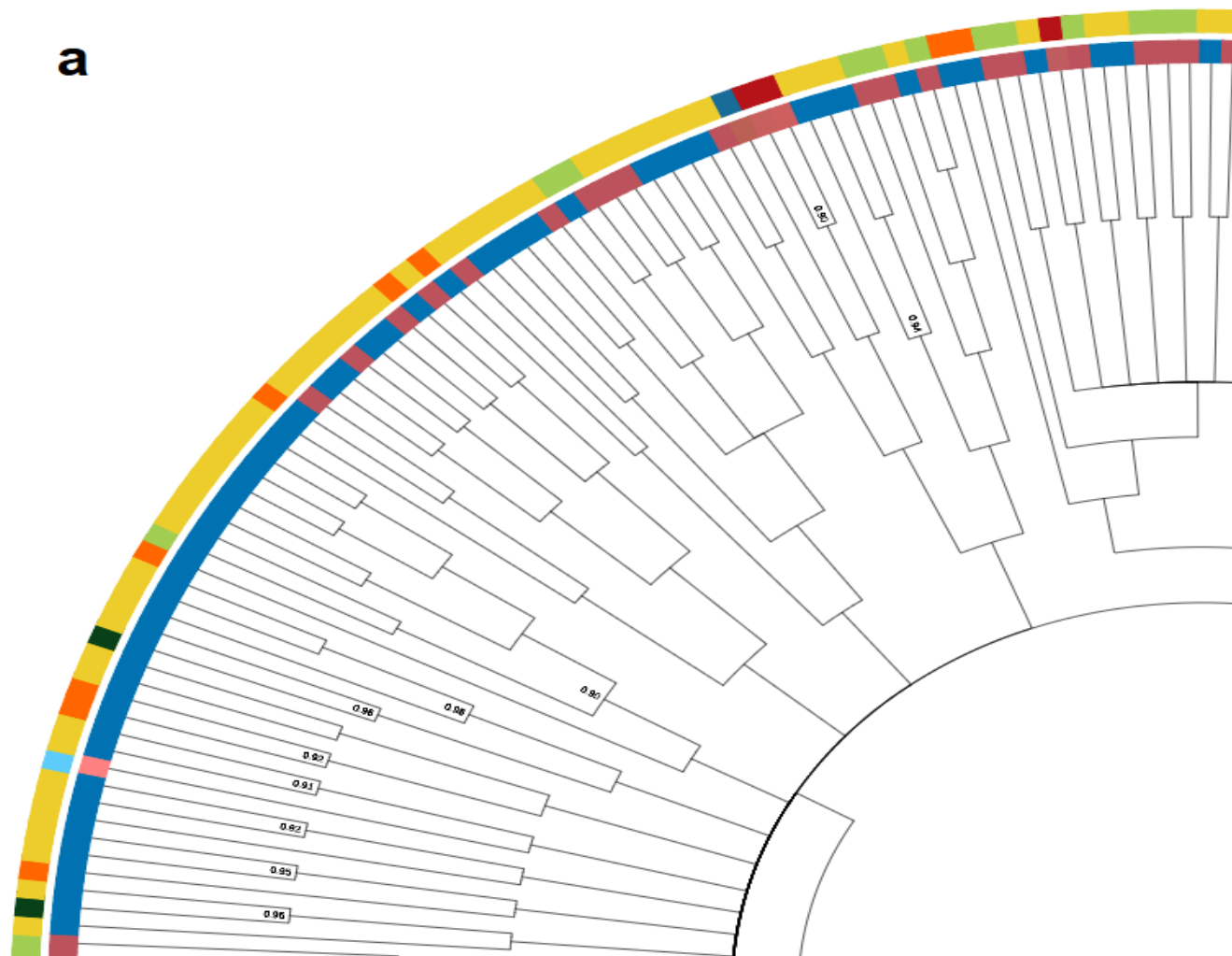
10.8 Acercamientos árbol filogenético *Ancylostoma caninum*

Figura 19. Acercamiento árbol filogenético *A. caninum*: porción superior izquierda. Se muestran probabilidades posteriores mayores a 0.6

