



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Un método simple y barato para la
obtención huevos fertilizados de
Toxocara canis in vitro.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

AARÓN RODRÍGUEZ CABALLERO

TUTORA:

DRA. MARTHA PONCE MACOTELA

2007





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Rodríguez
Caballero
Aarón
59 74 15 57
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
099287014

2. Datos del tutor

Dr
Martha
Ponce
Macotela

3. Datos del sinodal 1

Dr
Guillermo
Salgado
Maldonado

4. Datos del sinodal 2

Dra
Adela
Ruiz
Hernández

5. Datos del sinodal 3

M en C
Silvia
Caballero
Salazar

6. Datos del sinodal 4

Biol
Mario Noe
Martínez
Gordillo

7. Datos del trabajo escrito

Un método simple y barato para la obtención de huevos de *Toxocara canis* In Vitro.
35 p
2007

“Las huellas de tu pie se borran del polvo del camino, pero el paso que has dado queda impreso en la memoria del tiempo”

Proverbio Maya

“Si el hombre comienza con certidumbres terminará con dudas; pero si se contentara en empezar con dudas, terminará con certezas.”

“Son malos descubridores los que creen que ya no hay tierra cuando lo único que ven es mar.”

“Lee no para confundir y refutar, ni para confiar y dar por hecho, ni para saber hablar y disertar, sino para reflexionar y considerar.”

Francis Bacon

DEDICATORIAS:

A mis padres:

Blanca Estela Caballero García

Felipe de Jesús Rodríguez Romero

Por enseñarme que sin importar los problemas, condición o estado; se puede hacer mucho más de lo que uno piensa, aún cuando es todo lo que has dado siempre puedes dar el doble de lo que pensaste. También por olvidarse de ustedes y brindarme su amor, dedicación, apoyo y confianza. Por nunca dejar de creer en mí y por enseñarme a luchar en esta vida haciéndola ver fácil.

A mis Primos:

Itzel, Raziel, Yaira, Gisela, Zuriel, Mariana y Aura.

Sin importar los problemas, yo se que pueden alcanzar sus metas y sueños. Pero, lo más importante, es que también me superarán en todos los aspectos de esta vida. Siempre estaré orgulloso de ustedes.

A mis tíos:

Raymundo, Mario y Margarita

Por quererme como a un hijo y no como a un sobrino. Corrigiéndome cuando me equivoco, dándome ánimos cuando estoy triste, preocupándose cuando estoy lejos y sólo, apoyándome cuando lo necesito. Por su amor y su tiempo que me han dedicado.

A mis abuelos:

Martha Herminia Romero† y J Reyes Rodríguez†

Elia García y Fidel Caballero

A toda mi familia

Por quererme.

A mis amigos

A mis maestros

A mi Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS:

A mis tutores:

Mario y Martha

Por que gracias a su paciencia, comprensión y apoyo pude hacer posible unas de mis metas en el largo camino de la parasitología. También quiero agradecerles el que me hayan escuchado y confiado en mi.

A mis compañeros de trabajo:

David, Gustavo, Jorge, Silvia, Yadira.

Por soportar todo lo que hice estando en el laboratorio (incluyo accidentes, soportar las disecciones y como otros han dicho olores).

A mis compañeros del taller:

Alberto, Erick, Israel, Nancy, Sandra.

A mis amigos de la facultad:

Alberto, Ariel, Claudia, Diana, Jaquelline, Mellisa, Telma, Quetzally, Yadira, Yedith.

A Javier Diaz, *por ser un gran amigo y un modelo ha seguir en este largo camino.*

A las instituciones del gobierno:

Instituto Nacional de Pediatría y al Centro de Control Canino
“Culhuacan”

ÍNDICE:

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Taxonomía	2
2.2. Morfología de <i>Toxocara canis</i>	2
2.2.1. Huevo.....	2
2.2.2. Huevo larvado.	3
2.2.3. Larva de segundo estadio.....	4
2.2.4. Adulto.....	6
2.3. Huéspedes definitivos.....	6
2.4. Huéspedes paraténicos.....	7
2.5. Ciclo biológico.....	8
2.6. Toxocariosis.....	9
2.7. Larva migrans.....	10
2.8. Epidemiología.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. OBJETIVO.....	14
5. HIPÓTESIS.....	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
6.1. Obtención del intestino delgado de perros cachorros.	15
6.2. Disección uterina (MDU).....	16
6.2.1. Huevos larvados.	17
6.3. Cultivo de hembras de <i>T. canis</i> (MCH).....	17
6.3.1. Huevos larvados.....	18
7. RESULTADOS.....	19
7.1. Obtención de huevos después de la disección uterina (MDU) y del cultivo (MCH) de las hembras de <i>T. canis</i>	19
7.2. Obtención de huevos larvados por MDU y MCH.....	19
8. DISCUSIÓN.....	21
9. CONCLUSIONES.....	23
10. ANEXO.....	24
11. REFERENCIAS.....	26
12. ARTÍCULO PUBLICADO.....	31

1. RESUMEN.

La toxocariosis es una zoonosis muy importante debido a que las larvas de *T. canis* causan varios síndromes, como: larva migrans visceral (VLM), larva migrans ocular (OLM), meningo-encefalitis eosinofílica y toxocariasis encubierta. El diagnóstico fundamentalmente es inmunológico; sin embargo, la mayoría de las pruebas son de baja especificidad debido a que cruza con otras parasitosis. Para el ensayo inmunológico se necesitan antígenos de la larva de segundo estadio, pero, su obtención es muy problemática, porque se necesita extraerlas a partir de los huevos larvados. En el presente trabajo, nos propusimos comparar dos métodos para la obtención de huevos larvados de segundo estadio. Se obtuvo el intestino delgado de cachorros eutanizados del centro de control canino "Culhuacan", localizado en la zona sur del Distrito Federal. Se efectuó la disección intestinal y se obtuvieron las hembras de *T. canis*. Éstas se dividieron en dos lotes, uno para el cultivo de hembras (FMC) y el otro para realizarles disección uterina (UEM). Después del proceso, en ambos casos se cuantificó el número total de huevos y el número de huevos larvados. Operacionalmente, un huevo fertilizado desarrolla la larva después de un mes. Los resultados mostraron que el método de cultivo fue superior en una proporción de 3:1 por encima del método de disección uterina. Las ventajas del FMC son: a) poca probabilidad de contaminación con antígenos extraños, b) mayor seguridad para la manipulación de huevos infectivos, c) obtención de un mayor número de huevos larvados, d) se puede mantener al adulto durante una semana bajo condiciones axénicas y e) el método puede servir de modelo para cultivar otros nematodos intestinales.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. Taxonomía.

Los organismos del Phylum Nematoda son gusanos cilíndricos, no segmentados. Su pared corporal está formada por tres capas: cutícula, hipodermis y una capa interior de células musculares. Presentan una cavidad corporal o pseudoceloma, aparato digestivo completo, sistema excretor, nervioso y reproductor. Son dioicos y tienen dimorfismo sexual, en los machos la cloaca se encuentra en el extremo posterior, la cual está curvada centralmente, tiene ornamentaciones, papilas y espículas. En las hembras la vulva se localiza en la región superior del cuerpo y el ano en la parte inferior. Presentan receptores táctiles, quimiorreceptores y mecanorreceptores, en organismos de vida libre hay fotorreceptores (Bush et al., 2001).

Reino: Animal

Phylum: Nematoda (=Nemata)

Clase: Secernantea (Phasmodia)

Orden: Ascaridata

Suborden: Ascaradina

Superfamilia: Ascaridoidea

Familia: Toxocaridae

Género: *Toxocara*

Especie: *T. canis* (Werner, 1782)

2.2. Morfología de *Toxocara canis*.

2.2.1. Huevo.

Los huevos de *T. canis*, son semiesféricos y adherentes, miden 85-95 µm x 75-90 µm, El huevo está formado por cuatro capas, tres las forma el propio huevo y la cuarta la secreta el útero. La interna es la vitelina de color oscuro uniforme, sigue la capa quitinosa y la tercera capa formada por coalescencia de gránulos refringentes que salen del citoplasma. El material secretado por la pared del útero se adhiere a la pared del huevo, siendo esta una cubierta externa gruesa ornamentada, con pequeñas hendiduras o depresiones.

Cuando los huevos salen con las heces del huésped presentan un blastómero y no son infectantes. Fig. 1.

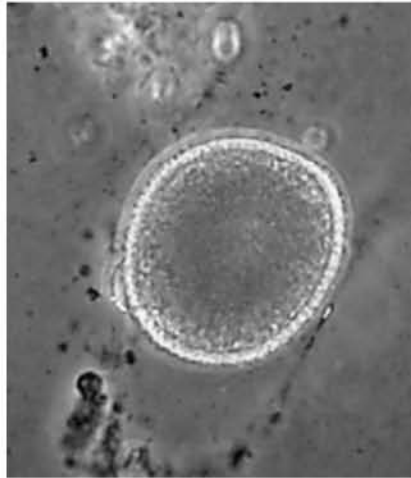


Figura 1.- Microfotografía de un huevo de *Toxocara canis*.

2.2.2. Huevo larvado.

El desarrollo del huevo larvado dependerá de las condiciones de temperatura y humedad del ambiente en donde se encuentre. Se estima que en aproximadamente tres semanas y a 22-25°C finaliza la embrionación. Dentro del huevo se desarrolla la larva de primer estadio y posteriormente la larva de segundo estadio, en esta fase el huevo ya es infectante. Fig. 2.

Los huevos, son altamente resistentes a los agentes químicos, mecánicos y térmicos; por ejemplo, los huevos de *Ascaris* spp., sobreviven en una solución de ácido sulfúrico al 9%, ácido clorhídrico al 14% y formol al 12% (Bush et al., 2001).



Figura 2.- Microfotografía de un huevo larvado de *Toxocara canis*.

2.2.3. Larva de segundo estadio.

Las larvas de segundo estadio miden entre 360-434 μm de longitud y 18-21 μm de ancho. La cutícula es estriada, la cavidad bucal en posición subterminal y dorsalmente inclinada, rodeada por tres labios desarrollados, presumiblemente implicados en la recolección de alimentos y el anclaje a los tejidos durante la migración. En la región anterior a los labios se sitúa una cápsula bucal superficial, cuyo margen ventral está formado por una cutícula fina, espinosa y afilada. En el extremo anterior de la larva se encuentran las papilas cefálicas.

