

Optimization a Methodology for the Isolation and the Molecular Detection of *Toxocara Canis* Eggs in Soil Samples

Dary Luz Mendoza Meza
Universidad del Atlántico

Humberto Maldonado Santana
Universidad del Atlántico

Recived: October 31, 2014

Accepted: February 23, 2015

Pag. 41-51

Abstract

Toxocaríasis is a common zoonosis in developing countries, such as Colombia. Accidental ingestion of *Toxocara sp.* eggs represents the principal form of transmission in humans. Therefore, monitoring of environmental contamination is the better strategy for preventing the toxocaríasis. The objective was to optimize a methodology for assessing soil contamination caused by *Toxocara canis* eggs. The soil samples were collected from a public park in the city of Barranquilla (Colombia). The *Toxocara* eggs were isolated by centrifugation/flocculation with $MgSO_4$ ($r = 1.20$), $ZnSO_4$ ($r = 1.18$), $NaCl$ ($r = 1.18$) and Sheather solution ($r = 1.27$). The parasite DNA was extracted and identified through amplification of ITS-2- DNAr (PCR-ITS-2) of *T. canis* and subsequent nucleotide sequencing. ANOVA analysis indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the DNA concentrations obtained with the flocculation solutions used to isolate eggs. Tukey test results suggest that the modified Sheather's solution is better for the flocculation. The PCR-ITS-2 analysis showed positive results for *T. canis* in 7 out of 13 samples examined (53.84 %). In conclusion, it is shown that the proposed method is efficient for the detection of *T. canis* in field samples.

Keywords: *Toxocara canis*, toxocaríasis, environmental contamination, ITS-2.

Optimización de una metodología para el aislamiento y detección molecular de huevos de *Toxocara canis* en muestras de suelo

Resumen

La toxocaríasis es una zoonosis común en países en desarrollo, como Colombia. La ingesta accidental de huevos de *Toxocara sp* representa la principal vía de transmisión al humano, por tanto, la vigilancia de la contaminación ambiental es una de las principales estrategias en la prevención de la toxocaríasis. El objetivo fue optimizar una metodología para evaluar la contaminación del suelo por huevos de *Toxocara canis*. Las muestras de suelo se colectaron en un parque público en la ciudad de Barranquilla (Colombia). Los huevos de *Toxocara* se aislaron mediante centrifugación/floculación con $MgSO_4$ ($r=1,20$), $ZnSO_4$ ($r=1,18$), $NaCl$ ($r=1,18$) y solución de Sheather ($r=1,27$). El ADN del parásito se extrajo y se identificó mediante amplificación del ITS-2-ADNr (PCR-ITS-2) del *T. canis* y posterior secuenciación de nucleótidos. El análisis ANOVA indicó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las concentraciones de ADN obtenidos con las soluciones de floculación utilizadas para aislar los huevos. Los resultados del test de Tukey sugieren que la solución modificada de Sheathers es la mejor para la floculación. El análisis PCR-ITS-2 mostró resultado positivo para *T. canis* en 7 de 13 muestras examinadas (53,84%). En conclusión, se demuestra que el método propuesto es eficiente por la detección de *T. canis* en muestras de campo.

Palabras clave: *Toxocara canis*, toxocaríasis, contaminación ambiental, ITS-2.

1 Introducción

Toxocara canis es un ascárido que parasita al sistema digestivo de los perros constituyéndose en uno de los endoparásitos más prevalentes en la población canina, a nivel mundial [1]. Desde el punto de vista epidemiológico, *T. canis* es de importancia zoonótica por ser el agente causante de la toxocariosis humana, una enfermedad considerada un problema de salud pública en varios países [2].

Las manifestaciones clínicas más frecuentes asociadas con la infección por *Toxocara canis* se clasifican de acuerdo a los órganos afectados. Se conocen dos síndromes principales: *larva migrans visceral* (VLM), que abarca las enfermedades asociadas con los órganos mayores (riñones, bazo, cerebro) y *larva migrans ocular* (OLM), en el que la patología y los efectos en el hospedador se limitan al ojo y el nervio óptico [3, 4]. Síndromes menos graves se han descrito, como toxocariosis encubierta y toxocariosis común [2]. La infección por *T. canis*, en los hospedadores naturales (perros) ocurre por la ingesta de huevos embrionados viables desde el suelo, o pueden adquirirse por vía transplacentaria. En el huésped paraténico (seres humanos), la infección es dependiente de la contaminación del medio ambiente con huevos infectantes presentes en las heces depositadas por los cánidos [5, 6].