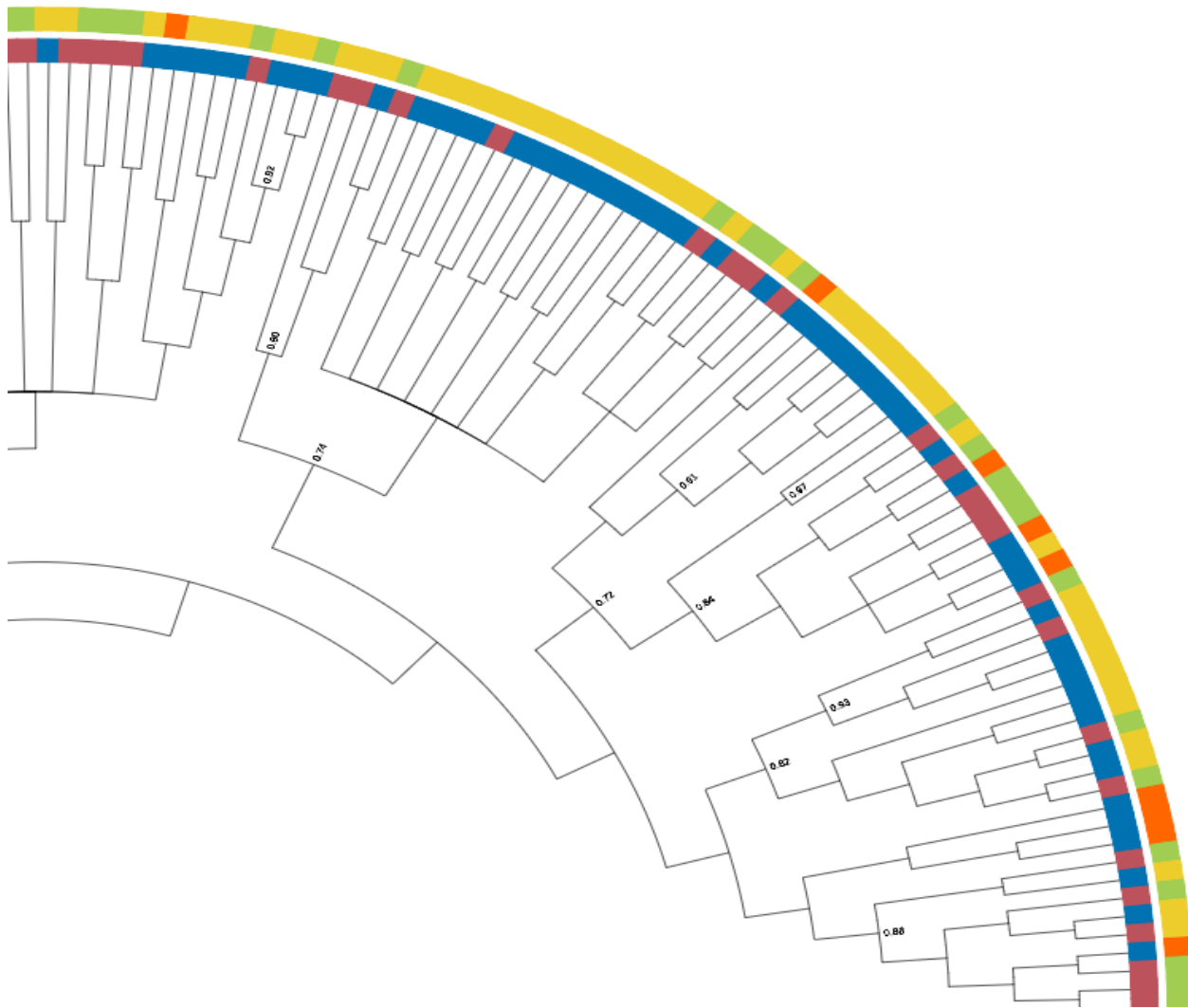


Figura 20. Acercamiento árbol filogenético *A. caninum*: porción superior derecha. Muestra probabilidades posteriores mayores a 0.6