El esófago ocupa un tercio de la longitud total de la larva. A nivel del primer tercio del esófago, se sitúa un anillo nervioso y en la posición subterminal se encuentra la célula excretora que desemboca en un poro excretor. La porción periesofágica tiene abundantes núcleos ganglionares. El intestino desemboca en el ano, situado en posición subterminal. El primordio genital se encuentra en el último tercio y adosado a la pared intestinal. Fig. 3 (Nichols, 1956; Vegni et al., 1986).

La larva de segundo estadio se encuentra migrando por órganos y tejidos del huésped definitivo o del huésped paraténico. En el primero migran hasta alcanzar la maduración o se quedan en estadio hipobiótico; en el segundo migran hasta encontrar un sitio fijo para quedarse en estado hipobiótico y se activarán cuando lleguen al huésped definitivo.

Beaver en 1966, realizó infecciones experimentales en monos, *Macaca mulata*, y observó que las larvas pudieron conservar la capacidad para completar su ciclo biológico hasta después de nueve años. A este fenómeno se le denomina paratenesis (Schantz y Glickman, 1983).

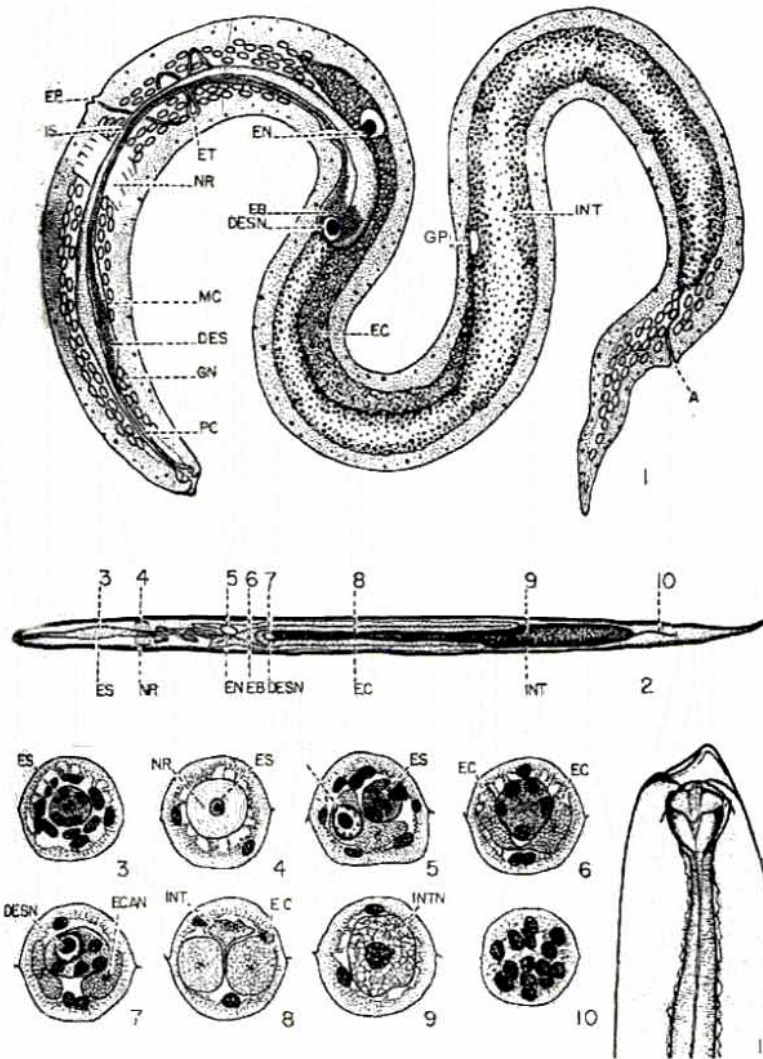


Figura. 3.- Esquema de la anatomía de la larva de segundo estadio, 1) larva post eclosión, 780x. 2) Sección sagital 300x. 3-10) Sección transversal, 1080x. 11) Aparato bucal y procorpus, 1600x. A: Ano, DES: Glándula esofágica dorsal, DESN: Núcleo de la glándula esofágica dorsal, EB: Bulbo esofágico, EC: Columna excretora, ECAN: Canaliculo excretor, EN: Núcleo de célula excretora, EP: Poro excretor., ET: Tubo excretor, GN: Núcleo glandular, GP: Primordio genital, INT: Intestino, INTN: Núcleo de la célula intestinal, IS: Istmo, MC: Metacarpus, NR: Anillo nervioso, PC: Procorpus (Tomado de Nichols, 1956).

2.2.4. Adulto.

El cuerpo del adulto de *T. canis* es de color blanquecino, tiene estrías transversales irregulares y alas cervicales estrechas y lanceoladas, que se extienden desde la extremidad anterior a lo largo de los márgenes laterales (Bush et al., 2001). El macho mide entre 4 y 6 cm de longitud por 2.5 mm de diámetro, con un extremo caudal curvado digitiforme, con dos series de 20-30 papilas preanales y cinco papilas postanales a cada lado de la cloaca. Las espículas son ligeramente desiguales y curvadas, de 750-1.50 μm . de longitud. La hembra mide de 6.5 a 15 cm. de longitud por 2.5 - 3 mm de diámetro y su extremo posterior es romo. La vulva se sitúa en el cuarto anterior del cuerpo. Fig.4.

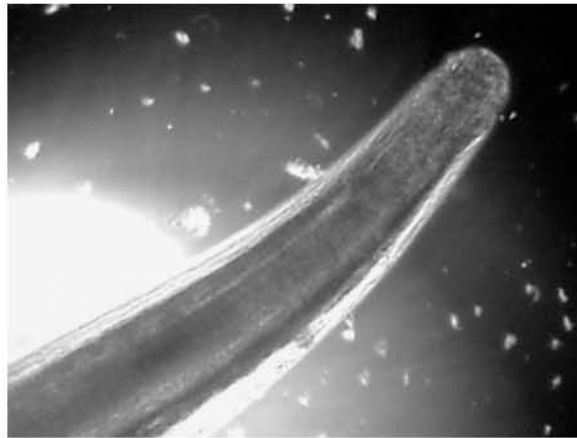


Figura 4.- Fotografía del extremo anterior de un adulto de *Toxocara canis*.

2.3. Huéspedes definitivos.

El huésped definitivo es el organismo en el cual el parásito alcanza su maduración sexual y reproducción. La revisión de Gibbons y col (2001) muestra la gran cantidad de mamíferos que son huéspedes definitivos de *Toxocara canis*, tabla 1.

Tabla 1.- Hospederos definitivos de *Toxocara canis*.

Nombré común	Nombre científico
Perro común	<i>Canis familiaris</i>
Lobo asiático	<i>Canis pallipes</i>
Hiena manchada	<i>Crocuta crocuta</i>
Zorro fenec	<i>Fennecus zerda</i>
Perro salvaje africano	<i>Lycaon pictus</i>
Zorros árticos	<i>Alopex lagopus, Alopex beringensis</i>
Lobo mexicano	<i>Canis mexicanus</i>
Lobo europeo	<i>Canis lupus</i>
Lobo occidental	<i>Canis occidentalis</i>
Dingo	<i>Canis dingo</i>
Chacal dorado	<i>Canis aureus</i>
Tejon japonés	<i>Meles anakuma</i>
Perro del raccoon	<i>Nyctereutes procyonoides ussuriensis</i>
Mapache	<i>Procyon lotor</i>
Zorro gris californiano	<i>Urocyon cinereoargentatus scotti</i>
Zorro de la india	<i>Vulpes bengalensis</i>
Zorro amarillo	<i>Vulpes fulva pennsylvanicus y Vulpes fulva regalis</i>
Zorro rojo	<i>Vulpes culpes</i>
Zorro rojo de Japón	<i>Vulpes vulpes japonicus</i>
Zorro de orejas largas	<i>Fennucus zerda</i>
Mangosta cola blanca	<i>Ichneumia albicauda</i>
León africano	<i>Panthero leo</i>
Mangosta gufa	<i>Herpestes sanguineus</i>

Gibbons y col 2001.

2.4. Huéspedes paraténicos.

Es aquel huésped ineficiente y superfluo en donde el parásito no se desarrolla y/o no lo libera. Para completar el ciclo biológico de *Toxocara*, el huésped paraténico debe ser ingerido por el huésped definitivo (Tay et al., 2003). Los huéspedes paraténicos son: humanos, pollos, ratones, conejos, ovejas y pequeños mamíferos silvestres (Nobuaki y Nobuo, 2007; Lee et al., 1976; Taira et al., 2003). En éstos, las larvas pueden vivir varios años (Page, 1992).

2.5. Ciclo biológico.

Los canidos son los hospederos definitivos de *T. canis*. La infección se adquiere cuando se ingieren huevos larvados de segundo estadio. El pH ácido del estómago, el pH alcalino del duodeno y el ambiente anaeróbico, estimulan la liberación de la larva del huevo. La larva emigra por vía hematógica al hígado, algunas larvas permanecen en el hígado y otras llegan a pulmones, en donde tienen dos vías de migración:

- Traqueal: se presenta principalmente en cachorros. Cuando las larvas llegan a pulmón, rompen la membrana alveolo capilar, llegan a los bronquiolos, bronquios, tráquea y laringe, se degluten y pasan a esófago, estómago e intestino delgado, aquí alcanzan la madurez y se reproducen (Barriga, 1991).
- Somática: muy común en perros adultos y en hospederos paraténicos, principalmente pequeños mamíferos, también se incluye a mamíferos superiores (hombre y ganado). Las larvas continúan su migración en la circulación y llegan a músculo esquelético, riñones, ojos y otros órganos en donde permanecen en estado hipobiótico,

Cuando las perras están preñadas e infectadas, las larvas se activan y reinician su metabolismo normal, emigrando a placenta y al feto.

Cuando las perras amamantan a sus cachorros, las larvas migran a las glándulas mamarias, viajan en la leche y llegan al intestino del cachorro (Burke MT, 1985).

