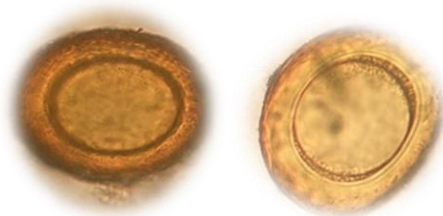




**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”
Centro de investigaciones, diagnóstico y referencia
Departamento de Parasitología**

Tesis para optar por el título de Máster en Parasitología



**Contaminación de suelos de parques con *Toxocara* spp., en los
períodos poco lluvioso y lluvioso, La Lisa, 2021**

Autor: Dr. MVZ. Adiel González González

La Habana

2023

**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
Centro de investigaciones, diagnóstico y referencia
Departamento de Parasitología**

Tesis para optar por el título de Máster en Parasitología

**Contaminación de suelos de parques con *Toxocara* spp., en los
períodos poco lluvioso y lluvioso, La Lisa, 2021**

Autor: Dr. MVZ. Adiel González González

Tutores: Lic. Idalia Sariego Ramos, MSc.

Lic. Magilé C. Fonseca Quintana, Dr. C.

La Habana

2023

"La amplitud de interés comunes entre la salud animal y la salud humana, nos hace pensar en una sola Medicina, veterinarios y médicos deben trabajar juntos."

Rudolf Virchow

Dedicatoria

- *A mi abuela Ángela de la Caridad Díaz Borrego por estar siempre y ser mi motor impulsor.*

Agradecimientos

- *Al oponente y demás miembros del tribunal.*
- *A mis tutoras Lic. Idalia Sarriego Ramos y Lic. Magilé C. Fonseca Quintana, por su gran enseñanza y dedicación durante este proceso.*
- *A Lic. Hilda María Hernández Álvarez y Lic. Lianet Monzote Fidalgo por su apoyo incondicional.*
- *Al profesor Waldemar Baldoquín Rodríguez por su colaboración.*
- *A mi esposa e hijo por su apoyo y ser mi razón de vida.*
- *A mis padres por su preocupación y su apoyo incondicional.*
- *A mis compañeros del Departamento de Parasitología del IPK que sin ellos no hubiera sido posible esta tesis.*
- *Al Dr. MVZ Leisan Cepero Fiallo por su colaboración.*
- *Al Tec. veterinario Yoesnay Saiz Guerra por su colaboración.*

Resumen

La toxocarosis es una de las infecciones parasitarias que se transmiten por el suelo. Los principales agentes causales son *Toxocara canis* y *Toxocara cati*, cuyos hospederos definitivos son perros y gatos, respectivamente. Para el control y la prevención de la toxocarosis resulta de gran importancia el estudio de la contaminación del suelo con huevos de estas especies. En la presente investigación se comparó la contaminación del suelo de parques del municipio La Lisa, por especies de *Toxocara*, entre los períodos poco lluvioso y lluvioso de 2021. Para ello, se realizó un estudio observacional longitudinal en el que se colectaron muestras de suelo en 23 parques públicos, mediante el método de las diagonales. El primer muestreo se realizó en el período comprendido entre febrero y abril y el segundo muestreo, entre julio y octubre. Las muestras se analizaron mediante el método de Sheather, se observaron los huevos de parásitos mediante microscopía directa y posteriormente, se identificaron las especies de *Toxocara* a que pertenecían los huevos, mediante qPCR. La positividad a *Toxocara* en el período poco lluvioso fue de 73,9 % y en el lluvioso de 82,6 %, sin que existieran diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$). El número de muestras positivas por parque, el total de huevos por parque y la intensidad de la contaminación, aumentaron en el período lluvioso, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P>0,05$) respecto al período poco lluvioso. Se encontró una cantidad mayor de huevos de *T. canis*, con respecto a *T. cati* en cada período ($P<0,05$); aunque ambas especies se encontraron en un número similar de parques ($P>0,05$). Al combinar los resultados de ambos períodos climatológicos, se demostró que 91,3 % de los parques del municipio La Lisa se encontraban contaminados con huevos del género *Toxocara*, lo que representa una amenaza para la salud pública y veterinaria.

Listado de abreviaturas y unidades de medidas

ADN: ácido desoxirribonucleico.

CT: ciclo umbral, del inglés *cycle threshold*.

d: densidad

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

ELISA: ensayo inmunoenzimático ligado a enzima, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*.

g: gravedad(es).

H₂O: agua.

IC: intervalo de confianza.

IgG: inmunoglobulina G.

IPK: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí

L1: primer estadio de desarrollo larval

L2: segundo estadio de desarrollo larval

L3: tercer estadio de desarrollo larval

L4: cuarto estadio de desarrollo larval

LMO: larva *migrans* ocular.

LMV: larva *migrans* visceral.

MIO: microscopia óptica

NaCl: cloruro de sodio.

NaClO: hipoclorito de sodio

p/v: parte por volumen.

PBS: tampón fosfato salino siglas del inglés, *phosphate buffered saline*.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*.

pH: potencial de hidrógeno.

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, del inglés *real time PCR*.

R²: coeficiente de determinación.

TE: toxocarosis encubierta.

TES: tampón Tris-HCl 0,2 M; pH 8,0; EDTA.

TES-120: antígeno de excreción-secreción de larvas de *Toxocara canis* de 120 kDa.

TES-32: antígeno de excreción-secreción de larvas de *Toxocara canis* de 32 kDa.

TH: toxocarosis humana.

TN: toxocarosis neurológica.

TO: toxocarosis ocular.

Tris-HCl: solución Tris (hidroximetil aminometano) - ácido clorhídrico.

v/v: volumen por volumen.

x: veces que aumenta tamaño del objeto, por microscopía.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Objetivos.....	3
1.1.1. Objetivo general.....	3
1.1.2. Objetivos específicos.....	3
2. Marco teórico	4
2.1. Clasificación taxonómica de especies de <i>Toxocara</i>	4
2.2. Morfología y ciclo de vida.....	5
2.2.1. Huevos.....	6
2.2.2. Larvas.....	7
2.2.3. Adultos.....	7
2.2.4. Ciclo de vida.....	8
2.3. Inmunopatogenia.....	10
2.4. Manifestaciones clínicas.....	12
2.5. Diagnóstico.....	14
2.5.1. Uso de la biología molecular.....	15
2.7. Epidemiología, control y prevención.....	17
2.8. Estudios de la toxocarosis en Cuba.....	19
2.9. Métodos para determinar la presencia de huevos de helmintos en muestras de suelo.....	20
3. Materiales y métodos	24
3.1. Diseño de estudio.....	24
3.2. Universo de estudio.....	24
3.3. Técnicas y procedimientos.....	25
3.3.1. Obtención de huevos de <i>Toxocara</i> para ser usados como controles.....	26
3.3.2. Determinación del método óptimo para la ruptura de la cubierta de los huevos de <i>Toxocara</i>	27
3.3.3. Colecta de las muestras de suelo.....	28
3.3.4. Determinación de la presencia de huevos de <i>Toxocara</i> en las muestras de suelo.....	29
3.3.5. Extracción de ácido desoxirribonucleico.....	30
3.3.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	30
3.3.7. Cuantificación molecular.....	31
3.4. Operacionalización de variables.....	32
3.5. Procesamiento estadístico.....	34

3.6. Consideraciones éticas	34
4. Resultados y discusión.....	36
4.1 Proporción de parques contaminados con huevos de <i>Toxocara</i> en el municipio La Lisa.	36
4.2. Comparación de la contaminación del suelo de los parques del municipio La Lisa con huevos del género <i>Toxocara</i> , entre los períodos poco lluvioso y lluvioso.....	43
4.3. Identificación de las especies de <i>Toxocara</i> presentes en el suelo de parques del municipio La Lisa	51
4.4. Consideraciones generales	59
5. Conclusiones.....	61
6. Recomendaciones.....	62
7. Referencias bibliográficas	

Introducción

1. Introducción

El suelo constituye una fuente de infección común para animales y humanos, pues a través de él se transmiten un gran número de patógenos, entre los que se destacan los parásitos (Mandarino y col, 2010). La principal vía de contaminación del suelo con parásitos es la deposición de las heces de animales y humanos infectados, que contienen huevos/larvas (Traversa y col, 2014). A su vez, los animales y humanos adquieren las parasitosis al ingerir accidentalmente huevos embrionados presentes en el suelo, o mediante la penetración de las larvas en estadio infectivo a través de la piel (Ma y col, 2018). Por su parte, los huevos de varias especies de helmintos son altamente resistentes a cambios en la humedad y temperatura del ambiente, por lo que pueden sobrevivir por largos períodos de tiempo en el medio ambiente (Storey y Phillips, 1985; Periago y col, 2015).

Entre las infecciones parasitarias que se transmiten por el suelo se encuentra la toxocarosis. Esta infección de distribución mundial, se produce principalmente por *T. canis* y por *T. cati*, cuyos hospederos definitivos son perros y gatos, respectivamente (Ma y col, 2018). En sus hospederos definitivos, el parásito completa sus etapas de desarrollo en el intestino delgado, los huevos se excretan en las heces y embrionan en el suelo. Con la ingestión de estos huevos embrionados ocurre la contaminación de otro hospedero (Chen y col, 2018).

En la toxocarosis humana (TH), el hombre se comporta como hospedero paraténico, por lo que en el interior del cuerpo humano las larvas no se desarrollan, ni se reproducen. Esto significa que luego de la eclosión de los huevos en el intestino, las larvas emergen e invaden la mucosa intestinal. Posteriormente, las larvas migran a través de la pared intestinal y mediante la corriente sanguínea, viajan hacia cualquiera de los órganos del cuerpo humano. Aunque la infección transcurre principalmente de forma asintomática, también pueden presentarse síndromes clínicos severos debido a lesiones orgánicas causadas por las larvas. Esto se debe a que las larvas muestran mayor predilección por el hígado (larva *migrans* visceral

(LMV)), el sistema nervioso (toxocarosis neurológica (TN)) y los ojos (larva *migrans* ocular (LMO)) (Despommier, 2003; Ma y col, 2018).

Para la cabal comprensión de la toxocarosis se deben combinar conocimientos del área médica y veterinaria, lo que además permite establecer criterios integradores para su tratamiento, control y prevención. Esto implica un nuevo paradigma, en el que se reconoce que la salud humana y la sanidad animal son interdependientes y están vinculadas a sus ecosistemas (Hurtado y Muñoz, 2022).

Debido a que la ingestión accidental de huevos embrionados de *Toxocara* representa la principal vía de transmisión al hombre, el estudio de la contaminación ambiental por huevos del parásito es de gran importancia para la prevención de la toxocarosis (Joy y col, 2017). Algunas investigaciones, han enfatizado la relación proporcional directa entre la contaminación del suelo con los huevos de *Toxocara* y la seropositividad en la población humana circundante (Mizgajka, 2001; Fajutag y Paller, 2013;). Por otro lado, numerosas investigaciones realizadas con muestras de suelo en diferentes partes del mundo, demuestran que existe una gran contaminación ambiental, fundamentalmente en lugares públicos, como parques, en especial los infantiles, donde la contaminación varía entre 18 y 50 %, aproximadamente (Laird y col, 2000; Mendoza y Maldonado, 2015; Vanhee y col, 2015; Gallardo y col, 2018). Se plantea que, en los parques con mayor afluencia de usuarios, la gran población de mascotas en áreas urbanas, el número creciente de animales callejeros y la estación del año pueden contribuir al incremento de esta contaminación (Apóstol y col, 2013; Periago y col, 2015; Tudor, 2015; Cáceres y col, 2017; Mizgajska y col, 2017; Papavasiliopoulos y col, 2018; Ramírez y col, 2019).

La dificultad para distinguir morfológicamente las dos especies de *Toxocara* tanto en muestras ambientales como en muestras humanas constituyó una de las grandes limitantes de la detección eficaz de estos parásitos (Fisher, 2003). Sin embargo, con el advenimiento de la biología molecular se han desarrollado métodos basados en la

biología molecular, que permiten la identificación específica de ambas especies de *Toxocara* (Durant y col, 2012).

En Cuba, son escasos los trabajos dedicados al estudio de la contaminación ambiental de los espacios públicos con huevos de especies del género *Toxocara* (Sariago y col, 2012). Los reportes más recientes de La Habana datan de la década de los años 90 (Duménigo y Galvez, 1995; Laird y col, 2000). En estos trabajos, no se tuvo en cuenta la estación del año y no se identificaron las especies a que pertenecían los huevos debido a que no existían los métodos que permitían la diferenciación de las mismas (Duménigo y Galvez, 1995; Laird y col, 2000). Precisamente, para enriquecer y actualizar los estudios cubanos, la presente investigación se propone determinar, mediante la combinación de técnicas convencionales, la contaminación ambiental con huevos de *Toxocara* en el suelo de parques del municipio La Lisa, en diferentes estaciones del año y la identificación de los parásitos a nivel de especie mediante técnicas de biología molecular.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Comparar la contaminación de suelos de parques con *Toxocara* spp., en los períodos poco lluvioso y lluvioso, La Lisa, 2021.

1.1.2. Objetivos específicos

1. Determinar la proporción de parques contaminados con huevos de *Toxocara* en el municipio La Lisa.
2. Comparar la contaminación de parques con huevos de *Toxocara* en el municipio La Lisa, en el período poco lluvioso y en el lluvioso.
3. Identificar las especies de *Toxocara* presentes en los parques del municipio La Lisa, mediante biología molecular.

Marco Teórico

2. Marco teórico

2.1. Clasificación taxonómica de especies de *Toxocara*

Las especies de *Toxocara* que afectan al hombre pertenecen a la superfamilia ascaridoidea que incluye numerosas especies, entre las que se encuentran los helmintos intestinales más comunes que infectan a mamíferos caninos y felinos (Fisher, 2003; Okulewicz y col, 2012). A continuación, se muestra la clasificación taxonómica de las especies de *Toxocara* que más frecuentemente infectan al hombre (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las especies de *Toxocara* que con mayor frecuencia infectan al hombre.

Clasificación Taxonómica	
Superreino	Eukaryota
Reino	Metazoa
Clado	Ecdysozoa
Phylum	Nematoda
Clase	Chromadorea
Orden	Rhabditida
Suborden	Spirurina
Infraorden	Ascaridomorpha
Superfamilia	Ascaridoidea
Familia	Toxocaridae
Género	<i>Toxocara</i>
Especie	<i>canis, cati.</i>

Fuente: Schoch y col, 2020

2.2. Morfología y ciclo de vida

Las especies de *Toxocara* son gonocóricas y se presentan en forma de huevo o larva, de tamaño microscópico, o en forma de adulto, que puede llegar a medir varios centímetros de longitud (Figura 1 y 2).



Figura 1. Fotografía de las formas del parásito *Toxocara canis*. A: huevos (400X), B: larvas (200X), C: adultos. Fuente: Laboratorio de zoonosis, 28 de diciembre de 2011, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí.



Figura 2. Formas del parásito *Toxocara cati*. A: huevos (400X), B: larvas (100X), C: adultos. Fuente: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=toxocara+cati>

Las especies del género *Toxocara* presentan gran similitud en su morfología. Las características principales del estadio adulto que permiten distinguir entre las

especies son el tamaño, la morfología de los labios y de las aletas cervicales, la longitud de las espículas y las características del aparato reproductor femenino (Borecka y col, 2010). En la figura 3 se muestra el extremo anterior del parásito adulto de tres de las especies del género *Toxocara* y se distinguen las diferencias en cuanto al ancho y largo de las aletas cervicales.

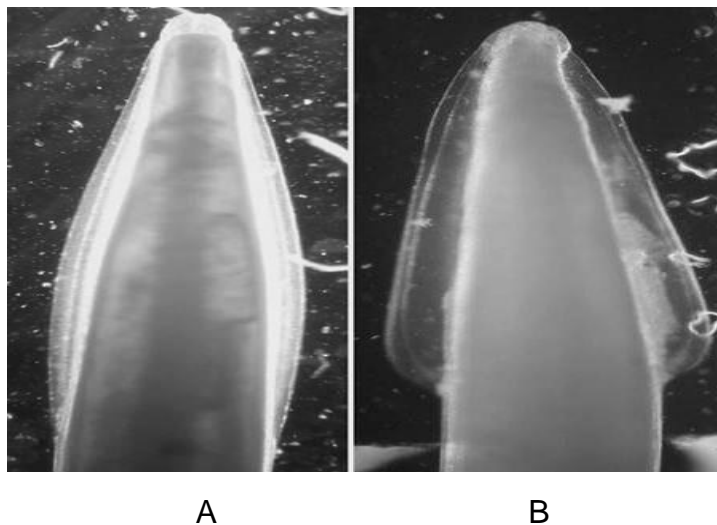


Figura 3. Extremo anterior del parásito adulto. A: *Toxocara canis*, B: *Toxocara cati*. Fuente: modificado de

https://www.google.com.cu/url?esrc=s&q=&rct=j&sa=U&url=https://brainstudy.info/images/difference-between-toxocara-canis-and-toxascaris-leonina&ved=2ahUKEwj257KamffxAhVineAKHZ6nCgw49AMQr4kDMAh6BAgDEAI&usq=AOvVaw2yeyf_npykKvxl6le_mfGO

2.2.1. Huevos

Los huevos de *T. canis* y *T. cati* son esféricos, de color marrón, más oscuro en el caso de *T. canis*, con cubierta externa gruesa e irregular, o sea presentan un sistema reticular superficial de crestas y nervaduras (Naidu, 1981); sus ejes miden aproximadamente 71,6–91,2 por 63,4–79,0 mm para *T. canis*; mientras que los de *T. cati* alcanzan 63,7– 88,1 por 53,3–73,3 mm (Uga y col, 2000). En ambas especies, el protoplasma se aprecia con un aspecto granuloso (Durette y Chabaud, 1974). Los

huevos se expulsan con las heces por los hospederos definitivos y embrionan en el medio exterior en un período de 2 a 3 semanas, según condiciones de humedad y temperatura (Mendoza, 2001).

2.2.2. Larvas

Existen cuatro estadios larvales de desarrollo (L1-L4). Las larvas L3 del género *Toxocara* miden aproximadamente 400 µm de largo por 20 µm de ancho, poseen una cutícula estriada y el extremo posterior en forma de gancho (Mendoza, 2001). En el medio externo las larvas siempre permanecen dentro de los huevos, dentro de los cuales (Gibbons y col, 2001), realizan dos mudas (L1-L2, L2-L3) (Bruñaská y col, 1995). El diámetro de la sección transversal de la larva constituye el único parámetro que permite una distinción morfológica entre las larvas de *T. canis* y *T. cati* (Nichols, 1956).

2.2.3. Adultos

En ambas especies de parásitos, las hembras son más grandes que los machos. Las hembras de *T. cati* miden entre 4 y 10 cm y el macho entre 3 y 6 cm de largo; mientras en *T. canis* la hembra puede alcanzar de 10 a 18 cm y el macho 9 a 13 cm, el diámetro oscila entre 0,2 y 0,3 cm en ambas especies. En la región anterior presentan una boca provista con tres labios bien desarrollados y aletas cervicales, que en el caso de *T. canis* son mucho más largas que anchas y miden entre 2 y 4 mm de largo por 0,2 mm de ancho. En comparación, las aletas cervicales de la especie *T. cati* son más cortas y anchas y asemejan una cabeza de flecha. El esófago alcanza alrededor de 5 mm de largo incluyendo el ventrículo, el cual mide 0,5 mm de longitud. En la hembra, la vulva se encuentra situada entre la quinta y sexta partes anteriores del cuerpo del verme (Gillespie, 1988; Nestor y col, 2000; Mendoza, 2001; Chen y col, 2012).

