

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL

**IMPLEMENTACIÓN Y PRUEBA DE UN MÉTODO PARA OBTENER HUEVOS
DE *Toxocara canis* EN MUESTRAS DE TIERRA.**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO
DE MÉDICO VETERINARIO.

CLAUDIA ANDREA CONCHA YAÑEZ

VALDIVIA – CHILE

2005

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Gerold Sievers P.

Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dra. Carolina Gallardo M.

Nombre

Firma

Dr. Ricardo Vidal M.

Nombre

Firma

FECHA DE APROBACIÓN: 28 DE DICIEMBRE 2005.

...a mis Padres Diva y Ricardo, a mi
hermana y a Toto...

ÍNDICE

	Capítulo	Página
1.	RESUMEN.....	1
2.	SUMMARY.....	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
5.	RESULTADOS.....	12
6.	DISCUSIÓN.....	17
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	20
8.	ANEXOS.....	25
9.	AGRADECIMIENTOS.....	27

1. RESUMEN

Con el fin de implementar un método para obtener huevos de *Toxocara canis* de muestras de tierra en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad Austral de Chile, se adaptó, probó y mejoró el método descrito por Horn y col (1990) preparando 160 muestras de 25 g de tierra tipo "Trumao" a las que se agregó $354,4 \pm 61$ huevos de *T. canis* contenidos en 0,1 ml de suspensión acuosa.

En el proceso de adaptación del método a las condiciones locales, fue necesario probar tres variables realizando 20 repeticiones de las siguientes combinaciones: 1. Tipo de detergente adicionado: aniónico ácido (pH 4,6), o aniónico básico (pH 11,5). 2. Tipo de solución de flotación utilizada: de azúcar (densidad: 1,25), o sulfato de zinc (densidad: 1,38). 3. Con o sin homogenización mecánica de la muestra previa al proceso de flotación. El mejor resultado, de un promedio de 50,9% de recuperación de los huevos agregados a muestras de 25 g de tierra de tipo "Trumao" se obtuvo con la adición de detergente aniónico ácido, la utilización de una solución saturada de sulfato de zinc para la flotación de los huevos y la homogenización de las muestras antes de cada proceso de flotación. Se puede concluir que con las modificaciones realizadas al método de Horn y col (1990) se aumentó su sensibilidad y es posible recuperar regular y cuantitativamente huevos de *T. canis* de muestras de suelo de tipo Trumao.

Palabras claves: *Toxocara canis*, huevos, tierra, método flotación.

2. SUMMARY

IMPLEMENTATION AND TEST OF A METHOD TO OBTAIN *Toxocara canis* EGGS IN SOIL SAMPLES.

With the purpose of implementing a method to obtain *Toxocara canis* eggs of soil samples in the Laboratory of Veterinary Parasitology of the Austral University of Chile, one adapted, it proved and it improved the method described by Horn and col (1990) preparing 160 samples by 25g of soil type "Trumao" to which one added 354.4 ± 61 eggs of *T. canis* contained in 0, 1 mililiter of watery suspension.

In the process of adaptation of the method to the local conditions, it was necessary to prove three variables making 20 repetitions of the following combinations: 1. Type of added detergent: acid anionic (pH 4.6), or basic anionic (pH 11.5). 2. Type of solution of used flotation: of sugar (density: 1, 25), or zinc sulphate (density: 1, 38). 3. With or without mechanical mixing of the sample previous to the flotation process. The best result, of an average of 50.9% of recovery of added eggs from 25g of soil type "Trumao" it was obtained with the addition of acid anionic detergent to the samples, the use of a zinc sulphate solution saturated for the flotation of eggs and mixing the samples before each process of flotation. It is possible to be concluded that with the modifications made to the method of Horn y col (1990) its sensitivity was increased and it is possible to recover to regulate and quantitatively *T. canis* eggs from ground samples of Trumao type.

Key words: *Toxocara canis*, eggs, soil, flotation method.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ANTECEDENTES GENERALES

Toxocara canis es uno de los parásitos más frecuentes de encontrar en los cánidos de todo el mundo (Boch y Supperer 1992). Los parásitos adultos se encuentran en gran número en el intestino delgado de los cachorros hasta los seis meses de edad y sólo esporádicamente y en bajo número en el intestino delgado de algunos perros mayores de un año (Soulsby 1987). Esto se debe a que *T. canis* infecta a los fetos por vía trasplacentaria antes de nacer y luego a los neonatos por vía lactogénica durante sus primeros dos meses de vida (Schantz y Glickman 1983, Acha y Szyfres 1986, Schantz y Steher-Green 1988). Posteriormente los perros se infectan a partir de huevos larvados del parásito existentes en el medio externo y, en la medida que cada individuo hace reiteradas experiencias con el parásito, desarrollan una inmunidad que impide al parásito realizar el ciclo hígato-pulmonar y volver al intestino delgado para formar los parásitos adultos. De esa forma quedan como larvas inhibidas en los tejidos de todos los perros de ambos sexos y todas las edades, y las hembras pasan a ser la primera y principal fuente de infección de sus cachorros (Soulsby 1987).