Debido a la transmisión vertical, los cachorros se infectan por vía transplacentaria y transversal (por la leche materna) (Lloyd, 1986). Fig. 5.

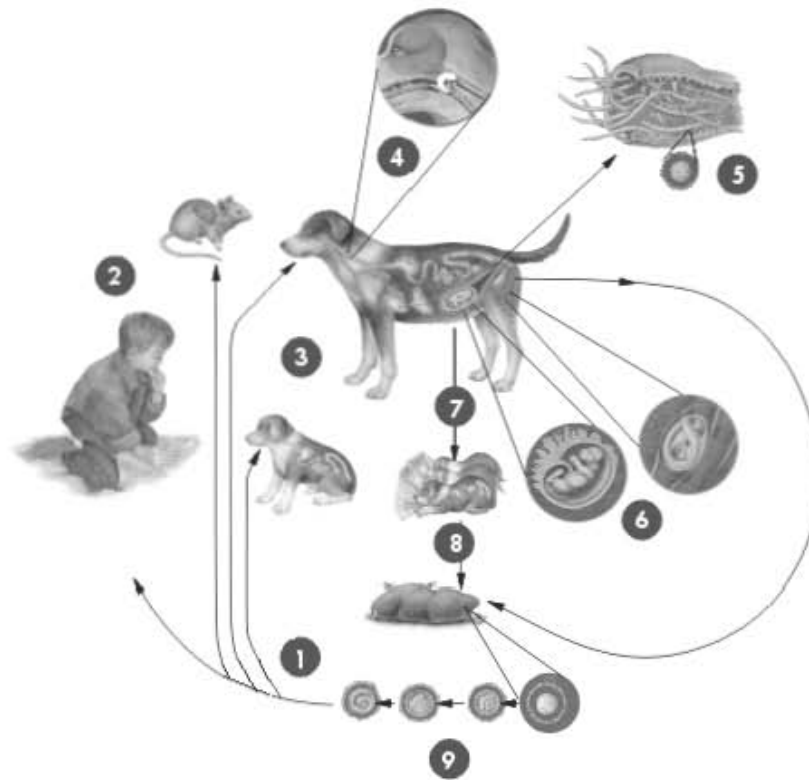


Figura 5.- Esquema del ciclo de vida de *Toxocara canis*. (1) Fase infectiva, huevo larvado de segundo estadio. (2) Hospedero paraténico. (3) Hospedero definitivo. (4) migración de la larva. (5) Fase adulta. (6) Larvas en el embrión o en estado hipobiótico. (7). Cachorros que nacen infectados o se infectan a través de la leche materna. (8) Heces con huevos de *T canis*. (9) Huevo fecundado.

2.6. Toxocariosis.

La toxocariosis es una geohelmintiasis que se presenta con mayor frecuencia en perros cachorros más que en adultos. Las manifestaciones clínicas son diarrea, vómito, distensión abdominal, anemia, tos y neumonía. En infecciones masivas puede llevar a la muerte (Overgaauw, 1994).

El diagnostico se basa en los signos clínicos de los cachorros: distensión abdominal marcada y condición física pobre; se confirma con exámenes coproparasitológicos para detectar la presencia de huevos, o mediante la eliminación de la fase adulta en las heces.

El tratamiento en los cachorros es con prazicuantel, febantel o febendazol, a las perras se les administra febantel o febendazol y doracmectina en varias dosis dependiendo del peso corporal (Schneider, 1996).

2.7. Larva migrans.

El humano se infecta al ingerir huevos larvados de segundo estadio que se encuentran en el ambiente, principalmente en la tierra. Los pacientes pueden presentar larva migrans visceral (LMV), cerebral (LMC), ocular (LMO) o encubierta (LME).

El cuadro clínico de LMV se caracteriza por: fiebre, eosinofilia, hepatoesplenomegalia y neumonitis. Puede haber daño hepático, pulmonar, cardíaco y renal.

En la LMC las manifestaciones son: convulsiones, parálisis, epilepsia, meningitis e incluso la muerte.

Los signos y síntomas de la LMO son: estrabismo, uveitis, fotofobia, visión borrosa, endoftalmitis, granuloma, desprendimiento de la retina y pérdida de la visión.

En la LME no hay manifestaciones clínicas patognómicas.

El diagnóstico es indirecto y se utilizan las pruebas inmunológicas (ELISA, inmonoblot, microprecipitación, entre otras) y biopsia. (Nobuaki y Nobuo, 2007).

El diagnóstico de LMO se realiza mediante la detección de anticuerpos circulantes a partir de antígenos crudos, pero, los resultados arrojan datos inespecíficos por las reacciones cruzadas con otros parásitos: filarias, *Schistosoma*, *Paragonimus*, *Fasciola*, *Spargano*, *Anisakis*, *Gnathostoma*, *Strongyloides*, *Trichinella* y otras helmintiasis intestinales. Tabla 2. (Patrick Jacquier et al., 1991; Magnaval et al., 1991, 1992; Gillespie et al., 1993; Nobuaki et al., 1997; Hiroshi et al., 1998, 2000; Yokoi et al., 2002; Fan et al., 2004; Taylor, 2001).

Tabla 2. Diagnóstico inmunológico de larva migrans y reacciones cruzadas

Autores	Técnica	Reacción cruzada	Tipo de antígeno
Patrick Jacquier et al. 1991	ELISA OD-405	Amibiasis, fasciolosis, cisticercosis, strongiloidosis, triquinelosis, filariasis	Antígenos de ES
MagnaVal JF, et al. 1991	Inmonoblot	No reportado	Antígenos de 24KD, 28KD, 30KD, 35KD, 132KD, 147KD Y 200KD
MagnaVal J.-F., et al. 1992	ELISA OD-420	Anisakiasis, quiste hídrico, fasciolosis, filariasis, schistosomiasis, strongiloidosis y helmintos intestinales.	Antígeno e IgE
Gillespie S H, et al. 1993	ELISA OD-405	Filariasis, no probada en ascaridos y cestodos	Anticuerpos monoclonales (Tcn-2),
Nobuaki Akao, et al. 1997	ToxocaraCHECK	Gnatostomosis, dilofilariasis, no probada para ascaridos	Antígeno crudo de E-S
Hiroshi Yamasaki, et al. 1998	Inmonoblot	Anisakiasis, filariasis y Toxocara cati.	Antígeno de 38KD
Hiroshi Yamasaki, et al. 2000	ELISA OD-414	Filariasis, gnatostomosis, schistosomosis, paragonimosis, fasciolosis, sparganosis, spirometrias. Pero no con Ascaridos y uncinarias.	Antígeno recombinante (38KD)
Yokoi K, et al. 2002	Sandwich ELISA	No reportado	Antígeno de 120KD

2.8. Epidemiología.

La toxocariosis tiene una alta frecuencia en perros cachorros y la prevalencia mundial oscila desde el 5 hasta el 83% (Styles, 1967; Schantz & Biagi, 1968; Lapage, 1981; Mizgajski, 2001; Luty, 2001). Los perros adultos también son portadores de la toxocariosis y la frecuencia es desde el 3 hasta el 21.2% (Schantz & Biagi, 1968; Martínez et al., 1998; Luty, 2001; Ponce-Macotela et al., 2005).

Se estima que las hembras de *T. canis* ponen aproximadamente 200,000 huevos/día (Overgaauw, 1994). Los huevos de *Toxocara* que se eliminan con las heces de los perros no son infectantes; necesitan madurar en el suelo hasta que se desarrolle la larva de segundo estadio dentro de éstos. El proceso dependerá de las condiciones de humedad, calor y consistencia del suelo (Gamboa, 2005).

La contaminación del suelo de parques, jardines y camellones con huevos de *T. canis* es alta en Alemania (87%), Japón (39%), Inglaterra (66%) y Polonia (2-37%) (Glickman, 1993; Mizgajski, 1998; Mizgajski, 2001). En México la frecuencia es del 14.6% (Martínez et al., 1998).

El hombre es un hospedero paraténico y las larvas le producen el síndrome de larva migrans: LMO, LMV, LMC y LME (Beaver, 1952; García, 2001). Fig. 6.

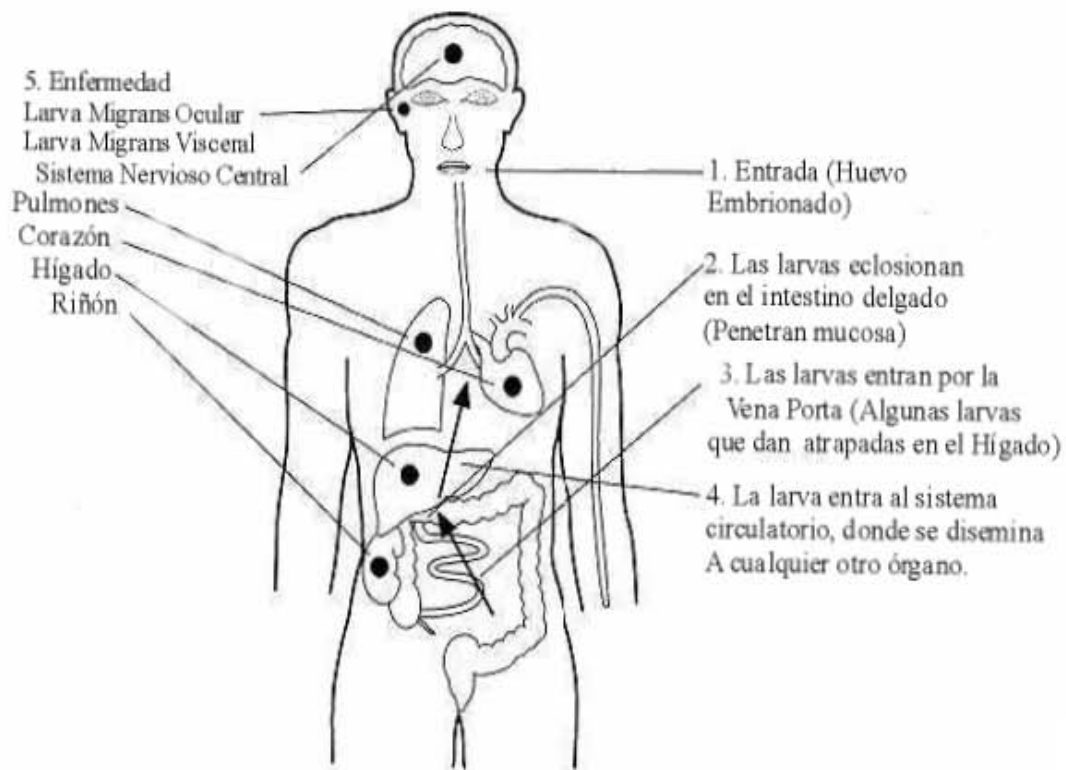


Figura 6.- Esquema que muestra la vía de infección, las rutas de migración de la larva de segundo estadio y su localización.