A pesar del aumento de la población canina en Colombia, son pocas las investigaciones sobre la contaminación ambiental por huevos de *T. canis* en áreas de acceso público. Uno de los problemas de estos estudios radica en que los métodos para el aislamiento y detección de los huevos del parásito, desde el suelo, son dispendiosos y difíciles de realizar cuando se trata de un gran número de muestras [7]. Adicionalmente, la microscopía óptica, que es el método tradicional para la identificación de parásitos en muestras de suelo, es considerada poco eficiente para diferenciar entre los huevos de *Toxocara* y de otros ascáridos, debido a su alta similitud morfológica [8]. Por lo anterior, se han desarrollado algunos métodos moleculares para la identificación precisa y el diagnóstico de estos nematodos, utilizando marcadores ribosomales y mitocondriales. No obstante, una de las limitantes de estos métodos es la estandarización de un protocolo de preparación de la muestra que sea rápido, económico y confiable, para la obtención de un ADN de alta calidad y en cantidades adecuadas para su aplicación en las pruebas moleculares [9].

El propósito de esta investigación fue optimizar una metodología para el aislamiento y detección de huevos de *T. canis* en muestras de suelo, mediante amplificación del transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosomal (ADNr) del parásito.

2 Materiales y métodos

2.1 Tipo de estudio

Para establecer la metodología más eficiente para el aislamiento y la detección de huevos de *T. canis* en muestras de suelo, se realizó un estudio analítico experimental.

2.2 Muestras

Se recolectaron muestras de suelo en el parque Sagrado Corazón de Jesús de la ciudad de Barranquilla, departamento de Atlántico ($10^{\circ}59'36''\text{N}$ y $74^{\circ}49'5''\text{W}$), durante el mes de diciembre de 2013 (Figura 1). El cálculo del tamaño de la muestra se basó en función del área verde aproximada del parque (1,3 hectáreas), recolectándose una muestra cada 100 m^2 para un total de 13 muestras. Para la recolección del suelo se realizó un muestreo aleatorio estratificado, definiéndose como unidad de muestreo el volumen de suelo resultante de recoger con una pala una parte de éste, constituida por un área de 10 cm de largo x 10 cm de ancho x 3 cm de profundidad. Las muestras recogidas se guardaron en bolsas plásticas, las cuales fueron selladas y almacenadas a 4°C .