2.2.4. Ciclo de vida

El ciclo de vida de las especies de *Toxocara* es complejo e incluye dos clases de hospederos: definitivos y paraténicos; a continuación, se mencionan las especies hospederas y se describen los ciclos (Iowa State University Center for Food Security and Public Health, 2016). El ciclo de *T. canis* incluye los siguientes hospedadores:

- ✓ Definitivos: perros y cánidos salvajes tales como: zorros, coyotes, lobos, chacales, hienas y dingos, en los mismos que el parásito alcanza su madurez y se reproduce sexualmente.
- ✓ Paraténicos: comprende una gran variedad de mamíferos, incluidos los cerdos, las ovejas, los roedores, así como los pollos, las codornices, los primates no humanos y el hombre, todos constituyen hospederos accidentales en los que el parásito no evoluciona, pero puede sobrevivir alojado en los tejidos.

El ciclo de vida de *T. cati* involucra a los hospedadores:

- ✓ Definitivos: gatos y félidos silvestres.
- ✓ Paraténicos: animales vertebrados.

El ciclo de vida de *T. canis* inicia cuando el perro ingiere los huevos embrionados presentes en el suelo (Figura 4). Con la llegada de los huevos al intestino, las larvas emergen de los mismos y en dependencia de la edad del perro puede llegar a desarrollarse el adulto, o pueden quedar larvas alojadas en los tejidos.

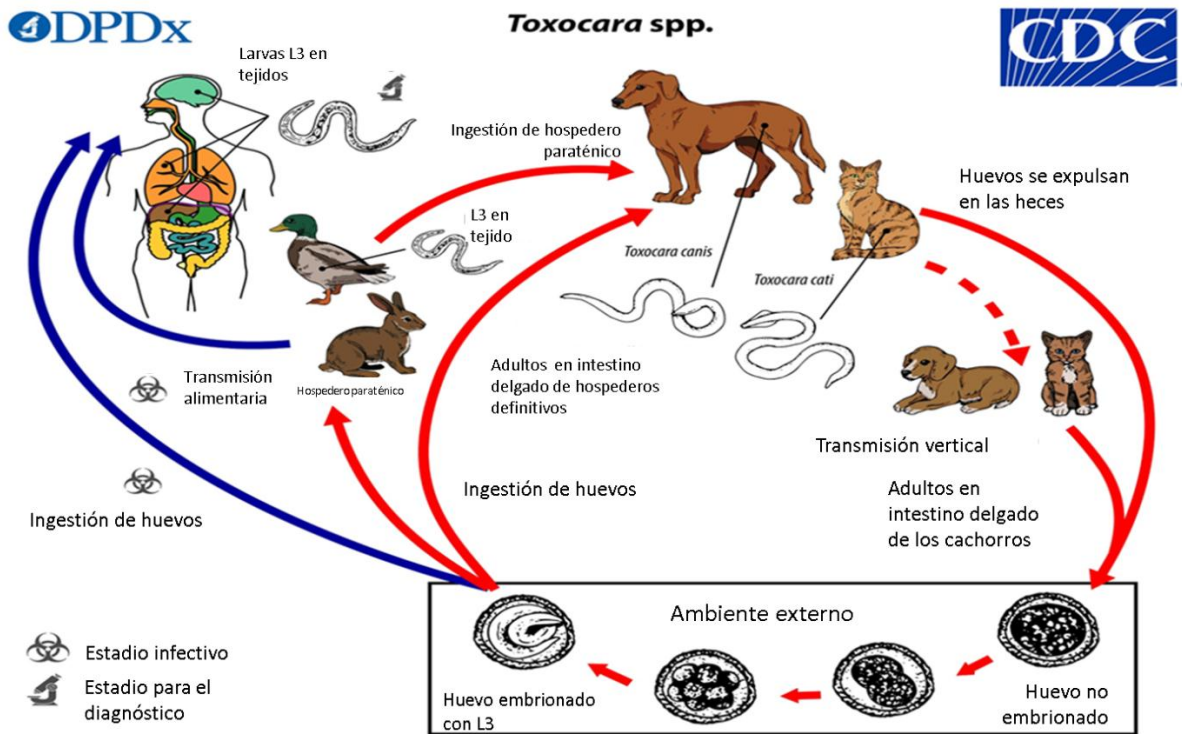


Figura 4. Ciclo de vida de *Toxocara canis* y *T. cati*. Fuente: CDC-DPDx-Toxocariasis, <http://www.cdc.gov> , última revisión: 9 de Julio, 2019.

Cuando se trata de un cachorro menor de 5 semanas de edad, las larvas penetran la pared intestinal y migran a través de la corriente sanguínea al hígado, pulmones donde ingresan en los alveolos y viajan a las vías aéreas, pasan a la tráquea donde pueden ser expulsadas al exterior mediante tos o estornudos, o pueden ser deglutidos a través de la faringe. Una vez deglutida, la larva llega hasta el intestino donde muda y luego se desarrolla el estadio adulto. Finalmente, los parásitos macho y hembra copulan, esta última pone huevos que salen con las heces del hospedero.

En cachorros mayores de 5 semanas y perros adultos, al ingerir los huevos embrionados algunas de las larvas que emergen no penetran la pared intestinal, posiblemente debido a la inmunidad local, y otras penetran, pero no completan la migración de los pulmones al intestino. Las larvas migran hacia varios tejidos, donde permanecen en un estado de hipobiosis. En el caso de perras gestantes infectadas, durante la gestación estas larvas pueden reactivarse y los cachorros se pueden

infectar vía transplacentaria o transmamaria, lo que resulta en el desarrollo de vermes adultos tanto en la madre como en los cachorros. De esta manera, se excretarán huevos infectantes tanto por el cachorro, como por la madre (Iowa State University Center for Food Security and Public Health, 2016).

El ciclo de vida de *T. cati* difiere del de *T. canis*, en que el gato desarrolla infecciones patentes a cualquier edad y no ocurre transmisión transplacental. El período prepatente es aproximadamente de 6 semanas después de ingerir las larvas alojadas en los tejidos de hospederos paraténicos o por vía transmamaria, o puede alcanzar 8 semanas si se trata de la ingestión de huevos embrionados (Iowa State University Center for Food Security and Public Health, 2016).

En hospederos paraténicos como el hombre, luego de la ingestión accidental, los huevos embrionados eclosionan en el intestino liberando las larvas, estas migran por vía circulatoria a vísceras y tejidos internos del cuerpo, como hígado, corazón, pulmones, cerebro, músculos y ojos, fundamentalmente (Despommier, 2003).

Las personas pueden adquirir la toxocarosis por varias vías. Una de ellas es la ingestión accidental de huevos con L3, presentes en el suelo contaminado, en agua, en verduras crudas, frutas y vegetales (Dubná y col, 2007; Poepl y col, 2013). Por otro lado, pueden ingerirse las larvas mediante el consumo de carne y órganos crudos o mal cocidos de hospederos paraténicos infectados como: conejos, oveja, ganado y aves (Dutra y col, 2014).

2.3. Inmunopatogenia

Las larvas del parásito, en su migración, al interactuar con el sistema inmune desencadenan una reacción granulomatosa con abundantes eosinófilos (Fillaux y Magnaval, 2013). Esta reacción puede destruir al parásito o bloquear su migración, al quedar encapsulado y permanecer en estado de hipobiosis (Acha y Szyfres, 2005). En ocasiones, ante estímulos que aún no han sido identificados, las larvas

hipobióticas pueden reactivarse para reiniciar la migración, pero nunca se desarrollan, ni se multiplican, según estudios realizados en modelos animales (Holland, 2017).

Los mecanismos responsables de la patogenia en el hombre no se han dilucidado, pero se conoce que las larvas causan respuesta inflamatoria, lo que provoca efectos patogénicos (Ma y col, 2018). Las migraciones larvales producen pequeños túneles de lesiones traumáticas, inflamatorias y necróticas, que provocan daños en órganos o tejidos (particularmente en hígado, pulmón y ganglios) (Dent, 1956). Las larvas al migrar también ejercen acción expoliatriz, hematófaga e histófaga (Costamagna y Visciarelli, 2008).

Las larvas realizan mudas y secretan o excretan productos que contribuyen a desatar la respuesta inflamatoria granulomatosa. El parásito se dispone en el centro del granuloma, intacto o destruido, rodeado por eosinófilos, macrófagos; a su vez aumenta la producción de citoquinas y de anticuerpos específicos. En la periferia del granuloma se pueden encontrar histiocitos grandes, dispuestos en empalizadas y fibras colágenas concéntricas envolviendo a las células inflamatorias, las que posteriormente, se calcifican (Valencia Venezuela, 1996).

En las estructuras del ojo, el granuloma puede presentarse en la periferia o en el polo posterior provocando uveítis (Woodhall y col, 2012). Además, puede ocurrir: inflamación en la retina induciendo pigmentación retinal simple con desprendimiento de la misma (Ahn y col, 2014 a; Ahn y col, 2014 b; Jee y col, 2016), opacificación del humor vítreo o tumor fibrótico, con compromiso visual parcial, entre otras complicaciones. En el cerebro, las larvas de *Toxocara* en su migración dan lugar a pequeñas áreas de necrosis y una mínima infiltración inflamatoria (Hotez, 1993).

2.4. Manifestaciones clínicas

En el hombre, la presentación clínica se encuentra determinada por diferentes factores tales como: el número de huevos larvados ingeridos, la edad del hospedero, la intensidad de la respuesta inmune que se desarrolla y los órganos donde se asientan las larvas. En el hombre, la toxocarosis puede cursar de forma subclínica o pueden ocurrir síndromes más severos conocidos como: LMV LMO, TN y toxocarosis encubierta (TE) (Taylor y col, 1988; Pivetti, 2009).

LMV: Es la consecuencia de la migración sistémica de larvas de *Toxocara*, ocurre mayormente en niños de 2–7 años. En adultos, la mayor frecuencia se ha descrito en el este de Asia (por ejemplo, Corea Sur y Japón), luego de la ingestión de carne cruda, de cordero, pollo, o hígado de avestruz (Akao y Ohta, 2007). Dentro de las principales manifestaciones clínicas de este síndrome se encuentran: anorexia, náuseas, vómitos, dolor abdominal, fiebre alta y en la piel provoca eritema, sarpullido, prurito, eccema, paniculitis, urticaria y vasculitis (Ismail y Khalafallah, 2005). El hígado es el órgano más afectado en LMV, las enzimas hepáticas se alteran levemente y se evidencia la aparición de surcos subcapsulares al realizar el estudio laparoscópico. Se observa la formación de focos granulomatosos e inflamación (Hartleb y Januszewski, 2001; Stoicescu y col, 2011). Las larvas pueden invadir otros órganos, como el corazón, los pulmones, los riñones, y los músculos, produciendo: miocarditis, mialgia, eosinofilia, polimiositis, artritis y nefritis (Prunier y col, 2001; Kuenzli y col, 2016).

LMO: Es la forma localizada de la toxocarosis más conocida en la literatura mundial (Pawlowski, 2001). En general, es más frecuente en niños mayores de 10 años y suele cursar sin la eosinofilia característica de las otras formas de toxocarosis y puede llegar a producir la pérdida permanente de visión en el ojo afectado (Schantz y Glickman, 1978; Woodhal y col, 2012; Ahn y col, 2014 a). El parásito puede localizarse en cualquiera de las estructuras del globo ocular, ocasionando con frecuencia uveítis. La presentación clínica más frecuente es la aparición del granuloma afectando la periferia del ojo o su polo posterior posterior (Molk, 1983;

Schantz y col, 1980; Dernouchamps y col, 1990). También puede pasar casi desapercibida, debido a que el paciente solamente aqueja disminución progresiva de la agudeza visual (Minvielle y col, 1999; Magnaval y col, 2001). Pueden llegar a producirse diversas secuelas tales como: la pigmentación simple de la retina, el surgimiento de una membrana epiretinal, que se produzcan defectos en la capa fibrosa del nervio retinal o que aparezca una escara macular (Ahn y col, 2014 a; Ahn y col, 2014 b). Algunos casos presentan dolor o hemorragias intraoculares debido al intenso proceso inflamatorio. Además, se describen otras manifestaciones clínicas como: endostalmatitis difusa, papillitis, y glaucoma secundario lo que puede llevar a pérdida de la visión parcial o total (Despommier, 2003; Magnaval y col, 2001).

TN: se produce cuando las larvas de *Toxocara* invaden el sistema nervioso central, lo que ocasiona diferentes desórdenes neurológicos como meningitis, encefalitis, mielitis, convulsiones epileptiformes, trastornos conductuales, hipoestusias, paraparesias, vejiga neurógena espástica y hemiplejía (Finsterer y Auer, 2007; Sánchez y col, 2018). Por otro lado, se ha sugerido la posible relación entre la TN y los desórdenes neurodegenerativos, por ejemplo: esquizofrenia, déficits cognoscitivos, enfermedad de Parkinson idiopática y demencia (Celik y col, 2013; Fan y col, 2015).

TE: no se asocia con la invasión de ningún órgano en particular. Los pacientes presentan: dolor abdominal, fiebre, anorexia, náusea, dolor de cabeza, vómitos, faringitis, neumonía, tos, jadeo y linfadenitis cervical, esto puede acompañarse de eosinofilia (Macpherson, 2013; Fan y col, 2015). Además, se describen trastornos dermatológicos como: prurito, sarpullido, urticaria crónica o eczema (Wolfrom y col, 1995; Walsh y Haseeb, 2014).

En cuanto a los animales, las infecciones son subclínicas con frecuencia. La enfermedad se presenta comúnmente en cachorros de perros y gatos. En ellos, la toxocarosis se manifiesta con el retardo en el crecimiento y deterioro de sus

condiciones físicas. Los animales infectados tienen un pelaje sin brillo y frecuentemente tienen el abdomen aumentado. Los parásitos se pueden expulsar en el vómito o en las heces, también puede presentarse diarrea con mucus. En los cachorros con infecciones severas, se pueden presentar: neumonía, ascitis, hígado graso y enteritis (Peregrine, 2022).

2.5. Diagnóstico

La confirmación de la presencia del parásito en seres humanos es posible solo mediante la demostración de la presencia de las larvas en tejidos biopsiados, por métodos directos, lo que resulta difícil por la distribución extensiva que pudieran tener las larvas y porque se presume que la carga parasitaria en humanos es baja (Pawlowoski, 2001; Magnaval y col, 2001; Despommier, 2003; Smith y col; 2009). Además, puede resultar difícil distinguir las larvas de *Toxocara* con las de otros ascarideos, ya que en ocasiones se degeneran o puede recuperarse sólo porciones de la misma en los tejidos (Norhaida y col, 2008; Chen y col, 2012).

Debido a esto se han sugerido marcadores principales para diagnosticar la toxocarosis sintomática como son: las características de la historia epidemiológica del paciente, los signos y síntomas clínicos encontrados, la presencia de eosinofilia, así como el resultado positivo en la serología (determinación de inmunoglobulina G (IgG) anti *Toxocara*) (Pawlowoski, 2001; Smith y col, 2009). En la actualidad, se cuenta con varios estuches comerciales, desarrollados para detección de anticuerpos IgG específicos contra antígenos de excreción-secreción larvales, que se encuentran disponibles para el diagnóstico clínico y para estudios epidemiológicos en humanos (Ma y col, 2018).

En los hospederos definitivos, el hallazgo del parásito se facilita debido a que puede producirse la expulsión del parásito adulto en las heces o en el vómito, o también pueden observarse los huevos en las muestras de heces. Además, se pueden usar métodos de concentración por flotación para incrementar la probabilidad de encontrar

los huevos en las muestras de heces (Peregrine, 2022). En los animales infectados, también puede presentarse eosinofilia (mayor de $0,5 \times 10^9/L$), asociada a neumonía eosinofílica (Peregrine, 2022).

2.5.1. Uso de la biología molecular

La utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) ha contribuido a identificar satisfactoriamente las diferentes especies de *Toxocara*. Entre los métodos que se han desarrollado se encuentran la PCR punto final, la PCR basada en el polimorfismo de los fragmentos de restricción y la PCR dúplex en tiempo real (2qPCR). Estos métodos han utilizado como dianas los espaciadores internos de la transcripción 1 y 2 o los genes mitocondriales y han permitido obtener resultados precisos de cuáles especies de *Toxocara* (*T. canis* y/o *T. cati*) están presentes tanto en muestras fecales de animales, como en muestras colectadas de suelos de parques y zonas públicas (Borecka, 2004; Durant y col, 2012; Mikaeili y col, 2017). En el caso de los humanos, se ha sugerido que estas herramientas pudieran ser muy útiles para confirmar la especie, cuando se hayan larvas, o solo partes de ellas en los tejidos humanos, ya que resulta difícil distinguir morfológicamente entre las especies (Özbakış y Doğanay, 2019).

2.6. Tratamiento

El tratamiento de la TH se basa principalmente en el uso de antihelmínticos como son: albendazol, mebendazol y tiabendazol (Fillaux y Magnaval, 2013). Con la acción de estos fármacos se alcanza a reducir o eliminar el daño causado por las larvas en su migración por órganos, especialmente en el cerebro o en los ojos. Sin embargo, es necesario considerar las posibles respuestas alérgicas surgidas después de la terapia antihelmíntica, que pueden llegar a ser más graves que la enfermedad en sí (Takayanagi, 1999; Pawlowski, 2001). No obstante, la TH se presenta como una infección crónica, en la que la reactivación de la migración de las larvas en el ojo o el cerebro, puede ocurrir en cualquier momento (Pawlowski, 2001; Wisniewska y col,

2012). En consecuencia, el tratamiento específico se recomienda en casos de LMV y en algunos casos de TE.

Entre los fármacos utilizados, el albendazol representa la principal alternativa de elección. Este antihelmíntico se utiliza a una dosis diaria de 10 mg/kg de peso durante 14 días (Hotez, 1993; Magnaval y col, 2005) o una dosis diaria de 15 mg/kg durante 5 días (Pawlowski, 2001). Este tratamiento debe acompañarse con corticoesteroides para lograr una disminución de la respuesta inflamatoria. La prednisona o prednisolona son los esteroides que se utilizan con mayor frecuencia y se administran por vía oral en una dosis diaria de 1 mg/kg de peso, durante un mes, con disminución gradual de la dosis (Magnaval y col, 2005).

El tratamiento de la TO y TN debe combinar el uso de los antihelmínticos con antialérgicos. Por otra parte, algunos casos seropositivos, con títulos altos, sin ningún tipo de expresión clínica de toxocarosis pudieran requerir terapia específica para intentar disminuir el número de larvas hipobióticas o migratorias que podrían estar presentes (Pawlowski, 2001; Magnaval y col, 2005).

Por su parte el tratamiento en los animales se enfoca primeramente en las perras gestantes, por ejemplo, con la administración de dosis diarias de fenbendazol (25 mg/kg) desde el día 40 de gestación hasta dos días después del parto. Los cachorros se deben tratar lo antes posible, el tratamiento idealmente se debe administrar dos semanas después del nacimiento y repetirse transcurridas dos semanas, con intervalos de dos semanas hasta los tres meses y luego con intervalos mensuales hasta alcanzar los seis meses. De igual manera, se debe proceder con los gatos, que se pueden tratar con una dosis única de emodepside/praziquantel (0,14 mL/kg de peso) en la última semana de la gestación. En el caso de los gatitos se puede seguir el mismo régimen de tratamiento descrito anteriormente para los perros (Peregrine, 2022).

2.7. Epidemiología, control y prevención

La toxocarosis tiene una distribución cosmopolita (Figura 5), se considera endémica en la mayor parte de los países de América, África y Asia, y es de interés tanto veterinario como sanitario. El estudio epidemiológico de esta zoonosis es complejo ya que se debe considerar la interconexión de tres eslabones: la contaminación ambiental con huevos del parásito, la enfermedad en hospederos definitivos y la TH (Alba-Hurtado y col, 2022).

