

ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

**STANDARDIZATION OF THE PCR TECHNIQUE FOR *TOXOCARA CANIS* DNA DETECTION IN SOIL SAMPLES****ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE ADN DE *TOXOCARA CANIS* (WARNER, 1782) EN MUESTRAS DE TIERRA**Andrés Romero-Osorio<sup>1</sup>; Angie Romero-Coronel<sup>1</sup>; María Lares-Hernández<sup>1</sup>; Emily Catalano-Donaire<sup>1</sup>; María Martínez-Aguilera<sup>1,2</sup> & Elizabeth Ferrer-Jesús<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Venezuela. Tel +58-243-2425822; Fax +58-243-2425333<sup>2</sup> Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Venezuela.**ABSTRACT**

Toxocariasis is produced mainly by the canine parasite *Toxocara canis* (Warner, 1782). The human is infected by eggs from feces eliminated by dogs. Therefore, it is important to detect the existence of the parasite in soil samples. The aim of this work was to standardize the PCR technique for the detection of *T. canis* DNA in soil samples. Three DNA extraction protocols were used (salt precipitation, Chelex® 100 resin, and Promega Kit) to identify the quantity and quality of DNA were obtained from eggs, larvae and adults of the parasite. The optimum reaction conditions of the components of the PCR (dNTP, MgCl<sub>2</sub>, primers and *Taq* polymerase) and hybridization temperature and number of cycles of the PCR were determined. The analytical sensitivity and specificity of the technique were also determined and the standardized technique was used in soil samples contaminated with parasite DNA. The best DNA extraction protocol was the Promega kit, the optimal PCR conditions were: 200 µM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µM primers, and 1 U of *Taq* polymerase and 35 cycles, at 55 °C. The sensitivity was 1 pg of DNA and the specificity was 100%. Inhibition was observed, which was reversed by adding bovine serum albumin to the reaction, achieving amplification of up to 1 pg of DNA, so that standardized PCR could be a tool useful for epidemiological studies and control programs.

**Keywords:** diagnosis – epidemiology – molecular techniques – toxocariasis – PCR – soil

## RESUMEN

La toxocariasis es producida principalmente por el parásito del perro *Toxocara canis* (Warner, 1782). El humano se infecta al ingerir los huevos eliminados en las heces del perro, por lo que es importante conocer la existencia del parásito en muestras de suelo. El objetivo de este trabajo fue estandarizar una PCR para la detección de ADN de *T. canis* en muestras de tierra. Se utilizaron tres protocolos de extracción de ADN (Precipitación salina, Resina Chelex® 100 y Estuche Promega), para identificar con cual se obtenía mejor cantidad y calidad de ADN a partir de huevos, larvas y adultos del parásito. Se determinaron las condiciones óptimas de reacción de los componentes de la PCR (dNTP, MgCl<sub>2</sub>, cebadores, y *Taq* polimerasa), así como la temperatura de hibridación y número de ciclos. Se determinó la sensibilidad y especificidad analíticas y se empleó la técnica estandarizada en muestras de tierra contaminadas con ADN del parásito. El mejor protocolo de extracción fue el Estuche de Promega, las condiciones óptimas de la PCR fueron; dNTP 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, cebadores 0,4 µM, y *Taq* polimerasa 1 U, 35 ciclos y 55 °C como temperatura de hibridación. Se obtuvo una sensibilidad de 1 pg y 100% de especificidad. Al aplicar la PCR estandarizada en las muestras de tierra contaminadas con ADN del parásito se observó inhibición, la cual fue revertida al añadir albúmina sérica bovina a la reacción, logrando amplificar hasta 1 pg de ADN, por lo que la PCR estandarizada podría ser una herramienta útil para los estudios epidemiológicos y los programas de control.

**Palabras clave:** diagnóstico – epidemiología – técnicas moleculares – toxocariasis – PCR – tierra.

## INTRODUCCIÓN

La toxocariasis humana es una zoonosis parasitaria causada por las larvas de *Toxocara canis* Warner, 1782 y *Toxocara cati* Schrank, 1788, cuyos hospedadores definitivos son el perro y el gato, respectivamente. La infección se produce debido a la ingesta de alimentos o agua contaminada con los huevos de este parásito, o por el contacto directo con la tierra contaminada con las heces de estos animales infectados. Los huevos eclosionan en el tracto intestinal y las larvas liberadas migran hacia los diferentes órganos y tejidos del cuerpo donde se forman granulomas (Moreira *et al.*, 2014; Holland, 2017).

*Toxocara canis* puede producir el Síndrome de Larva Migrans Visceral (SLMV), en el cuál las larvas liberadas en el intestino migran hasta llegar a diversos órganos como hígado, pulmones, sistema nervioso central, riñón y miocardio. Cuando las larvas llegan al globo ocular se produce el Síndrome de Larva Migrans Ocular (SLMO), en el que las larvas pueden dañar la retina y afectan la visión. Los signos y síntomas principales de la toxocariasis se caracterizan generalmente por

fiebre, leucocitosis, eosinofilia, destacando síntomas específicos según los órganos que se encuentre afectando el parásito (Fillaux & Magnaval, 2013; Macpherson, 2013).

La toxocariasis es una infección cosmopolita, endémica en la mayor parte de los países de América, África y Asia. La infección por *T. canis* en perros y en humanos tiene tasas de distribución mundial que varían de 1,3 a 99,4%, y en América Latina varían, de acuerdo a cifras publicadas, de 1,8 a 78% (Agudelo *et al.*, 1990; Acero *et al.*, 2001; Giraldo *et al.*, 2005; Chiodo *et al.*, 2006; Torres & López 2006; Espinosa *et al.*, 2008; Rivarola *et al.*, 2009; Romero-Nuñez *et al.*, 2013; Cassenote *et al.*, 2014).

Por otro lado, el suelo es muy importante en la diseminación de esta parasitosis, por lo que se han realizado estudios sobre la presencia de huevos de *Toxocara* sp, mediante técnicas parasitológicas, en plazas y parques públicos en varios países (Alonso *et al.*, 2006; Polo-Terán *et al.*, 2007; Celis-Trejo *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2014; Guarín-Patarroyo *et al.*, 2016; Astaiza-Martínez *et al.*, 2016; Melín-Coloma *et al.*, 2016).

