



Universidad Nacional  
Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

---

---

**Detección de ADN de *Toxocara canis* en  
sangre de conejos infectados  
experimentalmente**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:  
Médico Veterinario Zootecnista

Presenta:

Francisco Rosales Chanes

Asesor: Dr. Fernando Alba Hurtado

Coasesor: Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

UNAD  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

**Detección de ADN de Toxocara canis en sangre de conejos infectados experimentalmente**

Que presenta el pasante: **FRANCISCO ROSALES CHANES**

Con número de cuenta: **40801887-8** para obtener el Título de: **Médico Veterinario Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de marzo de 2015.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
<b>VOCAL</b>	Dr. Fernando Alba Hurtado	
<b>SECRETARIO</b>	Dr. Miguel Ángel Cornejo Cortés	
<b>1er SUPLENTE</b>	M.V.Z. Melión Lara Rocha	
<b>2do SUPLENTE</b>	M.V.Z. Eloise Chino Rosario	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen, el profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.

(Art 127 REP)

HrIA/Vc

## *DEDICATORIA*

*A todos aquellos que fueron, son y serán parte de lo mejor de mí, porque los quiero mucho, y sé ustedes me quieren con la misma intensidad.*

*A mi madre, Yolanda Chanes Zamora*

*Por darme la vida, por abrigarme, por protegerme, por educarme, por todo tu amor incondicional; tu fuerza, y tu amor me han sabido dirigir por la vida y me han dado las armas que necesito. Quisiera compensarte por todo lo que me has dado hasta ahora, pero no existe en el universo algo tan inmensamente valioso que se le compare. Me siento orgulloso de ser tu único hijo, Te quiero Yulís,*

*A mi padre, Francisco Rosales González*

*Por el apoyo que me has brindado, no sólo en la escuela, sino en la vida; por los momentos en los que convivimos, que a pesar de ser breves, he aprendido con tu ejemplo a ser un hombre trabajador, honesto y honrado. Te quiero papá.*

*A mi abuela, Cira Zamora Arcos (QEPD)*

*Por tu infinito amor incondicional, por ser una segunda madre, por ser una mujer fuerte, inteligente y protectora que nos amó a sus hijos y nietos a pesar de todo y nos mantuvo unidos. Te admiro y te quiero, nos haces mucha falta.*

*A mi amada familia Chanes Zamora*

*Mis tíos Fernando, Noé, Silvia, Rosalía, José Luis, Paty, Norma, Aurora y Paulo.*

*Mis primos Reyna, Mayra, Ulises, José Luis, Cintía, Dulce y mi sobrina Adenerí.*

*Porque somos una gran familia unida, ustedes me han guiado, me han enseñado, he compartido momentos especiales, felices y tristes y no nos hemos dejado vencer ante las adversidades. Este trabajo también es de ustedes.*

*A mis muy queridas amigas y colegas  
Aídee, Lucy, Lupita, Damaris, Marylu, Lety, Angie, Laura y  
Katy.*

*Quienes conocí alguna vez en un salón o laboratorio de la facultad y desde  
ese día volvernó inseparables para estudiar, jugar, bromear, echar relajo  
y sobre todo aprender de otras especies. Las quiero.*

*A mi amiga Rosy y la familia León Barragán.  
Que a pesar de la gran distancia geográfica que nos separa, seguimos  
siendo los mejores amigos. Los quiero.*

*A Robbin Isaac, Cínder Grisita, Eevangeline Manuela III, Sandy y  
Rayito  
Anubis, Bruno, Manuela I, Bastet, Goro, Mijari, Pechán, Goldy*

*Y a todos los seres que no hablan humano, pero les pude comprender con el  
lenguaje del alma. Ellos me inspiraron para elegir, iniciar, continuar y  
terminar esta preciosa carrera. Va por ustedes, mascotas queridas.*

*Francisco Rosales Chanes*

*“Quiero dominar el mundo. Cada vez que alcanzo la cima de un pico  
descubro otro al que quiero subir. Es como si no pudiera parar. Quizá  
debería descansar y admirar el paisaje, pero no puedo. Tengo que seguir.  
¿Por qué? No lo sé”*

*Madonna*

## *AGRADECIMIENTOS*

*A la omnipotente fuerza creadora y transformadora*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México y a mi querida Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.*

*A mi familia y todos mis amigos.*

*A los doctores Fernando Alba Hurtado y Marco Antonio Muñoz Guzmán, por asesorarme y guiarme en la realización de esta tesis.*

*A Iván Pérez Luna, quien me enseñó las técnicas útiles para desarrollar y concluir este trabajo.*

*A mis compañeros y amigos del laboratorio 1, Lucy, Aídee, Mario y Lorena, etcétera.*

*Al técnico académico M. en C. Cesar Cuenca Verde, por el apoyo técnico brindado a este trabajo.*

*A los médicos Roberto y Estela, por integrarme en el equipo de trabajo de La Huella, con Isaac y Coco, y dejar que adquiriera experiencia.*

*A los conejos.*

*Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyectos IN-215314 e IN-216913 de la UNAMAS*

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MORFOLOGÍA.....	2
CICLO BIOLÓGICO.....	3
EPIDEMIOLOGÍA.....	5
PATOGENIA.....	5
SEMIOLOGÍA.....	6
TOXOCARIOSIS EN HUMANOS.....	6
DIAGNÓSTICO DE LA TOXOCARIOSIS.....	8
JUSTIFICACIÓN.....	12
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
LUGAR DE REALIZACIÓN.....	15
ANIMALES EXPERIMENTALES.....	15
OBTENCIÓN DE GUSANOS ADULTOS DE <i>T. canis</i> .....	15
OBTENCIÓN Y CULTIVO DE HUEVOS DE <i>T. canis</i> .....	15
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	16
MONITOREO DE INFECCIÓN.....	16
MODIFICACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE KNOTT PARA LA CONCENTRACIÓN DE LARVAS DE <i>T. canis</i> DE LA SANGRE .....	17

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO (ADNg).....	17
ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR.....	18
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIÓN.....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28



## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1: Nombre y secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación del fragmento ITS-2 de <i>Toxocara canis</i> .....	18
FIGURA 1: Ciclo biológico de <i>Toxocara canis</i> .....	4
FIGURA 2: Lesiones hemorrágicas observadas en el día 20 pos-infección en pulmones de conejos infectados con 5000 huevos larvados de <i>Toxocara canis</i> .....	20
FIGURA 3: Promedio ( $\pm$ DS) del número de larvas recuperadas en los sedimentos de las muestras de sangre obtenidos por la técnica de Knott modificada .....	21
FIGURA 4: Amplificación por PCR del fragmento ITS-2 de <i>Toxocara canis</i> a partir de ADN extraído de sedimentos obtenidos por técnica modificada de Knott con diferentes concentraciones larvarias.....	22
FIGURA 5: Amplificación por PCR del fragmento ITS-2 de <i>Toxocara canis</i> a partir de muestras (negativas) de sangre (procesadas por técnica modificada de Knott) de conejos infectados experimentalmente con <i>T. canis</i> .....	23

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue estandarizar una técnica para la concentración de larvas de *T. canis* presentes en sangre para su detección molecular en conejos infectados con el parásito. Se infectaron 35 conejos Nueva Zelanda con huevos larvados de *T. canis* y se sacrificaron grupos de cinco a diferentes tiempos post-infección, 3, 5, 10, 20, 30 y 60 días, se tomaron muestras de pulmón e hígado y se realizaron digestiones artificiales para la búsqueda de larvas, además se observaron las lesiones macroscópicas en los órganos más afectados. La sangre obtenida fue procesada por una técnica de Knott modificada para evaluar la concentración de larvas de *T. canis*. De los concentrados obtenidos se extrajo el ADN total para la realización de la PCR. La infección con *T. canis* produjo lesiones hemorrágicas en pulmones e hígado de los conejos infectados. Las muestras de pulmón e hígado de todos los conejos infectados fueron positivas a la presencia de larvas de *T. canis* en la digestión artificial. Durante la estandarización de la técnica de Knott modificada se logró la sedimentación y el conteo de larvas de *T. canis* a partir de sangre de conejos con 100, 50, 25 y 10 larvas/mL. Los cebadores YY1/NC2 amplificaron los productos esperados (330 pb) de las muestras de 100, 50 y 25 larvas/mL así como de gusanos adultos y larvas de *T. canis*, sin embargo, no se obtuvieron amplificadores positivos en ninguna muestra de sangre obtenida de los conejos infectados. Estos resultados mostraron la eficiencia de la modificación de la técnica de Knott para la recuperación de larvas de *T. canis* en muestras de sangre sin alterar el DNA del parásito para su detección molecular. La falta de detección molecular del parásito en las muestras de sangre de los conejos infectados posiblemente fue debido a una baja concentración larvaria en las muestras, menos de 25 larvas/mL.