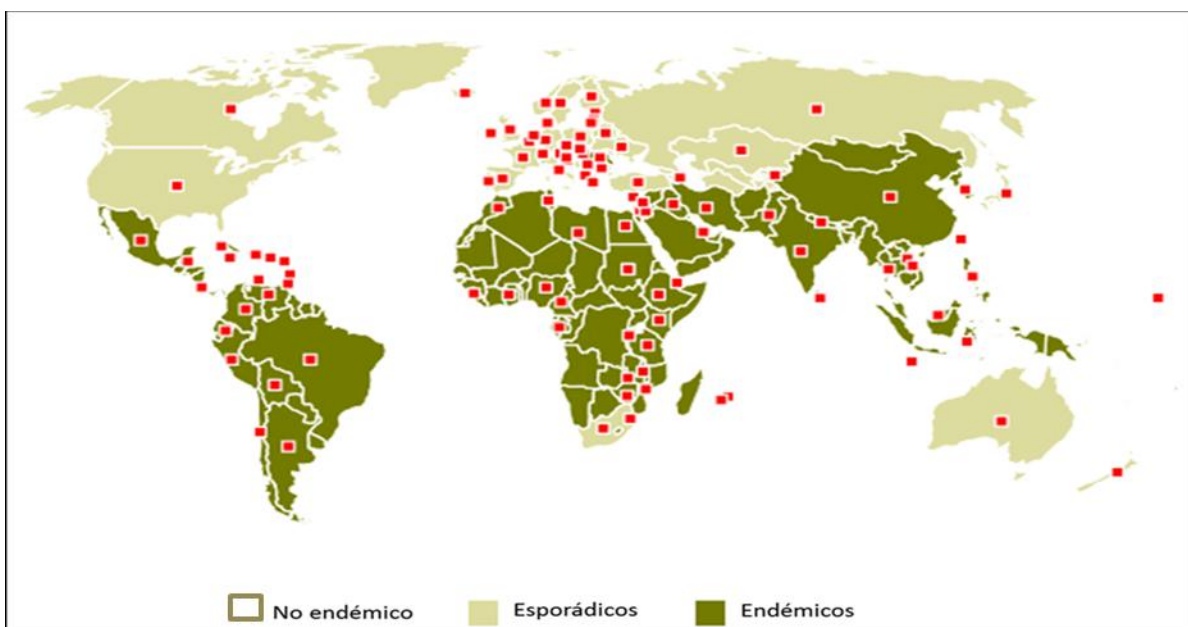


Figura 5. Distribución mundial de la toxocarosis. Los puntos rojos representan los países en los que se ha notificado la parasitosis. Fuente: GIDEON, <http://www.gideonline.com/> (Consultado 2 de febrero de 2021).

Tanto *T. canis* como *T. cati* tienen una distribución mundial (Ma y col, 2018). La prevalencia de *Toxocara* en perros y gatos respectivamente, se ha comportado con variaciones desde 1,2 % a 6,1 % en países como Australia, Holanda y Alemania (Palmer y col, 2008; Overgaauw y col, 2009).

El factor de riesgo más relacionado con la toxocarosis sintomática es la geofagia, este hábito se presenta fundamentalmente en niños menores de 5 años, vinculado a sus hábitos de juego que se relacionan a la tierra y la arena, luego al llevarse las manos sucias a la boca contraen la parasitosis (Krotten y col, 2018).

La seroprevalencia para la toxocariasis se ha estudiado tanto en niños como en adultos, por ejemplo: en 387 personas mayores de 15 años de edad de Isla Reunión la seroprevalencia alcanzó 92,8 % (Magnaval y col, 1994). En niños escolares de Manado, Indonesia, se alcanzó 85 % (Hayashi y col, 2005). Por otra parte, en 3247 personas menores de 40 años de edad y aparentemente sanas de Dinamarca, la seroprevalencia fue de 2,4 % (Stensvold y col, 2009). Un estudio en escolares de Islas Marshall reveló 87 % de seroprevalencia para *Toxocara* (Fu y col, 2014). En Lima, Perú, se estudiaron un total de 303 personas (128 hombres y 175 mujeres) de las cuales 62 resultaron positivas mediante ELISA-IgG, para una seroprevalencia de 20,5 % (Espinoza y col, 2010). Además, en estudios realizados en varias regiones de Brasil, la seropositividad a *T. canis* ha oscilado entre 4,2 % y 65,4 % (Fialho y Corrêa, 2016).

A pesar de contar con métodos serológicos no se conoce con claridad la verdadera exposición a la infección por *Toxocara*, por lo que existe una necesidad urgente de un trabajo internacional coordinado para estudiar y evaluar la carga global de TH, dando lugar a programas de prevención para esta parasitosis (Poulsen y col, 2015).

Para la prevención de la toxocarosis se deben poner en práctica varias medidas como: desparasitar regularmente a los perros (cachorros y adultos), evitar la contaminación del suelo de las áreas adyacentes a las casas y en las áreas de juego de los niños (parques infantiles) por heces de perro y gatos, las personas deben lavarse las manos después de jugar con animales o con el suelo y sobre todo antes de consumir alimentos, así como controlar la geofagia (Chen y col, 2018).

Aunque la prevención de la toxocarosis puede ser sencilla, no existe apropiada concientización sobre el alcance del problema. A pesar de que la enfermedad puede llegar a ser significativa y debilitante, la incidencia de manifestaciones clínicas graves es desconocida y el diagnóstico es difícil. Todo esto conduce a una percepción falsa de que la carga parasitaria y el impacto de la toxocarosis en la salud pública son bajos. Por ende, algunos autores se han referido a la toxocarosis como una infección olvidada de la pobreza (Hotez y Wilkins, 2009).

2.8. Estudios de la toxocarosis en Cuba

En Cuba se desconoce la prevalencia de la TH. Sin embargo, en la década del 70, se notificaron algunos pacientes con diagnóstico de LMV y aunque en muchos de ellos no fue posible identificar a qué especie pertenecía la larva presente en el material obtenido mediante biopsia, no se puede descartar que en algunos casos se tratara de *T. canis* (Fernández y col, 1974).

En 1994, se informó una seropositividad a *T. canis* de 5,1 %, en un grupo de niños sanos del municipio La Lisa, en la Ciudad de La Habana (Montalvo y col, 1994). El resultado de ese estudio contrastaba con los niveles de infección en canes y de contaminación ambiental con huevos del parásito, que se reportaron en la ciudad en esa misma época. Por ejemplo, se demostró la presencia del parásito en alrededor de 20 % de los perros domésticos que se estudiaron y aproximadamente 68 % de las áreas públicas, que se estudiaron en la Ciudad de La Habana, se encontraron contaminadas con huevos del parásito (Duménigo y col, 1994; Laird y col, 1995).

También en Cuba, en la década del 2000, se estudiaron un total de 461 perros callejeros de todos los municipios de la Ciudad de La Habana y se comprobó que aproximadamente la quinta parte de los perros se encontraban infectados con *T. canis* (Hernández y col, 2007). Por otro lado, en esa misma década, se notificaron pacientes con toxocarosis ganglionar u ocular (Luis y col, 2003; Gómez y col, 2008).

Una revisión de la literatura sobre la toxocarosis en Cuba hasta el año 2010, evidenció que el impacto de esta parasitosis en la salud pública se desconocía y que se necesitaban implementar nuevos algoritmos para el diagnóstico de TH, paralelamente con la actualización del conocimiento acerca de esta enfermedad en todos los niveles de atención médica en el país (Sariego y col, 2012).

Otro estudio seroepidemiológico con muestras procedentes de escolares de los municipios San Juan y Martínez (Pinar del Río) y Fomento (Santi Spíritus), realizado posteriormente, demostró una seropositividad de 38,8 % a *T. canis*. Además, la seropositividad se asoció con el género de los niños y con las coinfecciones por parásitos intestinales, pero no con la edad o con el municipio de residencia de los niños (Sariego y col, 2012).

En el laboratorio de referencia del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), se realiza el diagnóstico serológico de las muestras de los pacientes sospechosos de TH provenientes de cualquier zona del país, entre los que predominan casos sospechosos de LMO (informes anuales al Minsap). Actualmente, el diagnóstico serológico se realiza mediante estuches comerciales y se implementan nuevos ensayos inmunoenzimáticos desarrollados en el laboratorio de referencia (Sariego y col, 2017).

Según lo descrito anteriormente, han transcurrido alrededor de 20 años desde que se realizaron investigaciones en muestras de suelo de áreas públicas, para determinar la contaminación con huevos del género *Toxocara*. Retomar estos estudios pudiera brindar datos actualizados para orientar el trabajo de prevención, por la importancia del suelo como fuente de contaminación tanto para hospederos definitivos, como para los paraténicos, entre los que se encuentra el hombre.

2.9. Métodos para determinar la presencia de huevos de helmintos en muestras de suelo

A través del tiempo se ha estudiado la presencia de huevos de *Toxocara* tanto en regiones desarrolladas del mundo, como en regiones desatendidas, para explorar el

riesgo potencial para la ocurrencia de la TH (Fakhri y col, 2018). Esos estudios han aportado datos tan variados, como variadas son las metodologías que se han utilizado, en ausencia de normas estandarizadas internacionalmente para este propósito (Collender y col, 2015).

Para estudiar la contaminación del suelo se deben tener presentes varios aspectos como: el tipo de muestreo, localización, distribución, número de puntos y profundidad del muestreo, tipos de muestras (muestras simples o compuestas, de profundidad o superficiales), estimación del número total de muestras y medidas para asegurar la calidad como la, preservación de las muestras, tipo de recipientes y volumen de las muestras, plan de salud y seguridad del operario y el plan de cadena de custodia (Ministerio del Ambiente del Perú, 2014). La profundidad de la muestra del suelo representa un factor determinante para obtener resultados favorables. Varios estudios analizaron muestras de 3, 5, 6, 10, 15, 18, 35 y 38 cm de profundidad y se obtuvo la mayor cantidad de huevos de *Toxocara* en las capas superiores, entre 3 y 5 cm (Mizgajska y Uga, 2006).

Como consecuencia, se han desarrollado diferentes metodologías basadas principalmente en tomar muestras con un diámetro desde 5 cm hasta 10 cm y con una profundidad de 2 cm hasta 3 cm, con las que se han obtenido resultados positivos en parques y zonas públicas de varias regiones del mundo (Apóstol y col, 2013; Cáceres y col, 2017; Gallardo y col, 2018).

Algunas propiedades del suelo pueden influir en la supervivencia de los huevos, tales como la humedad, oxigenación, compacidad, exposición a la luz solar, configuración, estructura y limpieza. Sin embargo, no se ha encontrado una correlación directa entre la textura del suelo (porcentaje de grava, arena, arcilla y limo) y la prevalencia de los huevos de *Toxocara*, lo que sugiere que, la existencia de otros factores que influyen en el grado de contaminación del suelo con huevos de geohelminetos; como la intensidad de la contaminación o la acción de los invertebrados (Mizgajska, 1997).

Por otro lado, se ha demostrado que la época del año influye en el comportamiento de la infestación por huevos de helmintos, siendo generalmente más alta en otoño (septiembre a noviembre) y más bajas en invierno (diciembre a febrero), para el hemisferio norte (Stojčević y col, 2010).

Dentro de los métodos de muestreo utilizados para la obtención de huevos de helmintos en muestras de suelos se encuentra el de Zigzag en el cual se trazan líneas cruzadas caminando unos 25 a 30 pasos desde cada punto (Figura 6). Este método se adecua a terrenos homogéneos y planos. Otro método descrito es la Cuadrícula. Este método consiste en dividir cada lote seleccionado en cuadros iguales, recolectar las muestras en cada uno y después mezclarlas (Figura 6). El mismo, no es muy aplicado a grandes extensiones de suelo, por la variación de las propiedades de los suelos en cortas distancias, además requiere limitar adecuadamente los lotes. Existe otro método muy común y sencillo de las Diagonales apropiado para sitios planos bastante homogéneos que consiste en trazar dos líneas diagonales imaginarias sobre la superficie del terreno, de esta manera se colectan un total de 9 muestras (Figura 6) (Laird y col, 2000; Tudor, 2015; Papavasiliopoulos y col, 2018; Ramírez y col, 2019).

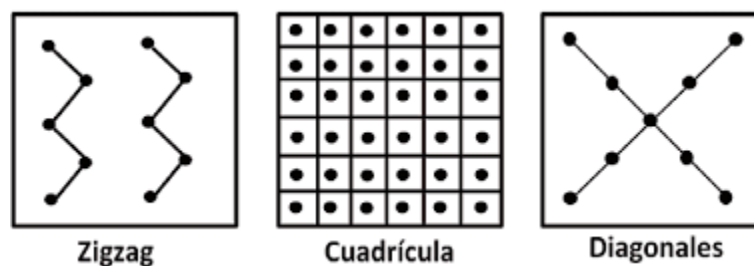


Figura 6. Representación gráfica de los métodos de muestreo de los suelos.

Fuente: <https://www.google.com/imgres?imgurl=x-raw-image%3A%2F%2F%2Fbdd90a5cfda70258d4d7072cfc6f5362ad87ff56e19a8eee36ede6364913e825&imgrefurl=http%3A%2F%2F>

Además de las metodologías de muestreo, es importante seleccionar las técnicas adecuadas para recuperar y concentrar los huevos, larvas y/o material genético de la muestra de tierra, o arena; y para detectar y cuantificar los huevos recuperados. Entre las primeras, las técnicas de sedimentación-flotación son fundamentales y por otro lado, la microscopía y los métodos basados en el estudio de los ácidos nucleicos, son los utilizados para la detección (Collender y col, 2015).

Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Diseño de estudio

Se realizó un estudio observacional longitudinal para comparar la contaminación con huevos de *Toxocara* en los parques de un municipio de La Habana, entre los períodos poco lluvioso y lluvioso. El primer muestreo se realizó entre los meses de febrero y abril y el segundo, entre julio y octubre, del año 2021. Para realizar el estudio se seleccionó el municipio La Lisa, pues en investigaciones anteriores, se demostró que hasta 60 % de sus suelos (parques y zonas públicas) se encontraban contaminados con huevos de parásitos del género *Toxocara* (Laird y col, 2000). El municipio La Lisa, está ubicado en la periferia oeste de la capital, limita al norte con el municipio Playa, al este con Marianao, al sur-suroeste con Boyeros y al oeste con el municipio Bauta de la provincia de Artemisa. El clima de este municipio se corresponde con el de sabana tropical, típico para todo el país, con un período poco lluvioso de noviembre a abril y otro lluvioso, de mayo a octubre (Llacerl, 2016).

3.2. Universo de estudio

El universo de estudio lo constituyeron los 23 parques del municipio La Lisa, que se clasificaron en 15 parques infantiles (en su área útil o de esparcimiento poseen aparatos infantiles, busto, tarjas, monumento, fuente, glorieta o pérgola), cuatro parques "de estar" (poseen un área útil o de esparcimiento con más de 4000 m², donde podemos encontrar busto, tarjas, monumento, fuente, glorieta o pérgola, y también aparatos infantiles), y cuatro micro parques (su área útil o de esparcimiento puede llegar a 4000 m² poseen busto, tarjas, monumento, fuente, glorieta o pérgola, así como aparatos infantiles) (Oficina Nacional de Estadística e Información, 2017) (Figura 7).

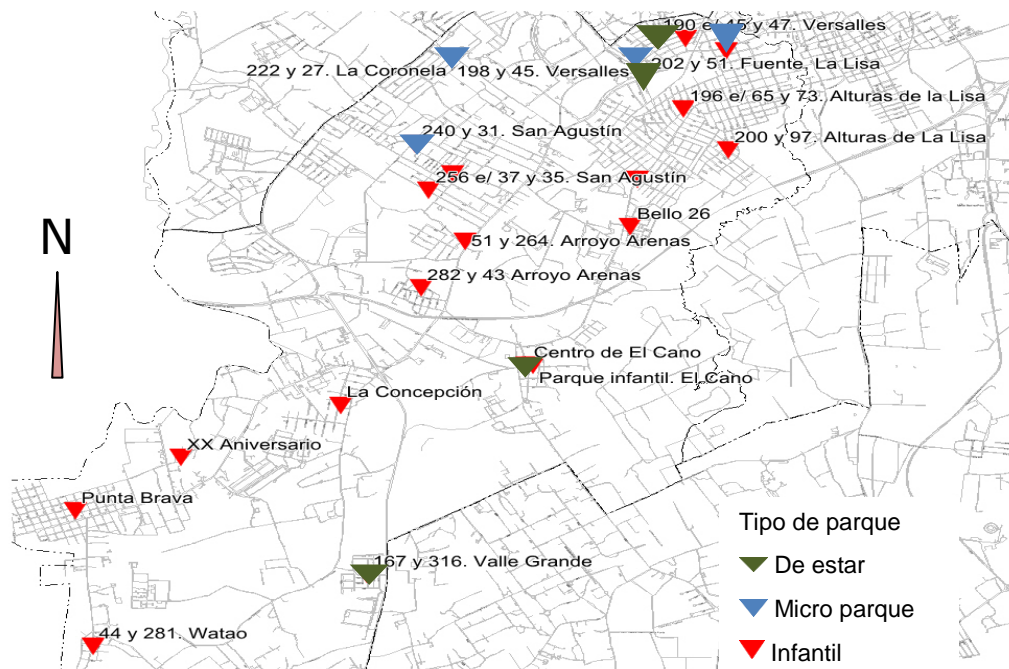


Figura 7. Representación en el mapa del municipio La Lisa (La Habana, Cuba) de los parques que se estudiaron entre febrero y octubre de 2021, para conocer la positividad a huevos de *Toxocara*. Los parques están clasificados según su propósito (Oficina Nacional de Estadística e Información, 2017). Para crear el mapa se utilizó el programa MapInfo 8.5 (MapInfo Corp., New York).

3.3. Técnicas y procedimientos

A continuación, se muestra el algoritmo de trabajo del presente estudio (Figura 8).

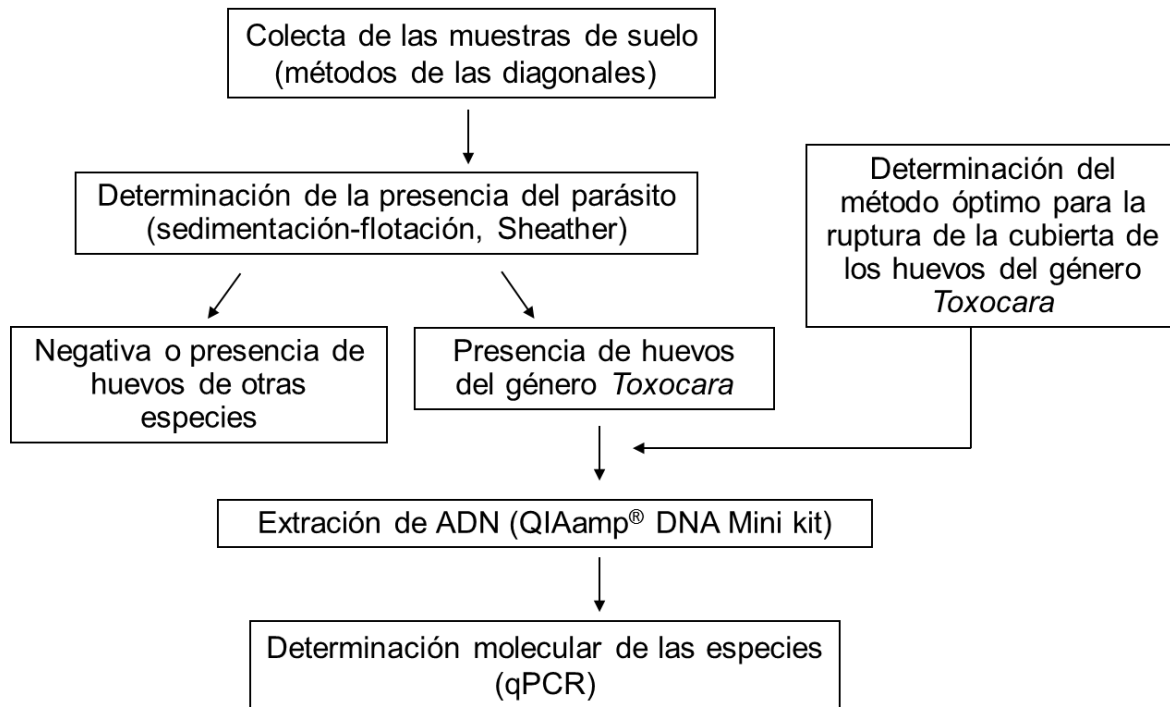


Figura 8. Diagrama de flujo de los procesos realizados para desarrollar la investigación.