Se estima que la LMO ocurre en una de cada mil personas (Maetz et al., 1987); la edad más afectada es de 3-5 años, aunque puede ser desde los 2 hasta los 50 años (Taylor, 2001; Bartelink et al., 1993; Hill et al., 1985; Martínez et al., 1997; García, 2001; Kraus et al., 1995). En la literatura médica, hay pocos casos reportados de infección sistémica y LMO simultáneamente; se sugiere que las manifestaciones clínicas dependen de la cantidad de huevos ingeridos y de la respuesta inmune del huésped (Glickman y Schantz, 1981; Fenoy et al., 2001). Por otro lado, se ha documentado que en EUA se infectan 10,000 personas por año (Toxocariasis, 2002).

Los niños con carencia de hierro, frecuentemente tienen geofagia (pica, ingestión de tierra), este antecedente es importante para la adquisición de la parasitosis, debido a que el principal mecanismo de infección es por la ingestión de huevos larvados de segundo estadio, que se encuentran en la tierra (García, 2001). Además, se sospecha que otro mecanismo puede ser la ingestión de carne que tenga entre sus tejidos larvas viables, como la carne de pollo, conejo, cerdo o pescado insuficientemente cocida, (Nagakura et al., 1989; Stürchler et al., 1990; Kraus et al., 1995).

La seroprevalencia en diferentes partes del mundo es del 3.6 hasta el 86% (Taylor, 2001). En México se reporta una seroprevalencia del 7.5% (Martínez et al., 1997). Un estudio, en donde se analizó el suero de 207 niños (20 meses hasta 17 años 11 meses) con diagnóstico clínico de parálisis cerebral infantil, el 1.9% fue positivo a LMV (Fernández et al., 1999).

3. JUSTIFICACIÓN.

En nuestro país hay un perro por cada siete habitantes, la OMS estima que hay un perro por cada 10 habitantes. Los perros con toxocariosis son potencialmente contaminadores de suelos de parques y jardines. La larva migrans es un verdadero problema de salud pública, que afecta fundamentalmente a la población infantil. El método diagnóstico es indirecto, mediante la detección de anticuerpos con pruebas inmunológicas que utilizan antígenos crudos, probablemente obtenidos a partir de la fase adulta del parásito y que frecuentemente presentan reacción cruzada con otras parasitosis. Es necesario contar con un método que permita obtener una gran cantidad de larvas de segundo estadio axénicas, para poder contar con material biológico indispensable para realizar técnicas inmunológicas que incrementen la sensibilidad y especificidad necesarias para el diagnóstico de larva migrans

4. OBJETIVO.

Determinar la eficiencia de dos métodos para la obtención de huevos larvados de *Toxocara canis*.

5. HIPÓTESIS.

La obtención de huevos larvados será mayor en el método de cultivo de las hembras de *T canis* que en el método de disección uterina.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1. Obtención del intestino delgado de perros cachorros.

El muestreo se realizó de septiembre del 2005 a julio del 2006. El intestino delgado de los perros cachorros (2-6 meses de edad), previamente eutanatizados se obtuvo del Centro de Control Canino de "Culhuacan". El intestino de cada perro se colocó en un recipiente con solución salina fosfatos (PBS) y se transportó al laboratorio de parasitología experimental del Instituto Nacional de Pediatría. Se realizó una disección longitudinal del intestino, Fig. 7. Los nematodos adultos se colectaron con pinzas o pincel y las hembras se depositaron en un vaso de precipitado con solución salina isotónica (SSI). Para disminuir o eliminar la contaminación, los nematodos se lavaron, durante 20 minutos, con PBS (pH 7.0)/ 1.0% formaldehído (FS). Este procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar.

En la Fig.8 se muestra un esquema de la estrategia que se siguió para la obtención de los huevos larvados de *T. canis* mediante dos métodos.



Figura 7.- Resección intestinal que muestra nematodos adultos.

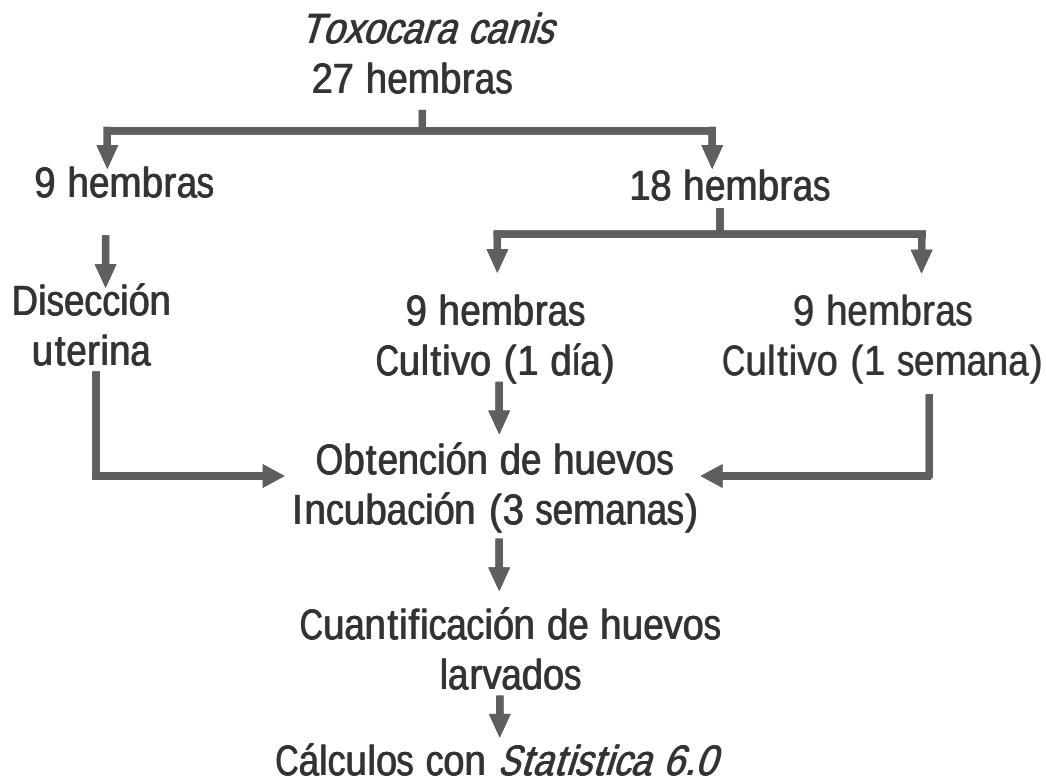


Figura 8.- Esquema que muestra la estrategia de trabajo.

6.2. Dissección uterina (MDU).

Para este ensayo se utilizaron nueve hembras con una longitud mayor de 120 mm. Cada una de las hembras se sujetó con agujas de dissección a una barra de cera. Con un bisturí se hizo una incisión longitudinal de la cutícula, se extrajo la región del útero grávido, los huevos se colectaron, lavaron y cuantificaron en una cámara de Neubauer. Fig. 9, Fig. 10.

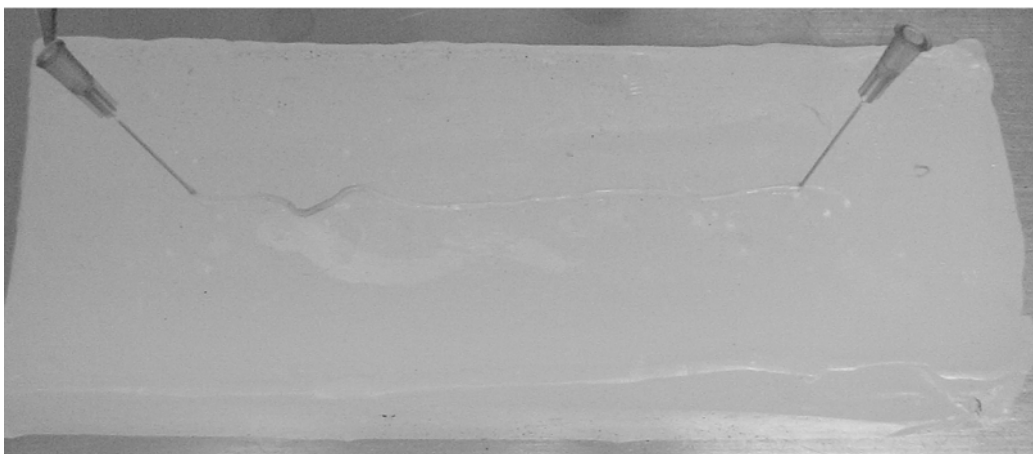


Figura 9.- Dissección uterina.

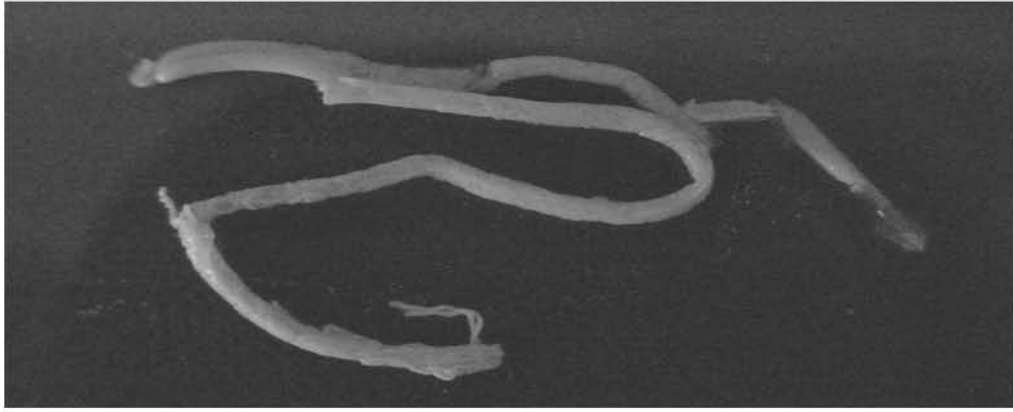


Figura 10.- Útero disecado de una hembra de *T. canis*.