## INTRODUCCIÓN

La Toxocariosis es una enfermedad parasitaria causada por la presencia y acción del nematodo *Toxocara canis*, caracterizada por disturbios entéricos en el hospedador definitivo, así como los síndromes de *Larva migrans visceral* (LMV), *Larva migrans ocular* (LMO) y toxocariosis encubierta en hospedadores paraténicos, principalmente el humano, provocados por la segunda fase del estado larvario del parásito (Quiroz, 2003).

Es una de las más importantes enfermedades parasitarias de perros y otros cánidos ya que su distribución geográfica es cosmopolita; en México es el helminto más común (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2011). Las infecciones masivas por *T. canis* provocan molestias abdominales intensas en los cachorros lactantes, pues los vermes se enmarañan formando nudos, provocando la muerte por ruptura u obstrucción del intestino. El aspecto de mayor importancia es su carácter zoonótico, la infección en el humano es por la ingestión de huevos embrionados infectantes. Los niños pequeños están especialmente expuestos cuando juegan con tierra contaminada o cuando tienen contacto corporal estrecho con perros que llevan adheridos a su pelaje huevos infectantes de *Toxocara* (Overgaauw, 1997).

## Morfología

*T. canis* es un ascárido que se encuentra en el duodeno de cánidos jóvenes durante sus primeros tres meses de vida. Tiene coloración blanquecina, los machos adultos miden de 4 a 10 cm y las hembras hasta 18 cm de longitud, presenta tres labios en el extremo anterior y un bulbo esofágico glandular localizado en la unión del esófago e intestino, posee aletas cervicales que le dan aspecto de punta de flecha. Una hembra puede producir hasta 200,000 huevos al día, éstos son esféricos, oscuros, de superficie irregular, de 75 a 90 micrómetros (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2011; Beck, 2010).

## Ciclo biológico

El ciclo de *T. canis* es complejo y varía dependiendo de la edad del hospedador definitivo y de la posible intervención de hospedadores paraténicos. Inicia con la eliminación de huevos en el excremento de cachorros parasitados que bajo condiciones óptimas de humedad, temperatura y oxígeno, desarrolla la larva 2 (L2) pasiva, la cual es la fase infectante. La infección ocurre cuando los perros, los humanos u otros hospedadores susceptibles ingieren huevos larvados, la eclosión de las L2 es en el duodeno, ahí la larva atraviesa la pared intestinal (Schacher, 1957, Webster 1958b).

En los cachorros menores de tres meses, las larvas pasan por vía linfática o sanguínea, a nodos linfáticos o al hígado, continúan hacia corazón y pulmones, la mayoría pasa por bronquios, tráquea y faringe y es deglutida (Webster, 1958b). La muda para el tercer estado larvario es en pulmón, tráquea y esófago. En el intestino se realiza la siguiente muda, que da a lugar a la cuarta larva, que crece hasta convertirse en adulto, copula y de 4 a 5 semanas después los huevos son eliminados en las heces (Webster, 1958a).

En perros adultos y hospedadores paraténicos, las larvas que llegan a los pulmones regresan al corazón y se distribuyen a través de la circulación sanguínea (migración somática), llegando principalmente al músculo estriado, hígado, pulmones, riñones y cerebro donde permanecen en estado de hipobiosis como larvas somáticas infectantes por años, hasta que mueren o se calcifican. En el humano, siendo hospedador paraténico, la migración somática incluye la circulación de larvas por el torrente sanguíneo (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2011).

En las perras, las larvas somáticas hipobióticas que puedan estar presentes en sus tejidos, se reactivan y movilizan hacia la placenta y glándula mamaria, produciéndose de esta forma la infección intrauterina de los cachorros, produciendo infecciones perinatales y ocasionando que la perra se re-infecte con la materia fecal de sus cachorros, cuando estos nacen, debido a los hábitos de

limpieza. En la perra lactante, la eliminación de larvas por calostro y leche se inicia inmediatamente después del parto. Los cachorros continuamente se reinfectan con las larvas a través de la ingestión de calostro y leche, este modo de infección no implica migración compleja, pues las larvas se desarrollan directamente hasta adultos en el intestino (Lloyd *et al.*, 1983).

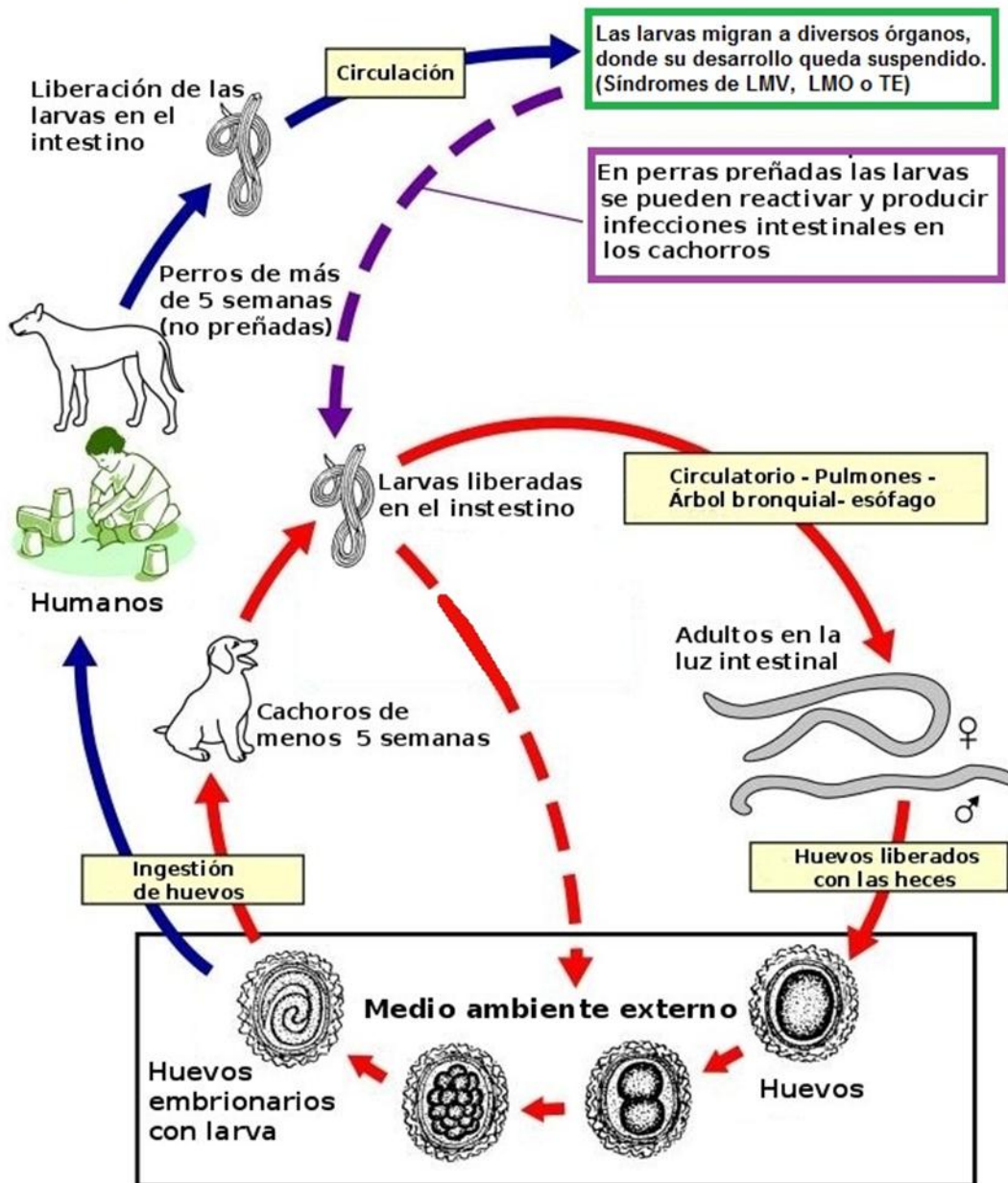


Figura 1. Ciclo biológico de *Toxocara canis*. Fuente: CDC [cdc.gov/dpdx/](http://cdc.gov/dpdx/)

## **Epidemiología**

La toxocariosis es una de las helmintiasis intestinales más frecuentes de perros en el mundo y con alta prevalencia, por lo que la mayoría de los perros cachorros recién nacidos están infestados con *Toxocara canis* (Cordero *et al.*, 1999; Quiroz, 2003). La contaminación se debe a los perros callejeros o caseros que al salir a la calle y defecar, contaminan un área determinada con huevos o estadios larvarios de parásitos. Los parques públicos que tienen un acceso sin control de los perros y los gatos son la fuente importante de infección para humanos. Especialmente los niños menores de 5 años de edad, por sus hábitos de juego, se llevan tierra a la boca de manera accidental, esto aunado a la presencia de cachorros y el contacto estrecho con ellos, puede llevar a la ingesta de miles de huevos. Otra razón por la que la prevalencia de *T. canis* sea tan alta, es su alto poder biótico (200,000 huevos por hembra por día), si se considera que un cachorro puede albergar varias decenas de parásitos, el medio en el que vive puede quedar contaminado con millones de huevos (Dada *et al.*, 1979; Stewart *et al.*, 1986; Esparza-Lozano, 2004).

