
DESARROLLO DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL PARÁSITO *TOXOCARA* *CANIS* EN SUELO



Virginia Villalba Ibáñez

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA
SECCIÓN BIOQUÍMICA – BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

Orientadora: Dra. Estela Castillo

Montevideo, Agosto 2012

Agradecimientos

A mis padres, Richard y Ana, por apoyarme siempre en todos estos años, por alentarme a hacer lo que me hace feliz y a pelear por mis ideas, por defender mi alegría ante todo. Por pensar conmigo críticamente muchas decisiones, por acompañarme en los momentos tristes y los felices. Por empujarme a ser más segura y más humilde en todo lo que hago. Les agradezco a ellos darme mis tiempos y ser tan comprensivos en este camino que resultó más extenso de lo que pensábamos. Por contemplar todas mis vetas soñadoras y tirarme cables a la realidad. Agradecida por haber aprendido de ellos a valorar y agradecer todo lo que he vivido. A mis hermanos, Javier, Andrés y Jessi, por estar ahí cada vez que los necesité, por disfrutar y compartir mis locuras. Por su respaldo incondicional, y creer siempre en mí. Por ser tan pacientes en tantas ocasiones, cuidarme y acompañarme en todo. A mis tíos, mis primas y mis sobrinas, por ser un impulso hacia adelante constantemente. También le agradezco a Coral, Daniel y Trilce por consentirme tanto en estas últimas etapas, trasmitirme su apoyo y entusiasmo.

A mis amigos Caro, Ceci, Mari, Sil, Huguito, Leo y Mati, porque vivimos de todo y en diez años siempre estuvieron, con toda su paciencia en mis ausencias; a mis amigos de pica por todos; a todos mis amigos y mis compañeros de militancia, porque aprendí con todos ellos. A Nico, porque nunca dudó que este momento iba llegar, por apoyarme siempre y cuidarme, aunque no estuviera cerca. A la Turquis, Lea y Manolo por haberme enseñado tanto, protegerme en cada paso, compartir lo bueno y lo malo.

A mis compañeros de trabajo y todos aquellos que estuvieron presentes, con su apoyo y cariño.

Infinitas gracias a Estela, por asumir el desafío de acompañarme en mi egreso y arriesgarse en este nuevo proyecto. Por compartir sus experiencias, escucharme y aconsejarme, por esperarme y exigirme. Por hacer converger mi interés sobre las problemáticas sociales y mi formación. Por enseñarme a pensar cómo hacer ciencia y despertar en mí la pasión por la investigación.

A Mónica y Uriel por dar forma al proyecto en el que se realiza este trabajo. A Serrana por ayudarme a perder el miedo en el laboratorio, enseñarme y acompañarme en los primeros pasos y ser mi pequeña tutora. Le agradezco a los compañeros de la 313: Ana, Ali, Fer, Sole, Germán, Manu, Gustavo y Lucía, por responder todas mis preguntas y ayudarme cada vez que los necesité, por los mates, las charlas, consejos y recomendaciones.

A Ana Acuña, Luis Calegari (por presentarme al *Toxocara canis*), y Esther Cidade por contribuir y hacer posible este proyecto de inclusión social.

El final de estos agradecimientos, es especialmente para Mijail. Por ser un compañero inquebrantable, sin el que no hubiera sido posible llegar hasta acá. Por tener una paciencia infinita y estar ahí para sostenerme cada vez que tropecé. Por la motivación cotidiana a culminar esta etapa y seguir adelante. Por darme seguridad y ayudarme a mejorar día a día. Por compartir cada momento, cada decisión, cada desafío. Por ser guardián de mis alegrías y apoyarme siempre. Porque ni un segundo ha dejado de acompañarme con inagotable ternura y hemos crecido juntos. Por alentarme a defender y trabajar por lo que creo, seguir mis sueños y ser feliz. Gracias.

Resumen

La Toxocariasis, ocasionada por *Toxocara canis* en perros y *Toxocara cati* en gatos, es la geohelmintiasis zoonótica de mayor importancia y prevalencia en el Uruguay e implica importantes problemas de Salud Pública. La Toxocariasis humana se produce por la ingesta de huevos embrionados que se esparcen con las heces de los perros infectados. La mayoría de los casos se registran en los niños pertenecientes a las capas más pobres. Muchos son asintomáticos y diagnosticados tardíamente. Los índices de sospecha clínica son muy bajos, por lo que se cree una patología muy sub diagnosticada. El objetivo de este trabajo es desarrollar herramientas moleculares, que con alta sensibilidad y especificidad identifiquen zonas contaminadas con huevos de *T. canis* en donde habitan poblaciones expuestas a la infección. Se diseñaron cebadores específicos y se comprobó la funcionalidad de éstos. Se realizó la extracción de ADN genómico de muestras de suelo y mediante técnicas de PCR se ha detectado e identificado ADN genómico de *T. canis*. Estos resultados han sido confirmados por secuenciación. Este trabajo, que se enmarca en un proyecto presentado al llamado de la UdelaR a proyectos de Inclusión Social, pretende colaborar a través de herramientas moleculares, a un mayor conocimiento sobre la epidemiología de *T. canis*, lo cual resulta fundamental para la elaboración de políticas sanitarias y educativas interinstitucionales que aborden integralmente la problemática y originen respuestas inclusivas para esta población.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Helmintos, nematodos y geohelmintiasis	5
1.2. <i>Toxocara canis</i>	6
1.3. Toxocariasis	9
1.4. Técnicas de diagnóstico y detección	12
1.5. Avances en el uso de la PCR	16
1.6. Estudios genómicos de <i>Toxocara</i>	17
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo general	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Obtención de especímenes parásitos de perro	19
3.2. Extracción y visualización de ADN genómico	19
3.3. Amplificación del ADNg producto de la extracción	19
3.4. Colecta de muestras de suelo	20
3.5. Extracción de ADNg de muestras de suelo	21
3.6. Amplificación de ADNg extraído de muestras de suelo	21
3.7. Purificación del producto de PCR	22
3.8. Secuenciación y análisis de secuencias	22
3.9. Técnica de Flotación/Centrifugación	22
4. RESULTADOS y DISCUSIÓN	23
4.1. Obtención de helmintos y extracción de ADNg	23
4.2. Amplificación de ADN genómico: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	24
4.3. Extracción de ADN genómico de suelos	26
4.4. Amplificación de ADNg de muestras de suelo	27
4.5. Amplificación de la dilución 1/10 de ADNg de las muestras 3, 4, 5, 6, 9 y 10	30
4.6. Reamplificación de los productos de PCR de las muestras 8, 11, 12 y 14	32
4.7. PCR por triplicado (muestras 8, 11, 12 y 14) y purificación del producto	33

4.8. Análisis de secuencias	34
4.9. Flotación/centrifugación de las muestras.....	36
5. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS	37
5.1. Obtención de Helmintos y extracción del ADNg.....	37
5.2. Amplificación de ADN genómico: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
5.3. Extracción y amplificación de ADN genómico de suelos.....	38
5.4. Purificación de los productos de PCR, secuenciación y análisis de secuencias	39
5.5. Flotación/centrifugación de las muestras.....	40
5.6. Consideraciones finales.....	40
6. BIBLIOGRAFÍA	41
Anexos	46

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Helmintos, nematodos y geohelmintiasis

Los Helmintos o gusanos, son organismos que parasitan el intestino humano y son los responsables de las helmintiasis intestinales que provocan morbilidad y en ciertos casos mortalidad, en un conjunto importante de la población mundial.

Los gusanos planos son denominados Platelminfos y los gusanos redondos pertenecientes al Phylum Nematoda reciben el nombre de Nematelmintos.

El conjunto de organismos conocidos como Nematelmintos o Nematodos es un grupo que presenta un elevado número de individuos y una gran diversidad. Se encuentran organismos de vida libre, así como parásitos de animales y plantas.

Los datos de la Organización Mundial de la Salud de comienzos de la pasada década estimaban en el mundo 3.800 millones de personas infectadas. Más recientemente informes elaborados por la Organización Panamericana de la Salud manejaban cifras actualizadas y también desalentadoras, ya que reportan más de 2 mil millones de personas infectadas por esquistosomas y helmintos que se transmiten por el contacto con suelos contaminados.

Los agentes llamados geohelmintos infectan principalmente a la población de menos recursos, particularmente mujeres y niños. Las geohelmintiasis son reconocidas por varios autores de la parasitología como una enfermedad de la pobreza que causa el deterioro de la salud con secuelas permanentes en ciertas ocasiones y que en los niños perjudica el crecimiento, el desarrollo y las capacidades cognitivas.

La elevada prevalencia de estas parasitosis, así como los altos niveles de carga parasitaria tienen graves consecuencias en el desarrollo de un país. Los recursos de Salud Pública destinados a la atención de complicaciones de estas enfermedades, muchas veces enmascaradas en las eventuales patologías generadas; las incapacidades permanentes para sostener un organismo saludable y el deterioro de los procesos cognitivos de los niños sumados al ausentismo escolar que los margina, son parte de la plétora de situaciones económicas y sociales que afectan a una sociedad y su crecimiento sin exclusiones.

Los geohelmintos deben su nombre a la necesidad compartida entre los integrantes de este grupo de presentar una etapa de su ciclo de vida en el suelo (geo=tierra). En este período, los huevos quedan diseminados en los suelos y allí maduran las larvas, y en ciertos casos adultos de vida libre. Los humanos contraen la enfermedad por la ingesta de los huevos, ya sea directamente de la tierra o alimentos y aguas contaminadas. Es así que los niños pequeños son los más vulnerables por realizar sus juegos en contacto con la tierra y los menos concientes del peligro.

Los geohelmintos parasitan a humanos y animales. En este último caso son agentes de zoonosis que provocan las geohelmintiasis zoonóticas. La Toxocariasis ocasionada por *Toxocara canis* en perros y *Toxocara cati* en gatos (similar al áscaris) es la geohelmintiasis zoonótica de mayor importancia y prevalencia en el Uruguay (OPS/DPC/CD/01.2003. Acuña, A. y cols.). Sin ser helmintos intestinales de humanos, significan importantes problemas de Salud Pública.

1.2. *Toxocara canis*

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Animalia; Phylum: Nematelminthes; Clase: Nematodos; Subclase: Secernentea; Orden: Ascaridida; Familia: Ascarididae; Género: *Toxocara*; Especie: *canis* (Mendoza Rodriguez, D. 2001).



Figura I1. Hembra adulto de *Toxocara canis*. Imagen obtenida de health.learninginfo.org

El macho adulto mide entre 4 a 8 cm y la hembra de 8 a 14 cm. Presentan dos expansiones laterales de la cutícula en la extremidad anterior en forma de alas o aletas. Sus huevos son parecidos a los de áscaris, sin embargo su tamaño es un poco mayor y su cubierta externa es más irregular.

Las especies *Toxocara canis* (perros) y *Toxocara cati* (gatos), encuentran en humanos y otros mamíferos un huésped paraténico en los que no completan su ciclo de vida, sino que se perpetúan en estado larvario.

Huéspedes paraténicos son los que no representan un ambiente adecuado y habitual para el parásito y que albergan la etapa larvaria en este caso del nematodo. Ejemplos de huéspedes paraténicos en algunos casos son el hombre, los roedores, las aves y también algunos invertebrados. En estos hospederos las larvas esperan su oportunidad de continuar su desarrollo, lo que implica que los tejidos infectados sean ingeridos por el huésped específico de la especie.

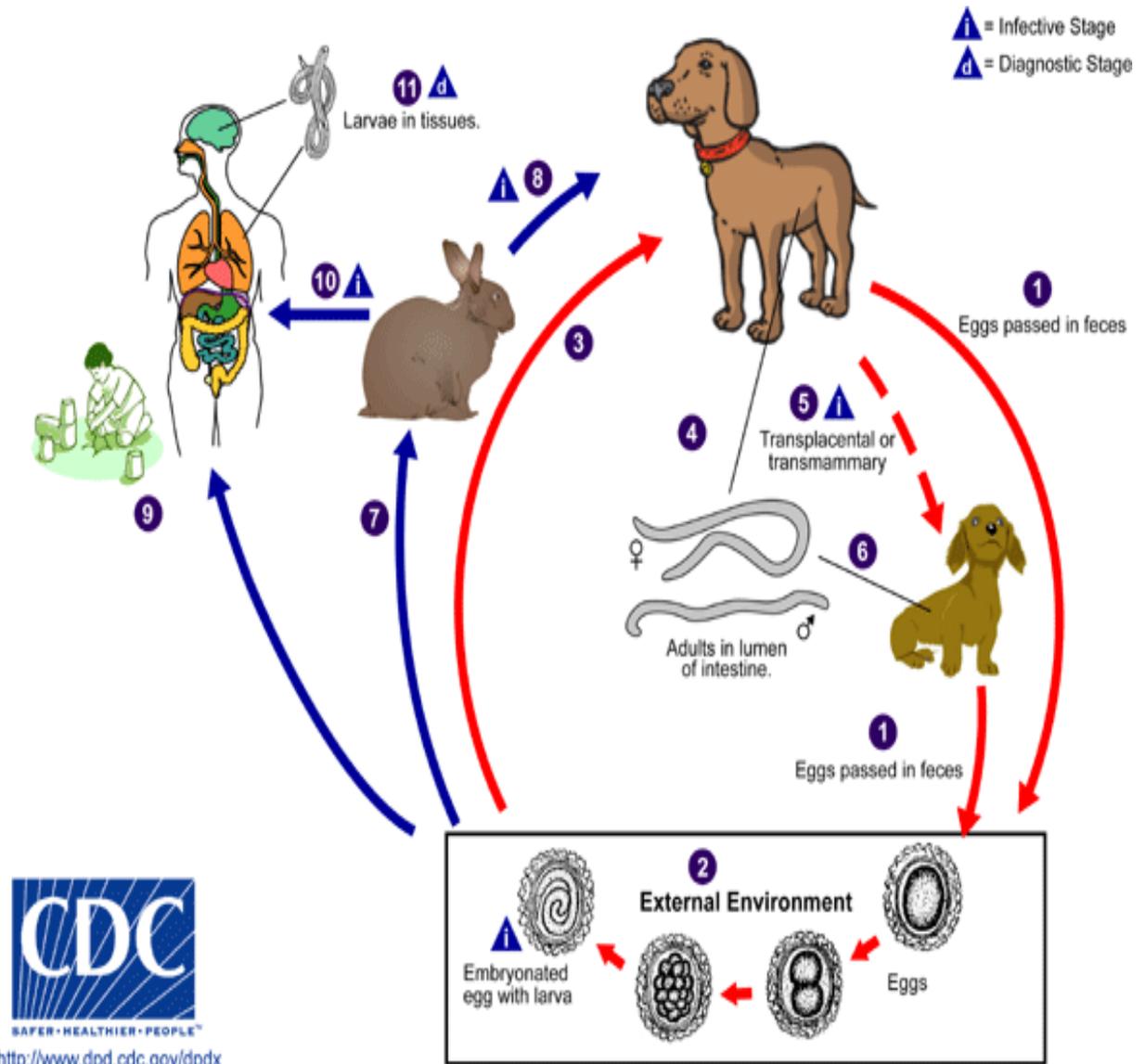


Figura I2. Ciclo de Vida de *Toxocara canis*. Obtenida de dpd.cdc.gov. El *Toxocara canis* cumple su ciclo de vida en los perros y los seres humanos pueden contraer la infección como huéspedes accidentales. Los huevos no embrionados se eliminan en las heces del huésped definitivo. 1. Los huevos embrionados se convierten en infectantes en el ambiente. 2. Posteriormente a la ingestión por los perros 3 los huevos eclosionan y la larva penetra en la pared intestinal. En los perros jóvenes las larvas migran a través de los pulmones, los bronquios y el esófago; los gusanos adultos se desarrollan y depositan sus huevos en el intestino delgado. 4. En perros adultos, pueden ocurrir infecciones, pero el enquistamiento larvario en los tejidos es lo más común. Durante el embarazo en las perras las etapas de enquistamiento son reactivadas e infectan por la vía transplacentaria y transmamaria a los cachorros. 5, en el intestino delgado de los cuales se establecen los gusanos adultos. 6. Los cachorros son la mayor fuente de contaminación ambiental por huevos. El *Toxocara canis* puede también ser transmitido a través de la ingesta de huéspedes paraténicos: huevos ingeridos por pequeños animales (por ejemplo conejos) eclosionan y las larvas penetran la pared intestinal y migra hacia varios tejidos donde se enquistan. 7. El ciclo de vida se completa cuando los perros comen estos huéspedes 8 y la larva se desarrolla hasta la puesta de huevos de gusanos adultos en el intestino delgado. Los humanos son huéspedes accidentales que se infectan por ingerir huevos infectivos provenientes de suelos contaminados 9 o huéspedes paraténicos infectados. 10. Después de la ingesta, los huevos eclosionan y las larvas penetran la pared intestinal y son transportadas por la circulación a una amplia variedad de tejidos (hígado, corazón, pulmones, músculos, ojos) 11. Mientras que las larvas no sufren un desarrollo posterior en estos sitios, pueden causar reacciones locales severas que son la base de la Toxocariasis.