En Venezuela no se conoce la prevalencia general de la infección, en algunos estudios en varias zonas del país, se han encontrado seroprevalencias entre el 9,7 y 66,6%, en algunas comunidades de diversos estados (Lynch *et al.*, 1988; Pifano *et al.*, 1989; García-Pedrique *et al.*, 2004; Díaz-Suárez *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2015; Devera *et al.*, 2015a; Cermeño *et al.*, 2016).

Por otro lado, mediante técnicas parasitológicas se han identificado huevos de *Toxocara* spp. en plazas y parques públicos de ciertas zonas de algunos estados, encontrándose porcentajes de infección entre 25 y 100% (Cazorla *et al.*, 2007; Devera *et al.*, 2008; Apóstol *et al.*, 2013; Devera *et al.*, 2014; Devera *et al.*, 2015b; Gallardo & Forlano, 2015; Javitt-Jiménez *et al.*, 2016).

El diagnóstico molecular utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR (por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*), permite determinar ADN del parásito en muestras de heces de perros y en suelos, y podría ser una ventaja sobre las técnicas coprológicas ya que la detección de huevos en tierra no es muy sensible, debido a huevos rotos o deteriorados y no fácilmente identificables (Fillaux & Magnaval, 2013; Moreira *et al.*, 2014). En otros países se ha utilizado la técnica de PCR para detección de ADN de *T. canis* y *T. cati* en muestras de tierra, permitiendo identificar las zonas donde está circulando el parásito; además de permitir la diferenciación del ADN de *T. canis*, del de *T. cati*, lo cual no puede hacerse por técnicas parasitológicas, ya que los huevos son indistinguibles (Fogt-Wyrwas *et al.*, 2007; Borecka & Gawor, 2008; Khademvatan *et al.*, 2014).

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue la estandarización de una técnica de PCR para detectar ADN de *T. canis* en muestras de tierra, y así disponer de una herramienta que pueda ser utilizada en estudios epidemiológicos y ayudar a los programas de control.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras biológicas

Se utilizaron muestras de huevos, larvas y adultos de *T. canis*, obtenidos por desparasitación de

cachorros (Nieves *et al.*, 2012) para la extracción de ADN. El ADN extraído se usó como control en las reacciones de estandarización, evaluación de la sensibilidad de la PCR, y en la contaminación de las muestras de tierra. Para la determinación de la especificidad de la PCR se utilizaron muestras de ADN humano, canino y de diferentes parásitos; *Ascaris lumbricoides* (Linneo, 1758), *Enterobius vermicularis* (Linneo, 1758), *Necator americanus* (Stiles, 1902), *Schistosoma mansoni* (Bilharz, 1851), *Fasciola hepatica* (Linneo, 1758) y *Taenia solium* (Bonomo, 1687). Además, se tomaron muestras de tierra de jardineras y macetas de apartamentos sin perros, ni gatos, para asegurar que no tenían la posibilidad de estar infectadas con *Toxocara* spp. A partir de allí se prepararon 6 muestras de 0,5 g cada una, a las cuales se les añadieron cantidades decrecientes de ADN del parásito, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg y 1 pg.

### Técnicas de extracción de ADN

Para la extracción de ADN a partir de huevos, larvas y adultos del parásito, se utilizaron; la técnica de precipitación salina (Sambroock & Russell, 2001), el uso de resina Chelex®100 (BioRad, USA) y el estuche comercial *Wizard® Genomic DNA purification Kit* (Promega, USA) a fin de lograr un procedimiento de extracción adecuado que permitiera la amplificación de la secuencia ITS-2 de *T. canis*.

### Protocolo de extracción de ADN por la técnica de precipitación salina

La extracción por la técnica de precipitación salina, se realizó siguiendo el protocolo descrito por Sambroock & Russell (2001). Se colocó una cantidad de huevos, larvas o adultos de aproximadamente 50 mg en un tubo de 1,5 mL. Se añadió 500 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, SDS 1%) y se mezcló. Se agregó 2,5 µL de ARNasa (10 mg/mL) y se incubó 30 min a 37 °C. Se añadió 2,5 µL de Proteinasa K (Pierce, USA) (20 mg/mL) e incubó a 55 °C por 4 h. Posteriormente, se centrifugó a 14.000 rpm por 30 min y se trasvasó el sobrenadante. Se añadió 2 volúmenes de etanol (95%) frío y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 7. Se mezcló e incubó 30 min a -20 °C. Se centrifugó a 14.000 rpm por 15 min, y se removió el etanol para luego lavar el precipitado con 1 mL de etanol al 70%. Se centrifugó a 14.000 rpm por 15 min y se removió el etanol. Se dejó secar y resuspendió el ADN en 50

$\mu\text{L}$  de agua destilada. Las muestras de ADN se mantuvieron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

#### **Protocolo para la extracción de ADN por la técnica de Chelex®100-Proteinasa K.**

La extracción usando la resina Chelex®100 (BioRad, USA), se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se colocó una cantidad, huevos, larvas o adultos de aproximadamente 50 mg en un tubo de 1,5 mL. Se añadió 500  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, SDS 1%), 200  $\mu\text{L}$  de Chelex-100® (BioRad, USA) al 5% y 2,5  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (Pierce, USA) ( $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), se mezcló e incubó por 30 min a  $60^\circ\text{C}$ . Posteriormente se incubó a  $100^\circ\text{C}$  por 10 min. Se centrifugó durante 5 min a 14.000 rpm y se separó el sobrenadante que contenía el ADN. Las muestras se mantuvieron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

#### **Protocolo para la extracción de ADN con el estuche de Promega (Wizard®Genomic DNA purification kit).**

La extracción de ADN usando el estuche Wizard®Genomic DNA purification kit (Promega, USA), se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras del parásito fueron previamente maceradas con nitrógeno líquido. Se lavó 0,5 g de material parasitario o de tierra con 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada en un tubo de 1,5 mL, y se centrifugó por 5 min a 14.000 rpm. Se colectó el sobrenadante y se evaporó el líquido en el DNA Speed Vac 120 (Savant, USA) hasta 100  $\mu\text{L}$ . Se añadió 50  $\mu\text{L}$  de solución de lisis. Se mezcló e incubó 30 min a  $60^\circ\text{C}$ . Se dejó a temperatura ambiente y se añadió 100  $\mu\text{L}$  de solución de precipitación de proteínas. Se mezcló e incubó 15 min en hielo. Luego se centrifugó durante 5 min a 14.000 rpm, se trasvasó el sobrenadante, se añadió 800  $\mu\text{L}$  de isopropanol y se mezcló e incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 5 min a 14.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se lavó con 800  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y se centrifugó durante 3 min a 14.000 rpm. Se descartó el etanol y se dejó secar completamente. Se resuspendió el ADN con 25  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

#### **Medida de la concentración, pureza e integridad del ADN**

La concentración y pureza del ADN extraído fueron determinadas por los métodos descritos por

Sambrook & Russell (2001). La concentración de ADN fue medida en un espectrofotómetro UV/Visible Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech, USA) midiendo la densidad óptica a 280 y 260 nm, usando la siguiente fórmula:  $[\text{ADN}] = A_{260\text{nm}} \times D$  (factor de dilución)  $\times 50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . El grado de pureza fue calculado mediante la relación  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  y su integridad fue evaluada por electroforesis.