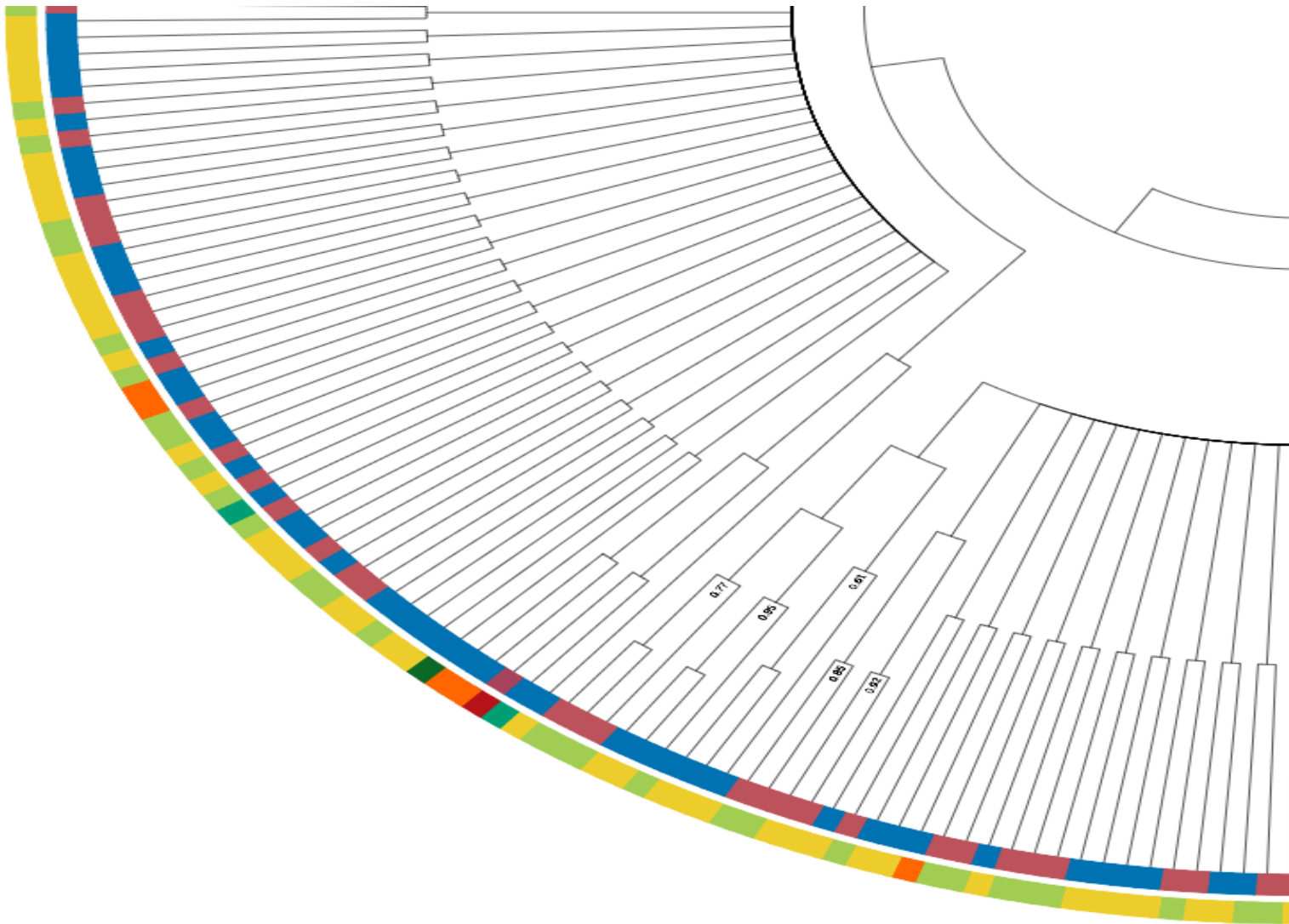


Figura 21. Acercamiento árbol filogenético *A. caninum*: porción inferior izquierda. Muestra probabilidades posteriores mayores a 0.6