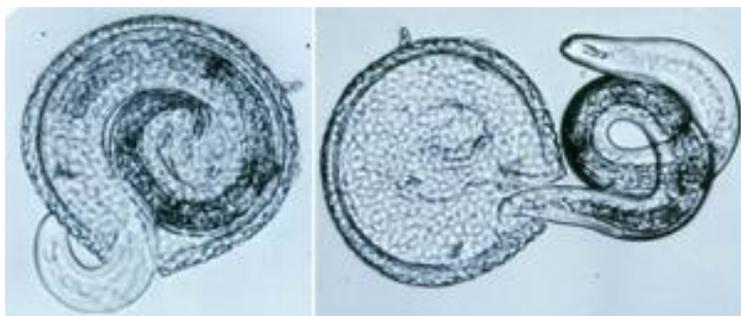
Las larvas que afectan al humano en el segundo estadio (L2) miden aproximadamente 400mm de largo y 20 mm de ancho. La cutícula es estriada y además presentan un gancho en la parte posterior.



FI3. Larva de *Toxocara canis*. Imagen obtenida de dpd.cdc.gov

La etapa larvaria en el perro contempla obligatoriamente la migración por meses o años por los tejidos del huésped. Las larvas generan resistencia a drogas en los animales, y en los humanos los Síndromes de Larva Migrans. Una de las particularidades de la larva de *Toxocara* es su capacidad de atravesar la placenta y ocasionar la infección previa al nacimiento. A su vez, es notoria su predilección por los tejidos cerebrales y oculares. En perros adultos la cáscara de los huevos es rota en el intestino delgado (estadio L2) (Gillespie S.H. 1988). La larva que atraviesa la mucosa intestinal comienza su migración por vasos sanguíneos y linfáticos. Se dirige al pulmón, corazón izquierdo y luego a través de la circulación alcanza distintos tejidos en los que puede alojarse en estado latente. Ciertos autores describen una preferencia por el Sistema Nervioso Central (Roth L. 2003).

Se cree que las hembras de *T. canis* llegan a eliminar hasta 200.000 huevos no embrionados por día que son eliminados en las heces del animal. Esta contaminación en el ambiente según la temperatura y humedad, generan en un período de 3 semanas a 6 meses huevos maduros que se convierten en infectantes.



FI4. Etapas de eclosión de la larva de *T. canis*. Imagen obtenida de dpd.cdc.gov

Los huevos de *T. canis* pueden permanecer durante años en el ambiente sin importar condiciones adversas.

Las descripciones que se registran sobre el genoma de la especie, plantean que existen 18 cromosomas (se incluyen las células germinales) y que su tamaño de 3×10^9 pb es cercano al genoma de áscaris (Maizels, R.M. et al., 2005; Walton,

1959). La pertenencia de *T. canis* al grupo Ascaridida ha sido confirmada por análisis de ADN ribosomal y mitocondrial (Nadler, S.A. y Hudspeth, D.S., 2000).

1.3. Toxocariasis

La enfermedad zoonótica causada por el agente parasitario del género *Toxocara* presenta una distribución mundial. El nematodo reportado como el de mayor importancia epidemiológica es el *Toxocara canis*. La afección es catalogada como una geohelmintiasis, que se produce por la ingesta de huevos embrionados que se esparcen con las heces de los perros infectados.

Las complicaciones de esta variante del ciclo natural de estos geohelminthos son subestimadas, ya que el diagnóstico de la enfermedad no es sencillo de realizar.

Según distintos autores la Toxocariasis es una enfermedad cosmopolita, detectada con mayor frecuencia en zonas templadas y tropicales. A nivel epidemiológico no se requiere su notificación, lo que conlleva una gran dificultad a la hora de establecer su prevalencia en humanos y realizar su diagnóstico.

Los perros recién nacidos presentan los niveles más importantes de parasitosis. Su infección es transmitida madre a hijo por vía transplacentaria y transmamaria y desde las tres semanas de vida son aptos diseminadores de huevos en sus heces. La importancia epidemiológica en las infecciones humanas se agudiza en el caso de los cachorros por la cercanía del hombre y el comportamiento de los niños con los animales. Todo el proceso de maduración ocurre en cachorros menores de 5 semanas (Gillespie S.H., 1988).

Cuando los cachorros ingieren los huevos, las larvas liberadas en el intestino delgado alcanzan el pulmón donde crecen y maduran a través de un proceso de mudas. Luego migran (estadio L3) a través de la tráquea y la faringe en donde son deglutidas para completar el desarrollo en el estómago e intestino delgado en un lapso de 2 a 3 semanas. Según Roth, se ha descrito que luego de 4 a 5 semanas de infección los huevos comienzan a ser excretados.

En el ciclo de *Toxocara*, la infección en el hombre se produce cuando los huevos eliminados en las heces por la hembra se transmiten por la ingesta de huevos embrionados (con el alimento o por la introducción de las manos, u elementos contaminados en la boca). En los niños pequeños con hábito de pica, sucede por la ingesta de tierra con huevos. Al llegar al intestino delgado se liberan las larvas y atraviesan las mucosas, migran al hígado por vía porta, luego al corazón derecho, pulmón y ojo. El hombre como huésped paraténico puede albergar en sus tejidos larvas potencialmente viables que no pueden completar su ciclo (Oliveros M. V., et al., 1995; Duran E. et al., 1993).

1.3.1 Principales afecciones en la Salud Humana causadas por *T. canis*

Hasta la fecha los autores describen cuatro síndromes de toxocariasis en humanos: larva migrans visceral (LMV), larva migrans ocular (LMO), toxocariasis encubierta (TE) y larva migrans neurológica (LMN) (Borecka et al., 2008).

"El Síndrome de Larva Migrans visceral es la entidad clínica producida en el hombre, secundaria a la migración sistémica de larvas de helmintos, principalmente del género Toxocara (T. canis, T. cati)" (Oliveros M., Salazar R., 1995; Schantz P.M., 1990).

La descripción del Síndrome de Larva Migrans se atribuye por parte de distintos autores a Beaver en el año 1952. "*Estudios de biopsias y autopsias en niños, y varios tipos de estudios en animales de experimentación han provisto más que interesantes hechos sobre T. canis como una causa de larva migrans visceral que puede mencionarse*" (Beaver P.C., 1959).

Además de *Toxocara* se reportan también como causantes del síndrome las larvas de *Ancilostomídeos* de perros y gatos, de *Gnathostoma*, la esparagana de *Spirometra*, las mesocercarias de *Alaria* y *Baylisascaris procyonis*.

El Síndrome LMV se describe con mayor frecuencia en niños menores de 10 años, y es elevada la incidencia en niños de 2 a 5 años.

"*El diagnóstico de esta patología se hace actualmente en base a la sospecha clínica, el antecedente de geofagia y/o hábito de pica, el contacto con cachorros, el cuadro clínico compatible, leucocitosis y eosinofilia en el hemograma, IgE elevada e isoaglutininas anti A y anti B elevadas*" (Oliveros M. et al., 1995)

Las larvas alojadas en distintos órganos generan lesiones inflamatorias (reacción granulomatosa inflamatoria eosinofílica intensa). La respuesta inflamatoria también genera la encapsulación de la larva, sin embargo no hay evidencias de que colabore con su destrucción (Schantz P. M., et al., 1990)

La mayoría de las infecciones son asintomáticas. Existen registros de numerosas e inespecíficas manifestaciones clínicas: anorexia, fiebre, malestar general, irritabilidad, dolor muscular, artritis, tos y expectoración.

Se describen también la hepatomegalia dolorosa, esplenomegalia, linfadenopatía, y estertores diseminados.

En el análisis de los pulmones a través de radiografía se han observado infiltrados. Las erupciones cutáneas y la urticaria también han sido identificadas como parte de las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Cuando las larvas alcanzan el Sistema Nervioso Central pueden aparecer afecciones de distinta índole, entre ellas epilepsias en bajos y altos niveles de gravedad, encefalitis, meningitis, síntomas de tumoración intracraneana y pleocitosis eosinofílica en el líquido cefalorraquídeo.

Según Roth, las publicaciones de Marmor en 1987 y Schantz en 1989 describen en niños test neurológicos de función motora y cognitiva de bajo rendimiento y deficiencias neurológicas y desórdenes de comportamiento respectivamente.

Distintas publicaciones mencionan la ocurrencia de casos fatales cuando la diseminación de las larvas compromete órganos como el miocardio, cerebro y pulmones.

El lapso de tiempo en el que la enfermedad se encuentra en su etapa aguda es de entre 2 a 3 semanas, sin embargo las manifestaciones clínicas pueden permanecer por un período de 18 meses a 2 años.

El Síndrome de Larva Migrans Ocular o Toxocariasis ocular ha sido observado en niños y en adultos. Se produce cuando la migración de la larva culmina con su alojamiento en el ojo. Generalmente se ubica en el segmento posterior. Es descrita como una de las causas de opacidad del humor vítreo, desprendimiento de la retina y pérdida total de la visión.

Vasta literatura establece que esta afección puede provocar alteraciones de la visión, desprendimiento de la retina e incluso ceguera. En niños pequeños, puede ocurrir que los síntomas clínicos no sean percibidos, en estos casos la lesión unilateral e indolora se evidencia en un examen de retina de fondo de ojo.

En exámenes oftalmológicos, se generan confusiones en el diagnóstico debido a que en algunas ocasiones se cree que se está en presencia de un retinoblastoma al no observar larvas. Se ha registrado que en ciertos casos se origina enucleación ocular.

En la bibliografía se evidencia la controversia generada en torno a la coexistencia de migración larvaria ocular y migración visceral. Algunos autores afirman que es característico del LMO la no detección de LMV ni eosinofilia, sin embargo se han registrado casos en los que ambas están presentes o se sospecha de que una es precedida por la otra. Se cree que la ingesta de una baja carga de huevos infectados da lugar a la ocurrencia de LMO y que por el contrario grandes cargas producen LMV.

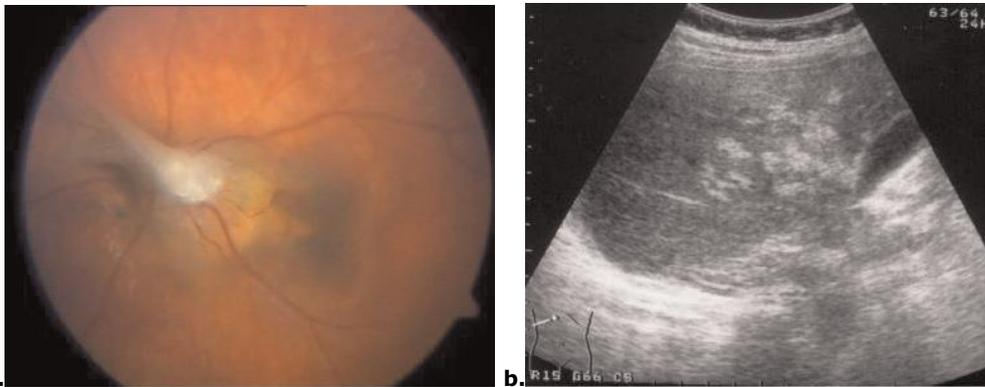


FIG. 15. Reporte de caso de co-ocurrencia de Síndrome de Larva Migrans Ocular y Síndrome de Larva Migrans Visceral en niño de 8 años infectado con *T. canis*. a. Análisis oftalmoscópico del ojo. Como consecuencia de LMO se observa membrana epirretinal falciforme creciendo desde el disco del nervio óptico a la periferia de la retina la que se encuentra rodeada de una cicatriz postinflamatoria coriorretinal inactiva. b. Ultrasonido de abdomen. Se observan múltiples granulomas hepáticos, producidos por LMV. Imágenes obtenidas de "The co-occurrence of Toxocara ocular and visceral larva migrans syndrome: a case series" de Paul, M. et al., 2009.

Los órganos afectados más frecuentemente por la enfermedad de Toxocariasis son el hígado, los pulmones, el cerebro, ojos, ganglios, riñones, corazón y bazo. Se cree que el número de larvas que provocan la infección y la sensibilidad del hospedero influyen en la intensidad con que se desarrolla la patología. Los tejidos dañados por la migración de las larvas generan la aparición de las manifestaciones clínicas y patológicas.

1.3.2 Epidemiología

El período de incubación oscila entre semanas y meses, lo que depende de la cantidad de huevos infectantes que se ingieren y la sensibilidad del hospedero. Se ha detectado que en los casos que se ingiere hígado crudo que contiene larvas el período de incubación se reduce a horas (Mendoza Rodríguez, D., 2001).

La situación generada por esta enfermedad es agravada por el hecho de detectarse la mayoría de los casos en la niñez, sobretodo en niños pertenecientes a las capas más pobres de la sociedad mundial. La ausencia de hábitos y condiciones de higiene, y la falta de conocimiento sobre los niveles de contaminación ambiental por huevos del parásito en múltiples lugares del entorno de la vida del ser humano,

se han convertido en una grave amenaza para la salud. La especie *Toxocara* está globalmente distribuida en el mundo. Valores reportados por Lavikainen en 2008, describen que en los países nórdicos - las enfermedades parasitarias no se presentan en cifras significativas - 6 de 7 pacientes con serología positiva para toxocariasis eran niños entre 2 y 16 años.

Los parques públicos son considerados por los autores como un importante factor asociado a la Toxocariasis, por la asidua concurrencia de perros y el rol de espacio recreativo para el ser humano. Se describen muchos estudios de la contaminación ambiental en estas áreas en Brasil, Japón, Polonia y Estados Unidos (Xavier, R. et al., 2010).

En Uruguay estudios realizados en el año 1985 mostraron una prevalencia de parasitismo por *T. canis* en perros adultos vagabundos del 13.7% y se reportan cifras de 90% en cachorros (Lezama G., Cabrera A. 2001).

El estudio realizado por Lezama G., Cabrera A. 2001 demuestra la existencia de una alta prevalencia de la infección por *T. canis* en el medio y cifras cercanas al 50% en la población infantil analizada. La mayoría de los casos eran asintomáticos, reportados en niños aparentemente sanos. En numerosos casos la Toxocariasis fue diagnosticada luego de un tiempo considerable, ya descartadas otras patologías. Las técnicas de diagnóstico basadas en el ensayo de ELISA no figura como comúnmente utilizada por los médicos ya que los índices de sospecha clínica son muy bajos.

1.4. Técnicas de diagnóstico y detección

Diversas técnicas son utilizadas en la detección de infecciones y contaminación ambiental provocada por la especie *Toxocara canis*: análisis histológicos, biopsias, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia, PCR, western blot, inmunoblot, etc. Ensayos coprológicos se han llevado a cabo en distintas regiones del mundo y han evidenciado la presencia de huevos de *T. canis* en un número importante de muestras analizadas.

1.4.1 Muestras serológicas

Se ha descrito la unión de antígenos presentes en los productos de excreción-secreción liberados in vitro por la larva de *T. canis* (TcES), a anticuerpos específicos. Según R.D. Iddawela, una de las ventajas de esta técnica radica en las importantes cantidades de productos de excreción secreción que se obtienen en los cultivos de larvas, estimada en 200 picogramos por día (Iddawela R.D. et al., 2007).