#### **Electroforesis de ADN**

La electroforesis de ADN fue realizada de acuerdo con el procedimiento descrito por Sambrook & Russell (2001), en geles de agarosa al 1 %, usando el tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8) y un sistema de electroforesis horizontal MINICELL® Primo EC 320 de TDI (Thermo, USA). El voltaje usado fue de 60-100V, de acuerdo con el tamaño del gel. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las bandas de ADN fueron visualizadas con luz UV usando el sistema Gel Doc®1000 (BioRad, USA) El tamaño de las bandas de ADN fue determinado, comparándolas con las de los marcadores de ADN, de 1 Kb para el ADN genómico y de 100 pares de bases (pb) (Promega, USA) para las amplificaciones por PCR.

#### **Estandarización de la PCR para la detección de la secuencia ITS-2 de T. canis**

La PCR para la amplificación de la secuencia del espaciador intergénico 2 (ITS-2, del inglés, *Intergenic Transcribed Spacer*), del ADN ribosomal de *T. canis* fue realizada, usando muestras de ADN extraídas de huevos, larvas y adultos de *T. canis*. Las reacciones de amplificación fueron realizadas de acuerdo al protocolo descrito por Borecka & Gawor (2008), empleando los cebadores; directo, Tcan1 5' AGTATGATGGGCGCGCCAAT-3' y el reverso, NC2 5'-TAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3' (Sigma, USA), variando las concentraciones de los diferentes reactivos (dNTPs, cloruro de magnesio, cebadores y ADN polimerasa), y las condiciones de temperatura de hibridación y número de ciclos para obtener el producto de PCR esperado de 380 pb de *T. canis*. Para la estandarización de la técnica se variaron las siguientes condiciones:

Cantidad de ADN molde: Desde 100 nanogramos (ng) hasta 1 picogramo (pg). Se hizo la curva utilizando las cantidades de ADN de 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg y 1 pg.

Concentración de los diferentes reactivos:

Desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTPs) (Promega, USA) (100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, 200  $\mu$ M y 250  $\mu$ M), Cloruro de Magnesio ( $Mg_2Cl$ ) (Promega, USA) (1 mM, 1,5 mM, 2 mM y 2,5 mM), Cebadores (0,2  $\mu$ M, 0,4  $\mu$ M, 0,6  $\mu$ M y 0,8  $\mu$ M), *Taq* ADN polimerasa (Promega, USA) (0,5 U, 0,75 U, 1 U y 1,25 U).

Programa de amplificación (temperatura de hibridación y número de ciclos):

Las condiciones ensayadas fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, y 30/35/40 ciclos de los procesos de: desnaturalización (94 °C, 1 min), hibridación (50/55/60 °C, 1 min) y extensión (72° C, 1 min). Adicionalmente se realizó una extensión final a 72°C por 5 min. Se realizó la PCR en un termociclador *C1000 Thermal Cycler* (BioRad, USA), cada amplificación incluyó un control negativo libre de ADN y un control positivo (ADN del parásito). Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1 % y comparados con marcadores de tamaño molecular.

#### **Determinación de la sensibilidad analítica y la especificidad de la PCR**

La sensibilidad se determinó haciendo curvas de titulación con diferentes cantidades de ADN (100 ng a 1 pg), para observar cual es la menor cantidad de ADN que producía amplificación. La especificidad se determinó utilizando ADN humano, canino y de diferentes parásitos (*A. lumbricoides*, *E. vermicularis*, *N. americanus*, *S. mansoni*, *F. hepatica* y *T. solium*).

#### **Análisis de resultados**

Se compararon todas las condiciones ensayadas para la técnica de PCR, y se seleccionaron como óptimas, aquellas condiciones donde se observaron bandas del tamaño esperado, únicas, nítidas y con ausencia de productos secundarios a través de imágenes fotográficas de los geles.

## **RESULTADOS**

#### **Técnicas de extracción de ADN**

Se utilizaron tres protocolos para la extracción de ADN a partir de huevos, larvas y adultos del parásito. Tanto en la técnica de precipitación salina,

como de Chelex®100, se obtuvo un rendimiento bajo de ADN y un grado de pureza por debajo del rango óptimo. Con respecto a la integridad del ADN no se observaron bandas nítidas (solo un tenue “barrido”) en ninguna de las extracciones realizadas por estas técnicas con las diferentes muestras (huevos, larvas y adultos de *T. canis*). Se trató de utilizar, estas muestras de ADN para la realización de la técnica de PCR, pero no se obtuvo amplificación en ninguna de las muestras (Datos no mostrados).

Para el protocolo del estuche de Promega se realizó la maceración de las muestras del parásito con nitrógeno líquido, y se observó mayor rendimiento y pureza del ADN extraído, además de mejores resultados en integridad (Datos no mostrados). Por disponer de mayor cantidad y calidad de ADN extraído a partir de las muestras de adultos del parásito, se utilizaron muestras de ADN de adultos, extraídas por esta técnica, como controles positivos para realizar la estandarización de la PCR y la contaminación de las muestras de tierra. Por otro lado, se utilizó este protocolo para la extracción de ADN a partir de las muestras de tierra contaminadas, por ser el que proporcionó mejor cantidad y calidad de ADN.