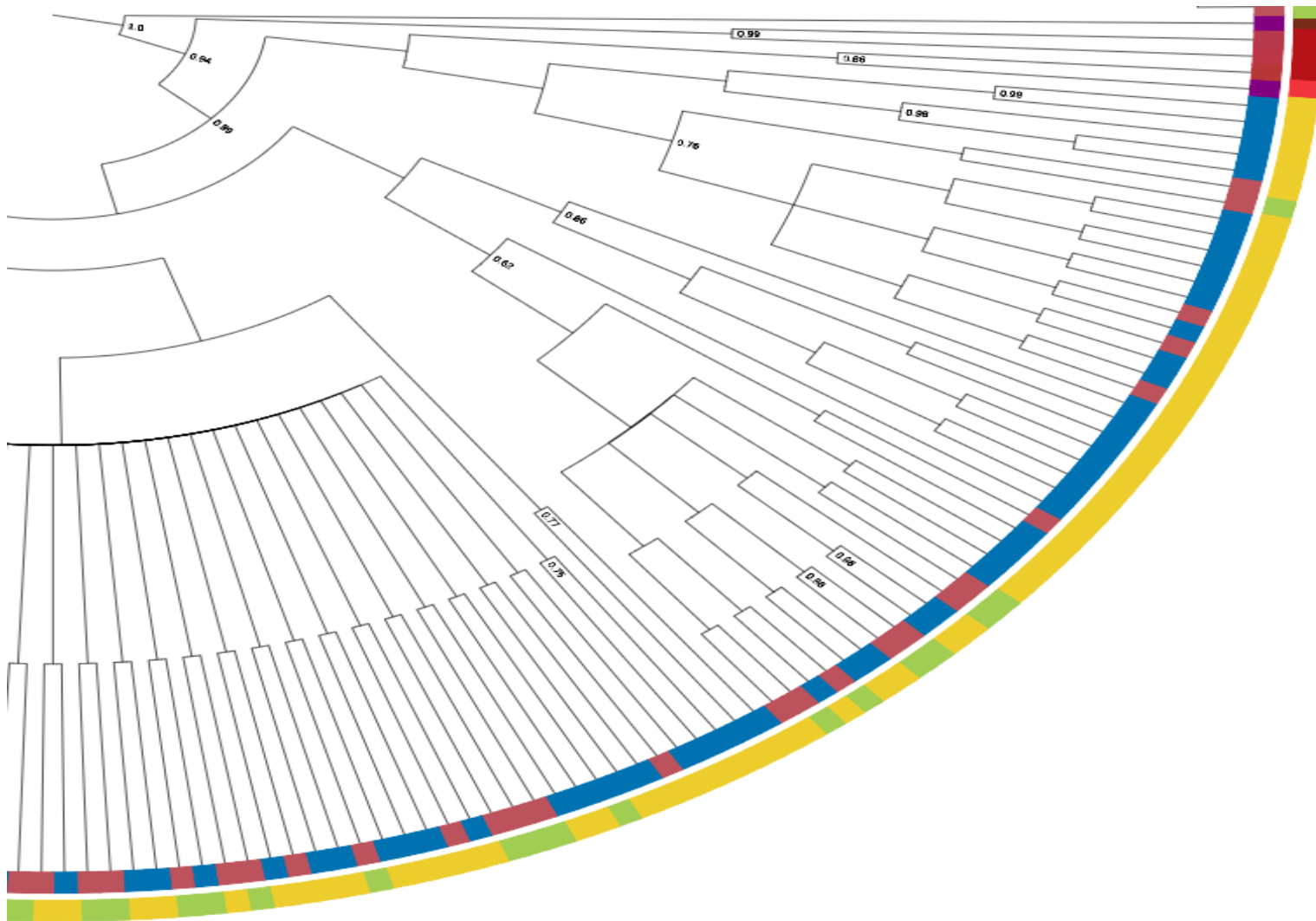


Figura 22. Acercamiento árbol filogenético *A. caninum*: porción inferior derecha. Muestra probabilidades posteriores mayores a 0.6