Para algunos autores el ensayo de ELISA (TcES-ELISA) es la técnica más sensible y específica entre las utilizadas para el diagnóstico inmunológico. Se cree que la gran aceptación por parte de los investigadores la ha convertido en la más utilizada (Iddawela, R.D. et al., 2007; de Savigny et al, 1979).

Las sensibilidades y especificidades reportadas por distintos autores varían en el rango 78 -91% y 86 - 93% respectivamente. Cuando se utiliza productos de excreción-secreción de larvas, se obtienen resultados positivos por un período no menor a 4 años luego de la desaparición de la enfermedad.

En detrimento del uso de esta técnica, se presenta evidencia sobre la incapacidad de obtener una diferenciación certera de las especies que integran el género

Toxocara. A su vez, no pocos ensayos han demostrado la ocurrencia de reacción cruzada intra género e intra orden.

La creación de un anticuerpo monoclonal llamado Ten 2 que aporta mayor especificidad fue reportado en la publicación de Kennedy et al. 1987, sin embargo el trabajo realizado por Gillespie et al., en 1993, afirma que las reacciones cruzadas en el ensayo de ELISA con Ten2 también ocurren.

La reacción cruzada se describe en ensayos de radioinmunoprecipitación con TcES, en difusión en gel y western blot seguida de SDS-PAGE.

Actualmente, se podría sugerir que los diagnósticos realizados basados en la especificidad de unión de anticuerpos y antígenos de TcES son menos confiables.

1.4.2 Muestras de suelo

a) Técnicas de Centrifugación/Flotación

Cierto número de publicaciones refieren a las técnicas de flotación para detectar la prevalencia de huevos de helmintos en muestras ambientales como tierra, arena, sedimentos, entre otros.

Se han mencionado variables de la técnica en las que se obtienen mejores y peores resultados. Es así que para soluciones de sulfato de zinc, de sulfato de magnesio, de iodo mercuriato de potasio y de yoduro de potasio, en distintos porcentajes de saturación, se ha evaluado la eficiencia según la capacidad de recolección de huevos luego del procedimiento de centrifugación/flotación de muestras de tierra naturales y otras artificialmente sembradas.

La solución de sulfato de magnesio saturado más yoduro de potasio 5% ha logrado la mayor eficiencia (Quinn R. et al., 1979) en la detección de huevos de *Toxocara*. Estos resultados no sólo se basan en la densidad de las soluciones, si no que existen propiedades físico químicas que inciden de gran manera.

Los ensayos de flotación no realizan mayores aportes al conocimiento sobre los efectos de temperatura, lluvia, luz solar y tiempo de deposición, por lo que se consideran limitados a determinar la presencia o ausencia de huevos en las muestras. Cuando es realizada la cuantificación de huevos recuperados en muestras artificialmente sembradas, no se logra el 100% de efectividad, lo que lleva a la subestimación de la presencia del parásito.

Por Otro lado, Rosa Xavier en 2010 plantea que entre las técnicas de centrifugación/flotación con soluciones de sulfato de zinc y nitrato de sodio en distintos niveles de concentración, no existen diferencias significativas en el rendimiento de recolección. Asimismo, destaca la sensibilidad de esta técnica que permite la recolección de huevos de *T. canis* en muestras con bajos niveles de contaminación.

b) Técnicas moleculares: Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Existen actualmente casi 100.000 títulos de publicaciones que refieren a la detección de infecciones parasitarias en animales y humanos y sólo en poco más del 10% figura que lo realizan a través de ensayos basados en el ADN.

Diversos ensayos utilizan como secuencia blanco ADN mitocondrial, ADN ribosomal, y secuencias repetidas de ADN.

Las técnicas de extracción de ADN varían según los estudios:

- . ADN se extrae de una pequeña porción del espécimen, es tratado con dodecilsulfato de sodio y proteinasa K, extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol, y purificación en columna (Wizard Clean Up; Promega). (Jex AR et al. 2008); (Li M.W. et al., 2008).
- . Disrupción física con kit de purificación (Donn S. et al., 2008)
- . Extracción con fenol/cloroformo (Donn S. et al., 2008)
- . Extracción con hidróxido de sodio (Donn S. et al., 2008)

Gasser entre otros autores enfatiza la utilidad de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico, estudio de taxonomía del parásito, análisis epidemiológicos e investigación en genética de poblaciones. Destaca la importancia de los avances producidos por la aplicación de esta técnica en el campo de la parasitología veterinaria. Por ejemplo, en el análisis de secuencias de ADN aisladas de muestras recogidas del ambiente. Asimismo, los autores advierten sobre las limitaciones producidas por la presencia de elementos inhibidores de la PCR.

“Muchos huevos de helmintos, sin embargo, como aquellos de las tenias cestodes, tienen similar, si no idéntica, morfología, por lo que la determinación precisa de las especies infectantes puede a menudo ser difícil sin la aplicación de procesos de diagnósticos adicionales” (Gordon C. A., et al., 2011).

Las similitudes entre los huevos y los estados larvarios de los helmintos que entorpecen la identificación entre especies, dejan de ser relevantes cuando se aplican técnicas con elevada especificidad y sensibilidad como la PCR convencional. Esta técnica puede ser utilizada en tejidos, suero, materia fecal y orina.

Comparaciones realizadas entre las técnicas basadas en el análisis de características morfológicas de los huevos de *T. canis* y *T. cati* y los estudios basados en PCR, para su identificación y diferenciación muestran que en algunas ocasiones los resultados de la primera son refutados por la segunda. Por ejemplo, el trabajo de Fahrion et al., 2010, reporta que la amplificación de la región del segundo espacio transcrito interno (internal transcribed spacer 2, ITS – 2) de muestras catalogadas como *T. canis* por análisis morfométricos pertenecían a *T. cati*. La secuenciación de los amplicones confirmó erróneo el resultado inicial.

La detección de ADN mediante PCR se basa en la desnaturalización de la doble hebra de ADN por calor y luego la disminución de la temperatura para permitir que los cebadores se unan específicamente a la secuencia de interés (en cada simple hebra) y se genere, a través de la acción de una polimerasa, la presencia de desoxinucleótidos y otras condiciones dos nuevas hebras complementarias.

Por los productos obtenidos (se incluyen cebadores específicos para la síntesis de la secuencia complementaria en ambos sentidos) del proceso de síntesis que se repite con los ciclos de aumento y disminución de temperatura, se logra identificar en una muestra la presencia de una secuencia conocida de ADN. El hallazgo de esta secuencia se traduce en la detección del organismo en la muestra.

Para que este proceso sea realmente efectivo, es importante asegurar que los cebadores sean específicos para la secuencia de interés. De este modo las hebras de ADN sintetizadas pertenecerán al organismo que se pretende identificar.

Cuando lo que se busca es la diferenciación de especies muy cercanas, la secuencia blanco debe presentar diferencias entre una y otra especie y se debe tener especial cuidado en el diseño de cebadores.

También es utilizada para distinguir cepas y variantes en una misma población. Según Bowles et al., 1995, en la amplificación de ITS-2 fue utilizado el cebador directo (forward) 3S (5'-CGGTGGATCACTCGGCTCGT-3') y el inverso (reverse) 28A (5'-CCTGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGC-3'). El análisis de la secuencia completa de la región ITS-2 obtenida de *T. canis*, *T. vitolorum* y *Ascaris suum* ha permitido a los autores describir las relaciones filogenéticas de estas especies.

Los ensayos que utilizan la región ITS han demostrado ser más sensitivos que aquellos que detectaban ADN filarial y mitocondrial (Peter W. Hunt, 2001).

Las regiones ITS-1 e ITS-2 se describen como marcadores genéticos confiables para la identificación y detección de nematodos parásitos. Sin embargo existen evidencias, reportadas en pocas ocasiones, de que estas regiones presentan heterogeneidad en su longitud para algunas especies. A estos casos se los ha interpretado y descrito como reflejos de variación poblacional o se los relaciona con especies escondidas (cript species) (Robin B. Gasser, 2006).

Jacobs et al., 1997; Zhu et al., 1998, entre otros autores le atribuyen a estas regiones de ADN nuclear ribosomal la potencialidad de ser útiles marcadores genéticos para especies parásitas de diferente orden.

Las diferencias en la región ITS - 2 permiten diferenciar las especies *T. canis*, *T. cati* y *T. leonina*. Las diferencias entre las secuencias (26-50%) fueron significativamente mayores que la variación en cada especie (0 - 0,6%). Los trabajos realizados han establecido la validez de la reacción en cadena de la polimerasa para identificar y diferenciar *T. canis* y *T. cati* en tejidos humanos (Robin B. Gasser, 2006).

Borecka y Gawor en 2008 realizan el intento de mejorar la extracción de ADN genómico de huevos de especies de *Toxocara* de muestras de suelo, reportado por primera vez en el trabajo de identificación de especies de *Toxocara* por PCR de Jacobs en 1997. El objetivo trazado era simplificar el ensayo que resultaba muy laborioso e insumía gran cantidad de tiempo. Estos autores consiguieron realizar la técnica RFLP (para la identificación de especies de *Toxocara*) con éxito en ocasiones anteriores, y describen que en comparación el análisis basado en PCR fue menos favorable.

La modificación de la extracción de ADN genómico que describen incluyó una prolongación de período de incubación reportado en publicaciones anteriores. Sostienen que la digestión directa de muestras de suelo por la proteinasa K colabora en la eliminación de la técnica de flotación y la manipulación de los huevos. Sugieren también que la técnica que realizaron permite trabajar con muestras de suelo más pequeñas, lo que aporta a la reducción de elementos inhibidores de la PCR. Asimismo, atribuyen a la proteinasa K la capacidad de inactivar los inhibidores presentes basados en el trabajo de Yeates de 1998.

Un posible método de detección de *T. canis* y *T. cati* es la obtención de los huevos de *T. canis* y *T. cati* de muestras de suelo por flotación. Luego los embriones son liberados por presión y sometidos a técnicas de extracción de ADN genómico. Mediante la utilización de la PCR con los cebadores Tcan/NC2 de *T. canis* y Tcat/NC2, se analiza la presencia discriminada de ambas especies del género *Toxocara* (Fogt-Wyrwas et al., 2007).

1.5. Avances en el uso de la PCR

Con el transcurso de los años se aplican versiones mejoradas y más adecuadas para distintas situaciones. Se describe el uso de la multiplex PCR, laloop mediated isothermal amplification LAMP, la real time PCR y la reverse transcriptase PCR. Algunos autores han sugerido que la reverse transcriptase PCR puede colaborar con la identificación puntual del estadio en el que se encuentra el parásito.

1.5.1 Contaminación ambiental por huevos *Toxocara*

En 2009, Gatcombe et al., demuestran la efectividad de la técnica beacon probe basada en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real time PCR) para la detección de huevos de *Baylisascaris procyonis* en suelos.

Los componentes húmicos de los suelos son inhibidores de la PCR, así como responsables de interferencias que pueden llevar a resultados no certeros. Se ha demostrado que existe la posibilidad de "limpiar" la muestra de estos componentes con lo que se mejoran los resultados. La técnica incluye la precipitación, previo a la lisis celular, con sulfato de aluminio y su eliminación previo a la extracción de ADN (Peršoh D. et al., 2008).

1.5.2 Toxocariasis en muestras de huéspedes paraténicos

Se han diseñado para *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Toxocara malaysiensis* y *Toxascaris leonina* cebadores basados en la secuencia de los espacios transcriptos internos del ADN nuclear ribosomal, ITS-1 y ITS-2 (Li, M.W. et al., 2007). Estas regiones enteras que incluyen ITS-1, 5,8S y ITS-2, y la secuencia de aproximadamente de 90 pb marco del cebador, fueron amplificadas por PCR y se usaron los cebadores de oligonucleótidos NC5 (directo: 5' GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT- 3') y NC2 (inverso: 5' TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3').

Basados en la comparación de las secuencias de ITS-1 y de ITS-2 de las cuatro especies, también se han diseñado cebadores directos específicos. Para *T. canis* el YY1 (5' -CGGTGAGCTATGCTGGTGTG-3'), el que es utilizado con el cebador inverso conservado NC2 para la amplificación de ITS-2. Para este ensayo se ha demostrado la especificidad con la secuenciación del amplicon de cerca de 330pb obtenido (Li, M.W. et al. 2007).

Según describe Gordon, la amplificación de la región ITS-2 en ensayos de detección realizados por Ai y colaboradores en 2010, ha demostrado la capacidad de identificar pequeñas cantidades de ADN genómico, menores a los valores de ADN de un huevo, de las especies *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*.

La PCR ha sido adaptada para la detección de larvas de *T. canis* en tejidos de *Mongolian gerbils* (*Meriones unguiculatus*) como modelo de experimentación. Previamente se han utilizado ratones, ratas, conejos, cerdos de guinea, ovejas, cerdos y babuinos (Borecka A. et al., 2008). La innovación que se describe en el ensayo de Borecka, consiste en el análisis de tejido de hígado con larvas de *T. canis* en los meriones infectados artificialmente. La extracción de genómico y de la amplificación se realizó a los 3, 5, 7 y 14 días de la infección, con resultados positivos para cada una de las muestras analizadas. El método de PCR convencional ha reportado la eficacia de identificar ADN de *T. canis* contenida en menos de una larva, por lo que reafirma su gran sensibilidad.

1.6. Estudios genómicos de *Toxocara*

En los últimos años se han realizado avances en el conocimiento de los genomas de nematodos. Aunque en menor volumen que otros nemathelminths, se describen los hallazgos realizados acerca del genoma de *T. canis* y las comparaciones con las bases de datos de otros organismos del mismo orden.

Con el objetivo de generar elementos de análisis más sólidos, las características morfológicas no son suficientes para construir una filogenia robusta del género *Toxocara*, se han realizado estudios que ofrecen datos moleculares. Wickramasinghe y colaboradores en 2009, han utilizado genes mitocondriales (ATP synthase subunit 6 (ATPase 6), la subunidad ribosomal menor RNA (12S rDNA)) y dos genes nucleares ribosomales (internal transcribed spacers 2 (ITS-2) y la subunidad ribosomal mayor (28S)). Los hallazgos realizados permiten diferenciar mediante una técnica molecular las especies *T. canis* y *T. vitolorum*, a la vez que brindan información relevante para análisis evolutivos, variabilidad genética y estudios taxonómicos. La secuenciación del genoma de *T. canis* ha aportado valiosa información sobre las similitudes y diferencias con *Ascaris suum* y *Anisakis simplex*. Asimismo la experiencia del uso de la long PCR – coupled y la secuenciación directa reportada, han sido la base de estudios que determinan la estructura y la secuencia del genoma mitocondrial de *T. canis* (Jex AR et al. 2008).

Los estudios comparados con otros integrantes del orden y del grupo de los nematodos son parte de los avances que en materia de conocimiento sobre la genética y epidemiología de *Toxocara* se han logrado (Jex AR et al. 2008).

Los estudios basados en los genomas mitocondriales para el análisis de los helmintos, reconocen que los marcadores genéticos del ADN nuclear ribosomal son buenas herramientas para la identificación de especies y cepas. Sin embargo, atribuyen a las secuencias de ADN mitocondrial una mayor riqueza para el estudio de sistemática, epidemiología, ecología y estructuras poblacionales (Jex A. et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Desarrollo de herramientas moleculares para detección e identificación de *Toxocara canis* en suelo.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Detección de contaminación por huevos de *Toxocara canis* en muestras de suelo de un barrio de la ciudad de Montevideo mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

2.2.2 Contrastar los resultados obtenidos en las técnicas moleculares con los resultados de la técnica de flotación/centrifugación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de especímenes parásitos de perro

Las especies de *Toxocara canis* y *Dipylidium caninum* fueron proporcionadas por la Dra. Esther Cidade de la Policlínica Veterinaria Barrios Unidos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República. Los especímenes fueron extraídos de las heces de un cachorro recién desparasitado, tratados con suero y conservados en alcohol.

3.2. Extracción y visualización de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de *T. canis* y *D. caninum*, se realizó mediante el QIAamp DNA Mini Kit, Tissue Protocol (QIAamp DNA Mini Kit only), de la que se obtuvo dos eluciones para cada especie.

Para la extracción de *D. caninum*, se realizó el procedimiento en presencia de RNAasa, mientras que el ADNg de *T. canis* luego de extraído fue tratado con RNAasa y posteriormente se culminó la extracción con cloroformo.