#### **Estandarización de la Técnica de PCR**

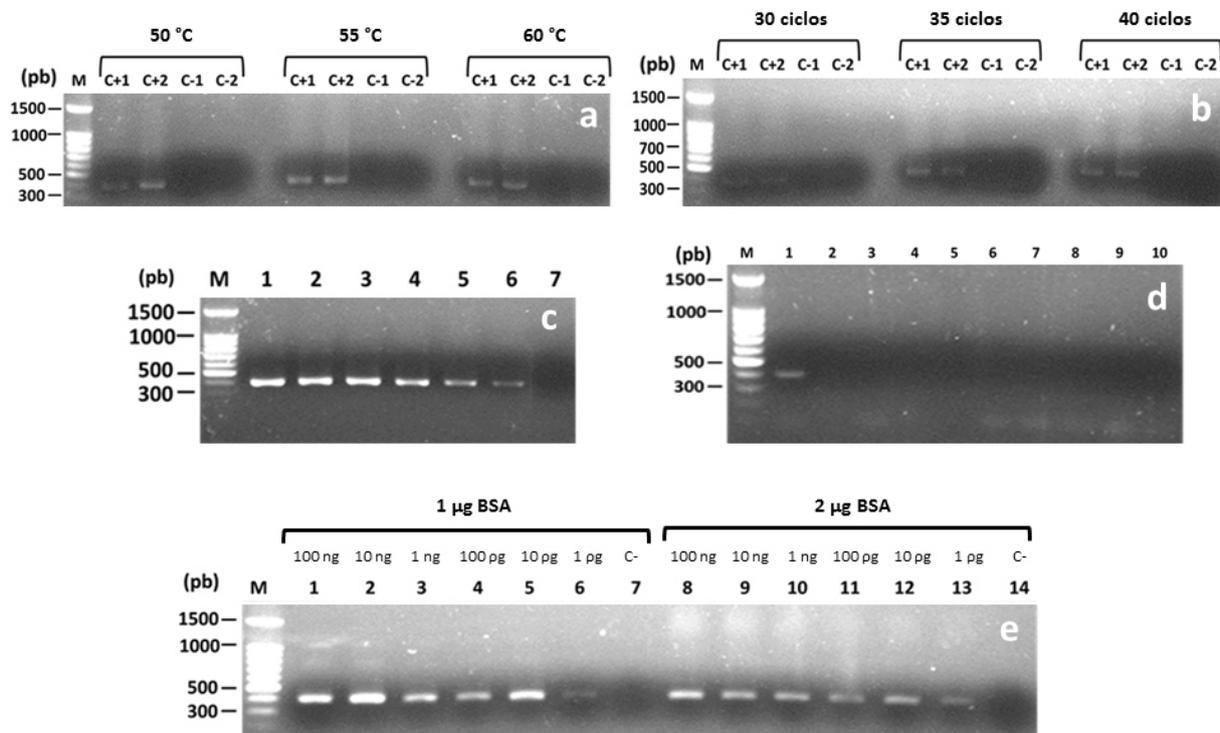
En la evaluación de los desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTPs) resultó ser la concentración óptima la de 200  $\mu$ M en la cual se observó una mejor amplificación, ya que en las otras concentraciones las bandas se observan más tenues (producto de amplificación del ADN esperado de 380 pb) (Fig. 1a). Con respecto a la concentración del cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) resultó ser la concentración óptima, 1,5  $\mu$ M (Fig. 1b). En cuanto a la concentración de los cebadores resultó la concentración adecuada para obtener una buena amplificación la de 0,4  $\mu$ M, al observarse mejores bandas de amplificación (Fig. 1c). En la evaluación de las diferentes concentraciones de la enzima *Taq* polimerasa 1U fue la concentración óptima (Fig. 1d). Por otra parte, se realizó la evaluación de la temperatura de hibridación, donde se observó que la temperatura óptima fue de 55°C ya que se obtuvo una mejor amplificación en comparación a temperaturas de 50°C y 60°C (Fig. 2a). Por último, en cuanto a la evaluación del número de ciclos se determinó que 35 ciclos, era el número de ciclos óptimo (Fig. 2b).

### Determinación de la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR estandarizada

En el gel de agarosa se logró observar que hubo amplificación de ADN en un rango de concentraciones desde 100 ng hasta 1 µg, siendo así la sensibilidad analítica de la técnica de 1 µg (Fig. 2c). Por otra parte, en cuanto a la especificidad, solo hubo amplificación en la muestra de ADN de *T. canis*, demostrando una especificidad del 100% (Fig. 2d).