## **Patogenia**

En los cachorros, las fases adultas en el intestino se alimentan de contenido intestinal por lo que compiten con el hospedador por los nutrientes y dependiendo del número pueden producir diferentes grados de desnutrición; también provocan irritación en la luz intestinal, que genera tanto la disminución en la absorción de nutrientes, así como diarrea y vómito en algunos cachorros. Además ejercen una acción mecánica en el intestino que obstruye el flujo normal de este órgano.

En los hospedadores paraténicos y accidentales como el humano, la migración larvaria tiene un efecto traumático sobre los órganos y tejidos por los cuales estas larvas transitan, principalmente se afectan el hígado, pulmón, riñón, músculo y cerebro. La presencia de la larva produce ruptura de capilares y alveolos en

pulmones, acción expoliatriz hematófaga, histófaga y de líquidos tisulares, acción mecánica por obstrucción de vasos capilares sanguíneos y linfáticos, y un efecto proinflamatorio dado principalmente por los antígenos de excreción-secreción de la larva de *T. canis* (AgESTc), caracterizado por formación de granulomas con infiltrado eosinofílico que además contiene neutrófilos, linfocitos, histocitos epiteloideos y células gigantes (Quiroz, 2003).

## **Semiología**

Los cachorros con infecciones moderadas o leves no presentan manifestaciones clínicas aparentes, sin embargo la migración de larvas en infecciones intensas pueden provocar signos respiratorios como tos, taquipnea y flujo nasal. Los signos nerviosos como incoordinación o convulsiones ocasionalmente observados en cachorros pueden ser debidos al paso de las larvas por el cerebro (Kassai, 2002; Quiroz, 2003).

## **Toxocariosis en humanos**

En el humano se han descrito algunas formas de manifestación clínica, como el síndrome de *Larva Migrans Visceral* (LMV), *Larva Migrans Ocular* (LMO) y toxocariosis encubierta (TE).

El cuadro de LMV fue reportado por primera vez en la década de los 50's cuando la L2 de *T. canis* fue encontrada e identificada en los tejidos de varios niños (Beaver 1952). Clínicamente, la gravedad de la enfermedad varía según el número de huevos larvados ingeridos, la duración de la infección, la presencia de larvas en lugares críticos y otros factores aún no entendidos (Beaver *et al.*, 1986). La mayoría de las infecciones humanas por *T. canis* cursan asintómicamente o con signos muy leves (Bass *et al.*, 1989).

Las lesiones en los órganos pueden ser de tipo agudo o crónico. Los principales órganos afectados son el hígado, pulmón y riñón. Estas lesiones pueden verse

con o sin la presencia de la larva y esto sugiere la importancia de los productos antigénicos liberados por la larva en los tejidos. La lesión crónica característica es el granuloma, en el cual puede verse una gran infiltración por células mononucleares, fibroblastos y eosinófilos, así como la presencia de fibrosis alrededor de la lesión con trazas de calcificación en el centro que en algunos casos puede ser extensa (Parson *et al.*, 1986).

Se han descrito cuentas leucocitarias de 30,000 a 100,000 por mm<sup>3</sup> y con una elevación de un 50 a 90 % del nivel de eosinófilos con respecto al normal (Limaye *et al.*, 1990). En casos más graves se reportan historias de pica, fiebre, hepatomegalia, hiperglobulinemia y dolor abdominal. La mayoría de los pacientes se recuperan y sólo algunos llegan a morir (Beaver *et al.*, 1986).

La presencia y el daño producido por larvas de *T. canis* en el ojo caracterizan a la LMO. Este síndrome fue descrito por primera vez por Wilder en 1950, quien encontró larvas de *T. canis* en 24 de 46 pseudogliomas en ojos enucleados por endoftalmítis con aparente retinoblastoma (Wilder, 1950; Glickman *et al.*, 1979). La LMO se observa generalmente en ausencia de otros signos y síntomas de LMV, (Schantz *et al.*, 1979; Glickman, 1987). La invasión de larvas a las estructuras del ojo produce lesiones de gravedad con pérdida de visión, generalmente unilateral. En la fase aguda aparecen endoftalmítis y uveítis, y en la crónica, granulomas del polo posterior con fibrosis; en la mayoría de casos, hay ausencia de otros signos o síntomas (Magnaval; 2001).

La infección por *T. canis* raramente resulta en enfermedad ocular y sistémica al mismo tiempo; estas diferencias clínicas y epidemiológicas entre LMV y LMO pueden estar relacionadas con la dosis ingerida en el organismo (Morales, 1999).

La TE permanece sin diagnosticar frecuentemente pero puede ocurrir comúnmente. Se caracteriza por síntomas y signos no específicos no incluidos dentro de las categorías LMV, LMO. La TE parece depender en menor grado de la reacción local a las larvas de *T. canis* pero son varios órganos incluidos en la respuesta inmunopatológica del hospedador. Los órganos predispuestos pueden



diferir en los diferentes individuos y debido a esto la expresión clínica de la TE varía ampliamente. Se puede presentar compromiso pulmonar como asma, bronquitis aguda, neumonía, con o sin síndrome de Loeffler (Buijs *et al.*, 1994).

Los pacientes que padecen asma y presentan anticuerpos IgE e IgG anti-*Toxocara* son considerados como casos de toxocariosis, también pueden presentarse afecciones dérmicas como urticaria y prurito, infadenopatía, miositis y síndrome pseudoreumático como artralgia y artritis eosinofílica y linfocítica, dolor abdominal, síndrome de irritación intestinal, vasculitis sistémica y equimosis (Soliz-Antezana, 2009).

## **Diagnóstico de la toxocariosis**

El diagnóstico de la toxocariosis canina es relativamente sencillo mediante la observación de huevos en heces por medio de técnicas de flotación y faust y la expulsión de gusanos con el vómito, y heces. A la necropsia se observan lesiones en hígado, pulmón y riñones; con presencia de nematodos adultos en intestino delgado. Signos clínicos, acompañados de una eosinofilia intensa, aumento de lactato deshidrogenasa láctica y transaminasa alcalina en las primeras semanas de vida (Quiroz, 2003).

En los seres humanos, los signos clínicos y resultados asociados con LMV y LMO son inespecíficos y pueden señalar otras de causas posibles de infección. Debido a que las larvas de *T. canis* no completan su ciclo biológico en humanos, nunca se pueden encontrar huevos en las heces, por lo que no es posible dar un diagnóstico por medio de exámenes coproparasitológicos, además, la biopsia puede no tener éxito o estar contraindicada. Por consiguiente, en la práctica el diagnóstico presuntivo puede basarse en signos clínicos, resultados de laboratorio, historia de geofagia y convivencia con perros, principalmente cachorros. En exámenes de laboratorio se encuentra comúnmente leucocitosis con predominio de eosinófilos. La confirmación del diagnóstico debe realizarse con

la búsqueda de anticuerpos específicos en el suero a través de pruebas serológicas (Huntley, 1965).

Para el inmunodiagnóstico se han empleado múltiples pruebas que incluyen fijación de complemento, inmunodifusión, hemoaglutinación directa, inmunofluorescencia, y radioinmunoensayo. Estas pruebas varían en sensibilidad y especificidad, principalmente por diferencias en el estado del antígeno parasitario empleado (adulto o larva, somáticos o de excreción-secreción), la definición del título diagnóstico y las modificaciones en las técnicas del laboratorio (Morales, 1999; Glickman, 1981).

Las larvas de *T. canis* producen una serie de glicoproteínas, que son reconocidas antigénicamente y se conocen como antígenos de secreción-excreción (AgSETc), estos antígenos aparentemente varían de acuerdo a las diversas condiciones fisiológicas del nematodo y forman parte de la envoltura externa del mismo (Maizels *et al.*, 1984; Page *et al.*, 1992) La mejor elección para el serodiagnóstico de las diferentes formas de toxocariosis se basa en el uso inicial de pruebas de ELISA empleando AgESTc, después de cualquier resultado positivo, posteriormente, debe ser probado por Western Blot (Magnaval, 1991).

La prueba de ELISA ha sido desarrollada y está dirigida principalmente para la detección de anticuerpos IgG anti-*Toxocara* con una sensibilidad que varía entre 80 y 100% y una especificidad del 90-95%. Estos indicadores pueden variar según la región geográfica, en países tropicales donde existen zonas endémicas de otras helmintiasis y problemas de poliparasitismo, las reacciones cruzadas suelen ser más frecuentes y, por lo tanto, se obtienen falsos positivos con más frecuencia (Magnaval y col., 2001; Finstener y col., 2007; Fu, 2014).