3.3.1. Obtención de huevos de *Toxocara* para ser usados como controles

Con la finalidad de obtener huevos de *T. canis* y de *T. cati*, para ser usados como como controles en los experimentos, se colectaron parásitos adultos de estas especies, luego de que se expulsaran por sus hospederos definitivos, infectados naturalmente, que se trataron con medicamentos antiparasitarios, en clínicas veterinarias. Los parásitos se transportaron al Laboratorio de *Toxocara* del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, donde se separaron macroscópicamente y se clasificaron según género, mediante observación bajo microscopio estereoscópico (Leica, Canadá). Los parásitos hembras se colocaron individualmente en placa de Petri y se disectaron para extraer el útero. Seguidamente se obtuvieron los huevos, que se mantuvieron en suspensión y se utilizaron inmediatamente.

3.3.2. Determinación del método óptimo para la ruptura de la cubierta de los huevos de *Toxocara*

Se ensayaron varios métodos físicos/químicos para la ruptura de los huevos. En todos los casos se partió de un precipitado que contuvo 1000 huevos de las muestras controles descritos en el acápite 3.3.1. A continuación, se describen las metodologías:

(I) Choque térmico: cuatro ciclos de congelación/descongelación sin intervalo de tiempo entre los ciclos. La suspensión se incubó en congelación a -80 °C (EVERmed, Italia) durante 10 min inmediatamente se calentó a 100 °C durante 2 min en baño termostático (Sakura, Japón) (Mikaeili y col, 2013).

(II) Incubación en hipoclorito de sodio (NaClO) seguido de la adición de solución saturada de NaCl: La suspensión se centrifugó a 500 *g* durante cinco min, posteriormente se añadieron 10 µL de NaClO 10 % al sedimento, que contenía los huevos del parásito, y se incubó a 4 °C durante 1 hora. Seguidamente, se añadieron 35 µL de solución saturada de NaCl y se incubó a 55 °C durante 1 hora en baño termostático (Tang y col, 2018).

(III) Choque osmótico: se añadieron 10 µL de tampón TES (Tris-HCl 0,2 M; pH 8,0; EDTA 0,5 mM; sacarosa 0,5 M) y se incubó a 4 °C durante 1 hora (Haier, China). Seguidamente, se añadieron 20 µL de tampón TES que previamente se diluyó cuatro veces con agua destilada y la suspensión se incubó a 4 °C durante 1 hora (Vincke y col, 2012).

(IV) Lisis enzimática con proteinasa K: se añadieron a la suspensión 180 µL de tampón lisis ATL® y 20 µL de proteinasa K® (Qiagen, Alemania) y la suspensión se incubó a 56 °C en baño termostático durante 2,5 horas (QIAamp® DNA Mini Kit (250), Qiagen, Alemania).

(V) Incubación en NaClO seguido de homogeneización manual: Se añadieron a la suspensión 10 μ L de NaClO 10 % y se incubó a 4 °C durante 1 hora, seguidamente, se añadieron 35 μ L de NaCl saturada y se incubó a 55 °C durante 1 hora. Posteriormente, se le realizaron dos enjuagues a la suspensión con 1 mL de tampón fosfato salino estéril, mediante centrifugación (Sigma, Alemania) a 500 g durante 5 min, al terminar se descartó el sobrenadante hasta quedar 100 μ L, aproximadamente, y se añadió a un homogeneizador manual tipo Potter (B.Braun, Suiza) y se homogeneizó tantas veces como fuera posible en 3 min.

Al terminar cada uno de los tratamientos, se observó la suspensión al microscopio (Olympus, Japón) para corroborar la ruptura de los huevos (400x). Cada experimento se repitió dos veces, con tres réplicas de las muestras (precipitado con 1000 huevos). Una vez seleccionado el método adecuado para la ruptura de los huevos, se aplicó ese protocolo a las suspensiones de huevos obtenidas a partir de las muestras de suelos (acápite 3.3.2).

3.3.3. Colecta de las muestras de suelo

En cada parque se colectaron muestras de suelo en dos períodos de tiempo, el primero abarcó de febrero a abril de 2021 (período poco lluvioso) y el segundo de julio a octubre de 2021 (período lluvioso). La obtención de las muestras se realizó mediante el método de las diagonales debido al diseño constructivo de nuestros parques y teniendo en cuenta que ya se había utilizado en otros trabajos en Cuba y otras partes del mundo con excelentes resultados (Laird y col, 2000; Tudor, 2015; Papavasiliopoulos y col, 2018; Ramírez y col, 2019).

De cada parque se colectaron 9 muestras de suelo, de aproximadamente 100 g cada una, de un área de 10x10 cm cada una, a una profundidad entre 3 y 5 cm (Laird y col, 2000). Las muestras se conservaron en frascos de plástico, que se trasladaron inmediatamente al laboratorio de *Toxocara* del Departamento de Parasitología, Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia (CIDR) del IPK, donde se

mantuvieron en un lugar fresco e iluminado hasta su procesamiento, en un período de tiempo no mayor de una semana.

3.3.4. Determinación de la presencia de huevos de *Toxocara* en las muestras de suelo

Para determinar la presencia de los huevos del parásito en las muestras de suelo se utilizó la metodología descrita por Mendoza y Maldonado (2015). Brevemente, cada muestra de suelo se homogeneizó y se utilizaron 50 g a los que se añadieron 60 mL de solución salina (NaCl 0,9 % p/v). La mezcla se agitó vigorosamente y se filtró a través de gasa estéril. El residuo que se obtuvo se descartó y el sobrenadante se distribuyó en tubos de 50 mL y se centrifugó (IEC, EUA) a 2000 g, durante 5 min. El sedimento se lavó varias veces, bajo las mismas condiciones, hasta que el sobrenadante quedó transparente.

Una vez lavado el sedimento, se le adicionó la solución de flotación de Sheather (azúcar granulada de calidad alimenticia, agua destilada y 1 % de formaldehído (densidad 1,27 g/mL) preparada con anterioridad en el laboratorio (Eisenbraun y col, 2019; Loftin y col, 2019). La mezcla se centrifugó a 2000 g durante 5 min. Al terminar, se aspiró la superficie del líquido con una pipeta Pasteur, pues es en esta interface donde se encuentran los huevos. A continuación, se mezcló el aspirado con solución salina en la relación 1:15, v/v (1 mL de suspensión de huevos más 14 mL de solución salina). Esta mezcla se centrifugó durante 5 min a 2000 g, el sobrenadante se descartó y el sedimento que contenía los huevos, se mezcló con 1 mL de solución salina. La presencia de huevos del género *Toxocara* en esta suspensión, se confirmó por microscopía directa (Olympus, Japón) a 400X. Se especificó si los huevos eran viables, según la morfología, o si estaban embrionados (Abou-El-Naga, 2018). La intensidad de la contaminación de los suelos se clasificó en ligera (de 1 a 5 huevos), moderada (de 6 a 10 huevos) o intensa (más de 10 huevos) (Conde y col, 1989). Además, se calculó el número de huevos por cada 100 g de suelo.

Se informó la presencia de huevos de otras especies de parásitos que se encontraron durante la visualización de la muestra. La presencia de larvas de helmintos se documentó, pero por la similitud entre las especies no se informó.

Los huevos de *Toxocara* se eluyeron de la lámina portaobjetos y se lavaron dos veces con solución salina (NaCl, 0,9%). A continuación, se añadieron 500 µL de agua destilada. La suspensión se conservó a -20 °C hasta su utilización.

3.3.5. Extracción de ácido desoxirribonucleico

Luego de verificar la ruptura de los huevos mediante microscopía, se procedió a extraer el ADN para lo cual se utilizó el estuche comercial QIAamp[®] DNA Mini kit (Qiagen, ciudad, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

3.3.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Para realizar la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) se utilizaron los cebadores directos específicos, descritos por Durant y colaboradores, que codifican la región de los espaciadores internos de la transcripción del genoma del parásito (Durant y col, 2012). Los cebadores fueron 5'-GCGCCAATTTATGGAATGTGAT-3' para *T. canis* y 5'-ACGCGTACGTATGGAATGTGCT-3' para *T. cati* y un cebador inverso común para ambas especies (5'-GAGCAAACGACAGCSATTTCTT-3'), (Eurofins Genomics, Alemania). Además, se utilizaron dos sondas específicas dirigidas a *T. canis* (5'-FAM-CCATTACCACACCAGCATAGCTCACCGA-3'-BHQ1) y a *T. cati* (5'-Cy5-TCTTTTCGCAACGTGCATTTCGGTGA-3'-BHQ3), (Eurofins Genomics, Alemania), respectivamente. De esta manera, se amplificó una región de 141 pb para *T. canis* y de 155 pb para *T. cati*.

La reacción de qPCR se realizó según las condiciones de concentración de los cebadores y ciclos de temperaturas, descritos por Durant y col (2012) con algunas modificaciones, dada la disponibilidad de otros reactivos de referencia conocida. Las muestras se evaluaron por los dos sistemas de qPCR (*T. cati* y *T. canis*) de forma

independiente, cada uno en un volumen total de 25 μ L. La mezcla de reacción contuvo el ADN molde previamente extraído (acápite 3.3.5) para *T. canis* y *T. cati* respectivamente, 300 nM de cada cebador, 100 nM de cada sonda y 12,5 μ L de 2x Quanti Fast Multiplex RT-PCR master Mix (w/o Rox) (Qiagen, Alemania). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (Rotor Gene Q 5-Plex- HRM, Qiagen, Alemania). La reacción se inició a 95 °C durante 5 min seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 10 s, hibridación a 60 °C durante 15 s (captación de la fluorescencia en los canales correspondientes al fluoróforo de cada sonda) y extensión a 72 °C durante 5 s. Una vez finalizada la amplificación, se visualizó el resultado directamente con el programa de computación Rotor Gene 2.3.1.49 (Qiagen, Alemania) que mostró las curvas resultantes, que se basaron en la correspondencia entre la fluorescencia y el número de ciclos.

3.3.7. Cuantificación molecular

Con el sistema de qPCR descrito anteriormente se prepararon dos curvas estándar con diluciones seriadas 1:4, entre 1 y 20 000 huevos de *T. canis* y *T. cati*, con el objetivo de lograr un sistema molecular para cuantificar la presencia de los huevos de cada especie de *Toxocara*. Para ello, los huevos de cada especie y por separado se lavaron con agua destilada tres veces, se contaron en cámara de Neubauer, se rompieron siguiendo el método seleccionado en el acápite 3.3.2 y se les extrajo el ADN como se describió en el acápite 3.3.5.

Se incluyeron dos controles negativos en cada experimento. Ambos controles contenían H₂O bidestilada estéril en lugar de ADN molde, el primero permitió verificar que no existiera contaminación en el área de mezcla y el otro, que no existía contaminación cruzada en el área donde se añadió ADN molde.

Para cada punto de la curva, se determinó el valor de ciclo umbral (CT, del inglés *Cycle threshold*). Los valores de CT se graficaron contra el logaritmo del número conocido de huevos, a los que se les extrajo el ADN. Se garantizó que el valor del

coeficiente de correlación y la eficiencia del modelo de regresión fueran óptimos (coeficiente de correlación $R^2 > 0,980$ y una eficiencia entre 95–105 %) (Svec y col, 2015). Estos parámetros, así como los valores de CT, se estimaron automáticamente mediante el programa Rotor Gene 2.3.1.49 (Qiagen, Alemania). Además, se determinó el límite de detección como la última dilución en la que el sistema es capaz de detectar el ADN diana en el mismo CT para 95 % de 10 réplicas (Forootan y col, 2017)

La variabilidad intraensayo se determinó usando tres réplicas de cada punto de la curva y la variabilidad interensayo, al repetir la prueba en tres días alternos. En todos los casos se determinó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación que se expresó en porcentaje. La cantidad de huevos presentes en las muestras de suelo, positivas por microscopía, para cada especie, se determinó a partir de la interpolación de los CT de cada muestra, en la curva patrón obtenida previamente.

3.4. Operacionalización de variables

A continuación, se describe la operacionalización de las variables que se usaron en el estudio (Tabla 2).

Tabla 2. Operacionalización de las variables cualitativas y cuantitativas que se usaron en el estudio

Nombre de la variable	Naturaleza de la variable	Operacionalización	Mediciones
Tipo de parque	cualitativa nominal politómica	infantil "de estar" micro parque	números absolutos, porcentajes
Contaminación con huevos del género <i>Toxocara</i>	cualitativa nominal dicotómica	sí, no	números absolutos, porcentajes
Intensidad de la contaminación	cuantitativa categórica	ligera (de 1 a 5 huevos) moderada (de 6 a 10) intensa (más de 10)	números absolutos, porcentajes
Contaminación con huevos embrionados	cualitativa nominal dicotómica	sí, no	números absolutos, porcentajes
Total de muestras positivas por parque	cuantitativa continua	número entero	mediana, desviación estándar
Total de huevos por parque	cuantitativa continua	número entero	mediana, desviación estándar
Ciclo umbral (CT)	cuantitativa continua	número decimal	media, desviación estándar
Especie de <i>Toxocara</i> que infesta el suelo del parque	cualitativa nominal politómica	<i>toxocara canis</i> , <i>toxocara cati</i> contaminación mixta	números absolutos, porcentajes
Total de huevos de <i>Toxocara canis</i> en la muestra	cuantitativa continua	número entero	media, desviación estándar
Total de huevos de <i>Toxocara cati</i> en la muestra	cuantitativa continua	número entero	media, desviación estándar
Total de huevos de <i>Toxocara</i> en la muestra	cuantitativa continua	número entero	media, desviación estándar

3.5. Procesamiento estadístico

Los datos se almacenaron en una base de datos en Excel 2010. Se utilizó el programa estadístico SPSS para Windows, versión 11.5.1. (del inglés, *Statistical Program Social Science*) para la determinación del porcentaje de áreas contaminadas con huevos del parásito, con sus respectivos intervalos de confianza a 95 %; además, se empleó la prueba Ji-cuadrado para comparar las proporciones y explorar la asociación entre las variables (Pearson, 1900).

La positividad entre los períodos lluvioso y poco lluvioso se comparó mediante el programa R, (prueba de McNemar) (R Core Team, 2020). La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk se usó para comprobar si las diferencias de las variables "Total de muestras positivas por parque" y "Total de huevos por parque", entre los períodos cumplían una distribución normal. Seguidamente, si cumplían distribución normal se empleó la prueba t de Student para la comparación, de no cumplirse, se utilizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon con corrección a la continuidad. Valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos (Pearson, 1900). Los resultados se graficaron con el paquete estadístico GraphPad PRISM 5 for Windows, versión 5.00, marzo, 2007. Se utilizó el software MapInfo 8.5 (MapInfo Corp., New York) para representar en el mapa del municipio La Lisa, los parques estudiados y la positividad a *Toxocara*.

3.6. Consideraciones éticas

Esta investigación constituyó una de las tareas del proyecto "Validación y aplicación epidemiológica de inmunoensayos para la detección de la TH. La Lisa" Para la realización del estudio se contó con el consentimiento y apoyo de las autoridades de salud y gobierno del municipio La Lisa. La investigación se aprobó por la Comisión Científica Especializada de Parasitología y por el Comité de Ética del IPK (CEI-IPK-5616).

Durante la colecta de las muestras de suelo, no se afectó ningún ecosistema y se tuvo cuidado para no afectar el ornato público. Los laboratorios del IPK, cumplieron con las normas de bioseguridad establecidas para Riesgo Biológico II. Con respecto a la manipulación y eliminación de los desechos, todos aquellos que pudieran contener huevos del parásito (embrionados o no) fueron incinerados para su eliminación, o se crearon inocuos mediante esterilización antes de ser sometidos a procesos de fregado, según lo descrito en los procedimientos normalizados de operación de los laboratorios. La información que se generó en el estudio se custodió y solo tuvieron acceso a ella los miembros del grupo que realizaron el estudio.

Resultados y Discusión

4. Resultados y discusión

4.1 Proporción de parques contaminados con huevos de *Toxocara* en el municipio La Lisa.

La contaminación de suelos con huevos embrionados de *Toxocara* spp. constituye la principal fuente de infección para el humano (Chen y col, 2018). La presencia de huevos en el suelo se ha notificado en todas las regiones del mundo designadas por la Organización Mundial de la Salud, con independencia del nivel socioeconómico o de desarrollo (Fakhri y col, 2018). El estudio del suelo de parques y zonas públicas, permite entonces, conocer la existencia del parásito para proponer medidas de prevención adecuadas (Ma y col, 2018). A pesar de su importancia, son escasos los trabajos que se dedican a este tema y no existen metodologías normalizadas para conducirlos, lo que dificulta la comparación de los resultados.

El municipio habanero de La Lisa posee 23 parques, que se concentran en las zonas más céntricas y pobladas del municipio. De estos parques, 15 no están correctamente delimitados, ya que no presentaban la cerca perimetral o se encontró en mal estado, cuando se realizó esta investigación. En contraposición, ocho parques cuentan con una buena delimitación, ya sea mediante una cerca de alambre galvanizado o engomado, o muros de cemento. Todos los parques tienen nombrado personal responsable por su limpieza y el cuidado de los medios existentes. Durante el estudio no se constataron cambios estructurales, ni organizativos, en los parques del municipio.

Veintiún parques (91,30 %, IC 71,96-98,93) se encontraron positivos con huevos del género *Toxocara*, según el análisis de ambos períodos (Figura 9) (Tabla 3). Del total de 414 muestras colectadas, 68 fueron positivas (16,4 %) y se encontraron 175 huevos de *Toxocara*, de los cuales ninguno se encontró embrionado, pero en su mayoría eran viables. Esto pudiera indicar que se trata de una contaminación reciente, por lo que la forma infectante se pudiera desarrollar en pocas semanas.

Tabla 3. Contaminación del suelo de parques del municipio La Lisa, La Habana, Cuba, con huevos del género *Toxocara*, en los períodos; poco lluvioso (febrero a abril) y lluvioso (julio a octubre) de 2021.