El ADN de ambas especies se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (1gramo de agarosa en 100 ml de Buffer TAE).

3.3. Amplificación del ADNg producto de la extracción

- Cebadores para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Según la bibliografía, se utilizaron dos juegos de cebadores específicos, Tabla MM.1, para la amplificación de la región ITS-2 del gen 5.8S rDNA de ADN genómico de *Toxocara canis*:

Tcan (directo)/NC2 (inverso); YY1 (directo)/ NC2 (inverso)

Juegos de Cebadores	Directo (Forward)	Inverso (Reverse)
Tcan/NC2	AGTATGATGGGCGCGCCAAT	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT
YY1/NC2	CGGTGAGCTATGCTGGTGTG	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT

Tabla MM.1. Se muestran las secuencias de los juegos de cebadores utilizados.

Con el primero se esperaba obtener la amplificación de un fragmento de 398 pb y para el caso del segundo un fragmento de 330 pb.

La amplificación del ADNg de *D. caninum* fue realizada como control de especificidad de los cebadores.

Las condiciones del programa utilizado para la reacción, con el termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400, consistieron en una desnaturalización de 5 minutos a 94 °C; seguida de 30 ciclos de: desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, apareamiento a 55 °C por 30 segundos; extensión a 72 °C por 30 segundos y finalmente una extensión a 72 °C por siete minutos.

Las condiciones de la reacción con un volumen final de 25 μ l fue:

a) buffer 10x PCR Buffer con $MgCl_2$ (concentración final 1x); dNTPs 10 mM (concentración final 0,4 mM); cebador inverso NC2 10 μ M (concentración final 0,8 μ M); Taq polimerasa (1 unidad por reacción); H₂O doblemente desionizada (H₂O_{dd}); cebador directo Tcan 10 μ M (concentración final 0,8 μ M) y 1 μ l de cada muestra.

b) buffer 10x PCR Buffer con $MgCl_2$ (concentración final 1x); dNTPs 10 mM (concentración final 0,4 mM); cebador inverso NC2 10 μ M (concentración final 0,8 μ M); Taq polimerasa (1 unidad por reacción); H₂O doblemente desionizada (H₂O_{dd}); cebador directo YY1 10 μ M (concentración final 0,8 μ M) y 1 μ l de cada muestra.

Los productos de PCR fueron cargados en gel de agarosa 2% (1 gramo de agarosa en 50 ml) para visualizar por electroforesis las bandas de interés de 398 y 330 pb.

3.4. *Colecta de muestras de suelo*

Las muestras fueron obtenidas del suelo de plazas, parques, jardines y patios de casas en las cercanías del barrio Casavalle en los primeros días del mes de setiembre de 2011, Figura MM1.



Figura MM1. Mapa de la zona de muestreo. Los puntos verdes indican la ubicación donde se colectaron las muestras.

En total fueron colectadas 14 muestras, Tabla MM.2. El procedimiento consistió en la recolección con espátula de aproximadamente 25 gramos de tierra seca en tubos Falcon de 50 ml (en toda la recolección se utilizaron guantes).

Sitio de colecta	Muestras
Plazoleta s/Pasajes	1;2;9;10;13;14
Jardines/Patio/Fondo	3; 4; 5; 8; 11;12
Plazas de Juegos	6; 7

Tabla MM.2. Distribución de recolección de muestras según el sitio.

3.5. Extracción de ADNg de muestras de suelo

El procedimiento de extracción de ADN de muestras de suelo se desarrolló mediante el kit Zymo Research Soil Microbe DNA Micro Prep según las indicaciones del fabricante. Asimismo, para obtener un mejor rendimiento en la extracción se siguió la sugerencia de añadir mercaptoetanol al buffer de binding en la concentración mencionada en el protocolo.

Las muestras, previamente al tratamiento con el kit, fueron tamizadas (poro de 0,5 ml) para desechar pasto y piedras.

3.6. Amplificación de ADNg extraído de muestras de suelo

La amplificación del ADNg obtenido del suelo se realizó con el juego de cebadores Tcan/NC2. Inicialmente se realizó para todas las muestras la amplificación del ADNg con idéntico programa al mencionado anteriormente en 2.3.

Las condiciones de reacción para 14 muestras consistieron en: buffer 10 x PCR Buffer con MgCl₂ (concentración final 1x); dNTPs 10 mM (concentración final 0,4 mM); cebador inverso NC2 10 μM (concentración final 0,8 μM); Taq polimerasa (1 unidad por reacción); H₂O doblemente desionizada (H₂O_{dd}); cebador directo Tcan 10 μM (concentración final 0,8 μM) y 1 μl de cada muestra (las muestras 4 y 8 fueron diluidas 1/10). El volumen final para cada muestra fue de 25 μl. En gel de agarosa 2% se observó la presencia del ADN amplificado.

Posteriormente, las muestras de 1 a 14 fueron sometidas al procedimiento diferencialmente. Se amplificó el producto de PCR de las muestras 8, 11, 12 y 14 para lo que se redujo el número de ciclos a 25. Se mantuvieron las temperaturas y los períodos de tiempo de desnaturalización, apareamiento y extensión. Las condiciones de reacción fueron iguales a las descritas anteriormente con 1 μl de cada muestra (1 μl del producto de PCR). El volumen final de amplificación fue de 25 μl.

Las muestras 1, 2, 7 y 13 fueron excluidas, mientras que la amplificación del conjunto de muestras restantes mantuvo el programa de amplificación inicial y se realizó la dilución 1/10 de las eluciones de ADNg. Se repitieron las condiciones de la reacción con un volumen final para cada una fue de 25 μl. Los productos de esta amplificación se observaron también en electroforesis en gel de agarosa 2 %.

Los programas utilizados se resumen en la tabla MM.3. La serie de amplificaciones realizadas en este proyecto y sus características se describen en la Tabla MM.4.

ETAPA	Programa 1		Programa 2	
	Temp. ° C	Tiempo	Temp. ° C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5 seg.	94	5 seg.
Desnaturalización	94	30 seg.	94	30 seg.
Hibridación	55	30 seg.	55	30 seg.
Extensión	72	30 seg.	72	30 seg.
Ciclos	30		25	
Extensión final	72	7 min.	72	min.

Tabla MM.3. Programas de amplificación.

Las Muestras 8, 11, 12 y 14 fueron sometidas finalmente a una amplificación por triplicado. Se mantuvieron las condiciones de reacción de PCR descritas previamente con 1 μ l de cada muestra. El volumen final también fue de 25 μ l.

Amplificación	Muestras	Volumen	Concentración	Programa	Producto PCR en electroforesis
1.ADN Genómico	1,2,3,5,6,7,9,10,11,12,13,14	1 μ l	1/1	1	5 μ l
	4,8	1 μ l	1/10	1	5 μ l
2.Producto de PCR	8,11,12,14	1 μ l	1/1	2	5 μ l
3.ADN Genómico	3,4,5,6,9,10	1 μ l	1/10	1	5 μ l
4. ADN Genómico (triplicado)	8,11,12,14	1 μ l	1/1	1	70 μ l

Tabla MM.4. Detalle de la amplificación.

3.7. Purificación del producto de PCR

Las bandas de interés fueron recortadas del gel de agarosa y se realizó la purificación mediante el kit BIOLINE Isolate PCR Gel Kit según las indicaciones de fabricación.

3.8. Secuenciación y análisis de secuencias

Con la finalidad de conocer certeramente la identidad de la secuencia amplificada, el ADN_g purificado se envió a secuenciar con el juego de cebadores Tcan/NC2 al servicio Macrogen (Korea). Con los programas Chromas (Technelysium) y Bioedit se analizaron y corrigieron las secuencias. Posteriormente se analizó la similitud de las secuencias de las muestras con las del banco de datos GenBank <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, con el programa Blastn.

3.9. Técnica de Flotación/Centrifugación

El procedimiento comenzó con el tamizado de las muestras, realizado para eliminar piedras y pasto, y posteriormente se pesaron 5 gramos de cada una y se depositaron en tubos Falcon de 50 ml.

El protocolo modificado de Quinn R. sugerido para este ensayo por la Dra. Ana Acuña de la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Medicina, consistió en: lavado con 5 ml de Tween 80 0,0025% (v/v); agitación por 5 minutos; vortex durante 5 minutos; tamizado en una matriz de poro 1mm²; centrifugación del filtrado durante 10 minutos a 2000g; descarte del sobrenadante; resuspensión en MgSO₄ saturado; centrifugación durante 10 minutos a 2000g.

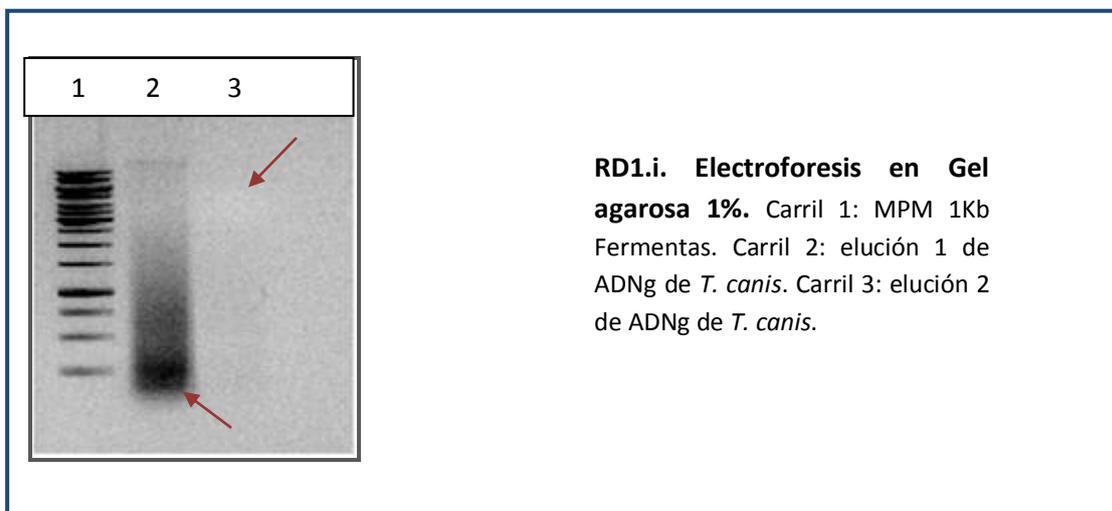
Del menisco superior se levantó un volumen reducido del sobrenadante mediante el uso de cubreobjetos. Estos se colocaron en portaobjetos, se observaron en microscopio.

4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de helmintos y extracción de ADNg

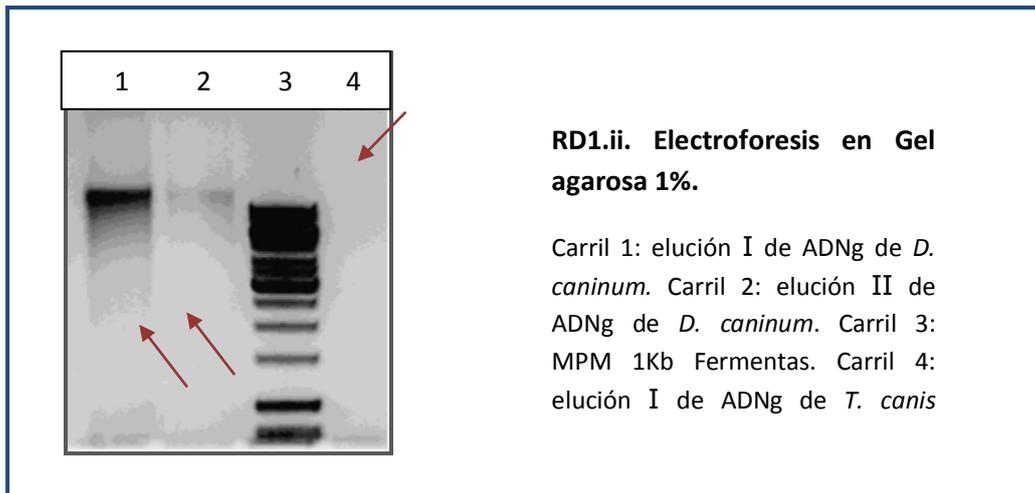
Los gusanos sustraídos de las heces de cachorro fueron contrastados macroscópicamente con imágenes de la bibliografía. Las especies fueron identificadas como *Toxocara canis* y *Dipylidium caninum*.

Las eluciones obtenidas del procesamiento de cada uno de los especímenes con el kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit, Tissue Protocol (QIAamp DNA Mini Kit only), visualizadas en gel de agarosa 1% se muestran en las figuras RD1.



En los carriles 2 y 3 señalados con flechas de color violeta en la figura RD1.i se sembraron respectivamente las eluciones de extracción 1 y 2 de *T. canis*. Se observó la presencia de ADNg en el carril 2 y no así en el 3, por lo que se podría concluir que fue eluido totalmente en la elución 1. Asimismo en el carril 2 se visualizó contaminación con ARN.

En la figura RD1.ii, se presentan los resultados de la extracción de *D. caninum* en presencia de RNAsa y del tratamiento de parte de la elución de genómico de *T. canis* con RNAsa y posterior extracción con cloroformo.



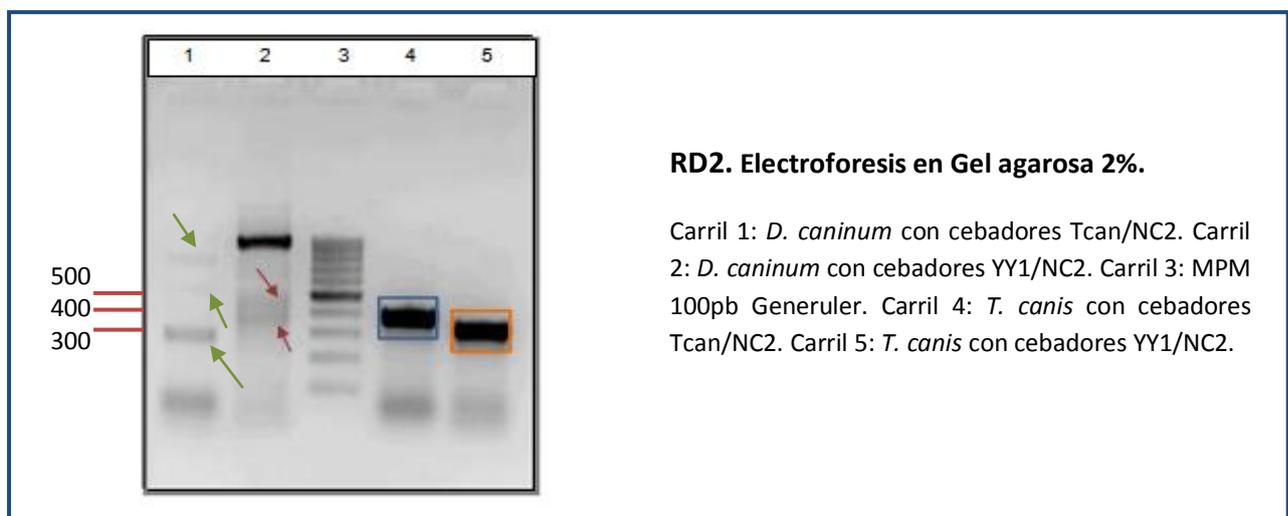
Los carriles 1 y 2 señalados con flechas de color violeta en la parte inferior, mostraron una extracción exitosa con presencia de ADNg de *D. caninum* en las dos eluciones, sin contaminación con ARN. En el carril 4 señalado con la flecha en la parte superior no se observó ADNg de *T. canis*, lo que sugeriría que se degradó la muestra porque la RNAsa utilizada estaba contaminada con DNAsa o por la incubación a 37°.

En base a los resultados observados en la electroforesis 1%, se podría afirmar la efectividad de la técnica de extracción elegida. A su vez, se consideró que la elución I de *T. canis* y la elución I de *D. caninum* serían útiles para realizar la reacción en cadena de la polimerasa con la finalidad de analizar la especificidad de la técnica propuesta. Si bien el ADN de *Toxocara* se visualizó algo degradado, puede ser utilizado para realizar la PCR.