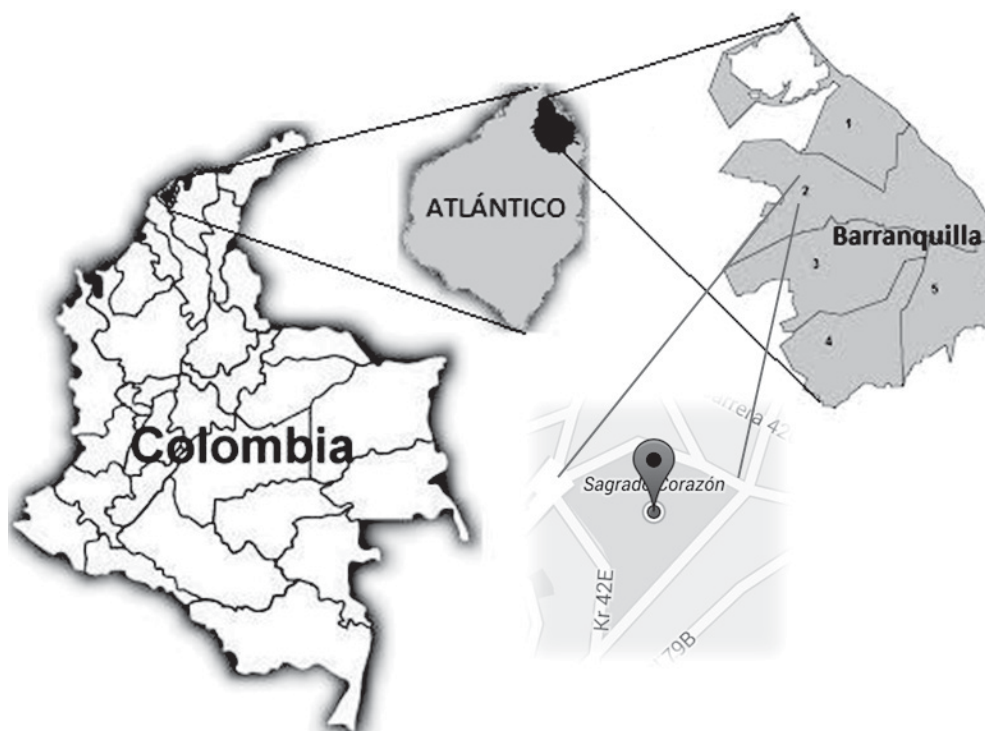


Figura 1. Ubicación geográfica de la zona de estudio. Humberto Maldonado Santana.

2.3 Aislamiento de huevos de *Toxocara sp* desde el suelo

Las muestras de suelo fueron cernidas a través de un tamiz de 4 mm, para eliminar hierbas y otro material particulado. La separación de los huevos del *Toxocara sp* se realizó mediante centrifugación/floculación utilizando las siguientes soluciones: MgSO_4 ($r = 1,2\text{ g/mL}$), ZnSO_4 ($r = 1,18\text{ g/mL}$), NaCl ($r = 1,18\text{ g/mL}$) y solución modificada de Sheather (azúcar granulada, agua destilada y 1% de formaldehído) ($r = 1,27\text{ g/mL}$).

La centrifugación/floculación se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Dryden y colaboradores en 2005 [10], con algunas modificaciones. Brevemente, una muestra de 50 g de suelo se lavó con 60 mL de solución salina (NaCl 0,9 % p/v) y se filtró a través de gasa estéril; el residuo obtenido se descarto y el sobrenadante se distribuyó en tubos de 15 mL que fueron centrifugados por 5 min a $1500 \times g$. El sedimento se separó y se lavó varias veces hasta que el sobrenadante quedó transparente. Seguido, se le adicionó la solución de flotación.

La mezcla se agitó y se centrifugó por 5 min a 2000 x g. Los huevos de parásitos que quedaron en la superficie del líquido fueron recuperados mediante aspiración con una pipeta Pasteur y se lavaron con solución salina usando la siguiente relación: 1 mL de suspensión de huevos más 14 mL de solución salina (1:15, v/v). La mezcla se centrifugó por 5 min a 2000 x g, el sobrenadante se descartó y el sedimento conteniendo los huevos se mezcló con 1 mL de solución salina. La presencia de huevos de *Toxocara sp* en esta suspensión se confirmó por microscopía.

2.4 Extracción de ADN

Esta etapa involucró la ruptura de la cubierta de los huevos de *T. canis*, extracción y análisis espectrofotométrico del ADN. Para debilitar y/o eliminar la cubierta del huevo del parásito se utilizó choque térmico [11] así: la muestra se congeló a -80 °C por 10 min e inmediatamente se calentó a 100 °C por 2 min. El ciclo de congelación/calentamiento se repitió cuatro veces. Posteriormente, un volumen de 100 µL de la suspensión anterior se extrajo con buffer de lisis compuesto por NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Tris- HCl 10 mM, Triton 100 al 2%, SDS 0,5 % y proteinasa K (30 µL). Las muestras se centrifugaron por 3 min a 10000 x g. El ADN se extrajo con 250 µL de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), seguido de precipitación con etanol absoluto frío. El ADN precipitado se diluyó con 50 µL de buffer TE (Tris-EDTA) 1X. La calidad y cantidad del ADN obtenido se determinó mediante análisis espectrofotométrico (relación absorbancia 260/280), empleando un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, West Palm Beach, EE.UU).