Parques	Período poco lluvioso		Período lluvioso	
	Muestras positivas	Total de huevos de <i>Toxocara</i>	Muestras positivas	Total de huevos de <i>Toxocara</i>
La Concepción	2	10	3	18
La Coronela (222 esquina 27)	4	15	1	2
Punta Brava	2	2	2	5
El Cano	1	3	2	2
Alturas de La Lisa (220 y 81)	1	3	5	13
San Agustín (246 y 35C)	1	3	0	0
La Lisa (156 y 49)	2	5	6	14
San Agustín (256/37y35)	1	1	2	3
Fuente La Lisa (202 y 51)	3	4	1	1
Guatao	1	1	2	10
Arroyo Arenas (282 y 43)	1	1	5	20
Bello 26	1	3	3	7
Arroyo Arenas (51 esquina 264)	2	4	1	3
Versalles (180/45 y 43)	1	2	1	2
San Agustín (240 y 31)	1	2	2	3
El Cano (calle central)	1	1	1	1
Versalles (190/47 y 45)	1	2	0	0
La Lisa (158 y 51)	0	0	2	4
Alturas de La Lisa (200 y 97A)	0	0	1	2
Valle Grande 167 (esq. 316)	0	0	1	2
XX Aniversario	0	0	1	1
Versalles (198 y 45)	0	0	0	0
Alturas de La Lisa (196/65 y73)	0	0	0	0
Total	26	62	42	113

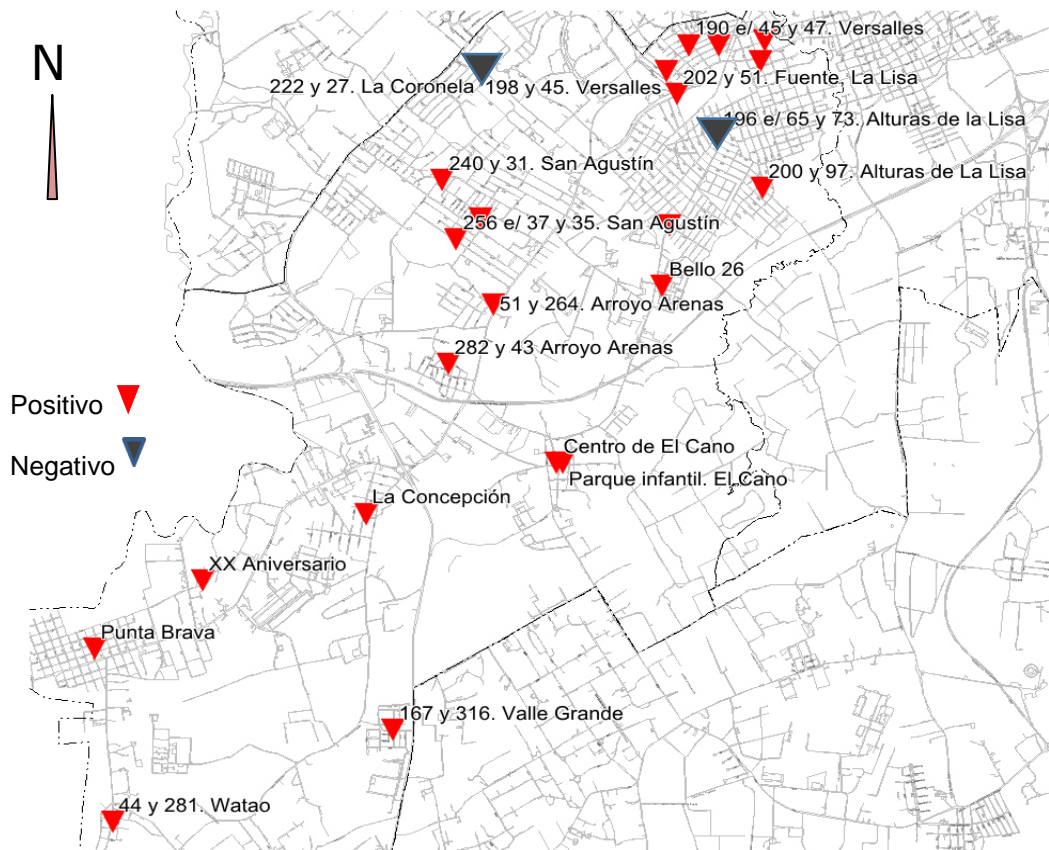


Figura 9. Representación en el mapa del municipio La Lisa (La Habana, Cuba), de la presencia de huevos de *Toxocara* (positivo, triángulo rojo) en los 23 parques estudiados, en al menos uno de los períodos. Para crear el mapa se utilizó el programa MapInfo 8.5 (MapInfo Corp., New York).

Según la literatura revisada, en Cuba, se han realizado solo tres estudios de la contaminación del suelo de zonas públicas o privadas, con huevos de *Toxocara*. Dos de los estudios se realizaron en la Ciudad de La Habana en la década de los 90, del pasado siglo y se muestrearon todos los municipios de la ciudad. Ambos demostraron que 68 % de los parques y zonas públicas que se estudiaron se encontraban infestados con huevos de *Toxocara* (Duménigo y col, 1995; Laird y col, 2000). El otro trabajo se llevó a cabo en Villa Clara, en la región central del país, en

2003 y comparó la contaminación del suelo de patios de casas donde habitaban perros positivos a *T. canis*, con el suelo de casas donde los perros eran negativos. En la investigación se encontró un mayor número de muestras positivas en los patios de hogares donde las mascotas eran positivas a *T. canis* (de la Fe, 2003).

En la década de los 90, se estudiaron 15 sitios públicos del municipio La Lisa, entre febrero y abril de 1995, como parte de una investigación que abarcó todos los municipios de La Habana. De cada sitio se colectaron 50 g de muestra de suelo a una profundidad de 3 cm, según el método de las diagonales, que se analizaron mediante el método de flotación-sedimentación en copa cónica, con solución de nitrato de sodio (densidad 1,32 g/mL). De los sitios estudiados en La Lisa, nueve se encontraron contaminados para 60 %, valor que fue cercano a la media obtenida para toda la ciudad (68,3 % de positividad) (Laird y col, 2000).

El porcentaje de contaminación que se obtuvo en el presente trabajo supera el valor de contaminación determinado para el municipio La Lisa en dicha investigación. Esto pudiera deberse a que en el estudio actual se realizó un examen más exhaustivo, al muestrear todo el universo de parques y en cada uno de los dos períodos meteorológicos (lluvioso y poco lluvioso), lo que incrementó el número de muestras estudiadas y por tanto la probabilidad de encontrar los huevos del parásito. Además, en este caso se utilizó la solución modificada de Sheather para la concentración de los huevos.

Es de resaltar además que, durante el tiempo de muestreo de este estudio, el municipio La Lisa, como el país, cursaba la pandemia del SARS-CoV-2, donde se restringieron los servicios públicos prestándose menor atención a la desparasitación regular de las mascotas y al control de los animales callejeros, que en definitiva constituyen la fuente de contaminación del suelo.

Los hallazgos del presente trabajo indican que la contaminación de los parques en La Lisa no solo se mantuvo en el tiempo, sino que se incrementó, en comparación con

resultados de estudios previos, lo que representa un riesgo elevado para la transmisión del parásito, tanto al humano como a otros hospederos.

Los valores de contaminación con huevos de *Toxocara* en suelos de parques y zonas públicas, en diferentes regiones del mundo son variados. Un estudio de meta-análisis que incluyó trabajos publicados desde 1975 hasta 2018, permitió estimar la positividad por regiones designadas por la Organización Mundial de la Salud, en el mundo. Los resultados del presente trabajo sobrepasan la media notificada para la región de América del Norte y Central (13 %) (Fakhri y col, 2018). Ese trabajo indicó que los menores valores de positividad se reportan precisamente en esta región, seguida de la región europea y Oriente medio y Norte de África (18 %) y los mayores, en la región del Pacífico occidental (35 %). Entre los factores asociados a estos valores desiguales, se determinaron: la longitud y latitud geográfica y la humedad relativa del medioambiente. Como otras causas de las variaciones se mencionaron también las diferencias en las estrategias de muestreo, diferentes comportamientos sanitarios de residentes y dueños de mascotas, diferentes condiciones culturales y sociales, composición y cantidad de muestras de suelo analizadas, números de perros y gatos, el acceso de los animales callejeros a sitios públicos, así como las diferencias en el clima.

Posterior al metanálisis, han continuado los estudios en parques y zonas públicas en todas las regiones del mundo. Por ejemplo, en la ciudad de New York, EUA, se estudiaron 91 sitios seleccionados al azar de cinco vecindarios, durante los meses de octubre de 2015 a julio de 2016. En cada sitio, se colectaron cinco muestras de 3 a 5 cm de profundidad de manera tal que se representara el área total del mismo y se analizaron mediante la técnica de flotación con nitrato de sodio (densidad 1,25-1,35 g/mL). La contaminación por *Toxocara* fue de 38,5 % (35/91) (Tyungu y col, 2020).

Por otro lado, se llevó a cabo un estudio en 56 parques públicos de Mexicali, Baja California, en el período de febrero 2016 a enero 2017. Para el mismo, en cada parque se recolectaron 10 muestras de 400 g, en la dirección cardinal y del centro, en un área de 20 x 20 cm, a una profundidad de 1 cm y se utilizó el método de

concentración de los huevos por flotación con una solución salina de densidad 1,20 g/mL. Con base en la frecuencia de contaminación específica por parásito se encontró que el más frecuente fue *Toxocara* con 46,4 % (26/56) (Ramírez y col, 2019).

En la región europea, en Ática, al sur de Grecia, se analizaron 1510 muestras de suelo colectadas de 33 áreas públicas, desde marzo hasta abril de 2014. El número de muestras se calculó en base a la dimensión del área en cuestión. Las muestras (aproximadamente 50 g) se colectaron al azar por debajo de los 3 cm de profundidad. Como solución de flotación, se utilizó solución saturada de nitrato de sodio ($d = 1,35$ g/mL). Con esta metodología se encontraron 31 áreas positivas para 94 % de contaminación (Papavasiliopoulos y col, 2018).

En parques de la ciudad Lisboa, Portugal, en el período de febrero a mayo de 2015, se estudiaron 151 muestras de suelo recogidas a una profundidad de 0 a 15 cm, el método de muestreo no se especifica por los autores. Las muestras se tomaron en diferentes momentos del día (mañana, mediodía y tarde); para procesar las mismas se utilizó una solución de sacarosa ($d=1,3$ g/mL). Para el análisis de la contaminación los parques se dividieron en infantiles (areneros de juegos) y en públicos. En el estudio mencionado, se obtuvo como resultado que en los primeros 85,7 % (6/7) y en los segundos 50 % (6/12) se encontraron positivos, por lo que la contaminación global con huevos *Toxocara* fue de 63,2 % (12/19) (Otero y col, 2018).

En el presente trabajo, no se detectaron huevos embrionados, hecho que llama la atención sobre todo si se tiene en cuenta que en un estudio anterior que se realizó en La Habana, se notificó un elevado número de huevos embrionados (80 %) (Laird y col, 2000). En un estudio que se realizó en Lisboa, Portugal, también se notificó la presencia de huevos embrionados, pero en menor cuantía (11 %) (Otero y col, 2018). En otros trabajos, solo se reporta la presencia de huevos viables, como es el caso de la investigación en suelo de parques públicos de Valencia, España. En este caso se estudiaron muestras de parques de la ciudad entre noviembre de 2019 y junio de

2019 y se utilizó una disolución de flotación de sulfato de zinc ($d = 1,2 \text{ g/mL}$) (Köchle y col, 2022).

Los resultados aportados por estos estudios permiten especular que los valores de contaminación del suelo están estrechamente relacionados con disimiles aspectos desde el diseño de los estudios hasta las condiciones locales de clima y desarrollo socio-económico. En los diseños de los estudios, es determinante el tipo de muestreo, la recuperación de los huevos, la cuantificación y la determinación de la viabilidad. El muestreo del suelo requiere la consideración de que puede existir una sobredispersión de los parásitos, con cúmulos localizados de alta contaminación, dentro de áreas que exhiben muy baja concentración, lo que puede estar provocado por la deposición de las heces con alta carga parasitaria, que constituyen la fuente de la contaminación (Collender y col, 2015). Por lo tanto, recae en el investigador el juicio para seleccionar el método de muestreo más apropiado en cada sitio a estudiar. Para ello se debe tener en cuenta, coleccionar las muestras de las áreas donde se piense que los parásitos pueden sobrevivir porque sean zonas húmedas o de sombra, dónde la exposición humana pueda ocurrir, o de los sitios donde la defecación de los animales se produzca (Fajutag y Paller, 2013).

Para recuperar los huevos de las muestras es necesario homogenizar la misma y disociar químicamente los huevos de la matriz, filtrar, sedimentar y luego utilizar un método de concentración, todo en ese orden (Collender y col, 2015). La filtración ayuda a remover las partículas más grandes que pueden interferir con el recobrado de los huevos y su detección. Sin embargo, cuando se desecha el contenido retenido en el tamiz, existe la probabilidad de perder huevos asociados al material que se va a descartar (Smith, 1998).

La sedimentación se usa para concentrar los huevos de una suspensión, lo que resulta en la reducción del volumen de la muestra, lo que permite el examen y procesamiento posterior. El proceso de sedimentación puede ocurrir de manera pasiva o puede acelerarse con la centrifugación. La flotación se refiere al uso de soluciones con gravedad específica elevada (densidad relativa con respecto al agua)

para separar los huevos de partículas más pesadas. Para lograr esto las soluciones de flotación deben ser más densas que los huevos de los parásitos. Al igual que la sedimentación, la flotación puede acelerarse mediante la centrifugación (Smith, 1998).

En cuanto a las disoluciones de flotación, se han utilizado varias, entre las que se encuentran $MgSO_4$ ($d = 1,2$ g/mL), $MgCl_2$ ($d = 1,20$ g/mL), $ZnSO_4$ ($d = 1,18$ g/mL), $NaCl$ ($d = 1,18$ g/mL) y solución modificada de Sheather ($d = 1,27$ g/mL). Al comparar su utilidad para concentrar los huevos de *Toxocara*, se encontró que la solución modificada de Sheather y la solución de $MgCl_2$ fueron las que brindaron mejores resultados (Mendoza y Maldonado, 2015).

En las muestras de suelo de los parques estudiados se observaron otros parásitos, cuyas especies en orden de frecuencia total para ambos períodos fueron ancilostomideos (5 huevos), *Toxascaris leonina* (1 huevo), género *Trichuris* (1 huevo). Anteriormente, se reportó la presencia de estas mismas especies en el suelo de zonas públicas de La Habana (Laird y col, 2000). En otros países de la región se han notificado otras especies, como en el suelo de los parques de Mexicali, México, en los que se encontraron *Spirocerca* y *Strongylus* (Ramírez y col, 2019). Por otro lado, en parques públicos de Niš (Serbia) se encontró una amplia diversidad de especies parasitarias además de *Toxocara*, tales como: *Cystoisospora*, *Toxascaris leonina*, *Trichuris vulpis*, *Alaria alata* y ancilostomideos (Ristić y col, 2020).

4.2. Comparación de la contaminación del suelo de los parques del municipio La Lisa con huevos del género *Toxocara*, entre los períodos poco lluvioso y lluvioso.

Para determinar cómo pudiera influir la estación del año en la contaminación del suelo con huevos de *Toxocara* en parques del municipio La Lisa, se compararon los resultados del muestreo en los parques en los períodos: poco lluvioso (febrero a abril) y lluvioso (julio a octubre). Un total de 15 parques permanecieron positivos a huevos de *Toxocara* en ambos períodos y solo 2 parques se mantuvieron negativos en ambos períodos de estudio (Tabla 4; Figura 10).

Al comparar la positividad entre los períodos, los resultados evidenciaron un pequeño/discreto aumento de la contaminación de 73,91 % (17/23) (IC 95 % 54,50-93,33) en el período poco lluvioso a 82,61 % (19/23) (IC 95 % 65,85-99,37) en el período lluvioso. Sin embargo, la diferencia no fue significativa estadísticamente ($P=0,683$). Esto indica que los niveles de prevalencia se mantuvieron elevados por igual durante todo el año, con independencia de la época poco lluviosa o lluviosa, lo que representa un riesgo potencial para la transmisión de la enfermedad.

Tabla 4. Comparación de la positividad a *Toxocara*, entre los períodos poco lluvioso (febrero a abril) y lluvioso (julio a octubre), en parques del municipio La Lisa, La Habana, Cuba, 2021.

Período poco lluvioso	Positividad a <i>Toxocara</i>		
	Período lluvioso		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	2	4	6
Positivo	2	15	17
Total	4	19	23

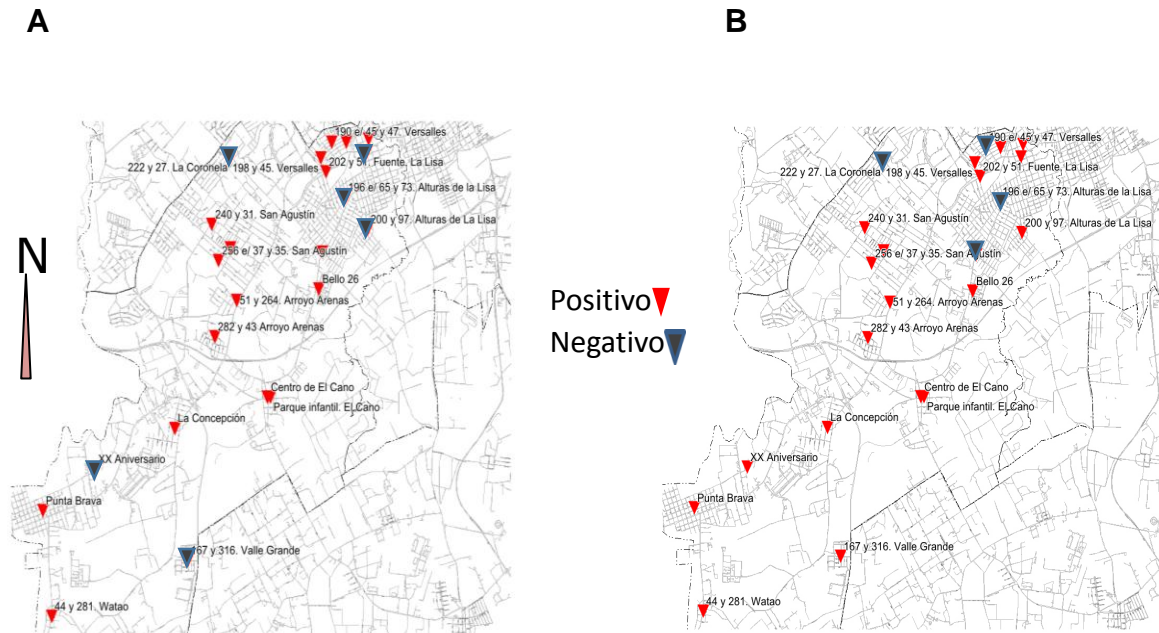


Figura 10. Representación en el mapa del municipio La Lisa (La Habana, Cuba), de la positividad a huevos de *Toxocara* (triángulo rojo) de los parques en el período poco lluvioso (A), o en el lluvioso (B) del año 2021. Para crear el mapa se utilizó el programa MapInfo 8.5 (MapInfo Corp., New York).

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la positividad a *Toxocara* para cada tipo de parque, entre los períodos climatológicos ($P > 0,05$) (Tabla 5). Las diferencias en cuanto a la positividad a *Toxocara*, en los parques, agrupados según si estaban correctamente delimitados o no, entre los períodos climatológicos no fueron significativas estadísticamente ($P > 0,05$) (Tabla 6).

Tabla 5. Comparación de la positividad a *Toxocara* según tipo de parque, en el municipio La Lisa, La Habana, Cuba, entre los períodos poco lluvioso (febrero a abril) y lluvioso (julio a octubre) de 2021.

Tipo de parque	Positividad a <i>Toxocara</i>				P
	Período poco lluvioso		Período Lluvioso		
	No.	%	No.	%	
Infantil	12	80	13	87	1,000
De estar	3	75	3	75	1,000
Micro parque	2	50	3	75	1,000

Tabla 6. Comparación de la positividad a *Toxocara* según la correcta delimitación del perímetro de los parques del municipio La Lisa, La Habana, Cuba, entre los períodos poco lluvioso (febrero a abril) y lluvioso (julio a octubre) de 2021.

Delimitación del perímetro del parque	Positividad a <i>Toxocara</i>				P
	Período poco lluvioso		Período Lluvioso		
	No.	%	No.	%	
Delimitado	7	87,5	6	75,0	0,250
No delimitado correctamente	14	66,6	13	86,6	1,000

Los perros y gatos callejeros infectados o incluso de las mascotas pueden contribuir con sus deposiciones a la contaminación de los parques, sobre todo cuando el cercado no se encuentra en buen estado, o cuando se les permite la entrada. Sin embargo, en el caso de los parques que tienen intacta su cerca y los guardaparques refieren no permitir entrada de animales, pudieran ser los felinos la principal fuente de contaminación, sobre todo si se tienen en cuenta las habilidades como escaladores de estos animales.

En cuanto a la intensidad de la contaminación, se observó que predominaron los parques con una contaminación ligera, con respecto a los que presentaban una

contaminación moderada e intensa, en cada uno de los períodos meteorológicos ($P < 0,05$) (Tabla 7). En el período lluvioso se incrementaron los parques con contaminación moderada (1) e intensa (3), con respecto al período poco lluvioso. Sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo ($P = 0,087$).

Tabla 7. Comportamiento de la intensidad de contaminación por huevos de *Toxocara*, en muestras de suelo de parques del municipio La Lisa, La Habana, Cuba, en los períodos poco lluvioso y lluvioso de 2021.