La técnica de Western Blot supera a las pruebas utilizadas convencionalmente en cuanto a sensibilidad y especificidad, además permite la realización de estudios seroepidemiológicos en las diferentes regiones donde esta parasitosis es un problema de salud pública. Por Western blot se han determinado dos patrones de AgESTc que son reconocidos por sueros humanos a los que se les llamó LMW

(*Low Molecular Weight*, bajo peso molecular) y HMW (*High Molecular Weight*, alto peso molecular), estos grupos fueron correlacionados con una prueba de ELISA ampliamente usada para el diagnóstico de toxocariasis, resultando el WB una prueba más específica con la que es posible reducir el margen de error del diagnóstico. En el patrón de HMW formado por bandas de 200, 147 y 132 kD hay mayor reacción cruzada con otros helmintos, mientras que la fracción LMW formada por bandas de 24, 28, 30 y 35 kD es más específica para el género *Toxocara* (Magnaval *et al.*, 1991).

Sin embargo, se ha demostrado que los AgESTc pueden cruzar con antígenos de otros nematodos como: *Anisakis simplex*, *Taenia solium*, *Strongyloides sp*, *Fasciola hepática*, metacestodo de *Echinococcus granulosus*, *Toxascaris leonina*, *Schistosoma sp* y *Oncocerca sp* y dar falsos positivos.(Magnaval *et al.*, 2001; Perteguer y col., 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase chain reaction, PCR) es una técnica que permite una rápida selección, aislamiento, amplificación y secuenciación de ADN de pequeñas cantidades de tejido; un fragmento específico de ADN es seleccionado de un genoma complejo y se amplifica enzimáticamente *in vitro*, el ADN genómico de doble cadena es desnaturalizado por calor, reduciendo posteriormente la temperatura para permitir que los cebadores específicos se acoplen con sus secuencias complementarias, sobre las hebras opuestas del ADN, catalizando por una enzima polimerasa; los productos resultantes son de doble cadena y el procedimiento se repite varias veces. La secuencia específica de ADN es replicada por un factor de 2 en cada ciclo, produciendo una amplificación enorme del fragmento de ADN específico original, que está disponible para su manipulación posterior (Kassai, 2002). Es en general una prueba de mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas inmunológicas y ha sido empleada para el diagnóstico e identificación de especies de protozoarios como: *Plasmodium*, *Leishmania*, *Toxoplasma* (Weiss, 1995) y *Trypanosoma* (Desquensnes and Dávila, 2002), así como algunos helmintos como: *Trichinella spiralis* (Dupouy-Camet *et al.*, 1991) y *Onchocerca vulvulus* (Meredith *et al.*, 1991).

Para la identificación molecular de *T. canis* se ha empleado principalmente la región de espaciador transcrito interno 1 y 2 (ITS-1 e ITS-2) del ADN ribosomal, utilizando técnicas como PCR convencional, PCR-RAPD y RFLP (Chen *et al.*, 2012). Algunos autores han logrado diferenciar exitosamente *T. canis* de *T. cati* y *T. leonina* utilizando los cebadores Tcan1 y NC2 (Jacobs *et al.*, 1997) o utilizando los cebadores YY1 y NC2 (Lie *et al.*, 2007).

Aunque existen varios trabajos que reportan la identificación específica de *T. canis* por técnicas moleculares, sólo existe en la literatura un reporte de identificación molecular del parásito a partir de animales infectados. Boreka *et al.* (2008) utilizando PCR convencional detectaron larvas de *T. canis* en tejido hepático de jerbos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) infectados con 1000 huevos del parásito, sin embargo los autores no reportaron amplificaciones positivas a partir de otros órganos.

El ciclo biológico de *T. canis* tiene fases en las que puede ser factible encontrar larvas en la circulación sanguínea u otros líquidos corporales como el humor acuoso, tomando en cuenta las dificultades antes mencionadas en las técnicas de diagnóstico serológico, es interesante explorar la posibilidad de una detección molecular del parásito a partir de muestras sanguíneas, lo anterior podría contribuir al mejoramiento del diagnóstico de la toxocariosis.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a que las larvas de *T. canis* no completan su ciclo de vida en el humano y otros hospedadores paraténicos, no es posible detectarlas mediante exámenes coproparasitológicos. Por lo tanto, para determinar la presencia del parásito, son indispensables las pruebas de inmunodiagnóstico, como ELISA y Western Blot, para detectar antígenos de secreción-excreción de *T. canis*. Sin embargo, estas pruebas no presentan una especificidad y/o sensibilidad suficientes ya que hay cruce antigénico con otros ascaridos, dando resultados falsos positivos.

La PCR es una técnica de mayor sensibilidad y especificidad, en la que se replica una secuencia determinada de ADN para definir o diagnosticar la especie de un organismo. Se ha logrado diseñar cebadores específicos para la secuencia ITS-2 de las especies de ascáridos, así como de *T. canis* para poder detectarlos mediante este procedimiento. Se han realizado estudios en donde ha sido posible la detección molecular del parásito en algunos tejidos como hígado (Boreka *et al.*, 2008), sin embargo, no en todos los casos es posible el acceso a muestras tisulares para la detección molecular. Las larvas de *T. canis* pasan por algunos periodos por la circulación sanguínea del hospedero paraténico, por lo que su detección en la sangre podría ser posible. Es por ello que en el presente estudio se pretende detectar la secuencia de ADN específico de *T. canis* en torrente sanguíneo, ya que esta ruta es el medio de transporte de las larvas de *T. canis* siguen dentro de cualquier hospedador después de infectarse con ellas, lo anterior podría ofrecer una herramienta útil para el diagnóstico.

## **HIPÓTESIS**

Si las larvas de *T. canis* migran a través de la circulación sanguínea, entonces es posible amplificar por PCR un fragmento específico del ADN de *T. canis* a partir de sangre de conejos infectados experimentalmente con el parásito.

## OBJETIVOS

- Estandarizar la técnica de PCR para la amplificación del segundo espaciador interno transcrito (2<sup>nd</sup> *Internal Transcribed Spacer*, ITS-2) de *T. canis*.
- Detectar el fragmento de ITS-2 en muestras de sangre de conejos infectados a con *T. canis*, obtenida en diferentes tiempos post-inoculación.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Lugar de realización**

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES-Cuautitlán, UNAM, campo 4, en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Los conejos fueron alojados en el área de corrales de Posgrado de la misma Facultad.

### **Animales experimentales**

Se utilizaron 35 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 70 días de edad con un peso promedio de 2 kg. Antes del experimento los animales fueron adaptados a las condiciones experimentales y se mantuvieron en observación durante una semana. Cada conejo se colocó en una jaula individual de aproximadamente 1 X 0.6 m con comedero de tolva y bebedero automático, el área de alojamiento se acondicionó con cortinas de plástico y se monitoreó diariamente la temperatura y humedad con un termómetro ambiental. Los animales se mantuvieron con alimento balanceado comercial y agua *ad libitum*.

### **Obtención de gusanos adultos de *T. canis***

Se realizaron necropsias a cachorros sacrificados en el antirrábico de Cuautitlán, México. El intestino delgado fue incidido y fueron recolectados gusanos adultos de *T. canis*. Los gusanos obtenidos se depositaron en un recipiente limpio, se lavaron varias veces con agua, y se colocaron en solución salina fisiológica para su transporte en refrigeración al laboratorio, en donde fueron identificados y guardados hasta su utilización.



## **Obtención y cultivo de huevos de *T. canis*.**

La obtención y cultivo de los huevos de ascaroideos se realizó modificando el método de Oshima, (1961). Se procesaron por separado hembras de cada especie en una caja de Petri con solución salina, se realizó una incisión para obtener los huevos. Los restos de los parásitos fueron eliminados con un colador fino, los huevos fueron lavados y resuspendidos en una solución de formol al 2% e incubados a temperatura ambiente durante 28 días. La embrionación de los huevos fue monitoreada a partir de los 20 días.

## **Diseño experimental**

Los conejos fueron divididos en 7 grupos experimentales ( $n = 5$ ). Cada grupo experimental fue inoculado por sondeo esofágico con 5000 huevos larvados de *T. canis* por conejo. En los días 1, 3, 5, 10, 20, 30 y 60 post-inoculación (p.i.) se sacrificaron humanitariamente los conejos de cada grupo experimental bajo la norma NOM-033-ZOO-1995, se obtuvo por punción intracardiaca sangre con anticoagulante y se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Para monitorear la infección de los animales se tomaron muestras de pulmón e hígado y se realizaron digestiones artificiales para la búsqueda de larvas, además se observaron las lesiones macroscópicas en los órganos más afectados. La sangre obtenida fue procesada por una técnica de Knott modificada para evaluar la concentración de larvas de *T. canis*. De los concentrados obtenidos se extrajo el DNA total para la realización de la PCR.