### Detección de ADN de *T. canis* en muestras de tierra mediante la técnica de PCR estandarizada

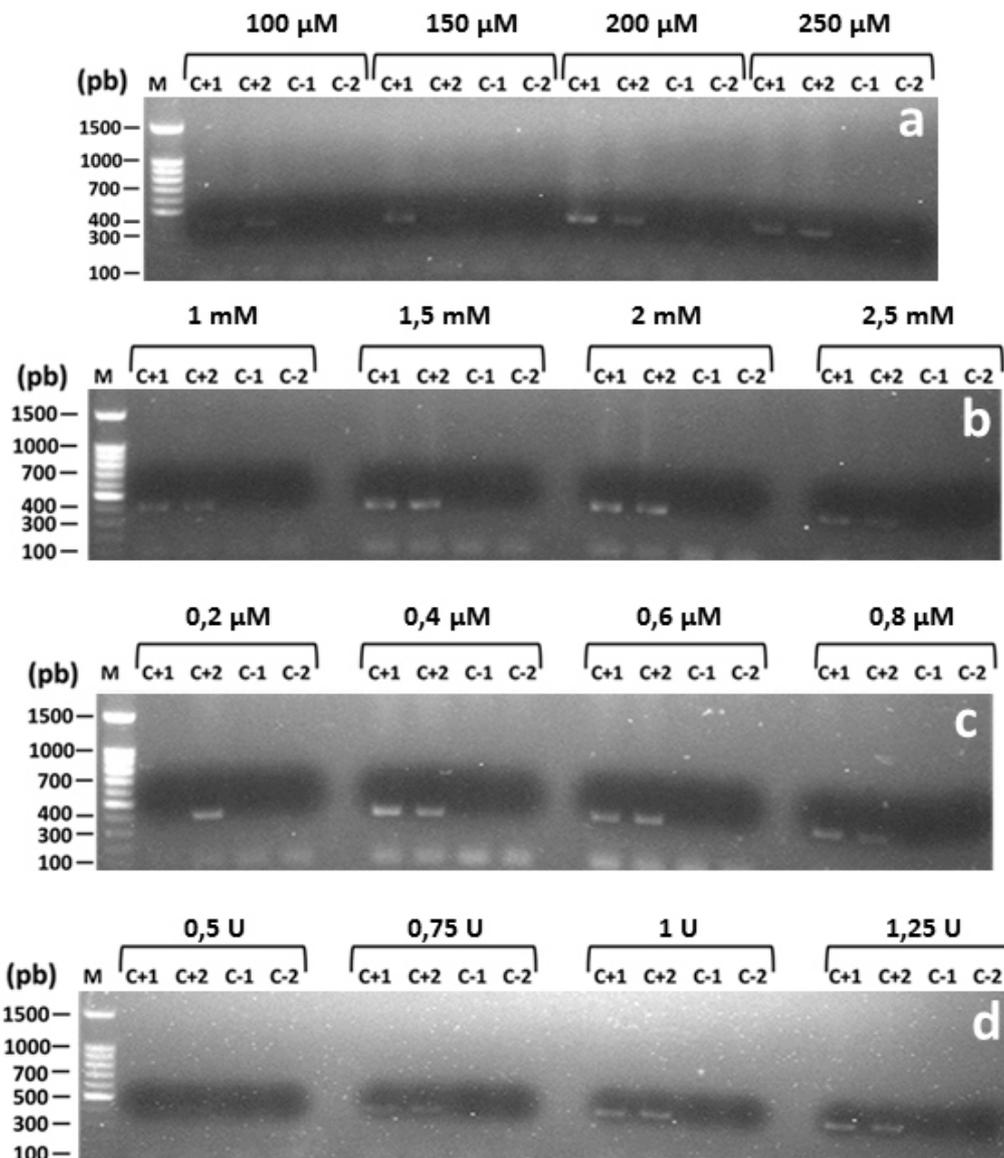
En principio, no se observó amplificación de ADN, en ninguna de las muestras de tierra contaminada con el ADN del parásito (Datos no mostrados). Se pensó que podría existir la presencia de inhibidores de la PCR en dichas muestras, por lo que se procedió a utilizar albumina de suero bovino (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) en la reacción de PCR, la cual es utilizada frecuentemente para evitar la inhibición causada por el ácido húmico presente en la tierra.



**Figura 1.** Amplificación de ADN de *T. canis* en diversas muestras. (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb plus DNA ladder, Promega. **(a)** Temperatura de hibridación **(b)** Número de ciclos. (C+1) Control positivo 1 ADN de *T. canis*. (C+2) Control positivo 2 ADN de *T. canis*. (C-1) Control negativo 1. (C-2) Control negativo 2. **(c)** Sensibilidad analítica de la técnica de PCR. **1-6:** Concentración de ADN. 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 µg, 10 µg, 1 µg, respectivamente **7** control negativo. **(d)** Especificidad de la técnica de PCR usando muestras de ADN de diferentes fuentes (1) *T. canis*, (2) *A. lumbricoides*, (3) *E. vermicularis*, (4) *N. americanus*, (5) *S. mansoni*, (6) *F. hepatica*, (7) *T. solium*, (8) Humano, (9) Canino, (10) Control negativo. **(e)** amplificación de ADN de *T. canis* de muestras de tierras contaminadas tratada con diferentes concentraciones de BSA. **1-6:** Muestras de ADN (100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 µg, 10 µg, 1 µg) tratadas con 1 µg de BSA. **7)** Control negativo. **8-13:** Muestras de ADN (100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 µg, 10 µg, 1 µg) tratadas con 2 µg de BSA. **14:** Control negativo.

Se repitió el ensayo agregando diferentes cantidades de BSA al ADN extraído (1 µg BSA y 2 µg BSA) obteniendo una buena amplificación en todas las muestras para ambos casos, pero bandas más definidas con concentración de BSA de 1 µg,

pudiendo así amplificar hasta 1pg del ADN extraído de estas muestras de tierra contaminadas, logrando obtener el producto de PCR esperado de 380 pb de *T. canis* en dichas muestras (Fig. 2e).



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación de ADN de *T. canis* en muestras controles, variando las concentraciones de los diferentes reactivos. (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb plus DNA ladder, Promega. (a) dNTPs, (b) MgCl<sub>2</sub>, (c) Cebadores, (d) *Taq* polimerasa. (C+1) Control positivo 1 ADN de *T. canis*. (C+2) Control positivo 2 ADN de *T. canis*. (C-1) Control negativo 1. (C-2) Control negativo 2.

## DISCUSIÓN

El aislamiento de ADN de alta calidad es esencial para la técnica de PCR y en esta se requiere una previa estandarización, adaptación y evaluación de las condiciones de reacción para su uso en cada laboratorio. A nivel internacional, se ha empleado la técnica de PCR para determinar ADN de *T. canis* en muestras de tierra, por ofrecer alta sensibilidad y especificidad, además de ser un marcador de endemicidad al determinar las áreas donde está circulando el parásito (Fogt-Wyrwas *et al.*, 2007; Borecka & Gawor, 2008; Khademvatan *et al.*, 2014).

En cuanto a las extracciones de ADN a partir de huevos, larvas y adultos de *T. canis* mediante la técnica de precipitación salina y la técnica de extracción Chelex®100 (BioRad) ninguna de las dos técnicas mostró los resultados deseados, ya que se observaba, poco rendimiento, baja pureza y degradación del ADN, lo que no permitió la amplificación de la banda diagnóstica. Mientras que al utilizar el estuche comercial de Promega el rendimiento, la pureza y la integridad resultaron mejores, permitiendo la amplificación del ADN del parásito. Esta diferencia quizás se deba, al paso previo (recomendado en el estuche comercial) de trituración del material parasitario en nitrógeno líquido que permite una mejor extracción de ADN de la muestra. Sería recomendable emplear este paso previo en los otros protocolos de extracción ensayados, ya que el uso de estuches comerciales tiene como desventaja que son de mayor costo. En la mayoría de los trabajos publicados se utilizaron estuches comerciales para la extracción de ADN y no refieren tener problemas con el ADN obtenido (Fogt-Wyrwas *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Borecka & Gawor, 2008; Mikaeili *et al.*, 2013; Khademvatan *et al.*, 2014).

Con todas las muestras de ADN extraídas por los diferentes protocolos se realizó la técnica de PCR bajo las condiciones de Borecka & Gawor (2008).