2.5 Amplificación (PCR-ITS-2) de *T. canis*

Se seleccionó el segundo espaciador del transcrito interno del ADNr de *T. canis* como marcador molecular para la identificación del parásito, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-ITS-2). Se utilizaron iniciadores especie-específicos, diseñados para las regiones 5,8s y 28s del ADNr, los cuales fueron descritos previamente (12): sentido NC13: 5'-ATCGATGAAGAACGCAGC-3'; antisentido NC2: 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3'. El tamaño esperado para el fragmento amplificado fue de 533 pb. La composición de la mezcla de reacción de PCR fue: 12,5 µL de Master Mix PCR 100 2X (Corpogen), compuesta por 20 mM de Tris-HCl (pH 8,5), 100 mM de KCl, 3,0 mM de MgCl₂ y 400 mM de cada dNTPs; 2,5 µL de cada primer (100 pmol); 5 µL ADN (10- 50 ng); 2U de Taq polimerasa y 2,5 µL de agua libre de ADNsa y ARNsa. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min; 35 ciclos de 94°C 1 min, 55°C 1 min y 72°C 1 min; extensión final a 72°C por 5 min en un equipo MJ Research PTC-200 Thermal Cycler. El control positivo de la reacción de PCR fue ADN de huevos de *T. canis*, obtenido previamente. El control negativo fue agua libre de ADNasa y ARNasa.

La detección de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % p/v, en un equipo horizontal Mini-Sub Cell GT™ BioRad. La corrida electroforética se realizó a 100 voltios durante 60 min, utilizando buffer TBE 1X. Los geles de agarosa se tiñeron con solución de Bromuro de Etidio (10 mg/mL) y se visualizaron en un Fotodocumentador Gel Doc-It2 310 con luz UV. El tamaño del producto de PCR se calculó usando como referencia un marcador de peso molecular (Ladder 100 pb).

2.6 Secuenciación

Uno de los amplificadores que mostró buena resolución en la electroforesis fue analizado mediante la técnica de secuenciación por extensión del iniciador, en ambos sentidos, con el equipo 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems™), usando el kit comercial BigDye® Terminator (Applied Biosystems™) y los iniciadores NC13 y NC2. Las secuencias consenso se derivaron de las obtenidas de cada hebra de ADN, utilizando el programa MEGA 5.05. Con la herramienta BLASTN (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>) se determinó el porcentaje de similitud de las secuencias obtenidas con respecto a las reportadas en la base de datos del Genbank.

2.7 Análisis de los resultados

La eficiencia de cada solución de floculación para aislar los huevos de *T. canis* desde suelo, se determinó en función de la concentración y la pureza del ADN extraído. Los datos obtenidos se sometieron, inicialmente a un análisis de varianza (ANOVA). Los análisis entre grupos fueron hechos con el test de comparaciones múltiples de Tukey, un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Todas las pruebas se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 21.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago).

3 Resultados

3.1 Aislamiento de huevos de *Toxocara sp* desde el suelo

Los resultados indican que la solución modificada de Sheather ($r= 1,27$ g/mL) y la solución de $MgCl_2$ ($r= 1,20$ g/mL) fueron las mejores para la separación de huevos de *T. canis* desde el suelo analizado, lo cual fue evidenciado por la concentración y pureza del ADN obtenido. El valor de la media de la concentración de ADN de las 13 muestras de suelo, incluidas en el estudio, se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentración y pureza del ADN de huevos de parásitos recuperados del suelo.

Solución de Flotación	Densidad (ρ)	[ADN] ng/ ϕ L	Pureza (A260/280)
NaCl	1,18	177,47 \pm 199,21	1,75 \pm 0,199
MgSO ₄	1,20	389,10 \pm 167,08	1,94 \pm 0,181
ZnSO ₄	1,18	101,30 \pm 43,66	1,65 \pm 0,031
Sheather	1,27	1692,75 \pm 279,05	1,96 \pm 0,068

* N = 13 muestras de suelo.

El análisis de varianza indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de ADN extraídas, sugiriendo que la solución de flotación influye en la recuperación de los huevos de parásitos desde el suelo ($p < 0,05$). La prueba de comparación múltiple entre medias (test de Tukey) sugiere que las concentraciones de ADN obtenidas con la solución modificada de Sheather ($r = 1,27$ g/mL) son estadísticamente diferentes a las obtenidas con las otras soluciones. En cuanto a la variable pureza del ADN, no se observó diferencia significativa entre las soluciones de flotación ensayadas (Tabla 2).