4.2. Amplificación de ADN genómico: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En esta etapa se utilizaron los juegos de cebadores Tcan/NC2 y YY1/NC2 para la amplificación específica de la región ITS-2 del gen 5.8s de ADN nuclear ribosomal a partir del ADN genómico extraído del espécimen de *T. canis*.

Los resultados de la amplificación de ADNg de *T. canis*, y de la amplificación de *D. caninum* utilizado como control de la especificidad de los cebadores, se presentan en la electroforesis que se muestra en la figura RD2.



En el carril 1 se observan bandas correspondientes al producto de la amplificación de *D. caninum* (control negativo de la especificidad de los cebadores) con el juego de cebadores Tcan/NC2. De mayor a menor tamaño se pueden diferenciar tres bandas, señaladas con flechas verdes, con distintas concentraciones (intensidades), de aproximadamente 800, 500 y 300 pb. Las bandas que se observan en el carril 2, indicadas con flechas violetas, corresponden al producto de amplificación de *D. caninum* con el juego de cebadores YY1/NC2. En este caso, las bandas de los segmentos de ADN_g amplificados observadas son cuatro, también con distinta intensidad y de aproximadamente 900, 500, 400 y 250 pb.

A la derecha del marcador de peso molecular de 100 pb, en los carriles 3 y 4, puede visualizarse claramente debido a su intensidad, una banda de aproximadamente 400 pb en recuadro azul y otra mayor a los 300 pb en recuadro naranja respectivamente. Se corresponden a los productos de amplificación de *T. canis* con el juego de cebadores Tcan/NC2 y YY1/NC2. Los tamaños esperados para estos fragmentos, 380 pb y 330 pb según Jacobs y Fogt-Wyrwas, coinciden con lo evidenciado en la figura.

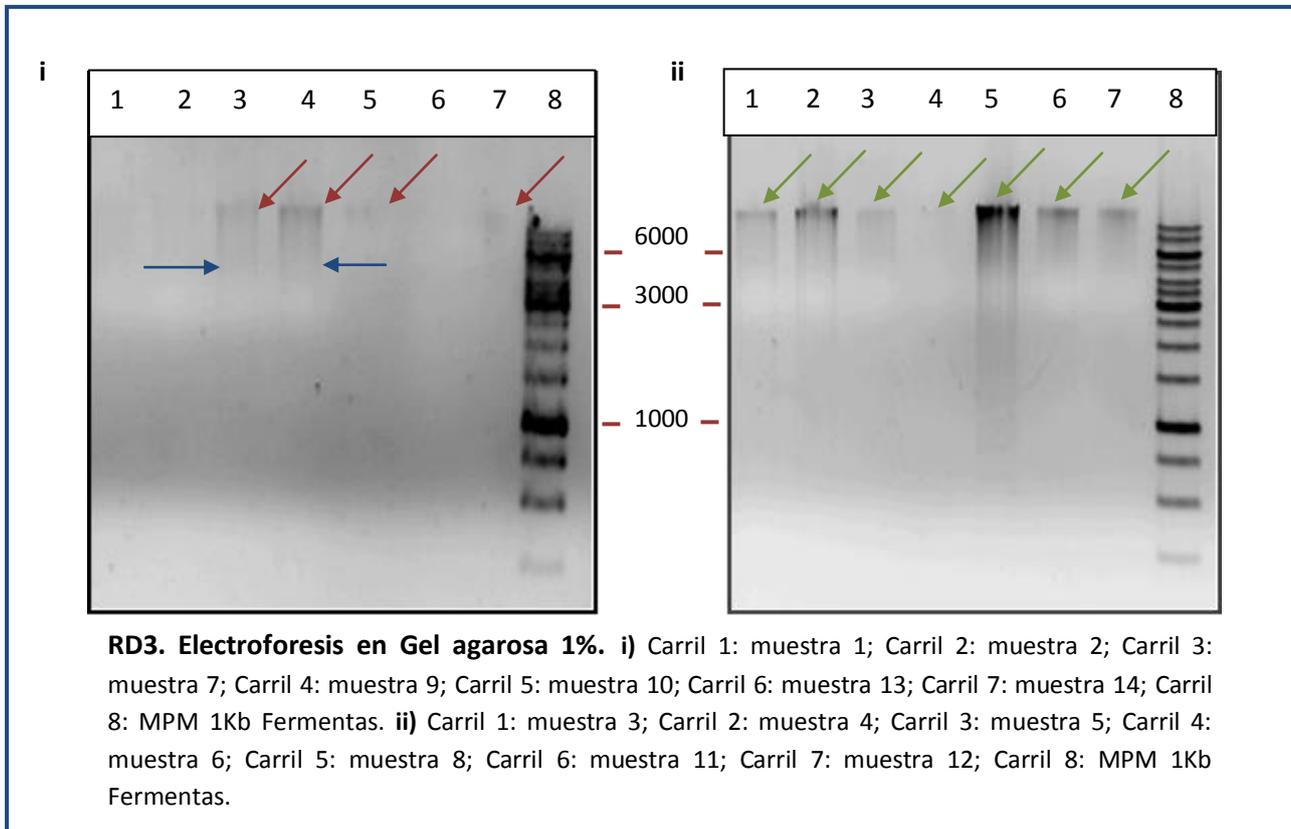
A la vez que sugiere que los dos juegos de cebadores amplifican el fragmento deseado de *T. canis*, el análisis de la electroforesis nos permitiría plantear tres aspectos relevantes. El primero es la efectividad del juego de cebadores Tcan/NC2 para amplificar específicamente segmentos de la región ITS-2 del ADN_r nuclear de *T. canis* con el tamaño esperado. Esto se desprende de la presencia de una banda nítida e intensa cercana a los 400 pb en el carril 3 y a la ausencia de bandas de este tamaño en el carril 1. Podríamos decir entonces, que las tres bandas señaladas con flechas verdes producto de la amplificación de *D. caninum* no corresponden a nuestro fragmento de interés y que este juego de cebadores permitirían discernir entre nuestro ADN problema y el control negativo de la especificidad del juego.

Por otro lado, el segundo aspecto destacado, se relaciona con el par YY1/NC2 y los resultados de la amplificación de la muestra de *D. caninum*. Como se señala con flechas violetas en la figura, dos de las bandas observadas en el carril 2, presentan un tamaño similar a las esperadas para la amplificación de *T. canis*, entre los 300 y 400 pb. De la mezcla de reacción preparada con esta especie y el juego de cebadores mencionado no se esperaría amplificación, porque se presumía la ausencia de apareamiento específico de los cebadores a la secuencia de ADN_g molde. Estos segmentos amplificados del ADN_g de *D. caninum*, con el cebador directo YY1 y el cebador inverso NC2, evidencian que en estas condiciones de PCR los cebadores no serían específicos.

Por último, el análisis global de las bandas que se perciben en el gel, permitiría descartar a YY1/NC2, como juego de cebadores específicos. Se consideró que la identificación de ADN_g de *Toxocara canis*, a través de la amplificación de un marcador genético como la región ITS-2 con estos cebadores, podría dar lugar a falsos positivos porque mostraría secuencias amplificadas de otra especie, como por ejemplo *D. caninum*. A partir de este resultado, no se incluyó el juego YY1/NC2 en próximas amplificaciones. Asimismo, si bien el tamaño es un poco distinto, y la intensidad de la banda es mucho menor que para *T. canis*, lo anteriormente mencionado nos permitiría plantearnos una futura perspectiva de modificar ciertas variables en la reacción de PCR, para obtener también con este juego de cebadores una banda específica en *Toxocara*.

4.3. *Extracción de ADN genómico de suelos*

El proceso de extracción de ADNg de las 14 muestras de suelo tamizadas se realizó con el kit Zymo Research Soil Microbe DNA Micro Prep, a través del que se obtuvo una elución para cada muestra. Los resultados de la extracción se muestran en la electroforesis 1% de la figura RD3.



En la figura RD3. i., se señalan con flechas de color violeta los carriles en los que se observó presencia de ADN. Las bandas no se distinguen con claridad, son difusas y de distinta intensidad para 5 de las muestras sembradas. En base al marcador de peso molecular, se podría decir que existen fragmentos de ADN mayores a los 10000 pb en cada una de ellas, que a su vez muestran patrones de migración similares.

Particularmente, los carriles 3 y 4 muestran las bandas más intensas, por lo que se podría sugerir que contienen mayor cantidad de ADN. En ambos casos también se observa una banda cercana a la 4000 pb señaladas con flechas azules, sin embargo se puede percibir que la muestra 9 en el carril 4 es la que tiene una concentración superior.

La figura RD3. ii. a la derecha, presenta la electroforesis de las eluciones restantes. Se observó presencia de ADN en todas ellas, y se muestran señalados con flechas de color verde todos los carriles. Las bandas se observan claramente, con patrones de migración casi idénticos, y un tamaño por encima de los 10000 pb.

En los carriles 2 y 5, correspondientes a las muestras 4 y 8, se visualizan bandas de gran intensidad. Se sugeriría entonces, que son las que mayor concentración presentan. Asimismo, la banda de la muestra 8 es la que sugiere mayor

concentración, a la vez que presenta un “smear” debido a la cantidad de fragmentos de ADN de distintos tamaños en la elución.

La Tabla RD1 resume lo observado en la electroforesis que evidencia los resultados de la extracción de ADN proveniente de las 14 muestras de suelo.

Muestras	Visualización de ADN	Muestras	Visualización de ADN
1	No	8	Si
2	No	9	Si
3	Si	10	Si
4	Si	11	Si
5	Si	12	Si
6	Si	13	No
7	Si	14	Si

Tabla RD1. Resumen de la visualización de los resultados de la extracción de ADN en la electroforesis en gel de agarosa 1%.

En general, las muestras de suelo del ambiente contienen grandes cantidades de ADN provenientes de organismos que lo habitan en el presente. A su vez, se encuentran rastros de organismos que habitaron en el suelo tiempo atrás, pero aún son detectables. Tales aspectos dificultan la identificación de las especies, sin embargo, autores como Zhu aporta elementos de peso para considerar que las técnicas moleculares son eficientes para la identificación inequívoca de especies muy cercanas.

En este sentido, a través del análisis de la electroforesis realizada se identificaron las muestras de suelo en las que se hallan secuencias de ADN. A partir de estas se podría determinar cuáles de ellas contienen ADN_g de *Toxocara canis* mediante la amplificación específica de un marcador genético como ITS-2.

4.4. Amplificación de ADN_g de muestras de suelo

La amplificación de la región ITS-2 del gen 5.8S de ADN_r ha sido utilizada en una plétora de investigaciones para identificar ADN genómico de *Toxocara canis*. En base a lo observado en 3.2, para la detección e identificación de *T. canis* se utilizaron los primers específicos Tcan/NC2 para la amplificación de esta región.

La figura RD4. i. muestra la electroforesis de los resultados de la PCR de las primeras siete muestras.

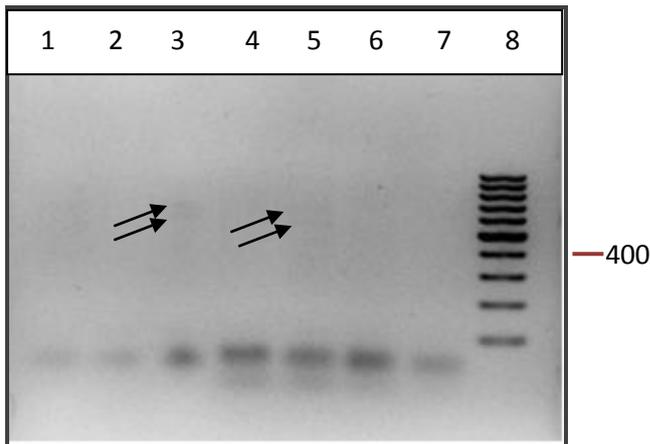


Figura RD4. i. Electroforesis en Gel agarosa 2%. Carril 1: muestra 1; Carril 2: muestra 2; Carril 3: muestra 3; Carril 4: 1/10 muestra 4; Carril 5: muestra 5; Carril 6: muestra 6; Carril 7: muestra 7; Carril 8: MPM 100pb Fermentas.

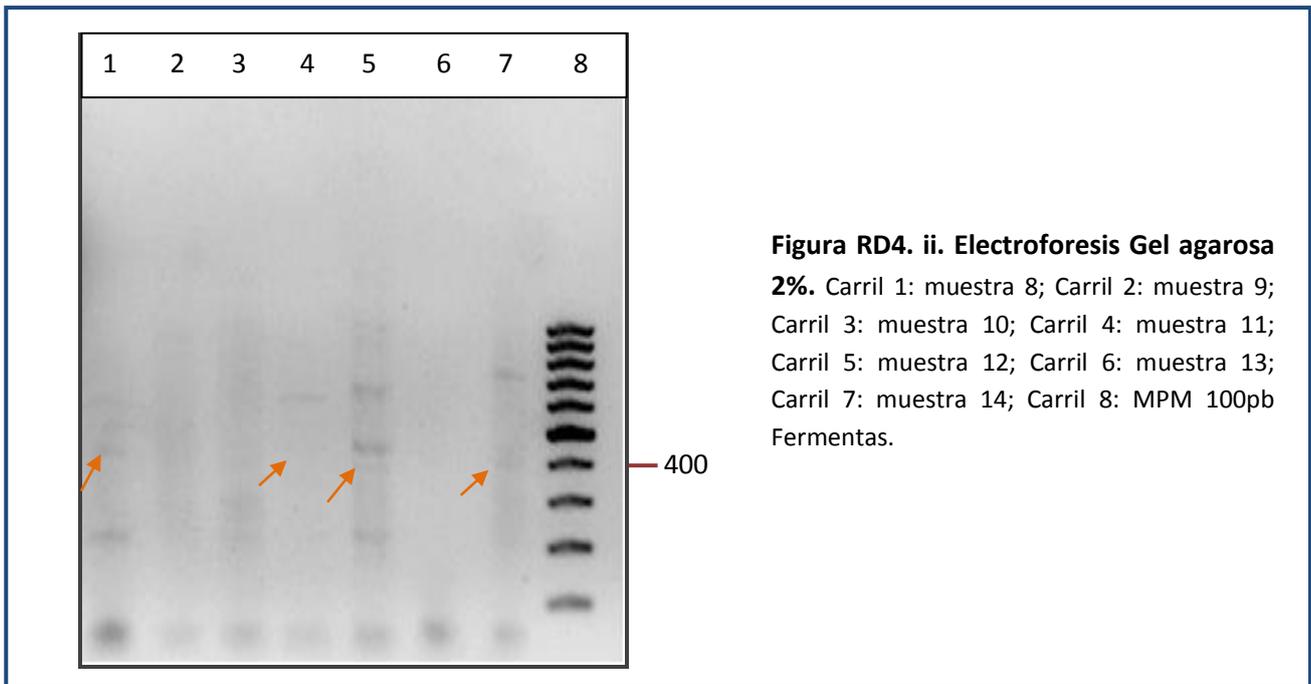
En principio, se puede percibir que no se detecta la banda esperada de 380pb en ninguno de los carriles.

En los carriles 3, 4, 5 y 6 se observa una sombra que podría deberse a la presencia de ADN producto de la amplificación, sin embargo sólo para las muestras 3 y 5 se observan bandas claras de 500 y 600 pb aproximadamente, señaladas en la figura con flechas de color negro.

Por otro lado, los productos de PCR sembrados en los carriles 1, 2 y 7 no se observan en la electroforesis, lo que sugeriría que no hay fragmentos de ADN amplificados.

De este análisis se desprende que no es posible detectar a partir de estas condiciones de amplificación la presencia de ADNg de *Toxocara canis* en estas muestras. De todas formas, en base a la observación de ADN en los carriles tampoco se podría descartar su presencia en las mismas, sino que sólo podríamos decir que el fragmento esperado producto de la amplificación específica no se visualiza en estas condiciones de PCR. No podría asegurarse en esta etapa la ausencia o presencia de *T. canis* en las muestras de suelo analizadas.

Los resultados de la amplificación de las restantes muestras, de la 8 a la 14, visualizados en la electroforesis de los productos de PCR se muestran en la figura RD4. ii.



La observación primaria del gel, permite identificar la presencia de ADN en todos los carriles excepto en el carril 6 correspondiente al producto de PCR del ADNg extraído de la muestra 13. En los carriles 1, 2, 3, 4, 5 y 7 se observan bandas de distinto tamaño e intensidad.