## **Monitoreo de la infección**

A la necropsia se inspeccionaron los órganos abdominales de todos los conejos para la búsqueda de lesiones macroscópicas. Las muestras de hígado y pulmón colectadas de los conejos del día 3 p.i. fueron seccionadas finamente y colocados en un tubo de ensaye con una solución de pepsina al 1% en HCl al 1% (pH 1.7)

durante 24 horas, posteriormente los digeridos fueron observados al microscópio para la detección de larvas.

### **Modificación y estandarización de la técnica de Knott para la concentración de larvas de *T. canis* de la sangre**

Se realizaron preparaciones de 10, 25, 50 y 100 larvas de *T. canis* suspendidas en 1 mL de sangre de ovino para estandarizar la prueba. Para la concentración de las larvas, se mezcló 1 mL de sangre con larvas con 9 mL de una solución de KCl 0.075 M y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente la mezcla se homogeneizó lentamente para favorecer la hemólisis y se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos con el objeto de romper membranas eritrocíticas y sedimentar las larvas. El sedimento se lavó tres veces con solución de KCl hasta obtener un sobrenadante claro. El sedimento de tres repeticiones se observó bajo un microscopio de campo claro para el conteo de larvas. Los sedimentos se procesaron para la extracción de ADN para las pruebas de PCR.

### **Extracción del ADN genómico (ADNg)**

El aislamiento del ADNg a partir de gusanos adultos y larvas de *T. canis* así como a los sedimentos obtenidos por la técnica de Knott modificada de las muestras de sangre de los conejos infectados con *T. canis*, fue realizado utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification y siguiendo el protocolo de Boreka *et al.*, (2008) como se describe: A cada paquete sedimentado inicialmente se le agregó 300 µl de Solución de lisis nuclear y 17 µl de proteinasa K, se homogeneizaron y se incubaron a 56 °C por 10 horas, después a 37 °C por 30 minutos, en baño maría y finalmente se dejaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Se agregó en cada muestra 1.5 µl de RNAsa, 100 µl de solución precipitadora de proteínas y se homogeneizó por 20 segundos. Las muestras fueron centrifugadas a 16000 rpm por 4 minutos, la fase líquida se transfirió a otro vial con 600 µl de isopropanol y se homogeneizó lentamente. Después de una centrifugación a 16000 rpm por 4

minutos, la fase líquida fue desechada y al sedimento se homogeneizó en 600 µl de Etanol al 70%. Las muestras fueron centrifugadas a 16000 rpm por 1 minuto y se retiró la fase líquida dejando el ADN sedimentado. Finalmente el ADN fue resuspendido en 50 µl de solución hidratadora de ADN a 63 °C por 1 hora. La cantidad de ADN fue cuantificada por medio de un nanoespectrofotometro (ND-1000, Nanodrop®).

## Estandarización de la PCR

La amplificación de la región del ITS-2 de *T. canis* fue realizada de acuerdo al método descrito por Jacobs *et al.*, (1997) y modificado por Borecka *et al.* (2008) como se describe: Para la mezcla de reacción se usaron los siguientes componentes: Buffer 12.5 µL, Primer YY1 0.5 µL, Primer NC2 0.5 µL, ADN de la muestra 2 µL y agua libre de nucleasas 8 µL. El ciclo se estableció con las siguientes condiciones: 98 °C por 30 segundos para desnaturalización, 56 °C por 30 segundos para el alineamiento y 74 °C para la extensión, por 40 ciclos. En cada ciclo de PCR se corrió un control negativo, con la mezcla de reacción sin ADN y como controles positivos, un tubo con ADN extraído de sedimentos de sangre mezclada con 25 y 50 larvas de *T. canis*, y otro tubo con ADN de *T. canis* adulto. La región ITS-2 fue amplificada a partir de 5 a 10 ng del ADN extraído de los gusanos adultos o de las muestras de sangre de los conejos infectados utilizando los cebadores YY1 (frontal) y NC2 (reverso). Los productos de la PCR fueron separados en geles de agarosa al 2% por 30 minutos y teñidos con GELRED® (Biotium Labs.), transiluminados y fotografiados para su estudio.

CEBADOR	SECUENCIA	REFERENCIA
YY1 (frontal)	5'-CGGTGAGCTATGCTGGTGTG-3'	Li <i>et al.</i> , 2007.
NC2 (Reverso)	5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3'	Lie <i>et al.</i> , 2007; Jacobs <i>et al.</i> , 1997.

Cuadro1. Nombre y secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación del fragmento ITS-2 de *Toxocara canis*.

## RESULTADOS

La infección con *T. canis* produjo lesiones (hemorragias petequiales y equimosis) en pulmones e hígado de los conejos (figura 1). Las muestras de pulmón e hígado de todos los conejos infectados fueron positivas a la presencia de larvas de *T. canis* en la digestión artificial.

Durante la estandarización de la técnica de Knott modificada y PCR, se logró la sedimentación y el conteo de larvas de *T. canis* a partir de sangre de conejos en todas las concentraciones probadas: 100, 50, 25 y 10 larvas/mL (figura 2). De estas, los cebadores YY1/NC2 amplificaron productos esperados (330 pb) de las muestras de 100, 50 y 25 larvas/mL así como del control positivo de *T. canis* adulto (figura 3).

No se obtuvieron amplificadores positivos de las muestras de sangre de los conejos infectados en ningún día p.i. las cuales fueron probadas siempre junto con ADN del estándar de 50 larvas/mL y ADN de *T. canis* adulto como controles positivos (figura 4).

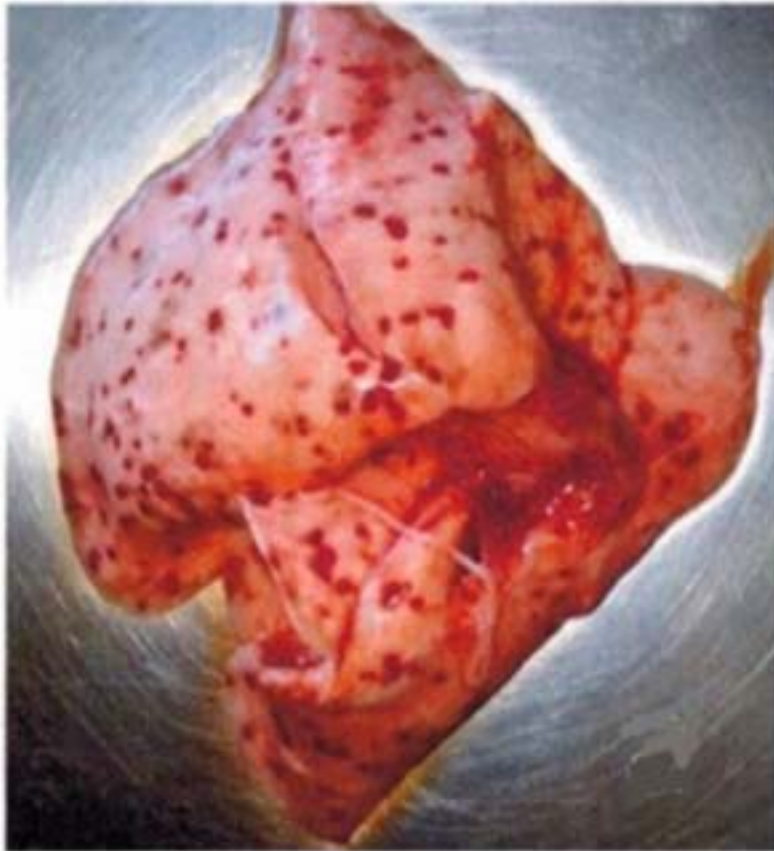


Figura 2. Lesiones hemorrágicas observadas en el día 20 post infección en pulmones de conejos infectados con 5000 huevos larvados de *Toxocara canis*.