En este estudio sólo se visualizaron los huevos de *Toxocara spp.*, en el suelo tratado con solución modificada de Sheather. Por microscopía, 5 de 13 muestras (38,5%) fueron positivas, lo que sugiere una mayor eficiencia de esta solución. El aislamiento de huevos y larvas del *T. canis*, desde muestras ambientales, es uno de los pasos fundamentales en la evaluación de la contaminación por geohelminthos de importancia zoonótica. La bibliografía reporta una gran variedad de metodologías que comparan técnicas de recuperación de los huevos de *Toxocara* desde suelo. Sin embargo, los resultados que se describen son muy variables [13, 14]. Actualmente se reconoce que existen muchos factores que influyen de manera directa en la tasa de recuperación de huevos de *Toxocara*. Algunos de los más relevantes son: el tipo de suelo, el tamizado de pre-tratamiento, el lavado y resuspensión de sedimentos, y la densidad específica de las soluciones de flotación [10, 15, 16].

Tabla 2. Resultados del test de comparación de Tukey para la concentración y pureza del ADN.

Solución de Flotación	Concentración (ng/μL)		Pureza (A260/280)	
	Subconjunto		Subconjunto	
	1	2	1	2
DHS de Tukey ^{a, b}	ZnSO ₄	101,30	1,655	
	NaCl	177,47	1,755	1,755
	MgSO ₄	389,10	1,940	1,940
	Sheather	1692,75		1,960
	Significancia	0,202	1	0,058

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

^a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4,0

^b. Alfa = 0,05.

Varios estudios coinciden en que la solución de floculación de los huevos del parásito es un factor determinante en las evaluaciones de contaminación por geohelminthos en muestras de campo. Ruiz de Ybañez y col., en 2000 [15] describieron tasas de recuperación de *T. canis* entre 3,21% a 99,98 %, al emplear la solución modificada de Sheather (r entre 1,20 y 1,27 g/mL). Estos investigadores, y otros más, también describieron tasas menores de recuperación de huevos de *Toxocara*, usando soluciones de floculación compuestas por NaCl ($r = 1,209$ g/mL) y ZnSO₄ ($r = 1,09$ a 1,27 g/mL) [17, 18].

3.2 Amplificación (PCR-ITS-2) de *T. canis*

La reacción de PCR permitió confirmar la identidad del ADN extraído desde la suspensión de huevos de *Toxocara* separados con la solución modificada de Sheather, obteniéndose amplificadas del tamaño esperado (533 pb). Siete (53,84%) de las 13 muestras de suelo recolectadas en el Parque Sagrado Corazón de Jesús de la ciudad de Barranquilla fueron positivas para *T. canis* (Figura 2).

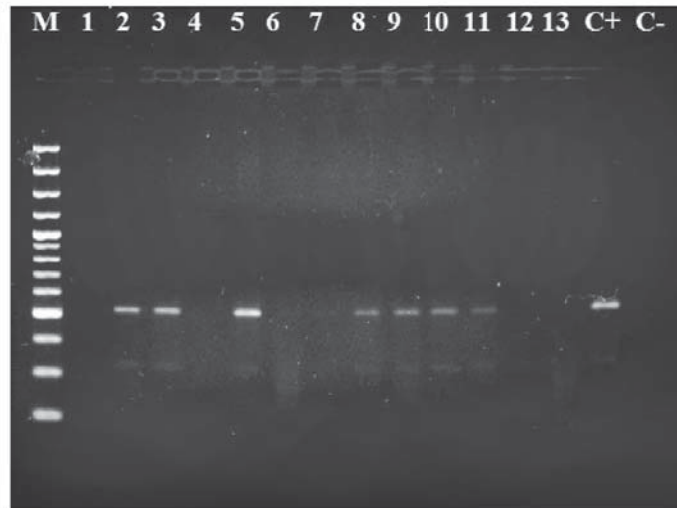


Figura 2. Producto amplificado del ITS2 del ADNr de *T. canis*.
 Línea M: Ladder 100 pb; líneas 1-13: Muestras; líneas C+ y C-: Control positivo y negativo.

Se observó que el porcentaje de muestras positivas por PCR fue mayor al obtenido en la evaluación microscopía (38,5%). Esta diferencia podría explicarse por la alta sensibilidad de la PCR, la cual es capaz de detectar hasta 2 parásitos por muestra (dato no mostrado). Adicionalmente, el resultado de la secuenciación de nucleótidos, de uno de los amplificados, mostró un porcentaje de similitud del 99% con el ITS2 del ADNr de *T. canis* (GenBank: AB110032.1) (Figura 3).