6.2.1. Huevos larvados.

Después de la disección uterina y bajo condiciones de esterilidad, los huevos se incubaron en FS a temperatura ambiente, durante un mes, siguiendo el procedimiento descrito por Glickman (1979). Posteriormente, se cuantificó el número de huevos larvados.

6.3.- Cultivo de hembras de *T. canis* (MCH).

Para este ensayo, se utilizaron 18 hembras de más de 120 milímetros de longitud y se formaron dos grupos, con nueve hembras cada uno. El primero se mantuvo en medio de cultivo solución glucosa plasma humano (SGPH) durante 24 horas a 37°C. El segundo se mantuvo en el medio de cultivo (SGPH) por una semana (8 días) a 37°C. Cabe aclarar que las hembras se cambiaron a cajas de cultivo celular con medio nuevo SGPH, cada 24 o 72 horas. Fig. 11. El medio de cultivo con los huevos se centrifugó para su cuantificación e incubación.

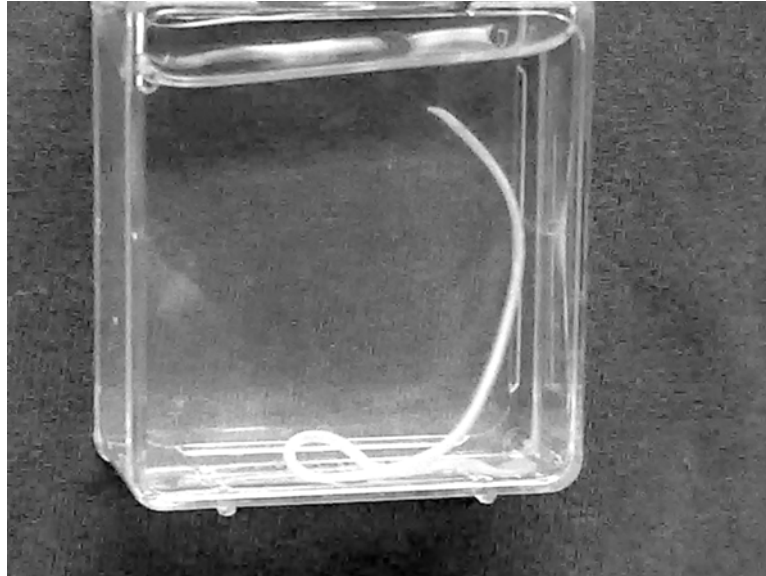


Figura 11.- Hembra de *T canis* en medio de cultivo.

6.3.1. Huevos larvados.

Los huevos que se obtuvieron de las hembras en medio de cultivo, se incubaron en FS a temperatura ambiente, durante un mes. Posteriormente se cuantificaron.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de chi-cuadrada, con un nivel de p mayor a 0.05.

7. RESULTADOS.

7.1. Obtención de huevos después de la disección uterina (MDU) y del cultivo (MCH) de las hembras de *T. canis*.

La cantidad de huevos que se obtuvo con la disección uterina y con el cultivo de la hembra de *T. canis* se muestran en la gráfica de caja y bigote de la Fig.12. En la disección uterina se obtuvo un promedio de 113,167 huevos; en el cultivo de un día fue de 68,000 y en una semana fue de 119,556 huevos.

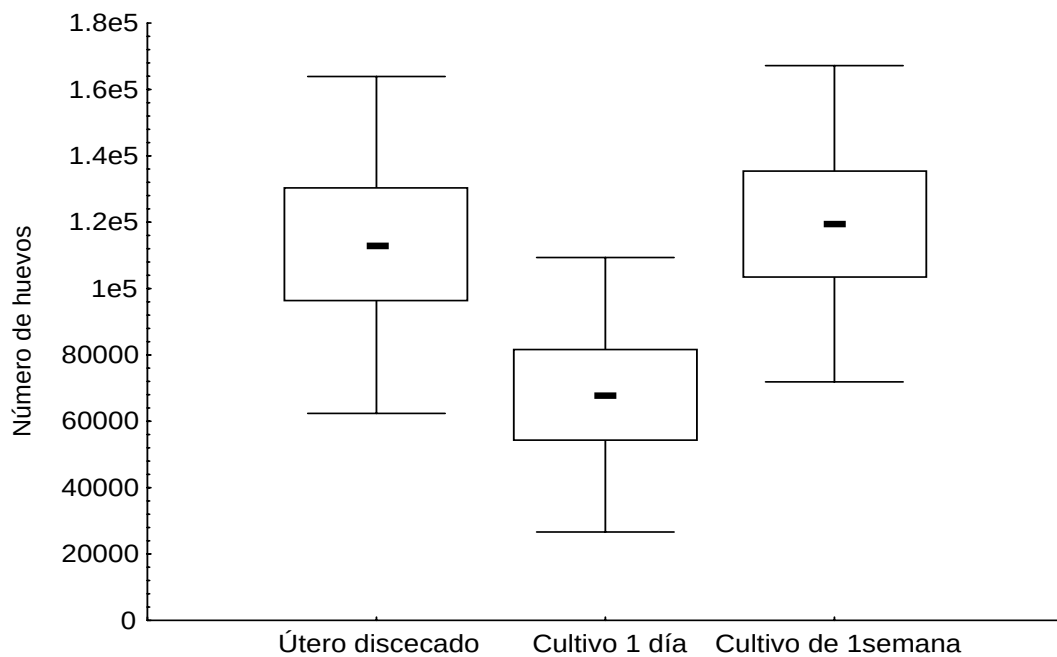


Figura 12.- Número total de huevos por cada uno de los métodos.

7.2. Obtención de huevos larvados por MDU y MCH.

Después de la incubación de los huevos durante 3 semanas, se observaron las larvas dentro de éstos. Fig 13.

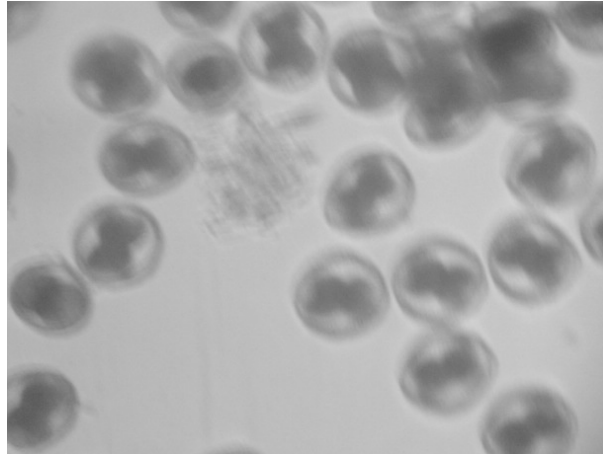


Figura 13.- Huevos larvados de *T. canis*.

La gráfica de caja y bigote de la Fig.14 muestra la cantidad de huevos larvados que se obtuvieron por MDU y por MCH. En MDU se obtuvieron 18,889 huevos larvados. En el MCH, con 24 horas de incubación fueron 54,883 (**radio 1:3**) y con MCH de una semana de incubación fue de 79,889 (radio 1:4) huevos larvados ($p < 0.05$),

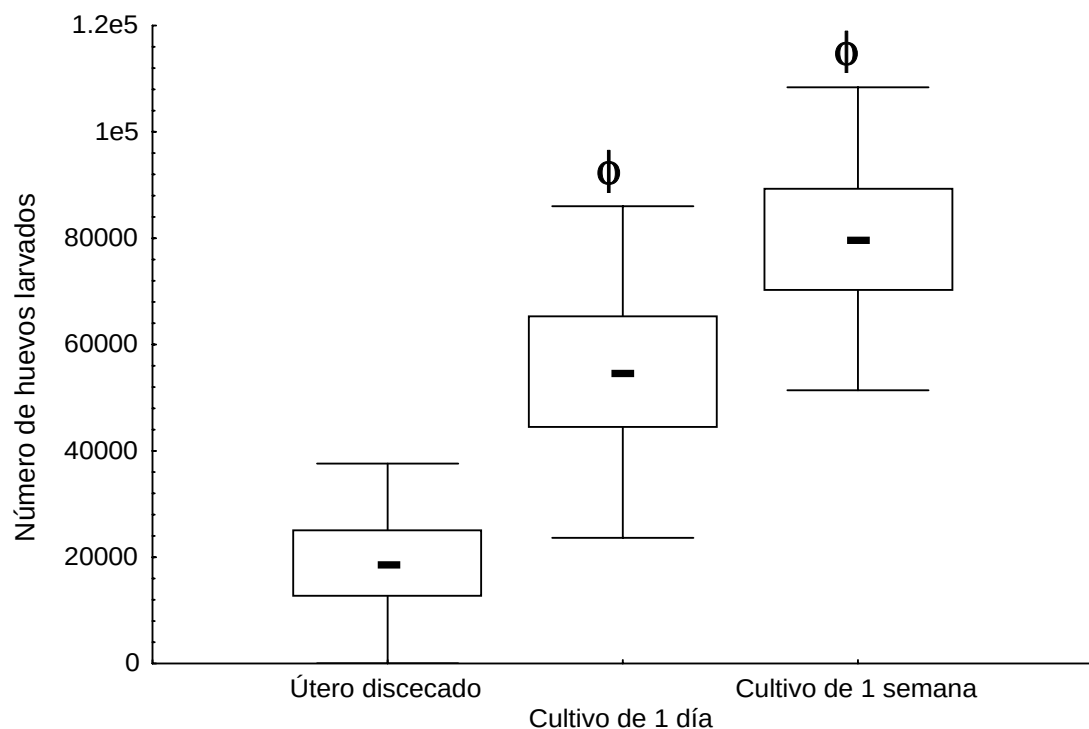


Figura 14.- Número total de huevos larvados por cada método, $\phi p > 0.05$.