Particularmente, se puede observar para los productos de PCR de las muestras 8 y 14 (carriles 1 y 7), 3 bandas difusas de 700, 400 y 200 pb aproximadamente. Asimismo, para las muestras 9 y 12 (carriles 2 y 5) se observa una sombra cercana a los 400 pb y respectivamente bandas de 500 y 650 pb. Mientras tanto, en el carril 3 correspondiente al producto de PCR de la muestra 10, se pueden observar 3 bandas de 200, 250 y 300 pb y para la muestra 11 en el carril 4 una banda muy débil de 400 pb y una de 600 pb. Por último, el resultado de la amplificación de la muestra 12 que se muestra en el carril 5, son 3 bandas nítidas de 700, 500 y 200 pb, a la vez que se observan bandas de menor intensidad de 900 y 400 pb aproximadamente.

En este caso, a diferencia de la electroforesis mostrada en la figura RD4.i., los fragmentos de ADN de los productos de PCR se visualizan con mayor claridad, por lo que podría decirse que hubo una buena separación entre ellos y que se consiguió en la reacción de PCR amplificar estas secuencias en una concentración superior.

Las bandas cercanas a los 400 pb, señaladas con flechas azules, parecerían ser los fragmentos amplificados de interés para nuestro estudio, con un tamaño aproximado de 380 pb.

En síntesis, podríamos decir que para la PCR del ADNg de las muestras 1, 2, 7 y 13 no se obtuvieron fragmentos amplificados con el juego de cebadores Tcan/NC2. Lo que sugeriría que no hay un apareamiento entre las secuencias presentes en las muestras y la secuencia de los cebadores. Con respecto a esto, podría pensarse que la no amplificación de la región ITS-2 del gen 5.8S ADNr de ADNg de *T. canis*, nuestra secuencia blanco para detección, se debe a la ausencia de ADNg de esta especie en las muestras de suelo.

Por otro lado, la presencia de fragmentos de ADN de distintos tamaños percibida (con visualización de "smear" para los productos de PCR de las muestras 4, 6 y 9), permitiría intuir que este ensayo no fue suficiente para afirmar o descartar la identificación del fragmento amplificado esperado. De este modo, se plantearía la necesidad de realizar una nueva amplificación en condiciones diferentes según lo observado.

Mientras que la banda de interés de 380 pb estaría aparentemente presente con variable intensidad en las muestras 8, 11, 12 y 14, en las muestras 3, 4, 5, 6, 9 y 10, se percibiría la presencia de ADN pero no el fragmento esperado.

Para las primeras esto podría explicarse por una baja concentración del fragmento de 380 pb, sin embargo para las segundas, podría plantearse que el contenido de ADN en las eluciones inhibe la amplificación ó que diversos tamaños de fragmentos de ADN amplificado no lograrían una buena separación.

Una posterior reacción en cadena de la polimerasa debería aumentar la concentración del fragmento correspondiente a la región ITS-2 en el primer caso y mejorar la separación de fragmentos en las restantes para lo que se podría reducir la concentración de molde o aumentar la temperatura de hibridación.

Las características de la amplificación de las muestras y los resultados se describen en la Tabla RD2.

Muestras Programa 1	[] y volumen en ml de molde	Visualización del fragmento esperado	Muestras Programa 1	[] y volumen en ml de molde	Visualización del fragmento esperado
1	1/1 1 µl	No	8	1/10 1 µl	Si
2	1/1 1 µl	No	9	1/1 1 µl	No
3	1/1 1 µl	No	10	1/1 1 µl	No
4	1/10 1µl	No	11	1/1 1 µl	Si
5	1/1 1µl	No	12	1/1 1 µl	Si
6	1/1 1µl	No	13	1/1 1 µl	No
7	1/1 1µl	No	14	1/1 1 µl	Si

Tabla RD2. Resumen de resultados de la amplificación del ADN_g extraído de las 14 muestras de suelo.

4.5. Amplificación de la dilución 1/10 de ADN_g de las muestras 3, 4, 5, 6, 9 y 10

Basado en la discusión de los resultados mostrados en la electroforesis de las figuras RD.4.i, el ensayo realizado en esta etapa del estudio, consistió en la amplificación de las eluciones de ADN_g extraído inicialmente de las muestras de suelo 3, 4, 5, 6, 9 y 10, diluidas 1/10.

A su vez, con la finalidad de observar nuevamente la especificidad de la técnica y del juego de cebadores elegidos, se realizó la amplificación de una muestra con agua como control negativo, y la amplificación de ADN_g extraído al comienzo de un espécimen de *T. canis* como control positivo. Se procedió a partir de una misma mezcla de reacción y fue desarrollada simultáneamente en un mismo programa.

La electroforesis de los productos de PCR para estas seis muestras y los controles se presenta a continuación en la figura RD5.

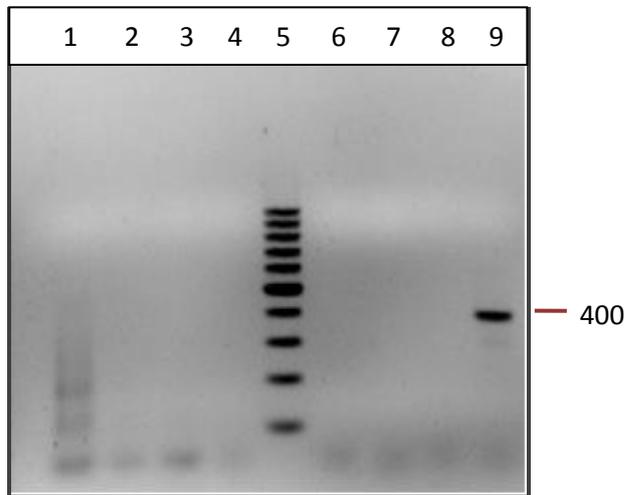


Figura RD5. Electroforesis Gel agarosa 2%.

Carril 1: muestra 3; Carril 2: muestra 4; Carril 3: muestra 5; Carril 4: muestra 6; Carril 5: MPM 1Kb Fermentas; Carril 6: muestra 9; Carril 7: muestra 10; Carril 8: C(-) producto PCR con H₂O; Carril 9 : C (+) producto de PCR *T. canis*.

En los carriles sembrados con los productos de la amplificación no se observa presencia de ADN para las muestras 4, 5, 6, 9 y 10, mientras que la única excepción en esta PCR se observa en la muestra 3 en el carril 1. Para este carril, se observa un "smear" por debajo de los 700 pb y tres bandas medianamente definidas de 250, 200 y 100 pb aproximadamente.

A su vez, se percibe la ausencia de bandas en el carril 8 sembrado con el control negativo, y se visualizan dos bandas de 400 y 300 pb aproximadamente en el carril 9 sembrado con el control positivo.

Particularmente para la muestra 3 podríamos decir que presenta un resultado negativo para *T. canis*. Sin embargo el "smear" observado a la altura de los 400 pb no permitiría concluir que la secuencia molde no se encuentra en el producto de la amplificación del genómico.

Asimismo, podemos decir que en esta nueva amplificación no se lograron obtener bandas definidas en la mayoría de las muestras, de lo que se desprende que no se consiguieron los resultados esperados. La banda de interés de 380 pb no se observa en ninguno de los productos de PCR de las muestras, pero si ocurre en el control positivo, donde se percibe claramente.

Si a lo observado para el control positivo le sumamos la ausencia de ADN en el control negativo, se comprobaría que la técnica es efectivamente específica y que la mezcla de reacción funciona y no contiene contaminación.

En base a lo anterior, la modificación realizada en la concentración de las eluciones no permitiría la amplificación y visualización de la secuencia de ITS -2 en estas muestras. Aunque esto indicaría que en el ADNg extraído de las muestras de suelo no se detecta ADN de *Toxocara*, sería arriesgado descartar su presencia.

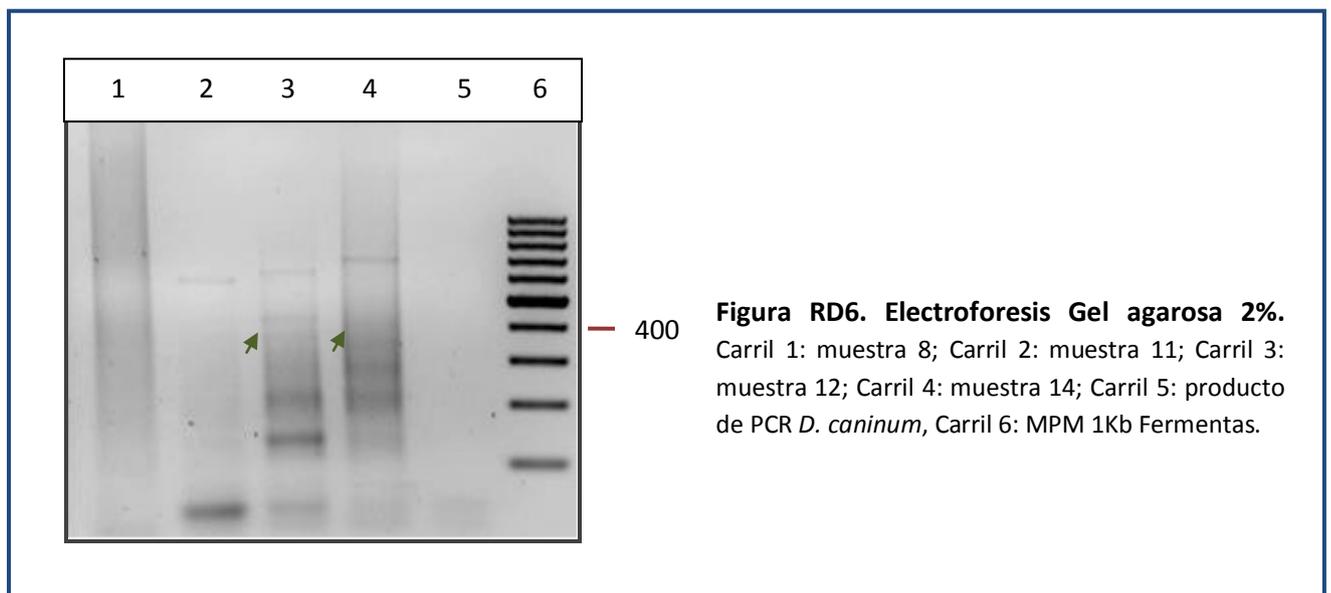
Las explicaciones se relacionarían tanto con una disminución excesiva de la cantidad de ADN o con la total ausencia de éste. Asimismo, al tratarse de ADN proveniente de muestras de suelo, un exceso de ADN también puede traer un exceso de impurezas que dificulten la amplificación.

4.6. Reamplificación de los productos de PCR de las muestras 8, 11, 12 y 14

La reamplificación de las muestras fue fundada en la presencia de bandas semejantes a la de interés en la electroforesis observada en RD.4.ii.

El volumen de producto de PCR fue nuevamente de 1 μ l, no obstante el número de ciclos de la reacción fue disminuido a 25. Esto se fundamenta en la precaución de una posible inhibición de la PCR por la cantidad de ADN presente y en la necesidad de no visualizar en la electroforesis la presencia de "smears".

En el gel de agarosa 2% de la figura RD6. se muestran los resultados de la reamplificación.



Para la reacción en cadena de la polimerasa a partir de producto de PCR se esperaba observar el fragmento de interés de 380 pb.

Aunque no se distinguen bandas en el carril 1 correspondiente a la amplificación del producto de PCR de la muestra 8, se divisa un "smear" y la presencia de una sombra más intensa a la altura de los 400 pb.

A su vez, para el producto de reamplificación de la muestra 11 en el carril 2, se puede notar una banda de 600 pb y una mancha difusa entre los 400 y 200 pb.

Para estos dos productos de PCR se puede advertir sombras en los carriles que nos sugieren la presencia de ADN. Sin embargo no se discierne la banda de 380 pb propia de la amplificación de la región ITS-2, como tampoco bandas definidas.

Una vez más, no es posible detectar la existencia de *T. canis* en el genómico extraído del suelo. De todas formas, sólo se podría decir que en estas condiciones

de PCR y volumen de muestra amplificada, no se desprende de los resultados un diagnóstico positivo de la contaminación del suelo por huevos del nematodo. En este sentido, y en base a las anteriores ampliificaciones de ambas muestras, aún no se descartaría de forma certera la contaminación de la muestra.

Mientras tanto, en los carriles 3 y 4 se perciben bandas de distintos tamaños e intensidad. Para la muestra 12, se observan fragmentos de ADN de diversos tamaños. Las más intensas se encuentran cercanas a los 200 y 150 pb. Al mismo tiempo se ven 4 bandas de intensidad decreciente de 650, 450, 400 y 300 pb.

De igual modo, la corrida de la muestra 14 presenta dos bandas intensas, en este caso cercanas a los 300 y 200 pb. A su vez se perciben bandas de 700, 400, 350 y 150 pb aproximadamente. Cabe destacar que los fragmentos de tamaño comprendido entre los 300 y 400 pb están débilmente visualizados.

Los aspectos a resaltar de los resultados recién mencionados se relacionan en primera instancia con la constatación de la presencia de fragmentos de ADN en ambos carriles.

Aunque la PCR dio lugar a más fragmentos de los que se deseaba amplificar, las bandas con un tamaño cercano a los 400 pb son señaladas en la figura con flechas verdes por poseer características semejantes al segmento de ADN_g esperado para la detección de *T. canis*.

La observación de estas bandas es un importante indicio de la contaminación de muestras de suelo con huevos de *Toxocara*, sin embargo, debido a su baja intensidad y el fondo difuso observado en el carril, se podría sugerir que la confirmación de la detección de ADN_g del parásito en estas muestras se corroboraría a través de la secuenciación del fragmento en cuestión o con una nueva ampliificación en la que se modificarían ciertas condiciones de la PCR, como cantidad de muestra, temperatura y cantidad de enzima.

4.7. PCR por triplicado (muestras 8, 11, 12 y 14) y purificación del producto

Una vez realizada una serie de ampliificaciones, diferencialmente desarrolladas según los resultados obtenidos oportunamente, se eligieron productos de PCR de ADN_g extraído de muestras de suelo para la purificación y posterior secuenciación.

La selección de las muestras 8, 11, 12 y 14, así como la elección del programa y las condiciones en que fue realizada la ampliificación se desprenden del análisis del conjunto de los resultados que son sintetizados a continuación.

En un principio, las electroforesis de las figuras RD4.i y RD4.ii permiten identificar la presencia de "smear" en las muestras 3, 4, 5, 6, 9 y 10. Para estas muestras sólo se notan bandas definidas en el caso de la 3 y la 5, de un tamaño que no es el esperado. La banda de interés se observa en los productos de PCR de las muestras 8, 11, 12 y 14, aunque se aprecia en la poca intensidad de las bandas la baja concentración de ADN.

Por otro lado, los resultados de la ampliificación del genómico diluido 1/10 presentados en la electroforesis de la figura RD5, no muestran presencia de ADN a excepción de un único caso en el que se observa un "smear" y no se distingue el fragmento de 380 pb (muestra 3).

Finalmente, la electroforesis de los productos de reamplificación de la figura RD6, permite divisar nuevamente la banda de interés de 380 pb en los carriles correspondientes a las muestras 12 y 14.

En tal contexto se procedió a realizar la PCR por triplicado de las muestras 8, 11, 12 y 14. Las bandas de interés visualizadas fueron recortadas del gel y de la purificación se obtuvieron numerosas eluciones para cada una debido a la gran cantidad de agarosa.

Posteriormente, se incrementó la concentración de ADN mediante la técnica de precipitación (descrita en Anexo I) y se obtuvieron 20 µl de cada una para la secuenciación.

4.8. Análisis de secuencias

El ADNg fue secuenciado con el juego de cebadores Tcan/NC2. Las secuencias correspondientes a las muestras 8, 11, 12 y 14 presentadas en la tabla RD3, tuvieron un tamaño cercano a los 200 pb menor al esperado de 380 pb.