Toxocara canis genes for internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: Tnj1
 Sequence ID: dbj|AB110032.1 Length: 400 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
706 bits(382)	0.0	394/400(99%)	2/400(0%)	Plus/Plus
Query 35	CATTGAGC-CTAGAATTTTCGCACACTACATTGCNCCATCGGGTTCATTCCCCTGGGCACG	93		
Sbjct 2	CATTGAGCACTAAAATTTTCGAACGC-ACATTGCGCCATCGGGTTCATTCCCCTGGGCACG	60		
Query 94	TCTGGCTGAGGGTCAGTATATTAAGGAGTATGATGGGCGCGCCAATTTATGGAATGTGAT	153		
Sbjct 61	TCTGGCTGAGGGTCAGTATATTAAGGAGTATGATGGGCGCGCCAATTTATGGAATGTGAT	120		
Query 154	TAACGCGCAAGGTTGTGGTGCATTTCGGTGAGCTATGCTGGTGTGGTAATGGATATTGTGC	213		
Sbjct 121	TAACGCGCAAGGTTGTGGTGCATTTCGGTGAGCTATGCTGGTGTGGTAATGGATATTGTGC	180		
Query 214	AATGTACAGCGTACCTTGCCAAGGAAATATTGCACAAGAAATGGCTGTCGTTTGCTCG	273		
Sbjct 181	AATGTACAGCGTACCTTGCCAAGGAAATATTGCACAAGAAATGGCTGTCGTTTGCTCG	240		
Query 274	TAAAGAGGCAAAATGGCCATGAGTGTATGTTGCGTTGCTTCACGATACGGCCTCCAGCA	333		
Sbjct 241	TAAAGAGGCAAAATGGCCATGAGTGTATGTTGCGTTGCTTCACGATACGGCCTCCAGCA	300		
Query 334	AACGTTGTTTATTGTTTGGTTGTGGCAGCATCCAGGTTGGAGGTGGCGTTATCGGTCGCT	393		
Sbjct 301	AACGTTGTTTATTGTTTGGTTGTGGCAGCATCCAGGTTGGAGGTGGCGTTATCGGTCGCT	360		
Query 394	TGAATGAGGAATGCATGGCGAATGGTTGAAATGAGAtttt	433		
Sbjct 361	TGAATGAGGAATGCATGGCGAATGGTTGAAATGAGATTTT	400		

Figura 3. Alineamiento básico de la secuencia de nucleótidos del amplificado del ITS2 del ADNr de *T. canis*.
<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

La contaminación del suelo por formas infectantes del nemátodo *T. canis* ha sido descrita en parques públicos de algunos países en Europa [19, 20], Asia [21, 22] y América Latina [23, 24, 25, 26]. En la mayoría de estas investigaciones, la metodología usada para detección de *T. canis* involucró un paso inicial de aislamiento de los huevos por la técnica de flotación, seguido de identificación por microscopía con base a caracteres morfológicos y tamaño típico.

En Colombia, la contaminación con huevos de *Toxocara* y otros parásitos zoonóticos fue descrita en parques de la localidad de Suba, Bogotá [27] y en el municipio de Bucaramanga, Santander [28]. En ambos estudios se empleó la técnica de flotación para el aislamiento de los huevos del *Toxocara*, seguido de identificación por microscopía, reportándose porcentajes de positividad del 0,90% y 3,77%, respectivamente. Estos resultados podrían estar subestimando la frecuencia real de este parásito en el suelo de parques públicos, como lo sugiere el alto porcentaje de cachorros infectados con *T. canis*, reportados en Bogotá, durante 1987-1988 (43,6%) y en el año 2000 (66,7%) [29, 30]. A pesar de que la microscopía es considerada la prueba de oro para la identificación de huevos de *Toxocara* spp en suelo, desde hace algunos años se están empleando técnicas alternativas más sensibles y específicas como la PCR. Un estudio publicado recientemente por Khademvatana y colaboradores (2014), describe una mayor eficiencia de la técnica PCR-ITS-2 para la detección de huevos de *T. canis* en muestras de suelo colectadas en plazas, calles, parques públicos, y vertederos de basura de la población de Ahvaz, en el suroeste de Irán. En este estudio los huevos de *Toxocara* fueron aislados por floculación con solución de NaNO_3 ($r= 1,3 \text{ g/mL}$) y el ADN usado para la PCR fue extraído con el estuche comercial QIAamp DNA Mini, previa digestión con proteinasa K [21]. Nuestro estudio presenta una estrategia similar, sin embargo, la extracción del ADN se realizó con un buffer de lisis, lo cual disminuiría los costos al aplicarse este procedimiento en estudios epidemiológicos, donde se procesa un gran volumen de muestras.