10.9 Acercamiento árbol filogenético *Spirocerca lupi*

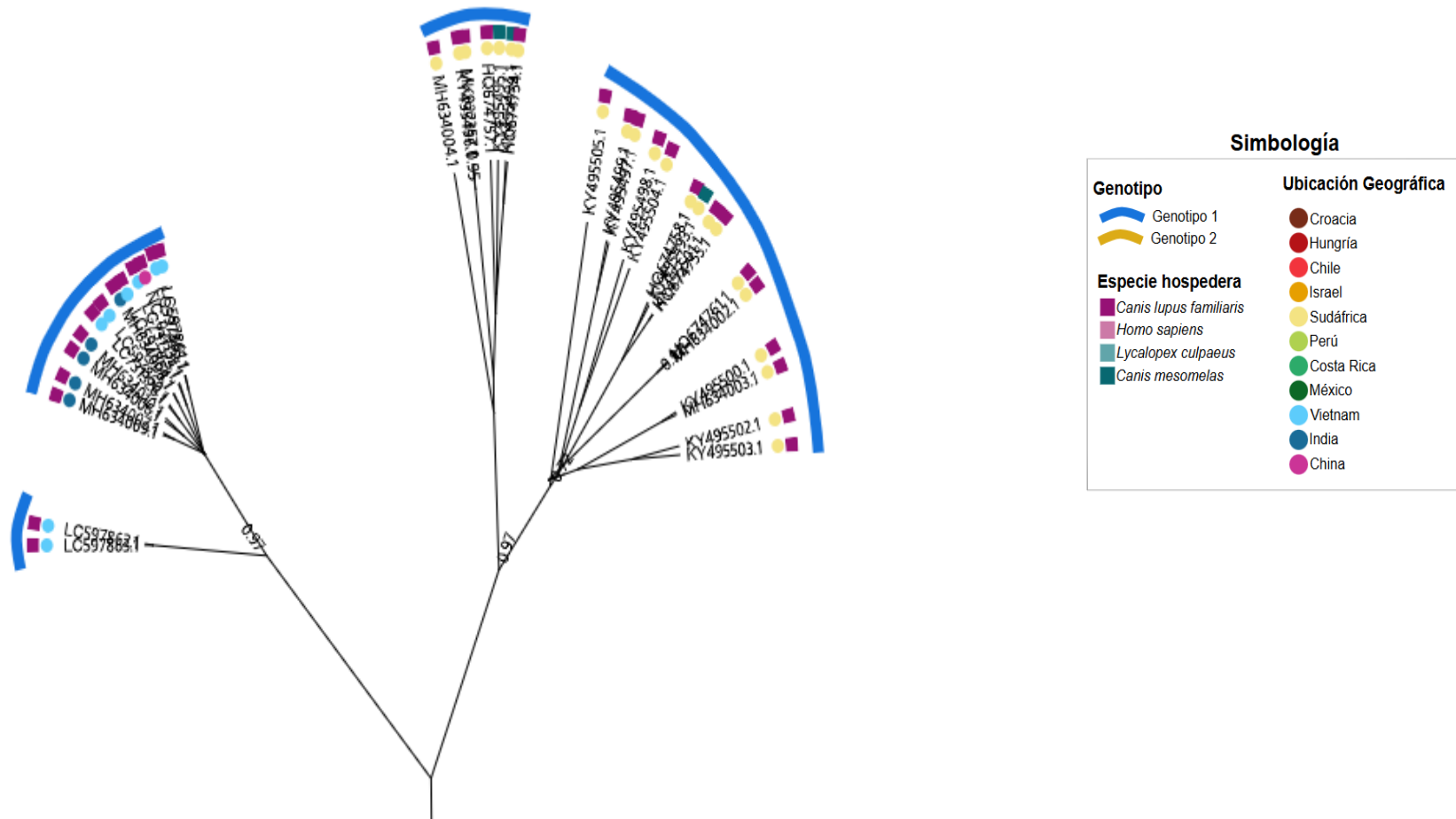


Figura 23. Acercamiento árbol filogenético *Spirocerca lupi*: porción superior. Se muestran probabilidades posteriores mayores a 0.6