Muestras	Secuencias
8	AATCAAGGGGGGGAGGGGAGAAAGAAGGGGACGACAGCTCAGAGCCTTTCTG CAACAGATAACAAGCCCCAGATTGATTATCCACCATGTCCTACATCAGCAGCGGGC TGGCTGTAAATTTAAATCCAACAACCACATTCCTCGTGATCTCGCAGAGGGCGGC TGCTCTTTCTCCGGAGTTCGCATCATGAGTTGCGTGTCCAGCA
11	AGCCAATCAATTGGGGGGGGGAGAGGAATCAGAGCCAGCTCCAGATTCTTTCTG GATCAGAGACAGACAGCGTGATAAATTATCAGCCATTTTAGAATCAAGAGCGGGG CCGTTGTTAATTCAGAGGCAGCGACCACCTCGTCGTGATTGCGTGAAGCATGGA AGTGATTTCTTCGGATTTTCACTAGATTGTTTGTGGGGCGTGTAT
12	ATTAAACCCCGCCGTGGGTCACTGAGCTGAGGTCAGAAAAAAAAAACCTTCC TTCAACACATTACAATCCATTCCACTATCAAGCCACCTAAAACCCCAACCCAAAC CGGGATCTGCCACAACCAACAATAACAACGTTTGGGGGAGGCCGATACCGGG AAGCAACCCAACAACCTCCTCATGGCCAATTTTGC
14	ACAACACAACGGGGAGGGAAAAGAGGTAGACACAGCTCGGAGGCTTCCTGCATA GATAACAAGCCCGAGATAGATTACCCGCCATCTTTACATCAGGGGCTGGGTTCTG TTAATTTTCGATCCGGCAGCCTCATTATGTCTGGGTTGCTGAGCCGGTGACTGATT TCCGGATTTCTTGCATGGATTGCGGCACCGGTGGC

Tabla RD3. Secuencias del ADNg de las muestras.

La diferencia entre el tamaño esperado y el obtenido sugeriría que no se logró secuenciar completamente el fragmento con el juego de cebadores Tcan/NC2. Igualmente, la extensión de la secuencia permitió analizar las mismas.

Los alineamientos realizados con el programa BLASTn, mostraron que la secuencia correspondiente al ADNg de la muestra 12 presenta similitud con la secuencia de la región ITS-2 del gen 5.8s de ADN nuclear ribosomal de *Toxocara canis* entre los 19 y 146 pb. Se puede afirmar entonces, la presencia de ADN perteneciente a *T. canis* en la muestra 12. Para las muestras restantes, podríamos plantear la ausencia de ADN de *T. canis*, sin embargo solo podemos afirmar que no fue detectado en las condiciones de la reacción de amplificación.

Con el programa Chromas y Bioedit se realizaron correcciones del cromatograma de la muestra 12 y se obtuvo un alineamiento, entre los 19 y 200 pb, con más pares de bases que el primer alineamiento realizado.

En la figura RD7 se observan los alineamientos de la secuencia de ADN de la muestra 12 con secuencias pertenecientes a ADN de *Toxocara canis*.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gii 238055516 FJ418788.1	Toxocara canis 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	154	154	91%	2e-34	85%
gii 372126543 JN617989.1	Toxocara canis internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	141	141	72%	1e-30	84%
gii 42821345 AB110032.1	Toxocara canis genes for internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: Trj1	141	141	72%	1e-30	84%
gii 2956665 Y09489.1	Toxocara canis rRNA gene, partial	141	141	72%	1e-30	84%
gii 42821347 AB110034.1	Toxocara canis genes for internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA, partial sequence	132	132	72%	7e-28	82%

Figura RD7. Alineamientos realizados con la secuencia de ADN de la muestra 12.

Lo observado anteriormente muestra que la secuencia presenta gran similitud con secuencias de *T. canis* que se encuentran en las bases de datos. Asimismo, en la figura RD8 se puede visualizar la distribución de los alineamientos con cinco secuencias de *Toxocara* indicadas con barras de color violeta.

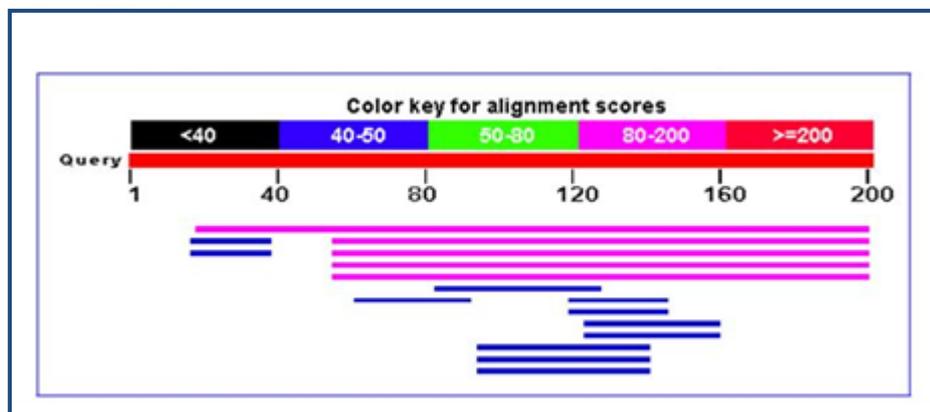


Figura RD8. Esquema de la distribución de los alineamientos realizados entre la secuencia de interés y otras secuencias presentes en las bases de datos.

La primera de las barras corresponde al alineamiento (entre las 19 pb y 200 pb) con la secuencia perteneciente a la región ITS-2 del gen 5.8s de ADN nuclear ribosomal de *Toxocara canis* (Anexo II), utilizada como marcador molecular para identificar la especie. Con estos resultados confirmamos la presencia de *Toxocara canis* en la muestra 12.

4.9. Flotación/centrifugación de las muestras

En esta etapa del estudio el objetivo perseguido consistía en contrastar los resultados de la detección de *Toxocara canis* en suelo mediante técnicas moleculares con los obtenidos de la técnica de flotación/centrifugación.

Estos últimos no se consiguieron para el conjunto de las muestras, debido a que las cantidades de suelo luego del tamizado no fueron suficientes para todos los ensayos.

Los resultados del análisis de las muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 10 son presentados en la Tabla RD4.

Muestra	Presencia de Huevos	Fotografía
1	No	Si
2	No	Si
3	No	Si
4	No	Si
5	No	Si
6	No	Si
7	No	Si
10	No	Si

Tabla RD4. Resultados de la detección de huevos de *T. canis* por Flotación/Centrifugación

Como se observa en la tabla, la técnica no arrojó resultados positivos para las muestras analizadas, lo que coincide con lo observado en la detección mediante herramientas moleculares. Sin embargo, la ocurrencia de dificultades en la manipulación del cubre objeto para levantar el menisco del sobrenadante y la no repetición del procedimiento, no permitiría confirmar que los huevos de *T. canis* estuvieran ausentes en las muestras. En este sentido, la efectividad de la técnica para identificar específicamente huevos de este parásito no podría ser valorada.

Por otro lado, es de gran relevancia destacar que aunque no se registraran las dificultades mencionadas, únicamente se obtuvieron y compararon resultados que insinúan la ausencia de los huevos de *Toxocara*. Esta situación, no permitiría evaluar la incidencia del número de huevos en la detección, así como tampoco posibles contradicciones entre las técnicas.

5. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

5.1. Obtención de Helmintos y extracción del ADNg

En el presente estudio se trabajó con dos especies de helmintos, colectadas de las deyecciones de cachorros parasitados y suministradas por la Dra. Esther Cidade. El lavado con suero y la conservación en alcohol fue fundamental para realizar posteriormente una adecuada extracción del ADNg, lo que sería muy difícil a partir de especímenes conservados en formol.

Sabemos que *Toxocara canis* como *Dipylidium caninum* son parásitos del perro, sin embargo ambos son capaces de infectar al ser humano. Mientras que *T. canis* es un helminto perteneciente al Phylum Nematoda, *D. caninum* pertenece al Phylum Cestoda y es un platelminto. A diferencia de múltiples trabajos, en el presente estudio se utilizaron especies con mayor distancia filogenética, con ciclos de vida con grandes diferencias (Anexo III).

En este contexto surge la particularidad de que el ADNg extraído de las especies utilizado para observar la especificidad de los cebadores, proviene de especies de las que no se reportan grandes similitudes. De hecho, en la totalidad de bibliografía consultada sobre la epidemiología del *T. canis*, su taxonomía y su detección mediante técnicas serológicas, moleculares o de microscopía no se encuentran referencias al *D. caninum*.

No obstante, especies como *Toxocara cati*, *Toxocara vitolorum* y *Ascaris lumbricoides*, todos geohelmintos, si forman parte de ensayos de identificación, detección y diagnóstico del *T. canis*. Esto se debe a la reacción cruzada de *A. lumbricoides* en la unión antígeno - anticuerpo del ensayo de ELISA, las semejanzas en morfología de sus huevos y ciclos de vida de *T. cati* y *T. vitolorum*, y los avances de las técnicas moleculares que han permitido superar las dificultades de las anteriores y ofrecen una sólida identificación de cada helminto.

Con respecto a la extracción de ADNg de *T. canis* y *D. caninum*, considerada exitosa, podemos argumentar favorablemente sobre la eficiencia del kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit, Tissue Protocol.

5.2. Amplificación de ADN genómico: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Cabría destacar en esta etapa del ensayo, lo cuestionable de trabajar con el ADNg de *D. caninum*. La distancia filogenética entre esta especie y el *T. canis*, entre platelmintos y nematelmintos, hace que los ensayos de amplificación de ADNg de estas especies no sea tenida en cuenta en los procedimientos de detección por PCR, sino que mayoritariamente se utilizan especies de nematodos para confirmar la especificidad de los cebadores.

Los dos juegos de cebadores, Tcan/NC2 y YY1/NC2, son utilizados para la identificación específica de ADNg *T. canis*. Justamente se los elige porque se ha verificado que son marcadores moleculares confiables para discriminar especies de nematodos muy cercanas.

Sorpresivamente el análisis de la especificidad de estos cebadores, aunque en este estudio se trabajó con especies pertenecientes a distintos phylum, mostró que en

las condiciones en que se realizó la reacción en cadena de la polimerasa el juego de cebadores YY1/NC2 no resultó adecuado para una amplificación específica de *T. canis*.

De lo anterior se desprende que el ADNg de *D. caninum* presenta tramos en su secuencia que se unen a estos cebadores, lo que resulta en la amplificación de un fragmento de aproximadamente 400 pb. A partir de esta conclusión, y en base a la detección de *T. canis* en muestras de suelo en las que puede estar presente ADNg de *D. caninum*, se consideró que no sería útil en las condiciones de PCR establecidas para el ensayo. Particularmente, se valoró que para utilizar este juego de cebadores se deberían modificar las condiciones de la reacción.

Asimismo sería interesante analizar el genoma de *D. caninum*, concretamente la secuencia de la región ITS-2 del gen 5.8s de ADN nuclear ribosomal. Cabe mencionar que la dipilidiasis humana también es una patología difícil de diagnosticar y estudiar con profundidad, se cree que el resultado obtenido podría colaborar a mejorar los métodos de detección del *D. caninum* en el ambiente.

Por otro lado, ambos juegos de cebadores amplifican los fragmentos esperados para *T. canis* en las condiciones de concentración de molde, temperatura y ciclos de amplificación, los que se observan claramente en la electroforesis. De todas formas, sería importante comprobar la especificidad de estos cebadores con una especie perteneciente al phylum nematodo como *Ascaris lumbricoides*, que además presenta reacción cruzada en el diagnóstico serológico.

5.3. Extracción y amplificación de ADN genómico de suelos

Las muestras de suelo contienen generalmente grandes cantidades de ADN de distintos organismos. A la vez, ha sido reportado en múltiples publicaciones que los componentes húmicos del suelo inhiben la reacción en cadena de la polimerasa.

Es en este sentido, que la identificación de ADNg de un organismo a través de la extracción del ADNg de las muestras de suelo y su posterior amplificación puede parecer una tarea poco sencilla, sin embargo, la elaboración de un protocolo en el que se incorporen los sucesivos ajustes del procedimiento, podría ayudar a diseñar un mecanismo exitoso de detección e identificación con gran potencial para el conocimiento de la epidemiología del *T. canis*.

En nuestro ensayo se logró amplificar fragmentos del tamaño esperado con el juego de cebadores Tcan/NC2 a partir del ADNg extraído de cuatro muestras de suelo. Este resultado nos permitiría inferir que estos fragmentos corresponden a la secuencia de la región ITS-2 del gen 5.8s del ADN nuclear ribosomal de *T. canis*. Los resultados obtenidos se lograron luego de una serie de intentos en los que se determinaron las condiciones y el programa más adecuado.

Se debe remarcar al observar la electroforesis, que la banda que supuestamente corresponde al fragmento de interés es muy clara. Podría deberse a que la cantidad de ADN es escasa y/o que existan inhibidores de la reacción. En base a esto sería conveniente continuar la búsqueda de condiciones más adecuadas para obtener mayor concentración de ADN y para que la reacción se produzca sin inhibiciones.

Es importante retomar ciertos aspectos de la discusión de los resultados de la amplificación de los que se desprende que al modificar las condiciones de la PCR, tales como la temperatura, la concentración de molde y de enzima se podría

obtener para un número mayor de muestras el fragmento esperado y asimismo una cantidad superior de dicho fragmento en las bandas observadas en la electroforesis. Además se consideraron ciertos ensayos que podrían aportar a la técnica de detección del *T. canis* en suelo mediante PCR. El primero de ellos, consistiría en la determinación de la cantidad mínima de ng de ADN necesaria para la detección. Se realizaría a través de muestras artificiales de suelo, en las que se inocularían pequeñas cantidades de ADN, distintas para cada muestra y se realizaría la extracción y luego la amplificación en idénticas condiciones. De este modo, podríamos asegurar para todos los ensayos que se realicen con las mismas condiciones un umbral de detección.

En segundo lugar y a raíz de lo mencionado anteriormente, se diseñarían dos curvas de calibración que incluyan valores aproximados de la cantidad de ADN que existe en un huevo y cuánto se detecta a partir de la extracción. Una de las curvas permitiría analizar la relación que existe entre la cantidad detectada en la muestra contaminada artificialmente y la cantidad inoculada en dicha muestra; la otra podría colaborar a acercarse a determinar cuántos huevos estaban presentes en una muestra.

Por otro lado, también se consideró para la amplificación la necesidad de determinar un umbral de concentración de molde utilizado. La PCR puede inhibirse cuando existen grandes cantidades de ADN en la reacción y eso podría explicar la baja cantidad de ADN amplificado en los productos. En este sentido, se podrían realizar PCR que incluyan diluciones seriadas de un volumen de molde de concentración conocida para observar cuál es el impacto de la cantidad de ADN y cuál es el umbral para la inhibición. A su vez, esto podría realizarse en distintas condiciones para reunir más elementos que logren mejorar el protocolo de detección. Además tanto la Nested PCR como la PCR Real time, podrían ser posibles variantes de la técnica de amplificación.

Finalmente se ha valorado la posibilidad de realizar la extracción y posterior amplificación de ADN a partir de muestras de suelo contaminadas artificialmente con pequeños segmentos de gusanos nematodos como *T. canis* y *A. lumbricoides* que también permita evaluar la sensibilidad y la especificidad de la técnica.

5.4. Purificación de los productos de PCR, secuenciación y análisis de secuencias

La purificación de los productos de PCR por triplicado y su posterior precipitación fue un procedimiento adecuado para obtener para cada muestra una cantidad de ADN correspondiente a un número importante del fragmento de interés.

Del análisis de los resultados obtenidos en la secuenciación y el posterior alineamiento, podemos afirmar que de las cuatro bandas visualizadas en la electroforesis correspondientes a los fragmentos del tamaño esperado, sólo la secuencia correspondiente a la muestra 12 nos permite confirmar la identidad de la misma. Por lo tanto, podemos sugerir que el ADN amplificado y secuenciado corresponde a la región ITS-2 del gen 5.8s de ADN nuclear ribosomal de *T. canis*.

De todas formas, si bien el análisis de las secuencias de las muestras de ADN restantes no muestra similitudes con la región de interés, no podríamos descartar que el ADN extraído de las muestras de suelo no pertenecen a *T. canis* debido a que errores en las secuencias pueden ocasionar que no haya alineamientos.

En este contexto, se podría mejorar las secuencias de las muestras 8, 11 y 14 a través del estudio de los cromatogramas y realizar nuevamente la búsqueda de alineamientos.