4 Conclusión

A pesar de que el tamaño de la muestra en el presente estudio fue bajo ($N = 13$), se observó que la estrategia de aislamiento de los huevos del parásito por floculación con solución modificada de Sheather y posterior amplificación del transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosomal (ADNr) de *T. canis* (PCR-ITS-2), es una metodología eficiente para evaluar la contaminación de suelo por huevos de este nemátodo. Esta metodología podría aplicarse en estudios epidemiológicos que evalúen el riesgo de Toxocariasis en la población susceptible que acude a los parques públicos en Colombia.

Referencias bibliográficas

- [1] Macpherson, CN. (2013). The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance; *International Journal for Parasitology* 43: 999–1008.
- [2] Despommier, D. (2003). Toxocariasis: clinical aspects epidemiology, medical ecology, and molecular aspects; *Clinical Microbiology Journal* 16: 265–272.

- [3] Glickman, T. and Shofer, S. (1987) Zoonotic visceral and ocular larva migrans. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 17: 39–53.
- [4] Good, B. (2004). Ocular toxocariasis in school children. *Clinical Infectious Disease* 39: 173–178.
- [5] Glickman, T., Schantz, M., and Cypess, R. (1979) Canine and human toxocariasis: review of transmission, pathogenesis and clinical disease. *Journal Am Veterinary Medic Association* 175: 1265-1269.
- [6] Fahrion, A., Staebler, S., and Deplazes, P. (2008) Patent *Toxocara canis* infections in previously exposed and in helminth-free dogs after infection with low numbers of embryonated eggs. *Veterinary Parasitology* 152: 108–115.
- [7] Uga, S., Matsuo, J., Kimura, D., Rai, K., Koshino, Y., and Igarashi, K. (2000) Differentiation of *T. canis* and *T. cati* eggs by light and scanning electron microscopy. *Veterinary Parasitology* 92: 287–294.
- [8] Uga, S., Matsumura, T., Aoki, N., and Kataoka, N. (1989) Prevalence of *Toxocara* species eggs in the sandpits of public parks in Hyogo Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Parasitology* 38: 280–284.
- [9] Krämer, F., Vollrath, T., Schnieder, T., and Epe, C. (2002) Improved detection of endoparasite DNA in soil sample PCR by the use of anti-inhibitory substances. *Veterinary Parasitology* 108(3): 217-226.
- [10] Dryden, M., Payne, P., Ridley, R., and Smith, V. (2005) Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. *Veterinary Therapeutics* 6 (1): 1-17.
- [11] Mikaeili, F., Kia, E., Sharbatkhori, M., Sharifdini, M., Jalalizand, N., Heidari, Z., Zarei, Z., Stensvold, C., and Mirhendi, H. (2013) Comparison of six simple methods for extracting ribosomal and mitochondrial DNA from *Toxocara* and *Toxascaris* nematodes. *Experimental Parasitology* 134: 155–159.
- [12] Jacobs, D., Zhu, X., Gasser, R., and Chilton, N. (1997) PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog fox and cat. *Acta Tropica* 68: 191–200.
- [13] Dada, O. (1979) A new technique for the recovery of *Toxocara* eggs from soil; *Journal Helminthology* 53: 141–144.
- [14] Oge, S., and Oge, H. (2000). Prevalence of *Toxocara spp.* eggs in the soil of public parks in Ankara, Turkey. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*; 92: 75-79.