Sin embargo, solo se logró obtener amplificación, con el ADN obtenido por el estuche de Promega, por lo que fue el que se utilizó para el resto del trabajo.

En la estandarización de la técnica de PCR, se

variaron las concentraciones de los diferentes reactivos, temperaturas de hibridación y números de ciclos, ya que las condiciones de reacción, marcas de los reactivos y equipos varían en cada laboratorio (Fogt-Wyrwas *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Borecka & Gawor, 2008; Mikaeili *et al.*, 2013; Khademvatan *et al.*, 2014).

En cuanto a la concentración de dNTPs se encontró como óptima 200  $\mu$ M que se corresponde con la utilizada por Fogt-Wyrwas *et al.* (2007) y Mikaeili *et al.* (2013), mientras que la empleada por Li *et al.* (2007), Borecka & Gawor (2008) y Khademvatan *et al.* (2013) fue de 250  $\mu$ M, siendo una concentración mayor que la utilizada en el trabajo realizado.

La concentración de MgCl<sub>2</sub> óptima determinada fue de 1,5 mM, la misma utilizada por Fogt-Wyrwas *et al.* (2007), Mikaeili *et al.* (2013), mientras que Li *et al.* (2007), Borecka & Gawor, (2008) y Khademvatan *et al.* (2013) fue de 3 mM, mayor a la determinada en el presente trabajo.

Por otra parte, la concentración de *Taq* polimerasa utilizadas por Li *et al.* (2007), Borecka & Gawor, (2008) y Khademvatan *et al.* (2013) fue de 2 U, mientras que Mikaeili *et al.* (2013) utilizaron 1,25 U siendo concentraciones mayores a las utilizadas por Fogt-Wyrwas *et al.* (2007) y la técnica estandarizada en el presente trabajo que fue de 1 U.

En cuanto a la concentración de cebadores en nuestro trabajo se obtuvo como óptima 0,4  $\mu$ M, menor que la empleada por Fogt-Wyrwas *et al.* (2007) (1  $\mu$ M), Li *et al.* (2007) y Borecka & Gawor, (2008) (2  $\mu$ M), Mikaeili *et al.* (2013) (2,5  $\mu$ M), y Khademvatan *et al.* (2013) (10  $\mu$ M).

En general todas las concentraciones óptimas de los diferentes componentes de la PCR fueron similares o menores que las empleadas en los otros trabajos descritos lo que permite un ahorro de reactivos disminuyendo el costo de la técnica.

En el caso de la temperaturas de hibridación utilizada por Khademvatan *et al.* (2013) fue de 58 °C, a diferencia de la técnica estandarizada en donde se utilizó 55 °C. Por otro lado, con respecto al número de ciclos se encontró que no hubo variación entre los utilizados por Li *et al.* (2007), Khademvatan *et al.* (2013) y Mikaeili *et al.* (2013)

y el empleado en nuestro trabajo el cual fue de 35 ciclos. Mientras que Borecka & Gawor (2008) y Fogt-Wyrwas *et al.* (2007) utilizaron 30 ciclos.

En la amplificación de ADN de *T. canis*, se obtuvo un rango de amplificación que va desde 100 ng (nanogramos) hasta 1 µg (picogramo), indicando que la mínima cantidad de ADN que se amplifica mediante la técnica de PCR es de 1 µg, lo que significa que la técnica posee una alta sensibilidad.

Así mismo, al amplificar ADN de *T. canis* extraído de muestras de tierra se mantiene la sensibilidad analítica de 1 µg. En el trabajo realizado por Li *et al.* (2007), se obtuvo una sensibilidad de 100 ng. Además, en los trabajos realizados por Borecka & Gawor (2008) y Khademvatan *et al.* (2013), la sensibilidad fue de 10 ng. Comparando estos resultados los cuales tienen una sensibilidad entre 10 – 100 ng, con la sensibilidad establecida en el trabajo realizado, que fue de 1 µg, se observa que la técnica de PCR estandarizada en el presente trabajo es de 10.000 a 100.000 veces más sensible. Cabe destacar que un huevo de *T. canis* posee aproximadamente 10 µg de ADN (Maizels *et al.*, 2007) por lo que la técnica estandarizada estaría en la capacidad de detectar el equivalente a la décima parte de un huevo del parásito, obteniendo una mejor sensibilidad que la establecida en el estudio de Fogt-Wyrwas *et al.* (2007), que era capaz de detectar el equivalente a un huevo del parásito.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo también demuestran que la técnica de PCR para la amplificación de ADN de *T. canis*, es específica, al no amplificar ADN de otros parásitos ni ADN canino o humano al igual que lo demostrado por otros investigadores (Fogt-Wyrwas *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Borecka & Gawor, 2008; Mikaeili *et al.*, 2013; Khademvatan *et al.*, 2014).

Al utilizar muestras de tierra contaminadas con ADN del parásito, en principio, no se observó amplificación, quizás debido a la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras de tierra.

Según estudios, el principal inhibidor presente en la tierra es una mezcla de polifenoles complejos producidos durante la descomposición de la materia orgánica conocidos como ácido húmico, que actúa formando complejos con iones de hierro, calcio y magnesio, lo que significa que podrían

quelar los iones de magnesio necesarios para el funcionamiento de la *Taq* polimerasa (Kreader, 1996; Garland *et al.*, 2010; Sidstedt *et al.*, 2015). Se ha demostrado que al incluir en la mezcla de PCR, BSA se revierte la inhibición (Kreader, 1996; Garland *et al.*, 2010). Al emplear BSA en las reacciones de PCR se observó amplificación en todos los casos, revertiendo de esta manera la inhibición. Cabe destacar que el hecho de que las bandas de algunas de las muestras tratadas con 1 µg de BSA no se observen de manera decreciente podría corresponderse al hecho de que las extracciones de ADN fueron realizadas a partir de diferentes muestras de tierra y en cada una de ellas puede haber diferentes concentraciones de ácido húmico.