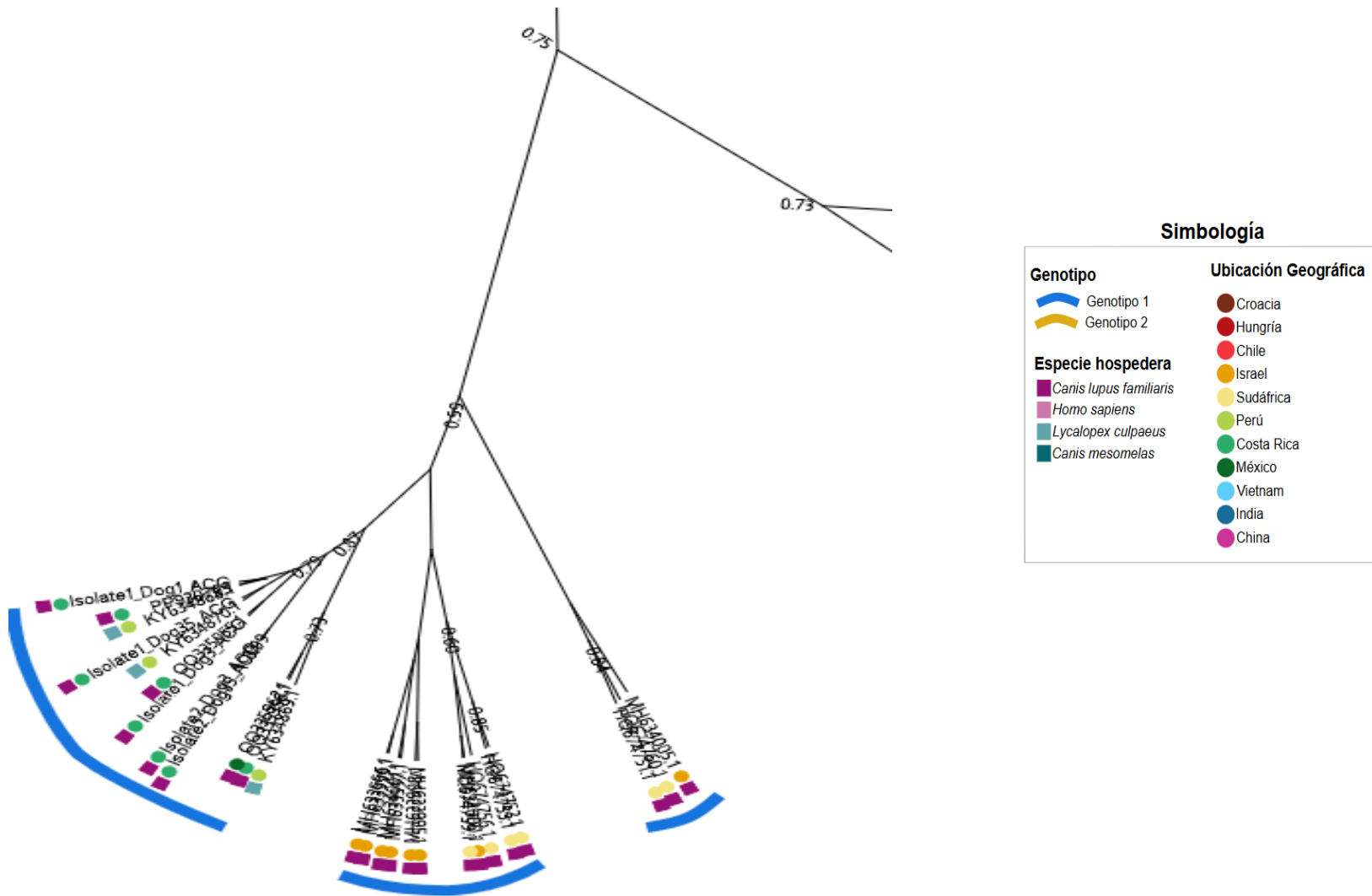


Figura 24. Acercamiento árbol filogenético *Spirocerca lupi*: porción inferior izquierda. Se muestran probabilidades posteriores mayores a 0.6