Intensidad de la contaminación	Positividad a <i>Toxocara</i>					
	Período poco lluvioso			Período Lluvioso		
	No.	%	<i>P</i>	No.	%	<i>P</i>
Ligera	15	88,2		13	68,4	
Moderada	1	5,9	0,000	2	10,5	0,004
Intensa	1	5,9		4	21,1	
Total	17	100		19	100	

Estos resultados son semejantes a los obtenidos dos décadas atrás por Laird y colaboradores (2000), donde la intensidad de la contaminación fue ligera para el 70,4 % de las muestras, valores promedio para toda la Ciudad de La Habana, ya que en ese estudio no se particularizó por municipio.

De febrero a mayo de 2019, en la ciudad de Niš (Serbia), se estudiaron tres parques públicos en los que se recolectaron de cada uno 50 muestras de suelo, las que contenían 100 g de un área de 25 cm x 25 cm, a una profundidad de 10 cm, el muestreo se realizó basado en el índice de condiciones bioclimáticas, siguiendo el método de bioclimatograma, teniendo en cuenta los valores de temperatura y humedad de la zona. Para el procesamiento de las muestras se utilizó una solución saturada NaCl y solución saturada ZnSO₄, entre otras técnicas y se notificó una prevalencia para *T. canis* de 14 % (Ristić y col, 2020).

Por otro lado, los resultados también son similares a los obtenidos en el Centro Poblado Menor Nueva Tacna, en Perú, donde las contaminaciones ligeras alcanzaron 85,4 % (Farfán y col, 2019). En este trabajo, se estudiaron diez áreas recreativas que se muestrearon de acuerdo al método de la W y se empleó el método de flotación de Willis con cloruro de sodio a 25 %.

En Cuba, no existen estudios anteriores en los que se compare la contaminación del suelo por *Toxocara*, entre las estaciones del año. Escasos trabajos de otras regiones del mundo han abordado esta temática, algunos de ellos plantean que los elevados valores de humedad favorecen la supervivencia de los huevos (Abou-El-Naga, 2018). Se ha demostrado que los huevos mueren a temperaturas superiores a 37 °C, en niveles bajos de humedad relativa y durante la exposición directa a los rayos del sol (Azam y col, 2011). Por el contrario, altas prevalencias se han asociado significativamente con alta longitud geográfica, baja latitud, baja temperatura y altos niveles de humedad (Abou-El-naga, 2018).

En parques de Pula, ciudad de Croacia, se realizó un estudio de los suelos en parques infantiles. Para ello se colectaron muestras en diez sitios de cada parque, para un total de 90. Cada muestra contuvo 500 g de suelo de un área de 25 cm x 25 cm y de una profundidad de 10 cm. Para el análisis de las mismas se utilizó una solución saturada $ZnSO_4$. El grado de contaminación en el mes de junio (estación poco lluviosa) alcanzó 15,5 % y en diciembre (estación lluviosa) 23,3 %, comportamiento semejante entre los períodos climáticos a pesar de que los valores de contaminación resultaron menores que en el presente trabajo. Aunque las diferencias entre ambas estaciones no fueron significativas estadísticamente, el mayor valor en la estación lluviosa se atribuyó a las condiciones de temperatura moderada y suficiente humedad del suelo, adecuadas para la conservación de los huevos (Stojčević y col, 2010).

En la región de Asia, en un estudio que se realizó en Filipinas se recolectaron 120 muestras de suelo en patios traseros, áreas abiertas, caminos y en el interior de viviendas. Cada muestra consistió en aproximadamente 200 g y se colectó a una

profundidad de dos a cinco cm. Para detectar los huevos de *Toxocara*, se utilizó el método de concentración por flotación con sacarosa obteniéndose una positividad de 40 % para el período lluvioso (24/60) y de 18 % durante el período poco lluvioso (11/60) (Horiuchi y col, 2013).

En estudio realizado en Hanover, la ciudad capital del estado federal de Baja Sajonia, Alemania, durante un año (enero a diciembre), se muestrearon mensualmente los areneros de parques infantiles, para estudiar la influencia de la estación en la contaminación por *Toxocara*. Cada muestra se tomó a una profundidad de 2 a 3 cm, siguiendo un patrón serpenteante, para un total de cinco muestras por arenero, hasta alcanzar un kilogramo de suelo. Las muestras se analizaron mediante el método de McMaster con solución saturada de cloruro de sodio. La contaminación con huevos de *Toxocara* fue elevada en los meses de enero y febrero (19/46, 41 %), mientras que en el mes de septiembre se observó una disminución hasta 6,5 % (3/46) (Kleine y col, 2017). La contaminación varió marcadamente de la estación invernal con los mayores valores, a la estival, con los menores. En este caso, se consideró que los valores de humedad y temperatura garantizaron la supervivencia de los huevos del parásito en el ambiente, durante los meses de invierno (enero y febrero). En los meses de verano (específicamente septiembre) al aumentar la afluencia de niños en los parques, decrece el número de mascotas en los mismos, que constituyen la fuente de infección (Kleine y col, 2017).

En la provincia de Teherán, Irán se realizó un estudio en 11 parques para comparar la prevalencia de huevos de *Toxocara* en las diferentes estaciones del año. Las muestras se colectaron al azar, de entre 3 y 5 cm de profundidad, para un total de 500 g por sitio y se analizaron mediante la técnica flotación con nitrato de sodio ($d = 1,30 \text{ g/mL}$). Se notificó una mayor prevalencia en la primavera (37,2 %) y en el otoño (32,6 %), aunque no se encontró diferencia estadística significativa entre estas estaciones. Se demostró asociación de la contaminación con la temperatura templada y con la mayor cantidad de lluvia (Raissi y col, 2020).

Al examinar el número de muestras positivas por parque, para tener una idea de la dispersión de la positividad, se encontró que, en el período de febrero a abril, el máximo fue de 4 muestras; mientras que en el período de julio a octubre las muestras positivas alcanzaron hasta 6 muestras. No obstante, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($P > 0,05$) (Figura 11).

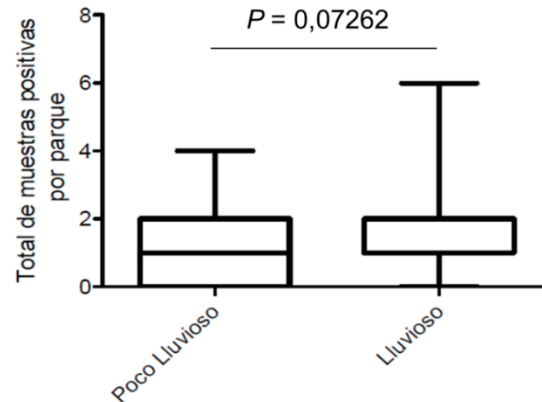


Figura 11. Comparación entre el total de muestras de suelo positivas a huevos de *Toxocara* en parques del municipio La Lisa, La Habana, Cuba, en los períodos; poco lluvioso (febrero a abril) y lluvioso (julio a octubre) de 2021. Los resultados se determinaron mediante la prueba t de Student después de comprobar mediante la prueba de Shapiro–Wilk que las diferencias se ajustan a la distribución normal.

El total de huevos encontrados en los parques estudiados en el municipio La Lisa también se incrementó del período poco lluvioso (62 huevos) al lluvioso (113 huevos). Al analizar el total de huevos por parque, en el período de febrero a abril se alcanzó la cifra de 15 huevos por parque y en el período lluvioso se encontraron hasta 20 huevos por parque, sin que estas diferencias fueran estadísticamente significativas ($P > 0,05$) (Figura 12).

De manera general, en ambos períodos, el número de huevos por 100 g de suelo fue de 0,84. Este valor es menor que el obtenido al muestrear los parques de Lisboa, en los que se notificaron 4,2 huevos en 100 g de suelo y en la provincia de Tehran, Irán,

donde se encontraron 4 huevos por muestra de 100 g de suelo (Otero y col, 2018; Raissi y col, 2020).

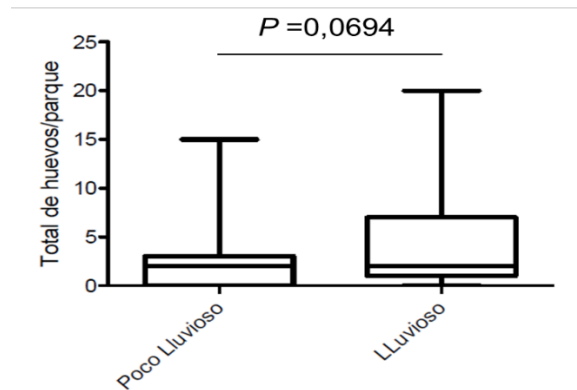


Figura 12. Comparación del total de huevos de *Toxocara* encontrados en el suelo de parques del municipio la Lisa, La Habana, Cuba, en los períodos poco lluvioso (febrero a abril) y lluvioso (Julio a octubre) de 2021. Los resultados se determinaron mediante la prueba de Wilcoxon después de comprobar mediante la prueba de Shapiro–Wilk que las diferencias no se ajustan a una distribución normal.

4.3. Identificación de las especies de *Toxocara* presentes en el suelo de parques del municipio La Lisa

Con la finalidad de determinar la metodología ideal para lograr la ruptura de la cubierta de los huevos de *Toxocara* y poder extraer el ADN, se compararon varios métodos físico-químicos. La figura 13 muestra la observación al microscopio óptico de la suspensión que resultó de la aplicación de los métodos. Para ambas especies de *Toxocara*, el método que provocó la ruptura de los huevos fue la incubación en NaClO seguida de homogeneización manual.

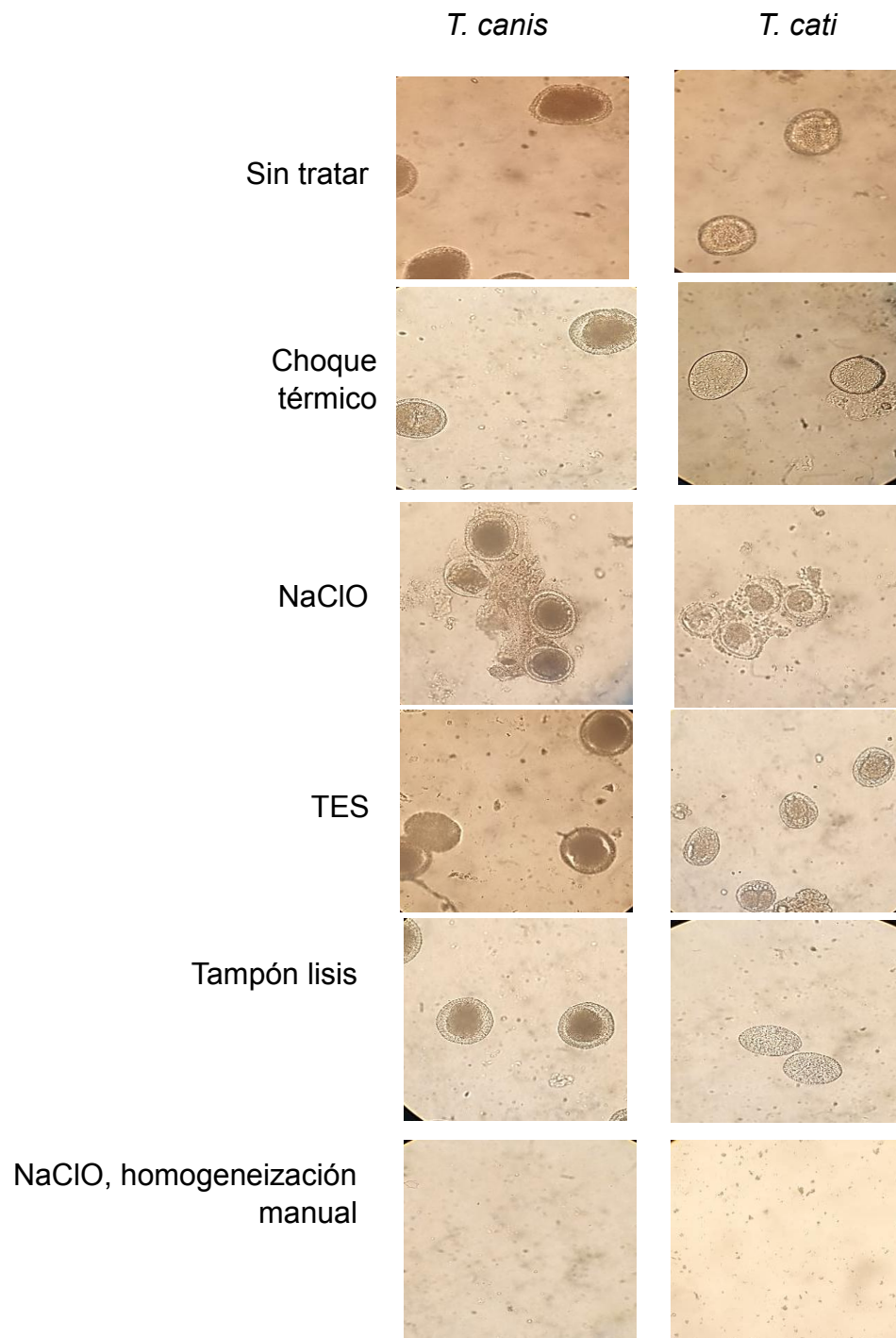


Figura 13. Microfotografía de la observación al microscopio óptico directo de los resultados de la aplicación de diferentes métodos físico-químicos para romper la cubierta de los huevos de *Toxocara canis* y *Toxocara cati*. Aumento 320x.

Seguidamente, se prepararon las curvas estándar para *T. canis* y *T. cati*, por separado cada sistema. A partir del ADN de una suspensión que contuvo 20 000 huevos se realizaron las diluciones seriadas 1:4 para cada sistema (Figuras 14 y 15).

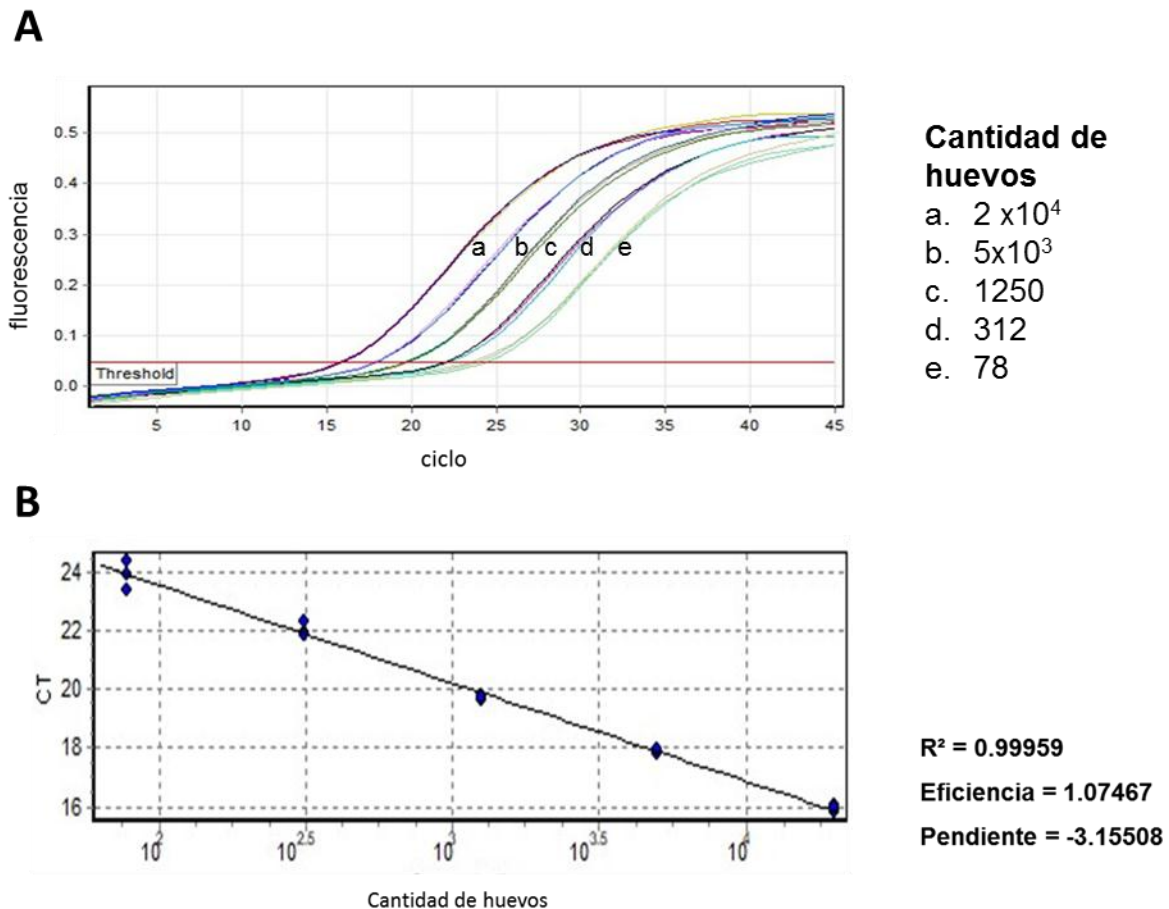


Figura 14. Curva estándar para la cuantificación de huevos de *Toxocara canis* en muestras de suelo. A) Amplificación mediante qPCR, de diluciones seriadas 1:4, de ADN extraído de 20 000 huevos. B) Recta obtenida al graficar los promedios de los CT contra el logaritmo de cantidades conocidas de huevos, a los que se les extrajo el ADN (B). R^2 = coeficiente de determinación.

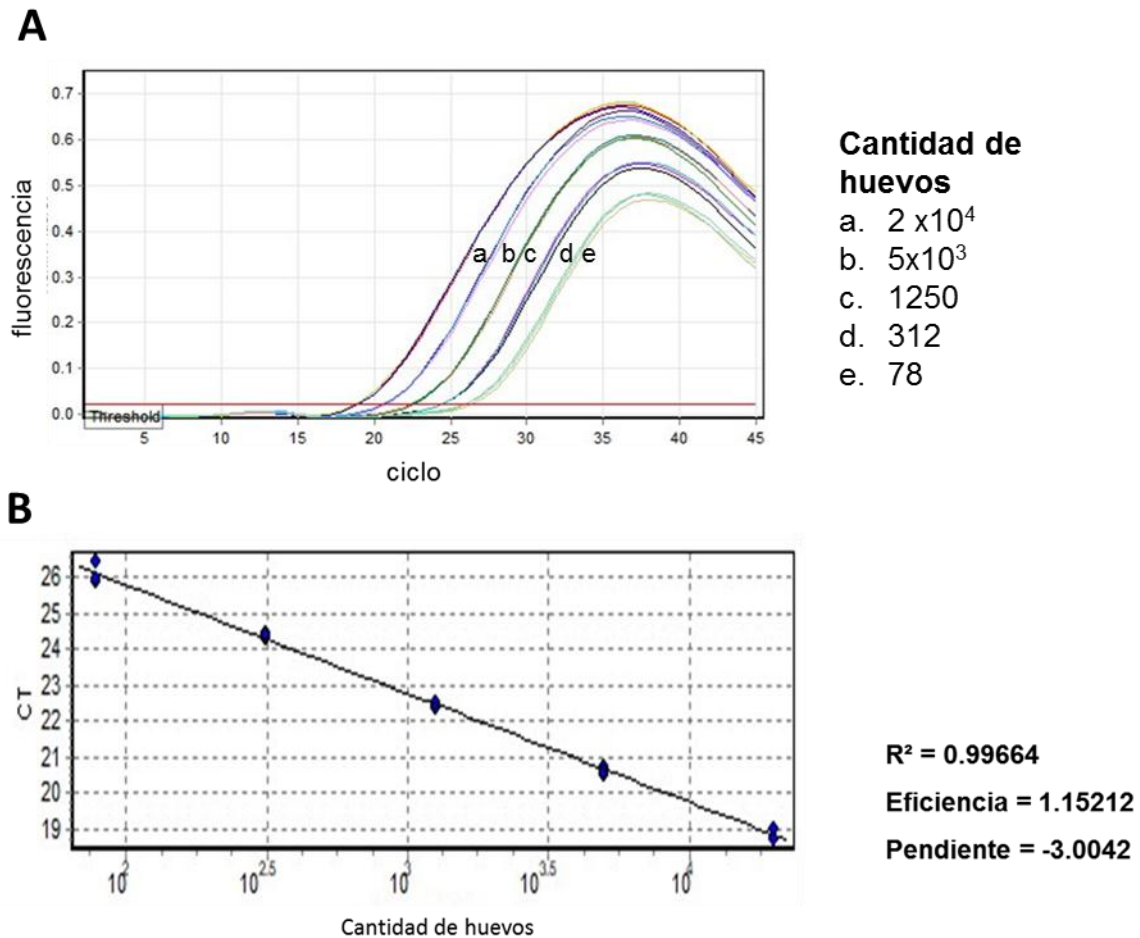


Figura 15. Curva estándar para la cuantificación de huevos de *Toxocara cati* en muestras de suelo. A) Amplificación mediante qPCR, de diluciones seriadas 1:4, de ADN extraído de 20 000 huevos. B) Recta obtenida al graficar los promedios de los CT contra el logaritmo de cantidades conocidas de huevos, a los que se les extrajo el ADN (B). R^2 = coeficiente de determinación.