Hasta la fecha no se tienen reportes publicados del uso de la PCR para la detección de ADN de *T. canis* en muestras de tierra en Latinoamérica, solo hay un trabajo realizado en Colombia, donde se aislaron los huevos del parásito de las muestras de tierra de un parque público (por técnicas parasitológicas) y a partir de estos huevos se realizó la extracción de ADN y la PCR para identificar *T. canis* (Mendoza-Meza *et al.*, 2015). Aplicado la técnica de PCR directamente a las muestras de tierra se podría obtener una mayor sensibilidad, ya que se puede identificar no solo huevos intactos, si no también trazas de ADN libre, debido a huevos rotos o deteriorados en la tierra, además del correspondiente ahorro de tiempo y recursos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la PCR estandarizada es altamente sensible y específica y puede ser usada para la amplificación de ADN de *T. canis* en muestras de tierra, lo cual pudiese ser útil para estudios epidemiológicos y para los programas de control.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los Proyectos DIPISA-PG-2017-004 y DIPISA-PG-2017-005, Universidad de Carabobo, Venezuela.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aceró, M, Muñoz, M, Flórez, A & Nicholls, R. 2001. *Seroprevalencia de anticuerpos contra Toxocara canis y factores de riesgo en niños, Ciudad Bolívar, Bogotá*. Biomédica, vol. 21, pp. 256-263.
- Agudelo, C, Villareal, E, Cáceres, E, López, C, Eljach, J, Ramírez, N, Hernández C & Corredor, A. 1990. *Human and dogs Toxocara canis infection in a poor neighborhood in Bogota*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 85, pp. 75-78.
- Alonso, JM, Luna, AC, Fernández, GJ, Bojanich, MV & Alonso, ME. 2006. *Huevos de Toxocara en suelos destinados a la recreación en una ciudad argentina*. Acta de Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 40, pp. 219-222.
- Apóstol, P, Pasceri, P & Javitt, M. 2013. *Detección de huevos de Toxocara sp. en suelos de tres parques públicos de la zona este de Barquisimeto, estado Lara*. Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del edo. Lara, vol. 5, pp. 38-44.
- Astaiza-Martínez, JM, Benavides-Melo, CJ, Chaves-Velásquez, CA, Vallejo-Tomarán, DA & Trejo-Escobar, JG. 2016. *Contaminación de los suelos con huevos de Toxocara spp. en parques públicos y zonas verdes de la ciudad de Ipiales, Nariño, Colombia*. Revista Investigación Pecuaria, vol. 4, pp. 31-35.
- Borecka, A & Gawor, W. 2008. *Modification of gDNA extraction from soil for PCR designed for the routine examination of soil samples contaminated with Toxocara spp. eggs*. Journal of Helminthology, vol. 82, pp. 119-122.
- Cassenote, AJ, Lima, AR, Pinto, JM & Rubinsky-Elefant, G. 2014. *Seroprevalence and modifiable risk factors for Toxocara spp. in Brazilian school children*. PLoS Neglected Tropical Disease, vol. 8, pp. e2830.
- Cazorla, D, Morales, P & Acosta ME. 2007. *Contaminación de suelos con huevos de Toxocara spp. (Nematoda, Ascaridida) en parques públicos de la ciudad de Coro, estado Falcón, Venezuela*. Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, vol. 17, pp. 117-122.
- Celis-Trejo, CA, Romero-Núñez, C, García-Contreras, A & Mendoza-Barrera, GE. 2012. *Soil contamination by Toxocara spp. Eggs in a University in Mexico City*. Revista Brasileira de Parasitología Veterinaria, vol. 21, pp. 298-300.
- Cermeño, J, Houda, S, Salvador, N & Salaverria, C. 2016. *Seroprevalencia y factores de riesgo asociados con la Infección por Toxocara canis en la población de La Laguna, estado Anzoátegui, Venezuela*. Saber, vol. 28, pp. 62-72.
- Chiodo, P, Basualdo, J, Carmela, L, Pezzani, B, Apezteguía, M & Minvielle, M. 2006. *Related factors to human toxocariasis in a rural community of Argentina*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 101, pp. 397-400.
- Devera, R, Blanco, Y, Hernández, H & Simoes, D. 2008. *Toxocara y otros helmintos en plazas y parques de Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, vol. 26, pp. 23-26.
- Devera, R, Pérez, Z, Yáñez, Y, Blanco, Y, Amaya, I & Tutaya, R. 2014. *Toxocara sp. y otros helmintos en muestras de suelo y heces de perros procedentes de la Escuela de Ciencias de la Salud, UDO-Bolívar, Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela*. Vitae Academia Biomédica Digital, vol. 59, pp. 1-10.
- Devera, R, Blanco, Y, Amaya, I, Resuena, I, Tutaya, R, González, A, Nastasi-Miranda, J, Lizardi, Y, Madrid, M, Rivero, Y, Rodríguez, J, Cárdenas, J, Carvallo, C, Wells, R, Sherman, R, Pavón, C & Rivas, E. 2015a. *Infección por Toxocara canis: seroepidemiología en escolares de Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela*. Saber, vol. 27, pp. 537-546.
- Devera, R, Tutaya, R & Devera-Velásquez, R. 2015b. *Aislamiento de huevos y larvas de Toxocara spp. y otros geohelminthos en suelos de parques de un colegio de Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela*. Saber, vol. 27, pp. 341-346.
- Díaz-Suárez, O, García, M, Meléndez, F & Estévez, J. 2010. *Seroepidemiología de la toxocariasis en una comunidad indígena Yucpa de la Sierra de Perijá al occidente de*