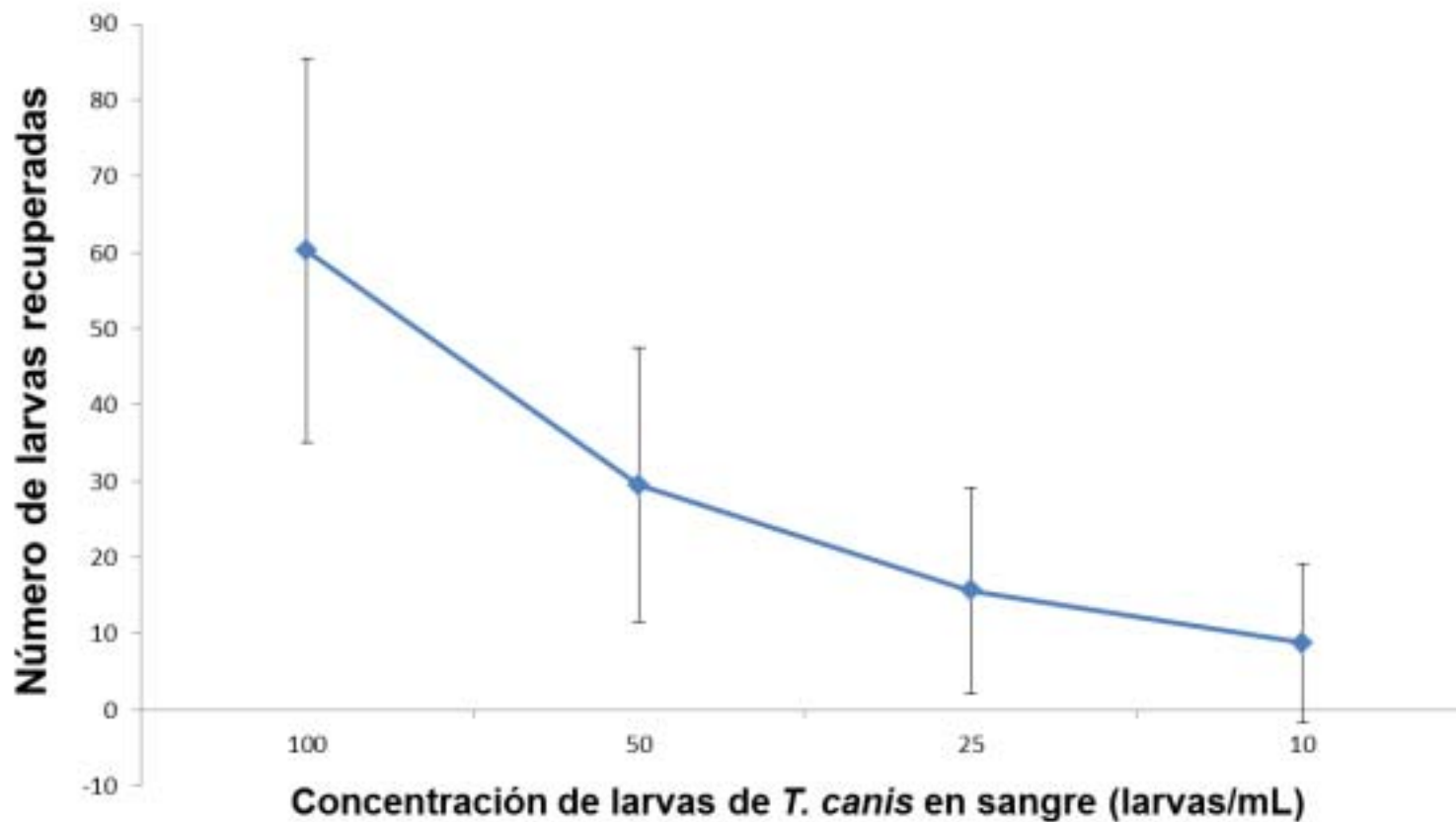


Figura 3. Promedio ( $\pm$ DS) del número de larvas recuperadas en los sedimentos de las muestras de sangre obtenidos por la técnica de Knott modificada. Cada dato es producto de tres repeticiones de cada muestra estándar.

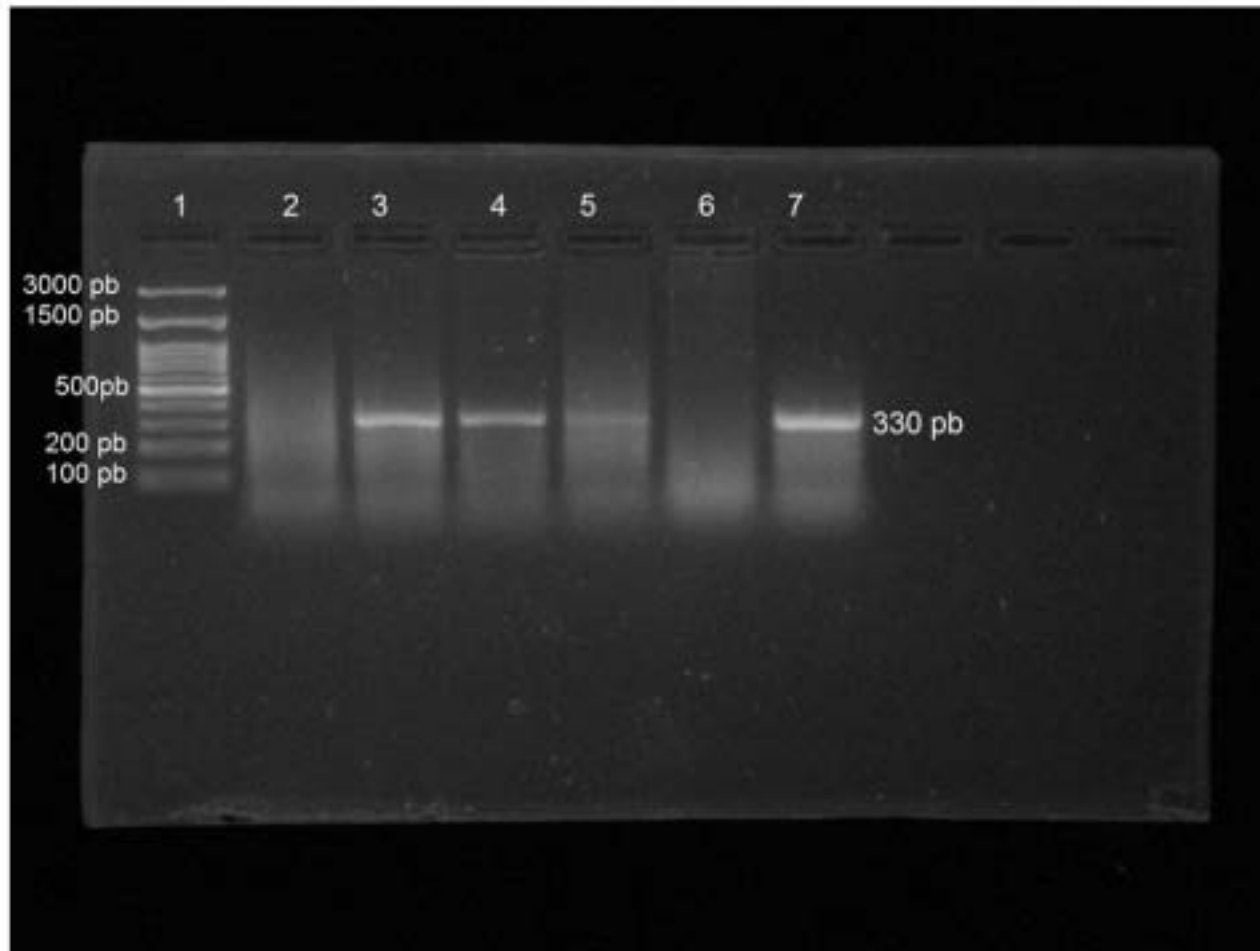


Figura 4. Amplificación por PCR del fragmento ITS-2 de *Toxocara canis* a partir de ADN extraído de sedimentos obtenidos por técnica modificada de Knott con diferentes concentraciones larvarias. Carril 1: Marcadores de tamaño molecular; Carril 2: control negativo; carril 3: 100 larvas de *T. canis*/mL; carril 4: 50 larvas de *T. canis*/mL; carril 5: 25 larvas de *T. canis*/mL; carril 6: 10 larvas de *T. canis*/mL; carril 7: ADN de *T. canis* adulto.