El problema lo representan los huevos larvados de *T. canis* en el medio externo ya que son la fuente de infección para los cachorros, los perros adultos, otros animales y también para el ser humano. En este último *T. canis* representa un serio peligro cuando consume involuntariamente huevos larvados (infectantes) del parásito. Las larvas que se liberan en el estómago traspasan activamente la pared intestinal y, por vía hemática, pueden ubicarse y enquistarse en los más diversos órganos produciendo el síndrome conocido como “*larva migrans visceralis*”. El síndrome es especialmente grave cuando las larvas invaden el cerebro y los ojos, causando graves trastornos nerviosos o de visión (Kayes 1997).

Los huevos de *T. canis* son esféricos levemente ovalados de 75-90 μm , de cáscara gruesa, rugosa y con un componente lipídico que les permite adherirse fuertemente a cualquier elemento. Inicialmente presentan en su interior una célula única que se desarrolla a una larva en un tiempo de 10 a 15 días (Glickman y Schantz 1981). Concluido el desarrollo de dicha larva, el huevo tiene la capacidad de infectar conservando su poder infectante en el suelo por 7 a 12 años. Estos huevos constituyen la fuente de infección para los hospederos definitivos y paraténicos entre los cuales se encuentra el ser humano (Schulz y Kroeger 1992), los mismos autores señalan que es importante el hecho que huevos de geohelminthos como *Toxocara canis* evolucionan a estado infectante en la superficie del suelo, no más allá de los 10 centímetros de profundidad. En cuanto a la resistencia de los huevos larvados de *T. canis*, también Liebmann (1970) indica que sólo después de 10 minutos a 100° C es posible alterar la fertilidad de 100% de los huevos. Enig (1979), observa a su vez, que a 35° C y con cierto grado de humedad, los huevos no alteran su fertilidad durante varios meses e incluso años. Esto se debería principalmente a que las proteínas de la cáscara, que protegen al huevo de las condiciones climáticas, recién se alteran a los 55° C producto de la coagulación. El mismo autor observa la sobrevivencia

de huevos de *T. canis* a temperaturas de -10°C durante 8 meses. Las radiaciones de onda corta como la ultravioleta tienen una efectiva acción ovicida. Es así, que la radiación de $254\ \mu\text{m}$ es capaz de dañar en un 100% la fertilidad de huevos de parásitos. En cuanto a las sustancias químicas probadas, el fenol en una concentración de un 20% durante 20 segundos daña en un 100% la fertilidad de los huevos de *T. canis*. Van Knapen y col (1979), estudian la manera de eliminar los huevos de parásitos de piletas de arena destinadas al juego infantil y aseguran que con aire caliente a una temperatura de 160°C y una presión de 10 atmósferas durante una hora, es posible eliminar todas las formas infectantes nocivas para el hombre.

La importancia de esta infección en humanos ha aumentado en los últimos años debido al incremento del número de perros que son mantenidos como mascotas, y por la disminución del espacio físico en que éstas son mantenidas, lo que aumenta el contacto mascota - amo (Barriga 1991). En Estados Unidos de América se comprobó que un 7% de personas clínicamente sanas presentaban anticuerpos contra éste nemátodo. En Santiago de Chile se realizó un estudio serológico sobre la infección por *Toxocara spp.* en una población humana adulta, presuntamente sana, el cual se encontró una positividad del 8,3% (Herskovic y Astorga 1985). En Valdivia, 3,9% de los donantes de sangre de la ciudad y 12,1% de los donantes provenientes de otras localidades de la provincia de Valdivia, mostraron anticuerpos anti-*Toxocara* (Navarrete y Rojas 1998). Ésto sugiere que la infección puede estar ampliamente distribuida en el país y que tiene una importancia creciente e insospechada (Herskovic y Astorga 1985). Por la gran presencia de perros con sus endoparásitos que pueden ser patógenos para el hombre, cabe preguntarse, cuán grave es la contaminación de sitios públicos (parques, plazas y calles), ya que en la mayoría de los países desarrollados los perros son sacados a las vías públicas para que puedan defecar (Chieffi y Müller 1978). En esos lugares la posibilidad de infección tanto para los perros como para los niños se ve acrecentada y son muchos los trabajos que demuestran la presencia de huevos de *Toxocara* en muestras de tierra.