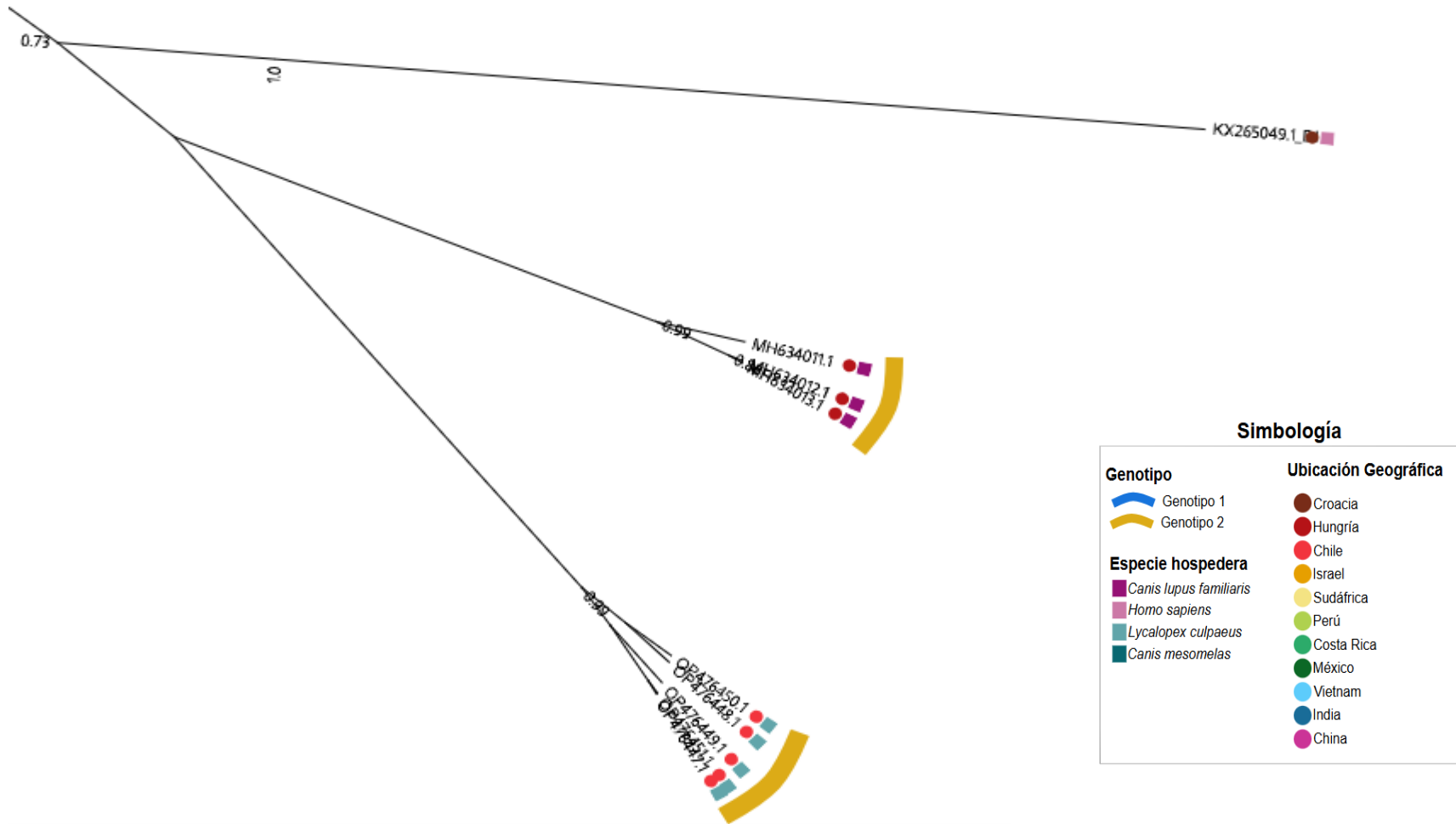


Figura 25. Acercamiento árbol filogenético *Spirocerca lupi*: porción inferior derecha. Se muestran probabilidades posteriores mayores a 0.6