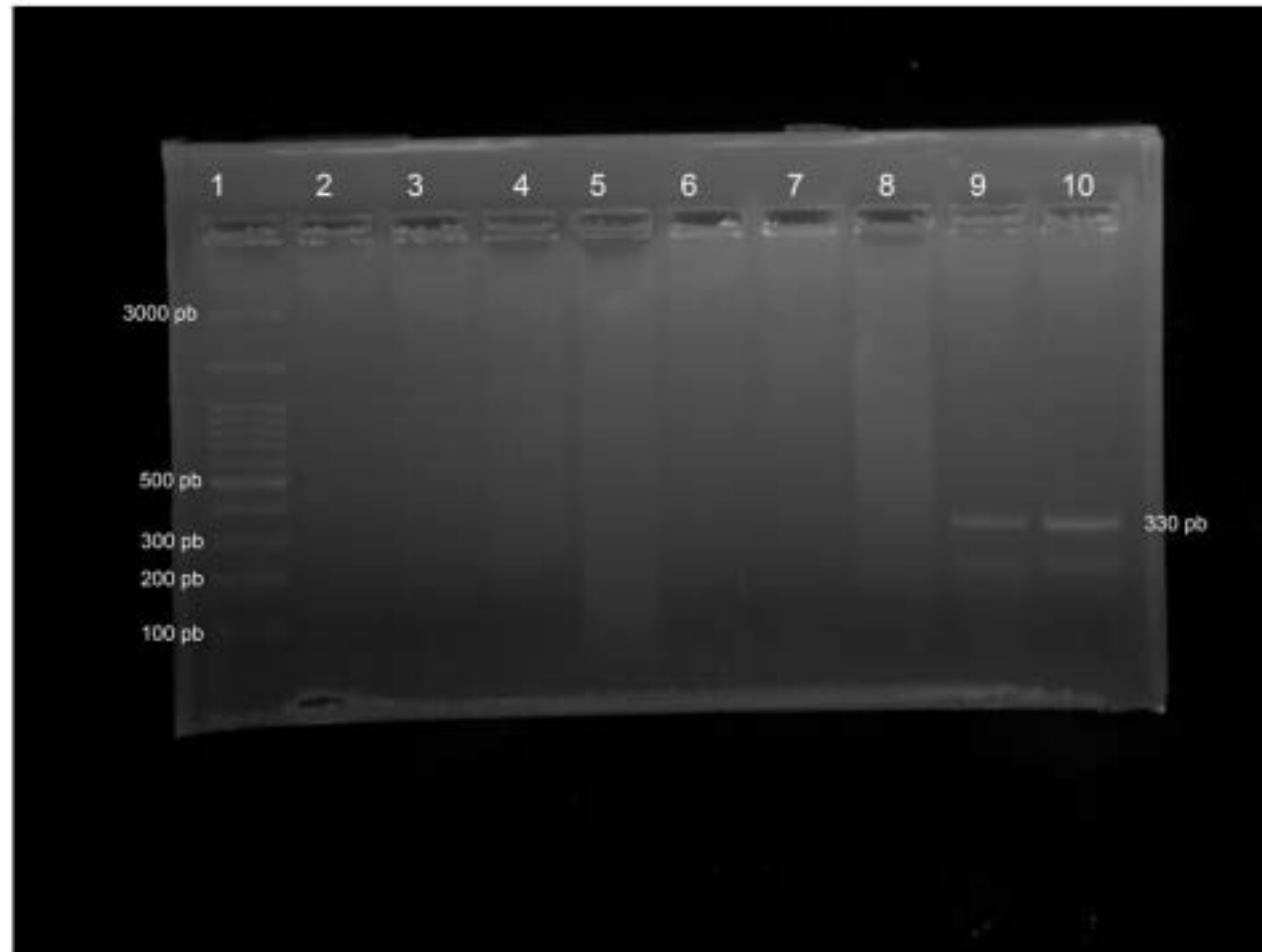


Figura 5. Amplificación por PCR del fragmento ITS-2 de *Toxocara canis* a partir de muestras (negativas) de sangre (procesadas por técnica modificada de Knott) de conejos infectados experimentalmente con *T. canis*. Carril 1: Marcadores de tamaño molecular; Carril 2: control negativo; carril 3: muestra de sangre de conejo 1; carril 4: : muestra de sangre de conejo 2; carril 5 : muestra de sangre de conejo 3; carril 6: muestra de sangre de conejo 4; carril 7: muestra de sangre de conejo 5; carril 9: control 50 larvas/mL de sangre ; carril 10: ADN de *T. canis* adulto.



## DISCUSIÓN

El diagnóstico de la toxocariosis en humanos se realiza integrando los antecedentes del paciente, su información clínica y pruebas de laboratorio como ELISA y Western blot que demuestran de manera indirecta la presencia del parásito. Algunos autores han descrito secuencias cebadoras para la detección molecular del fragmento ITS-2 de *T. canis* (Jacobs *et al.*, 1997; Lie *et al.*, 2007; Boreka *et al.*, 2008) y se ha logrado la amplificación de este fragmento a partir de hígado de animales experimentales (Boreka *et al.*, 2008). En este estudio se estandarizó una técnica para la concentración de larvas de *T. canis* presentes en la sangre y se logró la amplificación del fragmento ITS-2 del parásito a partir de larvas adicionadas a sangre, sin embargo no se logró amplificar el fragmento a partir de sangre de conejos infectados con el parásito, las causas posibles de esto se discuten más adelante.

La técnica de Knott se utiliza para la detección de microfilarias de *Dirofilaria* sp. en sangre, se basa en la lisis de los eritrocitos de la muestra, la fijación de las larvas con formalina al 2%, su concentración por centrifugación y su visualización adicionando azul de metileno (Kassai, 2002). En el presente estudio se modificó esta técnica para concentrar larvas de *T. canis* presentes en la sangre, a diferencia de la técnica original, no se fijaron las larvas con formalina porque esto desnaturaría el ADN necesario para la detección molecular, por lo cual se usó una solución hipotónica de KCl (0.075M) para producir la lisis de eritrocitos, posteriormente se utilizó la centrifugación para la concentración de larvas y ciclos de resuspensión-centrifugación para su limpieza. El proceso anterior permitió obtener un sedimento limpio de proteína contaminante (hemoglobina). Con esta técnica modificada de Knott, se logró la recuperación de larvas en muestras de sangre mezclada con 100 y hasta 10 larvas/mL (figura 2), lo cual indicó la alta eficiencia de nuestra técnica para medir la concentración de larvas de *T. canis* a partir de sangre.

Lie *et al.* (2007), describieron un par de secuencias cebadoras específicas para el fragmento ITS-2 de *T. canis*, logrando diferenciarlo de *T. cati*, *T. malaysiensis* y *Toxascaris leonina*. En este trabajo se utilizaron estas secuencias para la detección de ADN a partir de larvas y adultos de *T. canis* y en los sedimentos de las muestras de sangre mezclada con larvas del parásito. Se obtuvo en todos los casos un amplificado esperado de 330 pb tal como lo describieron Lie *et al.* (2007). Adicionalmente en otro estudio paralelo a este, se probó la especificidad de dichos cebadores con extractos de *Ascaris suum*, *A. lubricoides* y *Toxascaris leonina*, no encontrándose amplificados en estas especies (Pérez-Luna, 2012). Lo anterior hizo patente la utilidad de estos cebadores en la detección específica de *T. canis* y demostró que la técnica de Knott no modifica el ADN del parásito haciendo posible su detección.

A partir de los sedimentos obtenidos por la técnica de Knott modificada se logró la amplificación del fragmento ITS-2 de *T. canis* en muestras hasta con 25 larvas/mL de sangre de conejo, sin embargo no se logró amplificar el fragmento a partir de las muestras de sangre de los conejos infectados con 5000 huevos larvados de *T. canis*. Existe un trabajo en la literatura que reporta la amplificación de ADN de *T. canis* en hígado de jerbos infectados con el parásito y reportan una sensibilidad de hasta 3.5 larvas por gramo de tejido (Borecka *et al.*, 2008), es decir, en una relación equivalente (gramos/mililitros), la técnica descrita por Borecka *et al.* (2008) es siete veces más sensible. Pérez-Luna *et al.*, (2014) utilizando los cebadores YY1/NC2, logró amplificar el fragmento ITS-2 (330 pb) en cerebros de conejo infectados con *T. canis* en el día 30 y 60 p.i. Por otro lado la intensidad de la infección en el modelo utilizado por ellos (jerbo) no fue la misma. Mientras que en este estudio se infectó con 5000 larvas a conejos en promedio de 2 kg de peso (2.5 huevos por gramo de peso vivo) ellos infectaron con 1000 huevos jerbos de aproximadamente 200 gramos (5 huevos por gramo de peso vivo). Por otra parte, la cantidad de larvas que pueden estar presentes en la sangre es mucho menor que las que pueden estar presentes en el hígado, mientras que Cho *et al.*, (2007) reportaron hasta 100 larvas en el hígado de jerbos con infecciones de 1000 huevos larvados, Manhardt (1980) reporta 0.28 larvas/gramo de sangre de perros

inyectados (vena cefálica) con 200 mil larvas de *T. canis* (datos calculados por el autor del presente estudio). Lo anterior puede ser la principal causa de que no haya sido posible la detección molecular de larvas en la sangre de conejos infectados experimentalmente. Estudios en donde se inyecten cantidades conocidas de larvas directamente en circulación sanguínea en modelos experimentales podrían indicar de mejor manera el umbral de detección de *T. canis* por PCR en la sangre.

Por último, si se considera que los conejos estaban infectados porque se detectaron larvas de *T. canis* en pulmón e hígado y que en una tesis paralela (Parral-Sánchez, 2012), usando estos mismos conejos se demostró la presencia de anticuerpos específicos antitoxocara. Entonces pese a la propuesta de que la prueba de PCR puede ser efectiva para el diagnóstico de la toxocariosis, se demostró que las pruebas inmunológicas resultan ser más sensibles.

## CONCLUSIÓN

Con la técnica de Knott modificada, se logró la recuperación de larvas de *T. canis* en muestras de sangre mezclada con 100 y hasta 10 larvas/mL.