8. DISCUSIÓN.

La infección por larva migrans producida por *T. canis*, es un verdadero problema de salud pública. El diagnóstico depende fundamentalmente de la demostración de anticuerpos específicos contra secreciones y excreciones (E/S) de la larva de *Toxocara* mediante pruebas inmunológicas, como ELISA. Una piedra angular importante para evitar las reacciones cruzadas es la pureza de los antígenos de E/S y la concentración de éstos. Consideramos que el MCH es una excelente alternativa, para obtener antígeno puro, ya que las hembras productoras se mantienen viables en solución axénica (SGHP) durante una semana y en este período, las hembras van depositando huevos fértiles. Además, los huevos se encuentran libres de contaminación. Por otro lado, la solución de SGHP puede contener viable a una sola hembra.

Cuando se extrae el útero de las hembras, se corre el riesgo de obtener huevos sin fertilizar. En contraste, el método que se propone en este trabajo, asegura la obtención de huevos fértiles en un 84 % y en condiciones axénicas.

Es importante recalcar que los nematodos que se obtienen mediante la resección intestinal de los cachorros, están cubiertos de contenido intestinal, por lo tanto, éste debe ser removido con un pincel y es necesario lavar a los parásitos con SF (1%); de esta forma, aseguramos que las hembras cultivadas en el SGHP estén en condiciones axénicas.

Se sabe que bajo condiciones xénicas, las hembras solo se mantienen durante tres días y los huevos obtenidos no son axénicos (Aguirre, 1993). En este trabajo mostramos que las hembras cultivadas en el medio SGHP, en condiciones axénicas, producen huevos fértiles durante ocho días. Por otro lado, los huevos libres de bacterias podrían facilitar el proceso de eclosión y el cultivo de la larva libre de contaminantes (De Savigny, 1975).

En este estudio, todos los experimentos se llevaron a cabo en un ambiente estéril (campana de flujo laminar vertical) y fue ventajoso, ya que se obtuvieron huevos libres de contaminación bacteriana.

La dispersión en los resultados probablemente se debió a las diferencias en los lotes parasitarios. Por otro lado, el rendimiento en disección uterina (113167) y huevos ovipuestos en 24 horas (68000) fue mayor al reportado por Richards y Lewis (2001). Ellos reportan un rendimiento de 60,000 huevos en el método de disección uterina y 50,000 en oviposición obtenidos de zorros inoculados.

El rendimiento de huevos larvados, del cultivo durante 24 horas (55000) y el cultivo de seis días (80000) fue superior al obtenido por resección uterina (18000). Prociv (1989) usando un modelo *in vivo* en el que inoculó *Toxocara pterodopsis*, obtuvo menor rendimiento, a las 24 horas fue de 5,800 huevos y al día 34 postinfección fueron 33,000 huevos.

Los resultados son importantes e impactantes porque con el cultivo de las hembras de *T. canis* se asegura la obtención y mantenimiento axénico de huevos y por lo tanto de las larvas, que son importantes para la obtención del antígeno.

9. CONCLUSIONES.

Se aporta un método simple y de bajo costo para la obtención de huevos larvados de *Toxocara canis in vitro*

Con este método de cultivo bajo condiciones estériles se reduce al máximo la contaminación de antígenos bacterianos.

Cada hembra cultivada puede monitorearse de manera individual en la producción de cada lote de huevos.

Este método puede contribuir al estudio de la fisiología de *Toxocara* ya que se puede mantener al adulto por lo menos una semana bajo condiciones axénicas.

Finalmente, este método puede servir de modelo para cultivar otros nematodos intestinales.

10 ANEXO

Solución salina fosfatos (PBS).

Reactivos	g
NaCl	8.006
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	0.612
KH ₂ PO ₄	0.19

Los reactivos se mezclaron en 800 mL, se ajustaron a pH 7.5, después se aforó a 1.0 L y se esterilizó por filtración o autoclave.

Solución de salina fosfatos/formol 10% (SF)

PBS	990 mL
Formol	10 mL

Solución salina isotónica (0.9%)

NaCl	9.0 g
H ₂ O	900 mL

Se aforó a un litro y se esterilizó por autoclave.

Medio de cultivo SGPH (500mL)

PBS estéril	500mL
Plasma humano	5mL
Sacarosa (azúcar comercial)	10g
Antibióticos	Gentamicina 20mg, Penicilina 200mg, Estreptomicina 20mg, Ampicilina 10mg, Ceftazidina 10 mg, Anfoterizina B 1mg.

30 mL de PBS se mezclaron con los antibióticos y la sacarosa; se esterilizó por filtración (membrana 0.2 μ m) y se agregó el resto de PBS estéril y el plasma. Para control de esterilidad, una alícuota se sembró en medio de gelosa sangre. El medio se almacenó a 4°C hasta su uso.

11 REFERENCIAS

- Aguirre Alcántara Maria Teresa. 1993. Elaboración de antígenos de *T. canis* y su evaluación con la técnica de ELISA. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UNAM.
- Bartelink AK, Kortbeek LM, Huidekoper HJ, Meulenbelt J, van Knapen F. 1993. Acute respiratory failure due to toxocara infection. Lancet. 13; 342: 1234.
- Barriga O. 1991. Rational control of canine toxocariosis by the veterinary practitioner. J Amer Vet Med Assoc. 198:216-221.
- Beaver PC, Snider CH, Carrera GM, Dent JH, Lafferty JW. 1952 Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. Report of three cases. Pediatrics 9:7-19.
- Burke MT, Robertson EL (1985) Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*: experimental infection of the bitch at midpregnancy and at parturition. Int J Parasitol 15:485-490.
- Bush AO, Fernández JC, Esch GW, Seed JR. Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press. 2001; 566 pp.
- De Savigny DH. 1975. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara canis* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. J Parasitol 61, 781-782.
- Despommier D (2003) Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. Clin Microbiol Rev 16:265-272.
- Fan CK, Su KE. 2004. Cross-reactions with *Ascaris suum* antigens of sera from mice infected with *A. suum*, *Toxocara canis*, and *Angiostrongylus cantonensis*. Parasitol Int. 53, 263-271.
- Fenoy, S., Ollero, M.D., Guillén, J.L., Del Aguila, C. 2001. Animal Models in ocular toxocariasis. J Helminthol. 75, 119-124.
- Fernández P. Martínez I. Gutiérrez Q, Vázquez O, Pérez MJ, García Y. 1999. Serología para detección de helmintos extra intestinales en niños con alteración Neurológica. Rev Mex Patol Clin. 46, 217-21.
- Gamboa MI. 2005. Effects of temperature and humidity on the development of eggs of *Toxocara canis* under laboratory conditions. J Helminthol. 79, 327-31.
- Garcia LS. Diagnostic Medical Parasitology. 4th Edition. Washington DC: American Society for Microbiology; 2001.
- Gibbons M. L, Jacobs E. D, Rehana S A. 2001. *Toxocara malyseiensis* n. sp. (nematoda: ascaridoidea) from the domestic cat (*Felis catus* Linnaeus, 1758). J. Parasitol. 87(3): 660-665.

Gillespie SH, Bidwell D, Voller A, Robertson B D, Maizels R M. 1993. Diagnosis of human toxocariasis by antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Pathol.* 46, 551-554

Glickman LT, Magnaval JF. 1993. Zoonotic roundworm infections. *Infect Dis Clin North Am.* 7, 717-32.

Glickman LT, Schantz PM, Dombroske R, Cypess RH. 1978. Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *Am J Trop Med Hyg* 27:492–498.

Glickman LT, Schantz PM, Cypess RH. 1979. Epidemiological characteristics and clinical findings in patients with serologically proven toxocariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73:254–258.

Hill IR, Denham DA, Scholtz CL. 1985. *Toxocara canis* larvae in the brain of a British child. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 79:351-4

Hiroshi YU, Radzan T, Yoh-ichi W, Joon W,M, Ngah Z, Kunioki A, Lim P, Kim C, Kiyoshi K, Takashi A. 1998. Molecular characterization of a cDNA encoding an excretory-secretory antigen from *Toxocara canis* second stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol Int.* 47: 171-181.

Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J. 1991. Immunodiagnosis of Toxocarosis in Humans: Evaluation of a New Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit. *J Clin Microbiol.* 29: 1831-1835.

Kraus A, Valencia X, Cabral A, Vega G. 1995. Visceral larva migrans mimicking rheumatic diseases. *J Rheumatol.* 22: 497-500.

Lapage, G. *Parasitología Veterinaria*. México. Continental; 1981

Lee KT, Min HK, Chung PR, Chang JK. 1976. Studies on the inducing possibility of human visceral larva migrans associated with eating habit of raw liver of domestic animals. *Korean J Parasitol.* 14:51–60.

Lloyd S. 1986. Toxocariosis. *J of Small Animal Pract.* 27: 655-661.

Logar J, Soba B, Kraut A, Stirnkranjc B. 2004. Seroprevalence of *Toxocara* antibodies among patients suspected of ocular toxocariasis in Slovenia. *Korean J Parasitol.* 42:137-140.

Luty T. 2001. Prevalence of species of *Toxocara* in dogs, cats and red foxes from the Poznan region, Poland. *J Helminthol.* 75 :153-6.

Maetz HM, Kleinstein RN, Federico D, Wayne J. 1987 Estimated prevalence of ocular toxoplasmosis and toxocariasis in Alabama. *J Infect Dis.* 156 :414.

Magnaaval JF, Fabre R, Maurieres P, Charlet JP, Larrard B. 1991. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol Res*:77:697-702.

Magnaaval JF, Fabre R, Maurieres P, Charlet JP, de Larrard B. 1992. Evaluation of an Immunoenzymatic Assay Detecting Specific Anti-*Toxocara* Immunoglobulin E for Diagnosis and Posttreatment Follow-Up of Human Toxocariasis. *J Clin Microbiol*. 30: 2269-2274.

Martínez I. Gutiérrez M, Pérez M, Vázquez O, García Y. 1997. Reactividad serológica a antígeno de *Toxocara canis* en una población escolar. *Rev Mex Patol Clin*. 44: 85-89.