Los valores de los parámetros del modelo de regresión y de eficiencia de la qPCR estimados para cada curva, fueron óptimos (Svec y col, 2015). Para cumplir el requisito de eficiencia se hizo necesario ajustar el volumen de ADN molde, para *T. canis* se utilizaron 5 μ L, mientras que para *T. cati* fueron 7 μ L. El límite de detección fue de 0,3 huevos para ambas especies de *Toxocara*.

Los resultados coinciden con un estudio anterior en el que también se compararon diferentes metodologías para romper la cubierta de los huevos de *Toxocara*, y se encontró que el método más efectivo para la lisis era la ruptura mecánica de su cubierta. Aunque, a diferencia del presente trabajo, se utilizaron matrices de agitación con perlas, en lugar de homogenización manual (Jarosz y col, 2021).

El valor del coeficiente de variación intraensayo para la curva de *T. canis* fue 0,4 % y el interensayo fue 0,9 %. Los valores para estos parámetros en la curva de *T. cati* fueron 0,6 % y 1,49 %, respectivamente.

Al analizar las muestras de los parques mediante qPCR, en este caso el ADN de los huevos de las muestras que por microscopía óptica resultaron positivas, la mayor incongruencia entre los métodos se encontró en las muestras que por microscopía presentaron entre uno y cinco huevos (Tablas 3 y 7). Sin embargo, los parques en los que por microscopía se encontró mayor cantidad de huevos (10-20 huevos) coincidieron cuando se analizaron por qPCR, incluso las cuantificaciones fueron similares en la mayoría de los casos (Tabla 8).

Tabla 8. Cantidad de huevos de las especies *Toxocara canis* y *Toxocara cati* detectados mediante qPCR en los parques del municipio La Lisa, en los períodos poco lluvioso (febrero a abril) y lluvioso (julio a octubre) de 2021.

Parques	Período poco lluvioso		Período lluvioso	
	qPCR <i>T. canis</i>	qPCR <i>T. cati</i>	qPCR <i>T. canis</i>	qPCR <i>T. cati</i>
La Concepción	16	2	18	2
La Coronela (222 esquina 27)	18	2	0	0
Punta Brava	7	0	0	1
El Cano	10	0	0	0
Alturas de La Lisa (220 y 81)	2	0	0	0
San Agustín (246 y 35C)	4	0	NR	NR
La Lisa (156 y 49)	0	1	13	0
San Agustín (256/37y35)	0	1	0	0
Fuente La Lisa (202 y 51)	0	5	0	0
Guatao	0	0	10	3
Arroyo Arenas (282 y 43)	0	0	22	4
Bello 26	0	0	0	3
Arroyo Arenas (51 esquina 264)	0	0	0	1
Versalles (180/45 y 43)	0	0	0	0
San Agustín (240 y 31)	0	0	0	0
El Cano (calle central)	0	0	0	0
Versalles (190/47 y 45)	0	0	NR	NR
La Lisa (158 y 51)	NR	NR	0	2
Alturas de La Lisa (200 y 97A)	NR	NR	0	2
Valle Grande 167 (esquina 316)	NR	NR	0	0
XX Aniversario	NR	NR	0	0
Versalles (198 y 45)	NR	NR	NR	NR
Alturas de La Lisa (196/65 y73)	NR	NR	NR	NR
Subtotales	57	11	63	18
Totales generales	68		81	

NR: prueba no realizada, MIO negativa.

Aparentemente, mediante la qPCR no se pudieron detectar cantidades de huevos por debajo de 5, para ninguna de las especies, lo que pudiera estar dado porque luego de la observación microscópica, al tratar de recobrar los huevos que se encuentran entre cubre y porta, se corre el riesgo de perder los huevos, así como se puede perder parte del material genético en el homogeneizador. A pesar de que cada proceder se realizó con el mayor cuidado de evitar las pérdidas o la dilución del material genético, al lavar los dispositivos para el recobrado, es evidente el riesgo.

Otros autores de igual forma plantean las limitaciones del examen microscópico. Aunque constituye la regla de oro para el diagnóstico de múltiples parasitosis, el método incluye diferentes pasos pre-analíticos a través del uso de técnicas de flotación centrifugación, por lo que puede producirse baja recuperación de los huevos de *Toxocara*, especialmente de muestras de suelo. Además, es necesario tener en cuenta el error humano determinado por la experiencia del investigador para discriminar inequívocamente los huevos de las especies de *Toxocara* y de otros helmintos, a la hora de contar los huevos (Uga y col; 2000; Borecka y col, 2008; Durant y col, 2012; Tyungu y col, 2020)

En el presente estudio, se detectaron las especies *T. canis* y *T. cati* en el suelo de los parques, sin que existieran diferencias significativas entre el número de parques contaminados por cada una de ellas, en ninguno de los períodos (Tabla 9). Sin embargo, se detectó un mayor número de huevos de la especie *T. canis* en cada uno de los períodos, en comparación con la especie *T. cati* (Tabla 10). De acuerdo a estos resultados, en Cuba, los canes son los principales contribuyentes a la contaminación del suelo con *Toxocara*. Anteriormente, se ha notificado que la infección en perros domésticos o callejeros alcanza 20 % (Duménigo y col, 1994; Hernández y col, 2007). El no cumplimiento de la desparasitación periódica, la gran cantidad de perros callejeros y la no recogida de las heces que se depositan en el suelo de áreas públicas, contribuyen a estos niveles de infección y en consecuencia a la contaminación del suelo.

Tabla 9. Comparación del número de parques contaminados por las especies *Toxocara canis* y *Toxocara cati*, detectadas mediante qPCR, en el municipio La Lisa, La Habana, Cuba, en los períodos poco lluvioso (febrero a abril) y lluvioso (julio a octubre) de 2021.

Período	Número de parques		
	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>	<i>P</i>
Poco lluvioso	6	5	0,423
Lluvioso	4	8	0,063

Tabla 10. Comparación del número de huevos de las especies *Toxocara canis* y *Toxocara cati*, detectadas mediante qPCR, en los parques del municipio La Lisa, La Habana, Cuba, en los períodos poco lluvioso (febrero a abril) y lluvioso (julio a octubre) de 2021.

Período	Número de huevos		
	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>	<i>P</i>
Poco lluvioso	57	11	0,034
Lluvioso	63	18	0,004

Estos resultados se diferencian de los obtenidos en Lisboa y en New York, donde la única especie que se encontró en muestras de suelo mediante estudios de biología molecular fue *T. cati* (Otero y col, 2018; Tyungu y col, 2020). En países como EUA, las personas tienden a remover con mayor frecuencia las heces de los perros de la superficie de zonas públicas y se ha notificado que la prevalencia de la infección por *T. cati* en gatos es hasta cuatro veces superior a la prevalencia de la infección por *T. canis* en perros (Tyungu y col, 2020).

Si bien, la idea principal de este objetivo fue la introducción de técnicas moleculares específicas para la identificación de las especies *T. canis* y *T. cati*, además, se dispone de dos sistemas que permite también la estimación de los niveles de contaminación de los suelos, específicamente, de los niveles moderados e intensos. Esto tiene un gran valor pues varios autores demostraron previamente la correspondencia entre la prevalencia de la contaminación del suelo con los huevos de *Toxocara* y la seropositividad en la población humana con posible exposición. En Los Baños, Laguna, Filipinas, se demostró la existencia de altos niveles de contaminación del suelo (43 %) y elevados valores de seropositividad en escolares de la región (49 %) (Fajutag y Paller, 2013). En Polonia, los sitios más contaminados resultaron los patios, con entre 38 % y 53 % de muestras de suelo positivas. De los estudios que se llevaron a cabo en ese país se concluyó que la exposición humana a la infección por *Toxocara* resultó proporcional a la prevalencia de los huevos en las muestras examinadas (Mizgajska, 2001).

A pesar de que se debe seguir trabajando en la optimización del sistema qPCR tanto en las metodologías previas relacionadas con el tratamiento de las muestras, como en lograr el sistema múltiple y su aplicación a muestras de perros y gatos; contar con esta herramienta diagnóstica rápida, sensible y eficaz permitirá un mejor conocimiento de la prevalencia de las especies y sobretodo un mejor trabajo en la prevención de la enfermedad.

4.4. Consideraciones generales

La presencia de huevos de *Toxocara* en el suelo de parques del municipio La Lisa, con independencia del período climatológico del año, representa un riesgo potencial para la salud pública y veterinaria. La extensión de este trabajo a otros municipios de la ciudad o a otras zonas del país, permitiría conocer si el comportamiento de los niveles de contaminación es análogo, sobre todo si se tiene en cuenta que las condiciones epidemiológicas favorables para la transmisión y el riesgo, se encuentran extendidos en todo el país.

Por su parte, la introducción de la qPCR, permitió la detección de las especies de *Toxocara* que contaminaban el suelo. Esta técnica, a diferencia de la microscopía, es independiente de la morfología del parásito, que pudiera estar alterada por su estadía en el medio ambiente. Además, esta metodología permite incrementar la capacidad de procesamiento de las muestras y aunque resultó efectiva casi exclusivamente en el caso de niveles medio e intenso de contaminación, demostró ser una herramienta muy prometedora para la evaluación de la contaminación del medio ambiente, con posibilidades además de implementarse en el diagnóstico veterinario.

En contraposición a las investigaciones realizadas en otras regiones del mundo, la cantidad de huevos de *T. canis* fue superior en comparación con los de la especie *T. cati*. Aunque *T. canis* se considera la principal especie zoonótica, responsable de la gran mayoría de casos en humanos, *T. cati* también se ha señalado como la especie causante de algunos casos de toxocarosis humana (Fisher, 2003; Maciag y col, 2022). Por lo que se deben poner en práctica las medidas de prevención y control que abarquen la desparasitación regular de los hospederos definitivos y la remoción de las heces de estos animales de las zonas públicas. La población debe tener conocimiento de cómo atender a sus mascotas y contribuir a la disminución de animales callejeros a través de adopción responsable y la esterilización de las mismas.

Para un mejor control de esta enfermedad zoonótica y de otras parasitosis que se transmiten por el suelo, se deben incrementar las medidas de higiene personal, en especial en áreas públicas y evitar la geofagia. La educación en salud, la aproximación con el enfoque de una salud, la integración y la colaboración de autoridades locales, veterinarios, personal de la salud y decisores es necesaria para lograr una disminución de la contaminación por huevos de *Toxocara* y de otras especies de parásitos.

Conclusiones

5. Conclusiones

1. La mayoría de los parques del municipio La Lisa (91,3 %) se encuentran contaminados con huevos del género *Toxocara*, lo que representa una amenaza para la salud pública y veterinaria.
2. La contaminación con huevos de *Toxocara* de los parques en el municipio La Lisa se comporta de manera similar en los períodos poco lluvioso y lluvioso, lo que representa un riesgo potencial para la transmisión de la enfermedad tanto a humanos, como a los animales, durante todo el año.
3. La introducción de los sistemas de qPCR específicos para *T. canis* y *T. cati* permite una detección rápida y confiable de las especies en muestras de suelo, lo cual contribuirá a un mejor manejo de la prevención y control de la toxocarosis en el país.
4. Ambas especies, *T. canis* y *T. cati* se detectaron en el suelo de los parques del municipio, lo que permite orientar las medidas a implementar para prevenir y controlar esta parasitosis.

Recomendaciones

6. Recomendaciones

- ❖ Extender el estudio de la contaminación del suelo de áreas públicas por huevos de *Toxocara*, a otros municipios de La Habana y a otras zonas del país, integrando el estudio de la población veterinaria y humana circundante.
- ❖ Dar a conocer los resultados de la presente investigación a autoridades de salud del municipio.
- ❖ Desarrollar un sistema múltiple qPCR para la detección específica de las especies de *Toxocara* y su aplicación a diferentes muestras medio-ambientales y veterinarias.

Referencias bibliográficas

7. Referencias bibliográficas

- Abou-El-Naga, IF. Desarrollo y viabilidad de huevos de *Toxocara canis*. Biomédica. 2018;38:189-97.
- Acha Pedro N, Szyfres Boris. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre. Rev. Esp. Salud Pública [Internet]. Junio 2005 [acceso 28 Noviembre 2022]; 79:423-423. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_art
- Ahn SJ, Ryoo NK, Woo SJ. Ocular toxocariasis: clinical features, diagnosis, treatment, and prevention. Asia Pac. Allergy. 2014;4:134-41
- Ahn SJ, Woo SJ, Jin Y, Chang YS, Kim TW, Ahn J, *et al*. Clinical features and course of ocular toxocariasis in adults. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. Junio 2014 [acceso 4 agosto 2020]; 8. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002938>
- Akao N, Ohta N. Toxocariasis in Japan. Parasitol. Int. 2007;56:87-93.
- Alba-Hurtado F, Muñoz-Guzmán M A. Toxocariosis: From a One Health Perspective. In: Morales-Montor J, Río-Araiza VHD, Hernández-Bello R., editors. Parasitic Helminths and Zoonoses - From Basic to Applied Research. London: IntechOpen; 2022 [acceso 18 octubre 2022]; Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/81194>
- Apóstol P, Pierina P, Jiménez J. Detección de huevos de *Toxocara* sp. en suelos de tres parques públicos de la zona este de Barquisimeto, estado Lara. Gaceta de Ciencias Veterinarias. 2013;5:38-44.
- Azam D, Ukpai OM, Said A, Abd-Allah GA, Morgan ER. Temperature and the development and survival of infective *Toxocara canis* larvae. Parasitol. Res. 2011;110:649-56.
- Borecka A, Gawor J, Niedworok M, Sordyl B.. Occurrence of *Toxocara* spp. eggs in household environment of children with diagnosed toxocariasis in Łódź voivodeship. Wiad. Parazytol. 2010;56:141-44.
- Borecka A, Gawor J: Modification of gDNA extraction from soil for PCR designed for the routine examination of soil samples contaminated with *Toxocara* spp. eggs. J Helminthol. 2008;82:119-22.

- Borecka A. Differentiation of *Toxocara* spp. eggs isolated from the soil by the PCR-linked RFLP method. *Helminthol.* 2004;41:185-7.
- Bruñaská M, Dubinský P, Reiterová K. *Toxocara canis*: ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs. *Int J Parasitol.* 1995;25:683-90.
- Cáceres Pinto CM, Bustinza Cárdenas RH, Valderrama Pomé AA. Contaminación con Huevos de *Toxocara* sp. y evaluación sanitaria de parques en la Ciudad de Abancay, Perú. *RIVEP.* 2017;28:376-86.
- Çelik T, Kaplan Y, Ataş E, Öztuna D, Berilgen S. *Toxocara* seroprevalence in patients with idiopathic Parkinson's disease: ¿chance association or coincidence? *Biomed Res. Int.* 2013;685196.
- Chen J, Liu Q, Liu GH, Zheng WB, Hong SJ, Sugiyama H, *et al.* Toxocariasis: a silent threat with a progressive public health impact. *Infect Dis Poverty.* 2018;7:59.
- Chen J, Zhou DH, Nisbet AJ, Xu MJ, Huang SY, Li MW, *et al.* Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. *Infection, genetics and evolution: MEEGID.* 2012;12:1344-8.
- Collender PA, Kirby AE, Addiss DG, Freeman MC, and Remais JV. Methods for quantification of soil-transmitted helminths in environmental media: current techniques and recent advances. *Trends Parasitol.* 2015;31:625-39.
- Conde Garcia L, Muro Alvarez A, Simon Martin F. Epidemiological studies on toxocariasis and visceral larva migrans in a zone of western Spain. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1989;83:615-20.
- Costamagna Sr, Visciarelli Ec. *Parasitosis regionales.* 2^aed. Bahía Blanca, Argentina: REUN; 2008.
- de la Fe Rodríguez PY. Prevalencia de *Toxocara canis* en perros caseros de la provincia Villa Clara [Tesis de maestría]. Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". 2004
- Dent JH, Nichols RL, Beaver PC, Carrera GM, Staggers RJ. Visceral larva migrans; with a case report. *Am. J. Clin. Pathol.* 1956;32:777-803.
- Dernouchamps JP, Verougstraete C, Demolder E. Ocular Toxocariasis: a presumed case of peripheral granuloma. *Int. Ophthalmol.* 1990;14:383-8.

- Despommier D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *CMR*. 2003;16:265-72.
- Dubná S, Langrová I, Jankovská I, Vadlejch J, Pekár S, Nápravník, *et al*. Contamination of soil with *Toxocara* eggs in urban (Prague) and rural areas in the Czech Republic. *Vet. Parasitol*. 2007;144:81–6.
- Duménigo B, Galvez D. Soil contamination in Ciudad de La Habana province with *Toxocara canis* eggs. *Rev Cubana Med Trop*. 1995;47:178-80.
- Duménigo B, Lau N, Bravo JR. Prevalence of *Toxocara canis* in dogs in the City of Havana. *Rev Cubana Med Trop*. 1994;46:99-102.
- Durant JF, Ireng LM, Fogt-Wyrwas R, Dumont C, Doucet JP, Mignon B, *et al*. Duplex quantitative real-time PCR assay for the detection and discrimination of the eggs of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* (Nematoda, Ascaridoidea) in soil and fecal samples. *Parasit Vectors*. 2012;5:288.
- Durette-Desset MC, Chabaud AG. Three new nematode parasites of the water-chevrotain *Hyemoschusaquaticus* in Gabon (collected by G. Dubost). *Bulletin du Muséum d'histoire naturelle*. 1974;135:75-87.
- Dutra GF, Pinto NS, de Avila LF, Dutra PC, de Lima PT, Rodrigues LH, *et al*. Risk of infection by the consumption of liver of chickens inoculated with low doses of *Toxocara canis* eggs. *Vet. Parasitol*. 2014;203:87-90.
- Eisenbraun H, Alluwie A, Connolly S, Nair R, Verocai GG, Ketzis JK. Comparison of fecal analysis methods for the detection of *Platynosomum fastosum* in naturally infected cats. *J. Feline Med. Surg* [Internet]. Abril 2019 [acceso 9 marzo 2020]; Disponible en: <https://journals.feline>.
- Espinoza YA, Huapaya PE, Roldán WH, Jiménez S, Abanto EP, Rojas CA, *et al*. Seroprevalence of human toxocariasis in Andean communities from the Northeast of Lima, Perú. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010;52:31-6.
- Fajutag AJ, Paller VG. *Toxocara* egg soil contamination and its seroprevalence among public school children in Los Baños, Laguna, Philippines. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 2013;44:551-560.