- [15] Ruiz de Ybáñez, R., Garijo, M., Goyena, M., and Alonso, D. (2000). Improved methods for recovering eggs of *Toxocara canis* from soil. *Journal Helminthology* 74: 349-353.
- [16] Santarém, V., Magoti, L., and Sichiari, T. (2009) Influence of variables on centrifuge-flotation technique for recovery of *Toxocara canis* eggs from soil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 51(3): 163-167.
- [17] Quinn, R., Smith, H., Bruce, G., and Girdwood, A. (1980). Studies on the incidence of *Toxocara* and *Toxascaris spp.* ova in the environment. A comparison of flotation procedures for recovering *Toxocara spp.* ova from soil. *Journal Helminthology* 84, 83–89.
- [18] Santarém, V., Felix, A., Rodenas, R., Assis, A. y da Silva, A. (2010). Contaminação por ovos de *Toxocara spp.* em praças públicas das regiões central e periurbana de Mirante do Paranapanema, São Paulo, Brasil. *Veterinária e Zootecnia* 17(1): 47-53.
- [19] Bojar, H., Kłapeć, T. (2012) Contamination of soil with eggs of geohelminths in recreational areas in the Lublin region of Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 19(2): 267-270.
- [20] Dado, D., Izquierdo, F., Vera, O., Montoya, A., Mateo, M., and Fenoy, S. (2012). Detection of zoonotic intestinal parasites in public parks of Spain. Potential epidemiological role of microsporidia. *Zoonoses Public Health* 59 (1): 23-8.
- [21] Khademvatan, S., Abdizadeh, R., Tavalla, M. (2014) Molecular characterization of *Toxocara spp.* from soil of public areas in Ahvaz southwestern Iran. *Acta Tropica* 135 (1): 50-4.
- [22] Fajutag. A. and Paller. V. (2013). *Toxocara* egg soil contamination and its seroprevalence among public school children in Los Baños, Laguna, Philippines. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 44 (4): 551-560.
- [23] Sprenger, L. K., Green, K. T., Molento, M. B. (2014). Geohelminth contamination of public areas and epidemiological risk factors in Curitiba, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 23: 69-73.
- [24] Romero, C., Mendoza, G., Bustamante, L., Yáñez, S., and Ramírez, N. (2010). Contamination and viability of *Toxocara sp.* in feces collected from public parks, streets and dogs in Tejepilco at the subhumid tropic of Mexico. *Journal of Animal and Veterinary Advances*; 9: 2996-2999.
- [25] Armstrong, A., Oberg, C. y Orellana, J. (2011). Presencia de huevos de parásitos con potencial zoonótico en parques y plazas públicas de la ciudad de Temuco, Región de La Araucanía, Chile. *Archivos de medicina veterinaria* 43: 127-134.

- [26] Iannacone, J., Alvaríño, L. y Cárdenas, J. (2012). Contaminación de los suelos con huevos de *Toxocara canis* en parques públicos de Santiago de Surco, Lima, Perú, 2007-2008. *Neotropical Helminthology* 6: 97- 108.
- [27] Polo, L., Córtes, J., Villanil, L., and Prieto, E. (2007). Contaminación de los parques públicos de la localidad de Suba, Bogotá con nemátodos zoonóticos. *Revista de Salud Pública* 9: 550-557.
- [28] Cala, F., Duran, L. F., Gómez, C. (2010). Determinación de la presencia de estados inmaduros (huevos, larvas) de parásitos nematodos zoonóticos (*Toxocara spp.*, *Uncinaria spp.* y *Strongyloides spp.*) en los parques públicos urbanos del municipio de Bucaramanga, Santander. *Revista Spei Domus* 6: 27-31.
- [29] Agudelo, C., Villareal, E., Cáceres, E., López, C., Eljach, J., Ramírez, N., Hernández, C., Corredor, A. (1990). Human and dogs *Toxocara canis* infection in a poor neighborhood in Bogota. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85(1): 75-8.
- [30] Acero, M., Muñoz, M., Flórez, A. Santiago y Nicholls, R. (2001). Seroprevalencia de anticuerpos contra *Toxocara canis* y factores de riesgo en niños, Ciudad Bolívar, Bogotá, D.C., 2000. *Biomédica* 21: 256-63.

Dirección de los autores

Dary Luz Mendoza Meza

Programa de Química, Universidad del Atlántico, Barranquilla - Colombia
darymendoza@mail.uniatlantico.edu.co

Humberto Maldonado Santana

Programa de Biología, Universidad del Atlántico, Barranquilla - Colombia
maldonadohjs@gmail.com