Los cebadores YY1 y NC2 amplificaron específicamente el fragmento ITS-2 de *T. canis* a partir de los concentrados de la técnica de Knott así como de muestras de larvas y adultos de *T. canis*.

La técnica de Knott modificada no alteró el ADN del parásito haciendo posible su detección molecular por PCR.

No se logró la detección molecular del fragmento a partir de las muestras de sangre de los conejos infectados con *T. canis* quizá debido a una baja concentración larvaria.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alba-Hurtado, F. y Muñoz-Guzmán M.A., (2011). Ascaroideos. En: Ibarra V. F., Vera M. Y., Alcalá C. Y., Parasitología Veterinaria v. 2 Helminetos. Editorial Acastdel. México D.F.
2. Bass, J. L., Mehta, K. A., Glickman, L. T., Eppes, B. M. (1983). Clinically inapparent *Toxocara* infection in children. The New England journal of medicine, 308(12), 723.
3. Beaver P. C., Jung, R.C., Cupp, E.W. (1986). Parasitología clínica. 2da Ed. Salvat.
4. Beaver P.C. Snyder H., Carrera M., Dent H., Lafferty W. (1952). Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. Pediatrics; 9: 7-18
5. Beck, W., Pantchev, N. (2010). Zoonosis parasitarias. Servet.
6. Borecka, A., Gawor, J., Niedworok, M., Sordyl, B. (2008). Detection of *Toxocara canis* larvae by PCR in the liver of experimentally infected Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). Helminthologia, 45(3), 147-149.
7. Buijs, J., Borsboom, G., van Gemund, J. J., Hazebroek, A., van Dongen, P. A., van Knapen, F., Neijens, H. J. (1994). *Toxocara* seroprevalence in 5-year-old elementary schoolchildren: relation with allergic asthma. American Journal of Epidemiology, 140(9), 839-847.
8. Chen, J., Zhou, D. H., Nisbet, A. J., Xu, M. J., Huang, S. Y., Li, M. W., Zhu, X. Q. (2012). Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. Infection, Genetics and Evolution, 12(7), 1344-1348.
9. Cordero del C.M., Rojo F.; Martínez A. Sánchez C., Hernández S., Navarrete I., Diez P., Quiroz H. y Carballo M. (1999). Parasitología Veterinaria. Mc Graw-Hill Interamericana. España.
10. Dada, B. J. O., Lindquist, W. D. (1979). Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in some public grounds and highway rest areas in Kansas. Journal of Helminthology, 53(02), 145-146.

11. Desquesnes, M., Davila, A. M. R. (2002). Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Veterinary Parasitology*, 109(3), 213-231.
12. Esparza-Lozano, R. Presencia de huevos de *Toxocara canis* en el suelo del bosque de San Juan de Aragón. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 2004.
13. Fu, C. J., Chuang, T. W., Lin, H. S., Wu, C. H., Liu, Y. C., Langinlur, M. K., Fan, C. K. (2014). Seroepidemiology of *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in the capital area of the Republic of the Marshall Islands. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 261.
14. Glickman, L. T., Schantz, P. M. (1981). Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiologic Reviews*, 3(1), 230-250.
15. Glickman, L. T., Shofer, F. S. (1987). Zoonotic visceral and ocular larva migrans. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 17(1), 39-53.
16. Glickman, L. T., Shofer, F. S. (1987). Zoonotic visceral and ocular larva migrans. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 17(1), 39-53.
17. Huntley, C. C., Costas, M. C., Lyerly, A. (1965). Visceral larva migrans syndrome: clinical characteristics and immunologic studies in 51 patients. *Pediatrics*, 36(4), 523-536.
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*, 68(2), 191-200.
19. Kassai T. (2002). *Helmintología veterinaria*. Editorial Acribia S.A.
20. 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(5), 349-354.
21. Limaye, A. P., Abrams, J. S., Silver, J. E., Ottesen, E. A., Nutman, T. B. (1990). Regulation of parasite-induced eosinophilia: selectively increased

- interleukin 5 production in helminth-infected patients. *The Journal of experimental medicine*, 172(1), 399-402.
22. Lloyd, S., Amerasinghe, P. H., Soulsby, E. J. L. (1983). Periparturient immunosuppression in the bitch and its influence on infection with *Toxocara canis*. *Journal of Small Animal Practice*, 24(4), 237-247.
  23. Magnaval J.F., Glickman, L.T., Dorchies, P., B., (2001) Highlights of human toxocariasis, *The Korean Journal of Parasitology*, 2001; 31:1-11.
  24. Magnaval, J. F., Fabre, R., Maurieres, P., Charlet, J. P., De Larrard, B. (1991). Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitology research*, 77(8), 697-702.
  25. Manhardt, J., Stoye, M. (1981). Zum Verhalten der Larven von *Toxocara canis* WERNER 1782 (Anisakidae) während und nach der Lungenwanderung im definitiven Wirt (Beagle) 1. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 28(5), 386-406.
  26. Meghji, M., Maizels, R. M. (1986). Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Molecular and biochemical parasitology*, 18(2), 155-170.
  27. Morales, O. (1999). Identificación de antígenos de mediante la técnica de Western Blot en conejos infectados experimentalmente. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina. Instituto de Salud Pública. Bogotá.
  28. NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. [www.normateca.sagarpa.gob.mx](http://www.normateca.sagarpa.gob.mx)
  29. Oshima, T. (1961). Standardization of techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observations on the normal migration routes of the larvae. *The Journal of parasitology*, 652-656.
  30. Overgaauw, P. A., Nederland, V. (1997). Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. *Critical reviews in microbiology*, 23(3), 233-251.

31. Page, A. P., Rudin, W., Fluri, E., Blaxter, M. L., & Maizels, R. M. (1992). *Toxocara canis*: a labile antigenic surface coat overlying the epicuticle of infective larvae. *Experimental parasitology*, 75(1), 72-86.
32. Parral-Sanchez, J. L. Cinética de anticuerpos anti-antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *Toxocara canis* en conejos infectados experimentalmente con tres diferentes ascaroideos. Tesis de licenciatura. FES-Cuautitán UNAM. 2013
33. Parsons, J. C., Bowman, D. D., Grieve, R. B. (1986). Tissue localization of excretory-secretory antigens of larval *Toxocara canis* in acute and chronic murine toxocariasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 35(5), 974-981.
34. Pérez-Luna I., Muñoz-Guzmán M.A., Sánchez-Mendoza A.E., Cuenca-Verde C., Montiel-Sosa F., Alba-Hurtado F., Detección de DNA de *Toxocara canis* con diferentes secuencias cebadoras utilizando un kit de PCR directa. 2012. VII Seminario Internacional de Parasitología Animal IX Congreso Nacional Parasitología Veterinaria. 689-695.
35. Pérez-Luna I., Muñoz-Guzmán, M.A., Parral-Sánchez, J., Montiel-Sosa, F., Alba-Hurtado, F. 2014. DNA detection of *T. canis* in brain of rabbits experimentally infected. 13<sup>th</sup> International Congress of Parasitology. 1310.
36. Perteguer, M. J., Cuellar, C., Guillen, J. L., Aguila, C., Fenoy, S., Chivato, T., Laguna, R. (2003). Cross-reactivity between *Anisakis simplex* sensitization and visceral larva migrans by *Toxocara canis*. *Acta tropica*, 89(1), 85-89.
37. Pinelli, E., Roelfsema, J. H., Brandes, S., Kortbeek, T. (2013). Detection and identification of *Toxocara canis* DNA in bronchoalveolar lavage of infected mice using a novel real-time PCR. *Veterinary parasitology*, 193(4), 337-341.
38. Quiroz R. H. (2003). Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa.
39. Schacher, J. F. (1957). A contribution to the life history and larval morphology of *Toxocara canis*. *The Journal of parasitology*, 599-612.



40. Schantz, P. M., Meyer, D., Glickman, L. T. (1979). Clinical, serologic, and epidemiologic characteristics of ocular toxocariasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 28(1), 24-28.
41. Soliz-Antezana M.E. Relación entre infección por *Toxocara canis* y la presencia de asma en la población pediátrica. Tesis de especialidad en pediatría. Facultad de Medicina UNAM, 2009.
42. Stewart, G. L., Shebani, M., Crutchfield, J., Raines, K., Wood, B., Kilgore, M. (1986). Ova of canine intestinal helminth parasites in fecal samples recovered from suburban parks. *The Southwestern veterinarian (USA)*.
43. Webster, G. A. (1958). A report on *Toxocara canis* Werner, 1782. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, 22(8), 272.
44. Webster, G. A. (1958). On prenatal infection and the migration of *Toxocara canis* Werner, 1782 in dogs. *Canadian Journal of Zoology*, 36(3), 435-440.
45. Weiss, J. B. (1995). DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(1), 113-130.
46. Wilder H.R. (1950). Nematode endophthalmitis. *Trans An Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 55:99-109