- Fakhri Y, Gasser RB, Rostami A, Fan CK, Ghasemi SM, Javanian M, *et al.* *Toxocara* eggs in public places worldwide-A systematic review and meta-analysis. *Environ. Pollut.* 2018;242:1467-75.
- Fan CK, Holland CV, Loxton K, Barghouth U. Cerebral toxocariasis: ¿silent progression to neurodegenerative disorders? *Clin. Microbiol. Rev.* 2015;28:663-86.
- Farfán D, Quispe R, Rivera A, Lloja L. Prevalencia de huevos de *Toxocara* spp. en áreas recreacionales del distrito Gregorio Albarracín Lanchipa y el nivel de contaminación (ligero, moderado, alto). *Ciencia & Desarrollo.* 2019;18:58-65.
- Fernández JE, López-Hidalgo A, Sitchao N. Larva migrans visceral. Reporte de siete casos del hospital militar escuela "Dr. Carlos J. Finlay". *Rev Cubana Med Trop.* 1974;26:1-2.
- Fialho P M, Corrêa C R. A Systematic Review of Toxocariasis: A Neglected But High-Prevalence Disease in Brazil. *Am. J. Trop. Med.* 2016;94:1193-99.
- Fillaux J, Magnaval JF. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Vet. Parasitol.* 2013;193:327-36.
- Finsterer J, Auer H. Neurotoxocarosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2007;49:279-87.
- Fisher M. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends Parasitol.* 2003;19:167-170.
- Forootan A, Sjöback R, Björkman J, Sjögren B, Linz L, Kubista M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol Detect Quantif.* 2017;12:1-6.
- Fu CJ, Chuang TW, Lin HS, Wu CH, Liu YC, Langinlur MK, *et al.* Seroepidemiology of *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in the capital area of the Republic of the Marshall Islands. *BMC. Infect. Dis.* 2014;14:261.
- Gallardo J, Forlano M, Ontiveros Y. Presencia de huevos de *Toxocara* spp. en el suelo de patios de casas y heces de perros mascotas de la ciudad de Barquisimeto, estado Lara, Venezuela. *Gaceta de Ciencias Veterinarias.* 2018;23:19-3.

- Gibbons LM, Jacobs DE, Sani RA. *Toxocara malaysiensis* sp. (Nematoda: Ascaridoidea) from domestic cat (*Felis catus*, Linnaeus 1758). *J. Parasitol.* 2001;87:660-5.
- Gillespie SH. The epidemiology of *Toxocara canis*. *Parasitol Today.* 1988;4:180-2.
- Gómez L, Rueda T, Pulido C, Sanchez-Roman J. Ocular toxocariasis. A case report. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2008;83:49-52.
- Guía para el muestreo de suelos / Ministerio del Ambiente del Perú. Dirección General de Calidad Ambiental. Decreto Supremo N° 002-2013-MINAM. 2014;1-47.
- Hartleb M, Januszewski K. Severe hepatic involvement in visceral larva migrans. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001;13:1245-9.
- Hayashi E, Tuda J, Imada M, Akao N, Fujita K. The high prevalence of asymptomatic *Toxocara* infection among schoolchildren in Manado, Indonesia. *Southeast Asian Trop Med Health.* 2005;36:1399-406.
- Hernández R, Núñez F, Pelayo L. Potencial zoonótico de las infecciones por helmintos intestinales en perros callejeros de Ciudad de La Habana. *Rev Cubana Med Trop.* 2007;59:234-40.
- Holland CV. Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara*: the enigma remains. *Parasitology.* 2017;144:81-94.
- Horiuchi S, Paller VG, Uga S. Soil contamination by parasite eggs in rural village in the Philippines. *Trop Biomed.* 2013;30:495-503.
- Hotez PJ, Wilkins PP. Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance? *PLOS Negl. Trop. Dis.* [Internet] marzo 2009 [acceso 18 agosto 2020]; 400: Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658740/>.
- Hotez PJ. Visceral and ocular larva migrans. *Seminari Neurology.* 1993;13:175-9.
- Hurtado AF, Muñoz MA. Toxocarosis: From a One Health perspective. In: Morales-Montor J, Río-Araiza VHD, Bello RH, editors. *Parasitic Helminths and Zoonoses - From Basic to Applied Research.* London: IntechOpen [Internet] abril 2022 [acceso 30 agosto 2022]; Disponible en: <https://www.intechopen.com/online-first/81194>.

- Iowa State University Center for Food Security and Public Health, "Toxocariasis". Center for Food Security and Public Health Technical Factsheets. [Internet]. october 2016 [acceso 20 agosto 2020]; 134. Disponible en: http://lib.dr.iastate.edu/cfsph_factsheets/134.
- Ismail MA, Khalafallah O. *Toxocara canis* and chronic urticaria in Egyptian patients. J. Egypt. Soc. Parasitol. 2005;35:833-40.
- Jarosz W, Durant JF, Irengé LMWB, Fogt-Wyrwas R, Mizgajska-Wiktor H, Gala JL. Optimized DNA-based identification of *Toxocara* spp. eggs in soil and sand samples. Parasit Vectors. 2021;26:426.
- Jee D, Kim KS, Lee WK, Kim W, Jeon S. Clinical Features of Ocular Toxocariasis in Adult Korean Patients. Ocul. Immunol. Inflamm. 2016;24:207-16.
- Joy AT, Chris OI, Godwin NC. Toxocarosis and public health: an epidemiological review. Int. J. Infect. Dis. 2017;3:28-39.
- Kleine A, Springer A, Strube C. Seasonal variation in the prevalence of *Toxocara* eggs on children's playgrounds in the city of Hanover, Germany. Parasit Vectors. 2017;10:248.
- Köchle BR, Garijo-Toledo MM, Llobat L, Sansano-Maestre J. Prevalence of *Toxocara* Eggs in Public Parks in the City of Valencia (Eastern Spain). Vet. Sci. 2022;9:232.
- Kroten A, Toczyłowski K, Oldak E, Sulik A. Toxocarosis in children: poor hygiene habits and contact with dogs is related to longer treatment. Parasitol. Res. 2018;117:1513-9.
- Kuenzli E, Neumayr A, Chaney M, Blum J. Toxocariasis-associated cardiac diseases- a systematic review of the literature. Acta Trópica. 2016;154:107-20.
- Laird Pérez RM, Carballo Arrieta D, Reyes Zamora EM, García Roche R, Prieto Díaz V. *Toxocara* sp. en parques y zonas públicas de Ciudad de la Habana, 1995. Rev Cubana Hig Epidemiol. 2000;38:112-6.
- Llacerl D. Cantidad de días con lluvia y su distribución por intervalos en condiciones normales y de sequía severa en el occidente de Cuba. Rev. Cubana. Meteorología. 2016;22:49-65.

- Loftin CM, Donnett UB, Schneider LG, Varela-Stokes AS. Prevalence of endoparasites in northern Mississippi shelter cats. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2019;18:100322.
- Luis MC, Moroño M, Cabrera R, González M, Morales M, Silva R. Larvas migrans ganglionar: Presentación de un caso. *Rev Cubana Pediatría* [Internet]. Abril 2003 [acceso 18 noviembre 2022]; 75. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312003000100010&lng=pt.
- Ma G, Holland CV, Wang T, Hofmann A, Fan CK, Maizels RM, *et al*. Human toxocariasis. *Lancet Infect. Dis*. 2018;18:14-24.
- Maciag L, Morgan ER, Holland C. *Toxocara*: time to let cati out of the bag. *Trens Parasitol*. 2022;38:280-9.
- Macpherson CN. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. *Parasitol. Int*. 2013;43:999- 1008.
- MagnaVal JF, Dorchie P, Glickman LT. *Toxocara* species (Toxocariasis). In: Yu VL y col Eds., *Antimicrobial Therapy and Vaccines*. ESun Technologies LLC, Pittsburgh, PA, USA. 2005.
- MagnaVal JF, Glickman LT, Dorchie P, Morassin B. Highlights of human Toxocariasis. *Korean J. Parasitol*. 2001;39:1-11.
- MagnaVal JF, Michault A, Calon N, Charlet J P. Epidemiology of human Toxocariasis in La Reunión. *Trans. R. Soc. Trop*. 1994;88:531-3.
- Mandarino-Pereira ASF, Lopes CWC, Pereira MJS. Prevalence of parasite: in soil and dog feces according to diagnostic tests. *Vet. Parasitol*. 2010;170:176-81.
- Mendoza Meza DL, Maldonado Santana H. Optimization a methodology for the isolation and the molecular detection of *Toxocara canis* eggs in soil samples. *Rev. Cienc*. 2015;19:41-51.
- Mendoza Rodríguez D. *Toxocara* spp. En: Sánchez Ferrán T, editor. *Microbiología y Parasitología Médicas*. Vedado Ciudad de la Habana, Cuba. *Rev. Cienc*. 2001;297-302.

- Mikaeili F, Kia EB, Sharbatkhori M, Sharifdini M, Jalalizand N, Heidari Z, *et al.* Comparison of six simple methods for extracting ribosomal and mitochondrial DNA from *Toxocara* and *Toxascaris* nematodes. *Exp. Parasitol.* 2013;134:155-9.
- Mikaeili F, Mathis A, Deplazes P, Mirhendi H, Barazesh A, Ebrahimi S, *et al.* Differentiation of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* based on PCR-RFLP analyses of rDNA-ITS and mitochondrial *cox1* and *nad1* regions. *Acta Parasitol.* 2017;62:549-56.
- Minvielle M, Niedfeld M, Ciarmela M, Basualdo J. Toxocariosis causada por *Toxocara canis*: aspectos clínico-epidemiológicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 1999;17:300-6.
- Mizgajska H. Eggs of *Toxocara* spp. in the environment and their public health implications. *J. Helminthol.* 2001;75:147-51.
- Mizgajska H. The role of some environmental factors in the contamination of soil with *Toxocara* spp. and other geohelminth eggs. *Parasitol. Int.* 1997;46:67-72.
- Mizgajska-Wiktor H, Jarosz W, Fogt-Wyrwas R, Drzewiecka A. Distribution and dynamics of soil contamination with *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs in Poland and prevention measures proposed after 20 years of study. *Vet. Parasitol.* 2017;234:1-9.
- Mizgajska-Wiktor H, Uga S. Exposure and environmental contamination. In: Holland CV, Smith HV, editors. *Toxocara: the enigmatic parasite*. Oxfordshire: CABI Publishing. 2006;211-227.
- Molk R. Ocular toxocariasis: a review of the literature. *Ann. Ophthalmol.* 1983;15:216-9.
- Montalvo AM, Espino AM, Escalante G, Finlay CM. [Study of the seroprevalence of toxocariasis in an infantile population in the City of Havana]. *Rev. Cubana Med Trop.* 1994;46:156-8.
- Naidu TSV. Two new ascarid nematodes from vertebrate host from India. *Folia Parasitol.* 1981;28:327-34.

- Nestor J, Pasamonte L, Marinconz R, De Marzi M, Cajal S, Malchiodi E. Parasitosis zoonóticas transmitidas por perros en el Chaco Salteño. *Med- Buenos Aires*. 2000;60:217-20.
- Nichols RL. The etiology of visceral larva migrans II. Comparative larval morphology. *J.Parasitol*. 1956;42:363-99.
- Norhaida A, Suharni M, Liza Sharmini AT, Tuda J, Rahmah N. rTES-30USM: cloning via assembly PCR, expression, and evaluation of usefulness in the detection of S228 toxocariasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 2008;102:151-60.
- Oficina Nacional de Estadística e Información. Anuario estadístico de La Lisa 2016. Septiembre 2017 [acceso 12 marzo 2020]; Disponible en: <http://www.onei.gob.cu/node/13608>.
- Okulewicz A, Perek-Matysiak A, Bun´kowska K, Hildebrand J. *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* in wild and domestic carnivores. *Helminthol*. 2012;49:3-10.
- Otero D, Alhoa AM, Nijseeb R, Roelfsemac J, Overgaauwd P, Carvalhoa LM. Environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs in public parks and playground sandpits of Greater Lisbon, Portugal *J. Infect. Public Health*. 2018;11;94-8.
- Overgaauw PA, Van Zutphen L, Hoek D, Yaya FO, Roelfsema J, Pinelli E, *et al*. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Vet. Parasitol*. 2009;163:115-22.
- Özbakiş G, Doğanay A. Visceral larva migrans detection using PCR-RFLP in BALB/c mice infected with *Toxocara canis*. *J Helminthol*. 2019;9;94.
- Palmer CS, Thompson RC, Traub RJ, Rees R, Robertson ID. National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. *Vet. Parasitol*. 2008;151:181-90.
- Papavasiliopoulos V, Pitiriga V, Birbas K, Elefsiniotis J, Bonatsos G, Tsakris A. Soil contamination by *Toxocara canis* and human seroprevalence in the Attica region, Greece. *Germs*. 2018;8:155-61.
- Pawlowoski Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *J. Helminthol*. 2001;75:299-305.

- Pearson K. On a criterion that a given system of deviations from the probable in the case of correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Philos. Mag. Lett.* 1900;50:157-75.
- Peregrine AS. Nematodos en pequeños animales. *Veterinary Manual*, MSD, Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, USA, Last full review/revision Oct. 2022. Disponible en: <https://www.msddvetmanual.com/digestive-system/gastrointestinal-parasites-of-small-animals>.
- Periago MV, Diniz RC, Pinto SA, Yakovleva A, Correa-Oliveira R, Diemert DJ, Bethony JM. The Right Tool for the Job: Detection of Soil-Transmitted Helminths in Areas Co-endemic for Other Helminths. *PLOS Negl. Trop. Dis.* [Internet]. Agosto 2015 [acceso 9 marzo 2020]; 9. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003967>.
- Pivetti-Pezzi P. Ocular toxocariasis. *Int. J. Med. Sci.* 2009;6:129-30.
- Poeppl W, Herkner H, Tobudic S, Faas A, Mooseder, Burgmann H, *et al.* Exposure to *Echinococcus multilocularis*, *Toxocara canis*, and *Toxocara cati* in Austria: a nationwide cross-sectional seroprevalence study. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2013;13:798-803.
- Poulsen CS, Skov S, Yoshida A, Skallerup P, Maruyama H, Thamsborg SM, *et al.* Differential serodiagnostics of *Toxocara canis* and *Toxocara cati*-is it possible? *Parasite Immunol.* 2015;37:204-07.
- Prunier F, Delepine S, Victor J, de Gentile L, Moreau C, Laporte J, *et al.* Löffler's fibroblastic endocarditis. A report of a case complicating toxocarosis. *Arch. Mal. du Coeur Vaiss.* 2001;94:226-30.
- Raissi V, Raiesi O, Etemadi S, Firoozeh F, Getso M, Muslim A, Zibaei M. Environmental soil contamination by *Toxocara* species eggs in public places of Ilam, Iran. *Ann Agric Environ Med.* 2020;17;15-18.
- Ramírez Rubio L, García Cueto OR, Tinoco Gracia L, Quintero Núñez M, Cueto González SA, Trasviña Muñoz E. Frecuencia de huevos de *Toxocara canis* en parques públicos de Mexicali, Baja California, México. *Rev. Int. de Contam.* 2019;35.

- Ristić M, Miladinović-Tasić N, Dimitrijević S, Nenadović K, Bogunović D, Stepanović P, Ilić T. Soil and Sand Contamination with Canine Intestinal Parasite Eggs as a Risk Factor for Human Health in Public Parks in Niš (Serbia). *Helminthol.* 2020;57:109-19.
- Sánchez SS, García HH and Nicoletti A. Clinical and Magnetic Resonance Imaging Findings of Neurotoxocariasis. *Front. Neurol.* [Internet]. Febrero 2018; [acceso 9 agosto 2020]; 9: Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5809457/>.
- Sariego I, Kanobana K, Junco R, Vereecken K, Núñez FA, Polman K, Bonet M, Rojas L. Frequency of antibodies to *Toxocara* in Cuban schoolchildren. *Trop Med Int Health.* 2012;17:711-4.
- Sariego I, Kanobana K, Rojas L, Speybroeck N, Polman K, Núñez FA. Toxocariasis in Cuba: a literature review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:1382.
- Sariego I, Rojas L, Cantillo J, Falcon R and Polman K. Usefulness of *Toxocara canis* larval low molecular weight excretory-secretory products for diagnosis of human toxocariasis. *Trop. Med. Int. Health.* 2017;22:125.
- Schantz PM, Glickman LT. *Toxocara* visceral larva migrans. *N Engl J Med.* 1978; 298:436-9.
- Schantz PM, Weis PE, Pollard ZF, White MC. Risk factors for *Toxocara* ocular larva migrans: a case-control study. *Am. J. Public Health.* 1980;70:1269-72.
- Smith H, Holland C, Taylor M, Magnaval JF, Schantz P, Maizel R. How common is human Toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends Parasitol.* 2009;25:182-8.
- Smith HV. Detection of parasites in the environment. *Parasitology.* 1998;117:113-41.
- Stensvold CR, Skov J, Moller LN, Jensen PM, Kapel CMO, Petersen E, *et al.* Seroprevalence of human Toxocariasis in Denmark. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009;16:1372-3.
- Stoicescu RM, Mihai CM, Giannakopoulou AD. Marked hyper eosinophilia in a toddler: a case report. *J Med Life Sci.* 2011;4:105-8.
- Stojčević D, Sušić V, Lučinger S. Contamination of soil and sand with parasite elements as a risk factor for human health in public parks and playgrounds in

- Pula, Croatia. Veterinarski arhiv [Internet]. Febrero 2010 [acceso 25 junio 2022]; 80. Disponible en: <https://hrcak.srce.hr/62389>.
- Storey G, Phillips R. The survival of parasite eggs throughout the soil profile. *Parasitology*. 1985;91:585-90
- Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif*. 2015;3:9-16.
- Takayanagi TH, Akao N, Suzuki R, Tomoda M, Tsukidate S, Fujita, K. New animal model for human ocular Toxocariasis: ophthalmoscopic observation. *Br J Ophthalmol* 1999;83:967-72.
- Tang X, Huang G, Liu X, El-Ashram S, Tao G, Lu C, *et al*. An optimized DNA extraction method for molecular identification of coccidian species. *Parasitol Res*. 2018;117:655-664.
- Taylor MR, Keane CT, O'Connor P, Mulvihill E, Holland C. The expanded spectrum of *Toxocara* disease. *The Lancet*. 1988;1:692–95.
- Traversa D, Frangipane di Regalbono A, Di Cesare A, La Torre F, Drake J, Pietrobelli M. Environmental contamination by canine geohelminths. *Parasit Vectors*. 2014;7:67.
- Tudor P. Soil contamination with canine intestinal parasites eggs in the parks and shelter dogs from Bucharest area. *Agric Agric Sci Procedia*. 2015;6:387-91.
- Tyungu DL, McCormick D, Lau CL, Chang M, Murphy JR, Hotez PJ, *et al*. *Toxocara* species environmental contamination of public spaces in New York City. *PLOS Negl. Trop. Dis* [Internet]. Mayo 2020 [acceso 14 julio 2020]; 14. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/341167468>.
- Uga S, Matsuo J, Kimura D, Rai SK, Koshino Y, Igarashi K. Differentiation of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs by light and scanning electron microscopy. *Vet. Parasitol*. 2000;92:287-94.
- Valencia Venezuela. *Parasitología*. 2ª ed. Valencia Venezuela: Tatum. 1996;33.
- Vanhee M, Dalemans AC, Viaene J, Depuydt L, Claerebout E. *Toxocara* in sandpits of public playgrounds and kindergartens in Flanders (Belgium). *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2015;2:51-4.

- Vincke C, Gutiérrez C, Wernery U, Devoogdt N, Hassanzadeh-Ghassabeh G, Muyldermans S. Generation of single domain antibody fragments derived from camelids and generation of manifold constructs. *Methods Mol Biol.* 2012;907:145-76.
- Walsh MG, Haseeb MA. Toxocariasis and lung function: relevance of a neglected infection in an urban landscape. *Acta Parasitol.* 2014;59:126-31.
- Wisniewska-Ligier M, Wozniakowska-Gesicka T, Sobolewska-Dryjanska J, Markiewicz Jozwiak A, Wieczorek M. Analysis of the course and treatment of toxocariasis in children-a long-term observation. *Parasitol. Res.* 2012;110:2363-71.
- Wolfrom E, Chêne G, Boisseau H, Beylot C, Géniaux M, Taïeb A. Chronic urticaria and *Toxocara canis*. *Lancet.* 1995;345:196.
- Woodhall D, Starr MC, Montgomery SP, Jones JL, Lum F, Read RW, *et al.* Ocular toxocariasis: epidemiologic, anatomic, and therapeutic variations based on a survey of ophthalmic subspecialists. *Ophthalmol.* 2012;119:1211-7.