- Venezuela. *Kasmera*, vol. 38, pp. 138-146.
- Espinoza, YA, Huapaya, PH, Roldán, WH, Jiménez, S, Arce, Z & López, E. 2008. *Clinical and serological evidence of Toxocara infection in school children from Morrope district, Lambayeque, Peru*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, vol. 50, pp. 101-105.
- Fillaux, J & Magnaval, JF. 2013. *Laboratory diagnosis of human toxocarasis*. *Veterinary Parasitology*, vol. 193, pp. 327-336.
- Fogt-Wyrwas, R, Jarosz, W & Mizgajska-Wiktor, H. 2007. *Utilizing a polymerase chain reaction method for the detection of Toxocara canis and T. cati eggs in soil*. *Journal of Helminthology*, vol. 81, pp. 75-78.
- Gallardo, J & Forlano, M. 2015. *Diagnóstico de huevos de Toxocara spp. del suelo en parques y plazas públicas de la ciudad de Barquisimeto, estado Lara, Venezuela*. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, vol. 20, pp. 4-9.
- García-Predique, ME, Díaz-Suárez, O, Estévez, J, Cheng-Ng, R, Araujo-Fernández, M & Castellano, J. 2004. *Prevalencia de infección por Toxocara en pre-escolares de una comunidad educativa de El Moján, estado Zulia, Venezuela*. *Investigación Clínica*, vol. 45, pp. 347-354.
- Garland, S, Baker, A, Phillott, AD & Skerratt, LF. 2010. *BSA reduces inhibition in a TaqMan assay for the detection of Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms*, vol. 92, pp. 113-116.
- Giraldo, MI, García, NL & Castaño, JC. 2005. *Prevalence of intestinal helminths in dogs from Quindío Province*. *Biomédica*, vol. 25, pp. 346-352.
- Guarín-Patarroyo, CE, Serrato, MJ & Sánchez-Cuervo, FR. 2016. *Determinación de huevos de Toxocara canis en suelo de tres parques públicos de Duitama (Boyacá)*. *Revista Ciencia y Agricultura*, vol. 13, pp. 59-66.
- Javitt-Jiménez, M, Cárdenas, E & Trujillo, N. 2016. *Detección de huevos de Toxocara sp. en suelos de las plazas y parques públicos de la zona centro de Barquisimeto, estado Lara*. *Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del edo. Lara*, vol. 11, pp. 38-47.
- Khademvatan, S, Abdizadeh, R & Tafalla, M. 2014. *Molecular characterization of Toxocara spp. from soil of public areas in Ahvaz southwestern Iran*. *Acta Tropica*, vol. 135, pp. 50-54.
- Kreader, CA. 1996. *Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein*. *Apply and Environmental Microbiology*, vol. 62, pp. 1102-1106.
- Holland, CV. 2017. *Knowledge gaps in the epidemiology of Toxocara: the enigma remains*. *Parasitology*, vol. 144, pp. 81-94.
- Li, MW, Line, RQ, Chen, HH, Sani, RA, Song, HQ & Zhu, XQ. 2007. *PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats*. *Molecular and Cellular Probes*, vol. 21, pp. 349-354.
- Lynch, N, Eddy, K, Hogden, A, López, R & Turner, K. 1988. *Seroprevalence of Toxocara canis in tropical Venezuela*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 82, pp. 275-281.
- Macpherson, CN. 2013. *The epidemiology and public health importance of toxocarasis: a zoonosis of global importance*. *International Journal for Parasitology*, vol. 43, pp. 999-1008.
- Maizels, RM, Schabussova, I, Callister, DM & Nicoll, G. 2006. *Molecular biology and immunology of Toxocara canis*. In: Holland CV, Smith HV, editors. *Toxocara: the enigmatic parasite*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 3-17.
- Martínez, M, García, H, Figueras, L, González, V, Lamas, F, López, K, Mijares, V, Corrales, Y, Lares, M & Ferrer, E. 2015. *Seroprevalence and risk factors of toxocarasis in preschool children in Aragua state, Venezuela*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 109, pp. 579-588.
- Melín-Coloma, M, Villaguala-Pacheco, C, Lisboa-Navarro, R & Landaeta-Aqueveque, C. 2016. *Estudio de la presencia de huevos de Toxocara sp. en suelos de áreas públicas de la ciudad de Chillán, Chile*. *Revista Chilena de Infectología*, vol. 33, pp. 428-432.
- Mendoza-Meza, DL & Maldonado Santana, H. 2015. *Optimización de una metodología para el aislamiento y detección molecular*

- de huevos de Toxocara canis en muestras de suelo.* Revista de Ciencias, vol. 19, pp. 41-51.
- Mikaeili, F, Kira, EB, Sharbatkhori, M, Sharifdini, M, Jalalizand, N, Heidari, Z, Zarei, Z, Stensvold CR & Mirhendi, H. 2013. *Comparison of six simple methods for extracting ribosomal and mitochondrial DNA from Toxocara and Toxascaris nematodes.* Experimental Parasitology, vol. 134, pp. 155-159.
- Moreira, GM, Telmo, PdeL, Mendonça, M, Moreira, AN, McBride, AJ, Scaini, CJ & Conceição, FR. 2014. *Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions.* Trends in Parasitology, vol. 30, pp. 456-464.
- Nieves, A, Ortega, B, Martínez, M, Castejón, O, Lares, M & Ferrer, E. 2012. *Estandarización de la técnica ELISA para el diagnóstico inmunológico de Toxocariasis humana.* Boletín de Malariología y Salud Ambiental, vol. 52, pp. 39-50.
- Pifano, F, Orihuela, R, Delgado, O, Cortez, R, Abdul-Hadi, S, Dale, M & Garmendia de García J. 1989. *La Toxocariasis humana en Venezuela, especialmente en el Valle de Caracas.* Gaceta Médica de Caracas, vol. 97, pp. 31-41.
- Polo-Terán, L, Cortés-Vecino, J, Villamil-Jiménez, L & Prieto, E. 2007. *Contaminación de los parques públicos de la localidad de Suba, Bogotá con nematodos zoonóticos.* Revista de Salud Pública, vol. 9, pp. 550-557.
- Ramírez, J, Falcón, N & Serrano E. 2014. *Contaminación de suelos con huevos de Toxocara sp. en ambientes internos de Instituciones Educativas Estatales de los distritos del cono Norte de Lima.* Salud y Tecnología Veterinaria, vol. 2, pp. 78-82.
- Rivarola, M, Vuyk, I, Riveros, M, Canese, A & Micó, VG. 2009. *Toxocara canis in rural pediatric populations.* Pediatría, vol. 36, pp. 118-122.
- Romero-Núñez, C, Mendoza Martínez, GD, Yañez Arteaga, S, Ponce Macotela, M, Bustamante Montes, P & Ramírez Durán, N. 2013. *Prevalence and risk factors associated with Toxocara canis infection in children.* Scientific World Journal, vol. 9, pp. 572089.
- Sambrook, J & Russel, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* (3ra ed.). United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sidstedt, M, Jansson, L, Nilsson, E, Noppa, L, Forman, M, Rådström, P & Herman, J. 2015. *Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction.* Analytical Biochemistry, vol. 487, pp. 30-37.
- Torres, H & López, C. 2006. *Environmental exposure to toxocariasis as a factor associated with asthma in children of school age.* Anales de Investigación Médica, vol. 5 pp. 67-74.

Received January 3, 2018.  
Accepted February 5, 2018.