Martínez BI, Fernández PAM, Vázquez TO, Ruiz HA. 1998. Frecuencia de *Toxocara canis* en perros y áreas verdes del sur de la Cd. de México, Distrito Federal. *Vet Mex* 29: 239-44.

Mizgajiska H, Luty T. 1998. Toxocariasis in dogs and contamination of soil with *Toxocara* spp. eggs in the Poznan region. *Przegl Epidemiol*.52: 441-6.

Mizgajiska H. 2001. Eggs of *Toxocara* spp. in the environment and their public health implications. *J Helminthol*. 75:147-51.

Nagakura K, Tachibana H, Kaneda Y, Kato Y. 1989. Toxocariasis possibly caused by ingesting raw chicken. *J Infect Dis*. 160: 735-736.

Nichols R L. 1956. The etiology of visceral larva migrans. Diagnostic morphology of infective second-stage larvae. *J. Parasitol*. 42:349-362.

Nobuaki A, Albert E C, Setsuko T, Koichiro F. 1997. A rapid and sensitive screening kit for the detection of anti-*Toxocara* larval ES antibodies. *Parasitol. Int*. 46: 189-195.

Nobuaki A, Nobuo O. 2007. Toxocariosis in Japan. *Parasitol. Int*. 56: 87-93.

Overgaauw P. A. M. 1994. Toxocariosis in dogs and cats. *Vet Q. suppl* 1: 155-165.

Page A, Hamilton A, Maizels R. 1992. *Toxocara canis*: Monoclonal antibodies to carbohydrate epitopes of secreted (TES) antigens localize to Different Secretion-related structures in infective larvae. *Exp Parasitol*. 75; 56-71.

Ponce-Macotela M, Peralta-Abarca GE, Martinez-Gordillo MN. 2005. *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico City. *Vet Parasitol*. 131:1-4.

Prociv P. 1989. Observations on egg production by *Toxocara pterodopsis*. *Int J Parasitol* 4:441-443.

Richards DT, Lewis JW. 2001. Fecundity and egg output by *Toxocara canis* in the red fox, *Vulpes vulpes*. *J Helminthol* 75: 157–164

Sadgijadi M.D. 2000. Seroprevalence of *Toxocara* infection in school children in Shiraz, Southern Iran. *J Trop Ped*. 298: 436-439.

Styles TJ. 1967. Incidence of *Toxocara canis* and other helminth parasites of dogs in Mexico City. *J Parasitol*. 53: 822-3.

Schantz PM, Biagi FF. 1968. Coexistence of *Toxocara* and *Toxascaris* in dogs in Mexico City. *J Parasitol*. 54: 185-6.

Schantz PM, Glickman LT. 1983. Ascarids of cats and dogs: a public health and veterinary medicine problem. *Bol Oficina Sanit Panam*. 94:571-86.

Schneider T, Kordes S, Epe C, Kuschfeldt S, Stoye M.1996. Investigations into the prevention of neonatal *Toxocara canis* infections in puppies by application of Doramectin to the bitch. *Zentralbl Veterinarmed B*. 43: 35-43

Stürchler D., Weiss N., Gassner M. 1990. Toxocaral visceral larva migrans. *New Engl J Med*. 298: 436-439.

Taira K, Permin A, Kapel CM. 2003. Establishment and migration pattern of *Toxocara canis* larvae in chickens. *Parasitol Res*. 90:521–3.

Tay Z J, Gutiérrez Q M, López M R, Manjarez Z E, Molina L J. Microbiología y parasitología medica. 3er. México DF. Méndez Editores. 2003.

Taylor MR. 2001. The epidemiology of ocular toxocariasis. *J Helminthol*, 75:109-118.

Toxocariasis. Parasitic Disease Information. Center for Disease Control and Prevention (CDC). 20-03-2002. Disponible en:
http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/toxocara/factsht_toxocara.htm

Vegni M., Paggi L., Orecchia P., Dallai R., 1986. Fine structure of buccal cavity and esophagus in *Toxocara canis* (Nematoda, Ascarididae) infective larva. *J Ultrastruct Res*. 97:144-157.

Yokoi K, Kobayashi F, Sakai J, Usui M, Tsuji M. 2002. Sandwich ELISA detection of excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* larvae using a specific monoclonal antibody. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 33:33-37.

Yamasaki H, Araki K, Lim P K, Zasmyb N, Mak J W, Taibb R, Aokia T. 2000. Development of a Highly Specific Recombinant *Toxocara canis* Second-Stage Larva Excretory-Secretory Antigen for Immunodiagnosis of Human Toxocariasis. *J Clin Microbiol*. 38, 1409-13.

Yamasaki H, Radzan T, Watanabe Y., Mak J W, Ngah Z, Araki K, Lim P K C, Kita K, Aoki T. 1998. Molecular characterization of a cDNA encoding an excretory]secretory antigen from *Toxocara canis* second stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human toxocariasis. Parasitol Int. 47,171-81.

12. ARTÍCULO PUBLICADO

Rodríguez-Caballero A, Luna-Ochoa R I, Ponce-Macotela M, Peralata-Abarca G E, Martínez-Gordillo M N. 2007. A simple and inexpensive in vitro method for retrieving fertilized *Toxocara canis* eggs. *Parasitol Res* 101:829–832

A simple and inexpensive in vitro method for retrieving fertilized *Toxocara canis* eggs

Aarón Rodríguez-Caballero · Rodolfo I. Luna-Ochoa ·
Martha Ponce-Macotela · Gustavo E. Peralata-Abarca ·
Mario N. Martínez-Gordillo

Received: 28 December 2006 / Accepted: 12 April 2007 / Published online: 1 May 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract The erratic migration of nematode larvae is potentially deleterious for humans, especially those produced by *Toxocara* roundworms. Diagnosis of human toxocariasis: visceral larva migrans depends on antibody detection against excretions–secretions (E/S) from *Toxocara* larvae by enzyme-linked immunosorbent assay. In the present work, we wish to propose a simple and cheap culture procedure for keeping *T. canis* female worms alive. We removed living worms from the small intestine of euthanized puppies at the Canine Control Centre “Culhuacan” in the Southern part of Mexico City. To ascertain the utility of the method, we compared the population size of fertilized eggs from both female worms kept in culture (FCM) and those obtained using uterus excision method (UEM). Operationally, a fertilized egg develops a larva after 1 month. Our results show that the culture method was superior at a ratio of 3:1 over UEM. FCM had advantages over UEM, such as (1) low probability of contamination with foreign antigens, (2) greater safety for infective egg manipulation, and (3) gave rise to a higher percentage of fertile eggs.

Introduction

The erratic migration of nematode larvae is potentially deleterious for humans, especially if the larvae travel or invade the viscera, such as the liver, lungs, and central

nervous system (Despommier 2003). In the eyes, larva migrans produce a granulomatous reaction that can injure the retina and, in severe cases, cause loss of eyesight. The *Toxocara* genus has zoonotic transmission; this is especially important because *T. canis* larvae cause several severe syndromes, such as visceral larva migrans (VLM), ocular larva migrans (OLM), eosinophilic meningo-encephalitis (EME; Vidal et al. 2003) and covert toxocariasis (CT; Bass et al. 1983). *Toxocara* definitive hosts are puppies, dogs, and cats parasitized by *T. canis* and *T. cati*, respectively. *T. canis* is highly prevalent in puppies under 6 months old, with infection rates of approximately 100% (Styles 1967). This elevated infection rate is due to vertical transmission. The bitches transmit *T. canis* larvae to their puppies by two mechanisms: mainly by prenatal transmission as well through lactation (Burke and Robertson 1985; Overgaauw 1994). The accidental ingestion of *Toxocara* eggs with a developed larva produces infections in human beings (Beaver et al. 1952; Schantz and Glickman 1978). Larvae hatch in the intestine, penetrate the intestinal mucosa, and migrate throughout extraintestinal tissues, producing eosinophilia, leucocytosis, hepatomegaly, hyperglobulinemia, cough, and pulmonary infiltrates. A seroprevalence analysis in children from 1 to 11 years old from different geographic regions of the USA showed that 4.6 to 7.3% of cases had antibodies against *Toxocara* (Herrmann et al. 1985).

To achieve *Toxocara* diagnosis (VLM, OLM, EME, or CT), it is necessary to detect antibodies using immunological tests, such as indirect hemagglutination or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Glickman et al. 1978), using *T. canis* specific antigens from homogenized embryonated eggs (Glickman et al. 1979). However, to obtain antigens in elevated quality and high concentrations from excretions–secretions (E/S), it is necessary to cultivate a big population of *T. canis* larvae-2 stage, which can live

A. Rodríguez-Caballero · R. I. Luna-Ochoa ·
M. Ponce-Macotela · G. E. Peralata-Abarca ·
M. N. Martínez-Gordillo (✉)
Parasitología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría,
Insurgentes Sur No. 3700-C,
Mexico, Mexico
e-mail: marionmgordillo@yahoo.com

in reculture in RPMI just for approximately a year. Nevertheless, to reach this objective, it is necessary to find a large number of female worms from puppy dogs, with the goal of isolating fertilized eggs using the uterus excision method (UEM). Now, we wish to describe a cheap and efficient in vitro method to recover fertilized *T. canis* eggs from living female worms.

Materials and methods

Toxocara canis female worms were retrieved from the intestines of euthanized puppies at the Canine Control Centre “Culhuacan” following a method described elsewhere (Ponce-Macotella et al. 2005). Briefly, to remove the small intestines from the abdominal cavity, it was necessary to identify and clamp pyloric and cecum valves; the small intestines were isolated and transported to the experimental parasitology laboratory in wide-mouth bottles filled with phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.0. To recover the parasites, we slit the small intestine longitudinally and picked the worms up with forceps or a paintbrush. To eliminate and minimize contamination, all worms were washed once using a paintbrush dipped in 1.0% formaldehyde in PBS pH 7.0 solution (FS); afterwards, they were rinsed at least three times for 2 min in FS. All manipulations were performed in a vertical laminar flow cabinet under sterile conditions. To decide on the most successful strategy for harvesting *T. canis* eggs, we compared two methods: (1) UEM and (2) female culture method (FCM) in two modalities daily and weekly.