5.5. Flotación/centrifugación de las muestras

Se ha demostrado en publicaciones que mediante el protocolo de flotación/centrifugación que se siguió para observar huevos de *T. canis* en las muestras de suelo se obtienen resultados que permiten realizar la detección.

En nuestro caso, se tuvieron dificultades para recoger del menisco superior del sobrenadante lo que no permite adoptar conclusiones más que la conveniencia de incluir modificaciones en la manipulación realizada.

Posiblemente, incrementar el volumen de sobrenadante por capilaridad hasta la boca del tubo Falcon ayudaría a recoger del menisco superior, en los casos en que estuvieran presentes, los huevos que flotan en la superficie y observarlos al microscopio.

Por otro lado, para efectivamente contrastar los resultados de esta técnica con la técnica de PCR como estrategias de detección de *T. canis* en suelo, se debería analizar resultados opuestos o resultados positivos para cada muestra.

5.6. Consideraciones finales

La prevalencia de infecciones por helmintos parásitos y más aún por los geohelmintos en los contextos más carenciados de nuestro país ha alcanzado valores alarmantes. Como generalmente ocurre en la población en situación de vulnerabilidad social o económico-social, los niños son los que más sufren las afecciones y los impactos nocivos en el corto, mediano y largo plazo.

Estas enfermedades parasitarias no sólo lesionan la calidad de vida de estos niños, sino que los condenan a deficiencias nutricionales, dificultades de aprendizaje, de crecimiento y por lo tanto, a la exclusión social.

En el Uruguay patologías provocadas por la infección con *Toxocara canis*, (Toxocariasis, Síndrome de Larva Migrans Ocular, Síndrome de Larva Migrans Visceral) se consideran sub diagnosticadas.

Detectar la presencia de ADN de *Toxocara* en los suelos mediante la reacción en cadena de la polimerasa, nos advertiría sobre cuáles son las zonas en las que existe o existió contaminación con huevos de *T. canis*. De este modo, nos permitiría referenciar geográficamente aquellos lugares en los que viven personas expuestas a una posible infección y adoptar con mayor profundidad medidas de diagnóstico.

La región ITS-2 resulta en principio ser un buen marcador molecular para la identificación específica de *T. canis* y se deberán ajustar las condiciones de la reacción para aumentar la sensibilidad y la especificidad de la técnica de PCR.

Colaborar a través de herramientas moleculares a un mayor conocimiento sobre la epidemiología de *T. canis* es fundamental para la elaboración de políticas sanitarias y educativas interinstitucionales que aborden integralmente la problemática y originen respuestas inclusivas para esta población.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Beaver, P. C. 1959. *Visceral and Cutaneous Larva Migrans*. Public Health Reports (1896-1970), Vol. 74, No. 4 (Apr., 1959), pp. 328-332P
2. Borecka A. and Gawor J. 2008. *Modification of gDNA extraction from soil for PCR designed for the routine examination of soil samples contaminated with Toxocara spp. eggs*. Journal of Helminthology(2008) 82, 119-122
3. Borecka, A.; Gawor, J.; Niedworok, M.; Sordyl, B. 2008. *Research Note. Detection of Toxocara canis larvae by PCR in the liver of experimentally infected Mongolian gerbils (Meriones unguiculatus)*. Research Note. HELMINTHOLOGIA, 45, 3: 147 – 149, 2008
4. Bowles, J.; Blair, D and McManus, D. P. 1995. *A molecular phylogeny of the human schistosomes*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 4: 103–109.
5. de Savigny, D. H.; Voller, A. and A. Woodruff, W. (1979). *Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay*. Journal of Clinical Pathology, 1979, 32, 284-288
6. Devera R.; Campos F. 1998. *Dipilidiasis humana*. Rev Biomed 1998; 9:44-45.
7. Donn, S.; Griffiths, B. S.; Neilson, R.; Daniell, T. J. 2008. *DNA extraction from soil nematodes for multi-sample community studies*. Applied Soil Ecology 38 (2008) 20 – 26.
8. Fahrion, A.S.; Schnyder, M.; Wichert, B.; Deplazes, P.(2010). *Toxocara eggs shed by dogs and cats and their molecular and morphometric species-specific identification: Is the finding of T. cati eggs shed by dogs of epidemiological relevance?* Vet. Parasitol. (2010), doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.028.

9. Fogt-Wyrwas, R.; Jarosz, W. and Mizgajska – Wiktor, H. 2007. *Utilizing a polymerase chain reaction method for detection of Toxocara canis and T. cati eggs in soil*. Journal of Helminthology (2007) 81, 75–78 DOI: 10.1017/S0022149X07241872.
10. Gasser, R. B. (2006) *Molecular tools—advances, opportunities and prospects*. Veterinary Parasitology 136 (2006) 69–89.
11. Gatcombe, R. R. & Jothikumar, N. & Dangoudoubiyam, S. & Kazacos, K. R. & Hill, V. R. (2009). *Evaluation of a molecular beacon real-time PCR assay for detection of Baylisascaris procyonis in different soil types and water samples*. Parasitol Res (2010) 106:499–504.
12. Gillespie, S. H. (1988). *The Epidemiology of Toxocara canis*. Parasitology Today, vol. 4, no. 6, 1988.
13. Gillespie SH, Bidwell D, Voller A, Robertson BD, Maizels RM (1993) *Diagnosis of human toxocariasis by antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay*. J Clin Pathol 46: 551-554.
14. 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 (2011) 143e152.
15. Maizels, R. M.; Schabussova, I.; Callister, D. M. and Nicoll, G. (2006). *Molecular Biology and Immunology of Toxocara canis*. Section 1. Biology of Toxocara. 3-13. Holland, C. V. y Smith, H. V.; Toxocara: The Enigmatic Parasite Edition 2006. (2006).
16. Hunt, P. W. (2011). *Molecular diagnosis of infections and resistance in veterinary and human parasites*. Veterinary Parasitology 180 (2011) 12– 46.
17. Iddawela, R.D.; Rajapakse, R.P.V.J.; Perera, N.A.N.D.; and Agatsuma, T. (2007). *Characterization of a Toxocara canis species-specific excretory-secretory antigen (TcES-57) and development of a double sandwich ELISA for diagnosis of visceral larva migrans*. Korean Journal of Parasitology. Vol. 45, No. 1: 19-26.

18. Jacobs, D. E; Zhu, X; Gasser, R.B; Chilton, N.B. 1997. *PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat*. Acta Tropica. Volume 68, Issue 2, November 1997, Pages 191-200
19. Jex AR, Waeschenbach A, Littlewood DTJ, Hu M, Gasser RB (2008). *The Mitochondrial Genome of Toxocara canis*. PLoS Negl Trop Dis 2 (8): e273. doi:10.1371/journal.pntd.0000273
20. Jex, A. R.; Littlewood, D .T. J; Gasser, R. B. (2010). *Toward next-generation sequencing of mitochondrial genomes — Focus on parasitic worms of animals and biotechnological implications*. Biotechnology Advances 28 (2010) 151–159.
21. Kennedy MW, Maizels RM, Meghji M, Young L, Qureshi F, Smith HV (1987) *Species-specific carbohydrate epitopes on the secreted and surface antigens of Toxocara cati and Toxocara canis infective larvae*. Parasite Immunol 9: 407-420.
22. Lavikainen, A. (2008). *Human medical view on zoonotic parasites*. Acta Veterinaria Scandinavica 2010, 52(Suppl 1):S4
23. Lezama G., Cabrera A. (2001). *Monografía: Toxocariasis en Pediatría*. Universidad de la República. Escuela de Graduados. Clínica Pediátrica "A".
24. Li, M.W.; Lin, R.Q.; Chen, H.H.; Sani, R.A.; Song, H.Q.; Zhu, X.Q. 2007. *PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats*. Molecular and Cellular Probes 21 (2007) 349–354
25. Li, M.W; Lin, R-Q; Song, H-Q; Wu, X-Y and Zhu, X Q. 2008. *The complete mitochondrial genomes for three Toxocara species of human and animal health significance*. BMC Genomics 2008, 9:224 doi:10.1186/1471-2164-9-224.
26. Mendoza Rodriguez, D. *Capítulo 106. Toxocara spp.* Sección VI. Parásitos. Microbiología y Parasitología Médicas, (TOMO I,II,II)

- Alina Llop Hernández , Ma. Margarita Valdés-Dapena Vivanco, Jorge Luis Zuazo Silva. Editorial Ciencias Medicas, 2001.
27. Nadler, S.A. and Hudspeth, D.S., (2000) *Phylogeny of the ascaridídea (Nematoda, Ascaridida) base on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution*. Journal of Parasitology 86, 380-393.
28. Oliveros, M. V.; Salazar, R. 1995. *Prevalencia de nematodiasis con pasaje larvario pulmonar en niños de una zona carenciada de Montevideo*. MONOGRAFÍA DE POSGRADO PEDIATRÍA
29. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. (OPS/DPC/CD/01.2003) Acuña, A., Calegari, L.; Curto, S.; Lindner C.; Rosa, R.; Salvatella, R.; Savio, M; Zanetta, E. 2003. *Helmintiasis Intestinales. Manejo de las Geohelmintiasis*.
30. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. (Kingston, Jamaica, 15-17 mayo 2007). *Control de las helmintiasis en los países del Caribe inglés y francés: Hacia la Resolución 54.19 de la Asamblea Mundial de la Salud*.
31. Paul, M.; Stefaniak, J.; Twardosz-Pawlik, H. and Pecold, K. (2009). *The co-occurrence of Toxocara ocular and visceral larva migrans syndrome: a case series*. Cases Journal 2009, 2:6881 doi: 10.1186/1757-1626-2-6881
32. Peršoh, D.; Theuerl, S.; Buscot, F.; Rambold, G. 2008. *Towards a universally adaptable method for quantitative extraction of high-purity nucleic acids from soil*. Journal of Microbiological Methods 75 (2008) 19-24
33. Quinn, R.; Smith, H.V; Bruce, R.G. (1979). *Studies on the incidence of Toxocara and Toxocariasis spp. ova in the environment. 1. A comparison of flotation procedures for recovering Toxocara spp. ova from soils*. JHyg., Camb. (1980), **84**, 83.
34. Roth, L. 2002. *Infección animal por Toxocara canis y su importancia zoonótica*. Revisión Bibliográfica. Trabajo Especial I. Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias. Departamento de Parasitología y Micología-Instituto de Higiene. Universidad de la República.

35. Schantz, P. M. 1990. *Zoonosis of Enteric Parasitism*. Public Health Issues. Topics in Veterinary Medicine. Autumn 1990.
36. Walton, A.C (1959) *Some parasites and their chromosomes*. Journal of Parasitology 45, 1-20.
37. Wickramasinghe, S. & Yatawara, L. & Rajapakse, R. P. V. J. & Agatsuma, T. (2009). *Toxocara canis and Toxocara vitulorum: molecular characterization, discrimination, and phylogenetic analysis based on mitochondrial (ATP synthase subunit 6 and 12S) and nuclear ribosomal (ITS-2 and 28S) genes*. Parasitol Res (2009) 104:1425–1430
38. Xavier, I.G. R.; Ramos, B.C.; Santarém, V.A. 2010. *Recovery threshold of Toxocara canis eggs from soil*. Veterinary Parasitology 167 (2010) 77–80.
39. Zhu, X.Q., Chilton, N.B., Gasser, R.B., 1998. *Detection of sequence variation in parasite ribosomal DNA by electrophoresis in agarose gels supplemented with a DNA-intercalating agent*. Electrophoresis 19, 671–674.

Anexos

Anexo I

Protocolo de Precipitación

1)

- 1/10 vol AcNa concentración 3M.
- 2,5 vol EtOh concentración 100%.
- -20 °C Over night.

2)

- Centrifugar 20 minutos a 4°C a 12.000g.
- Descartar sobrenadante.
- Lavado con EtOH concentración 70%.
- Centrifugar 5 minutos a 4°C a 12.000g.
- Descartar sobrenadante.
- Secar a temperatura ambiente.
- Disolver en H₂O doblemente desionizada (20 µl)

Anexo II

Secuencia parcial de la región ITS – 2 del gen 5.8s de ADN nuclear ribosomal de *Toxocara canis*.

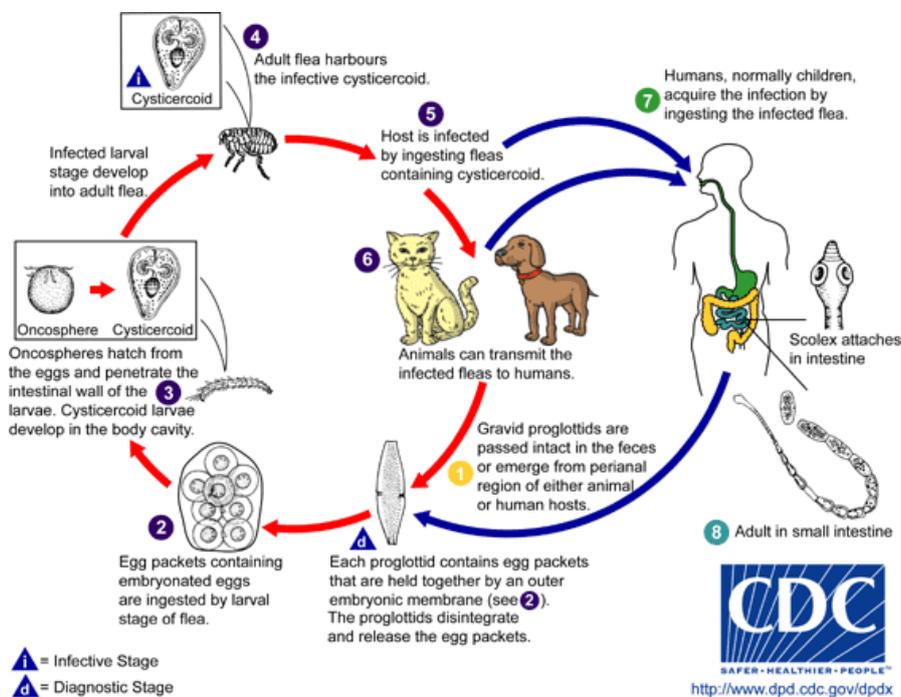
```
>gi|238055516|gb|FJ418788.1|
CGGTGGATCACTCGGCTCGTGGATCGATGAAGAACGCTGCTAGCTGCGATAAATAG
TGCGAATTGCAGACACATTGAGCACTAAAATTTCGAACGCACATTGCGCCATCGGG
TTCATTCCCGTTGGCACGTCTGGCTGAGGGTCAGTATATTAAGGAGTATGATGGGC
GCGCCAATTTATGGAATGTGATTAACGCGCAAGGTTGTGGTGCATTCGGTGAGCTA
TGCTGGTGTGGTAATGGATATTGTGCAATTGTACAGCGTACCTTGCCAAGGAAATA
TTCGCACAAGAAATGGCTGTCGTTTGCTCGTAAAGAGGCAAAATTGGCCATGAGTG
TATGTTGCGTTGCTTCACGATACGGCCTCCAGCAAACGTTGTTTATTGTTTGGTTG
TGGCAGCATCCAGGTTGGAGGTGGCGTTATCGGTCGCTTGAATGAGGAATGCATGG
CGAATGGTTGAAATGAGATTTTTTTTTTTCTGACCTCAGCTCAGTCGTGAGCACCCG
CTGAATTTAAGCATATAACTAAGCGGAGGAAAAGAACTAACCAGG
```

Anexo III

Dipylidium caninum

El parásito de perros *Dipylidium caninum*, es un platelminto con un ciclo de vida que involucra a la pulga (*Ctenocephalides canis*) como huésped intermediario (R. Devera et al. 1998). Las larvas de pulgas ingieren los huevos eliminados en las heces del animal y posteriormente pueden ser ingeridas por el mismo huésped definitivo o por otros mamíferos. De este modo se genera la infección parasitaria.

En este ciclo, los huevos de *D. caninum* así como pulgas que los hayan ingerido pueden encontrarse en el ambiente esparcidos en el suelo al igual que ocurre con *Toxocara canis*



Ciclo de vida de *D. caninum*. Imagen obtenida de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>