The most commonly used method, the UEM, consists of detaching the uterus from single female worm to obtain gravid uteri to collect all fertilized and perhaps a few, unfertilized eggs, and incubate them at room temperature

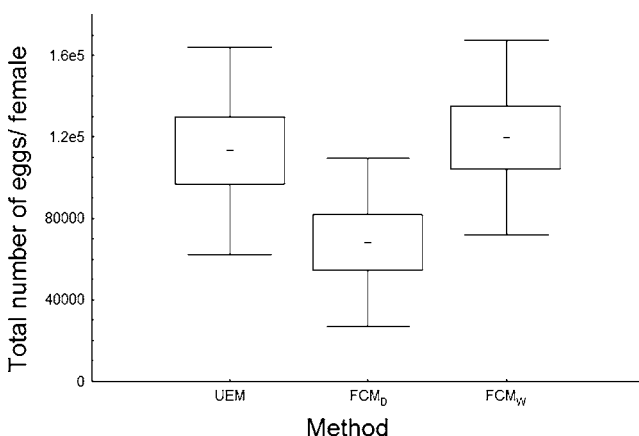


Fig. 1 Graph showing the total number of eggs retrieved using both methods: UEM ($n=9$), FCM_D (day; $n=9$), and FCM_W (week; $n=9$). There were no statistically significant differences $p>0.05$. Whiskers, $\pm$ SD; boxes, $\pm$ SE; dash, Mean

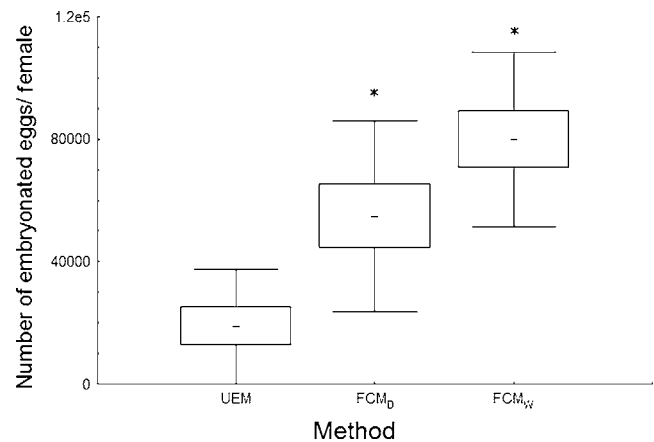


Fig. 2 Graph showing the number of fertilized eggs, operationally defined by the larva developed inside of the egg. There were statistically significant differences (asterisk) between the methods $p<0.05$. UEM and (asterisk) FCM_D (day), (asterisk) FCM_W (week). Whiskers, $\pm$ SD; boxes, $\pm$ SE; dash, Mean

for 1 month for larvae development in FS (Glickman et al. 1979). In the second method, single female worms were maintained in PBS pH 7.00, 2% glucose, supplemented with 1% human plasma (SGHP) and incubated at 37°C in tissue culture flasks (Nalgene canted neck flasks, 25 cm²). Operationally, we defined adult worms as female *T. canis* worms measuring at least 120 mm. To collect eggs, we removed the female roundworm to a new culture flask every 24 or 72 h. After 1 week in these culture conditions, the worms were exhausted. Harvested *Toxocara* eggs were centrifuged, washed, and incubated for 1 month until larvae development in 1.0% formaldehyde and PBS pH 7.0 at room temperature. To determine which method was superior, we counted the embryonated eggs collected using each method in a Neubauer chamber. We carried out each of the experiments blindly, with paired female worms retrieved from a worm batch isolated from a puppy. To avoid bias, two independent observers counted the number of eggs retrieved. We carried out three experiments in triplicate ($N=27$ female worms). The chi-square test was used for statistical analysis, at an alpha level of 0.05.

Results

The graphs show efficiency in the recovery of eggs using both methods. In Fig. 1, there were no significant differences between the size of the egg population recovered by UEM ($n=9$ females) and the female culture after a week [FCM_W, ($n=9$; $p>0.05$)]. On average, there were 113,167 eggs retrieved by UEM in contraposition with 119,556 eggs by FCM_W.

On the other hand, Fig. 2 shows significant statistical differences between methods ($p<0.05$), taking in account

embryonated eggs. In this case, there were 18,889 embryonated eggs with UEM; 54,883 (1:3 ratio) and 79,889 (1:4 ratio) embryonated eggs with FCMd and FCMw, respectively.

Discussion

Human toxocariasis, extraintestinal migration of *T. canis* larvae, is a neglected parasitic disease in many places of the underdeveloped world. Its diagnosis depends on the demonstration of specific E/S *Toxocara* antibodies by means of immunological tests, such as ELISA. A cornerstone important for avoiding pitfalls is E/S purity and concentration. We consider that our FCM is an alternative, which can be used to obtain highly pure and concentrated antigen because it is very efficient for obtaining fertilized *T. canis* eggs in SGHP solution, keeping female worms producing eggs. SGHP can hold a female worm in a continuous outputting egg process for at least a week.

It is known that E/S concentrations are in a direct relationship with the *T. canis* L2 population size maintained in RPMI. In addition, the larval population derives from fertilized eggs isolated from the female worm population. When uterus worms are retrieved, some unfertilized ova and fertilized eggs are probably also being harvested. In contrast, our method requires only careful elimination of the bacterial population before carrying out the female culture. The use of a paintbrush to remove adherent secretions from the worm body and chilling in 1% formaldehyde solutions makes it possible to obtain sterile female worms for culturing in a glucose-rich solution. Under xenic conditions, the female worms die within 3 days, while in bacteria-free solutions, female worms were able to survive for up to 8 days, producing fertilized eggs, which can evolve to an egg containing a mobile embryo. On the other hand, bacteria-free eggs made it easy to establish the hatching process and culture larvae under axenic conditions. In the present study, we carried out all experiments in a sterile environment using a laminar vertical flow cabinet, sterile solutions and plastic material. These circumstances were advantageous since there was no contamination with bacterial antigens, resulting in very high quality egg batches.

In addition, if there is any taxonomic uncertainty in relation to certain egg batches or *T. canis* females, it is possible to test the identity of the species by polymerase chain reaction (PCR) and single-strand conformational polymorphism (SSCP) using described primers to discriminate between *T. canis*, *T. cati*, *T. vitulorum*, *Ascaris sum*, and *Toxascaris leonina* (Ming-Wei et al. 2006).

Eggs output results in experiments in which the worms were changed every 24 h showed that, in the first culture

day, egg production was frequently between 55,000 and 80,000 eggs, and in subsequent days, egg output declines, as demonstrated by the number of eggs calculated after 1 week of culture. Our data are higher than reports by Richards and Lewis (2001) probably because they estimated the size of egg populations from death worm uteri. In our study, eggs were counted from live worms, maintained under artificial conditions in culture medium, which apparently drove the worms to senescence after 8 to 10 days. We are not sure if the dispersion in our results is due to differences in parasitic batches. However, Prociv (1989), using the *T. pterodopsis* model, found wide fluctuations in daily egg output and in egg fertility. To avoid bias in our work, we carried out all experiments in a blindly paired fashion, with female worms from the same batch and, therefore, exposed to the same selection pressures.

Conclusions

We describe in this paper a more efficient and cheap in vitro method to isolate fertilized *T. canis* eggs (at a 3:1 and 4:1 ratio superior to UEM).

With the culture method, procedures are conducted under sterile conditions and, consequently, reducing the contamination probability with bacterial antigens.

One additional benefit was that each individual female worm was kept producing her own egg batch. If there was any uncertainty in worm morphological typing, it was always possible to retest larvae taxonomic status using molecular tools. Finally, this method could be used to culture other intestinal roundworms.

References

- Bass JL, Mehta KA, Glickman LT, Eppes BM (1983) Clinically in apparent *Toxocara* infection in children. *N Engl J Med* 308:723–724
- Beaver PC, Snider CH, Carrera GM, Dent JH, Lafferty JW (1952) Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. Report of three cases. *Pediatrics* 9:7–19
- Burke MT, Robertson EL (1985) Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*: experimental infection of the bitch at midpregnancy and at parturition. *Int J Parasitol* 15:485–490
- Despommier D (2003) Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev* 16:265–272
- Glickman LT, Schantz PM, Dombroske R, Cypess RH (1978) Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *Am J Trop Med Hyg* 27:492–498
- Glickman LT, Schantz PM, Cypess RH (1979) Epidemiological characteristics and clinical findings in patients with serologically proven toxocariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73:254–258
- Herrmann R, Glickman LT, Schantz PM, Weston MG, Domansky LM (1985) Seroprevalence of zoonotic toxocariasis in the United States: 1971–1973. *Am J Epidemiol* 122:890–896

- Ming-Wei L, Xiang-Quan Z, Robin BG, Rui-Qing L, Rehana AS, Zhao-Rong L, Dennis EJ (2006) The occurrence of *Toxocara malaysiensis* in cats in China, confirmed by sequence-based analysis of ribosomal DNA. *Parasitol Res* 99:554–557
- Overgaauw PAM (1994) Toxocariosis in dogs and cats. *Vet Q* 16:155–165
- Ponce-Macotela M, Peralta-Abarca GE, Martínez-Gordillo MN (2005) *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico City. *Vet Parasitol* 131:1–4
- Prociv P (1989) Observations on egg production by *Toxocara pterodopsis*. *Int J Parasitol* 4:441–443
- Richards DT, Lewis JW (2001) Fecundity and egg output by *Toxocara canis* in the red fox, *Vulpes vulpes*. *J Helminthol* 75: 157–164
- Schantz PM, Glickman LT (1978) Toxocaral visceral larva migrans. *New Engl J Med* 298:436–439
- Styles TJ (1967) Incidence of *Toxocara canis* and other helminth parasites of dogs in Mexico City. *J Parasitol* 53:822–823
- Vidal JE, Sztajnbock J, Seguro AC (2003) Eosinophilic meningoencephalitis due to *Toxocara canis*: case report and review of the literature. *Am J Trop Med Hyg* 69:341–343