En Inglaterra se demostró la presencia de huevos de *T. canis* en un 24,4% de 800 muestras de tierra de parques públicos (Borg y Woodruff 1973). También en Inglaterra, Pegg (1975) examinó 5200 muestras de tierra de parques públicos encontrando huevos de *Toxocara* en un 5,2% de las muestras. En Canadá, Viens (1977), determina la presencia de huevos de *Toxocara* en un 18% de las "piletas de arena" de los parques de Montreal. En Estados Unidos de América, Dada y Lindquist (1979) comparan la contaminación con huevos de *Toxocara* de áreas verdes de escuelas, parques, lugares de descanso en las carreteras y plazas de juego, encontrando que la mayor contaminación se encontraba en las piletas de arena con un 15% de muestras positivas. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Dubin y col (1975) que también trabajaron sitios públicos del mismo país. Barriga 1988 confirma que 0,3 a 15% de muestras de tierra de sitios públicos y que 7 a 31% de jardines y piletas de arena, contienen huevos de *Toxocara*. En Munich, Alemania se determinó la presencia de huevos de *Toxocara* en 14% de muestras de tierra de los parques de la ciudad y en sólo 4% de las calles y estacionamientos; además se observó huevos de *Toxocara* en un 42% de muestras de tierra que, a simple vista, no presentaban evidencias de contener materia fecal (Deumer 1984). En Praga se determinó que un 21,2% de las muestras de la ciudad estaban positivas a *T. canis* y que el 2,2% en piletas de arena también lo estaban (Bozdech 1981).

También son numerosos los estudios de análisis de la materia fecal de perros halladas en los lugares públicos y la presencia de huevos de *T. canis*: En Alemania, se encontró que el 34% de los sitios destinados al juego infantil estaban contaminados con materia fecal de caninos, pero que sólo muy pocas muestras fecales contenían huevos de *T. canis* pero otras especies parasitarias estaban presentes (Schaffert 1978). En Chile, Castillo y col (2000), estudiaron un total de 84 plazas y 12 parques públicos de la ciudad de Santiago de Chile; se recolectaron y analizaron 288 muestras fecales de perro y demostraron la presencia de huevos de *T. canis* en un 13,5% de las muestras. Ello coincide en gran medida con las prevalencias del parásito en los perros de Santiago, de 25% (Tagle 1962, Arias 1974), y de 23,18% (Alcaíno y Tagle 1970). En Valdivia los porcentajes de materia fecal positiva a *T. canis* de perros urbanos fueron de un 10,7 % (Leyán 1978, Oberg y col 1979, Martin 1980), un 13,5 % (Torres y col 1974) y un 16,6 % (Linfati 1979); en tanto que en los perros de las poblaciones ribereñas de la cuenca del río Valdivia se encontró una prevalencia de un 19% positivo a *T. canis* (Torres y col 1995). Valores que según Lámina (1974), estarían por sobre el 7% crítico, en el cual la salud humana se vería afectada. Por otra parte, Ernst y col (1987), en un estudio realizado en perros de ambos sexos y de diversas razas y edades, determinaron que los perros mestizos menores de un año tienen el mayor riesgo de infectarse con *T. canis*, contribuyendo a su vez, a la contaminación del suelo. Docmac (1981) en un estudio de fichas clínicas, encuentra un 73,8% de infección en perros menores de un año de edad.

Los estudios de la contaminación parasitaria del suelo se deben considerar como los indicadores más directos del riesgo de infestación al que están expuestos los residentes humanos de un lugar o región (Uga y col 1997). Barriga (1991) estima que, en promedio un perro elimina 136 g de materia fecal al día y que los 80 millones de perros que habitan en Estados Unidos eliminan 1300 toneladas métricas de materia fecal. Asumiendo que un 12% de los perros están positivos a *T. canis* y que una infección leve puede producir una eliminación promedio de 10.000 huevos por gramo de materia fecal, calcula que se descargan diariamente 13 trillones de huevos del parásito en las calles. Ésta materia fecal sólo en un pequeño porcentaje sería eliminada en forma higiénica. El mayor porcentaje permanece en el medio ambiente y se disuelve en el suelo producto de la acción mecánica de la lluvia, el viento y los insectos. Un importante porcentaje de estos huevos encuentran condiciones favorables para sobrevivir desarrollarse y permanecer infectantes por años. A su vez Liebmann (1970), indica que en Alemania, llegarían al año varios millones de huevos de parásitos a las aguas del alcantarillado procedentes de las aguas lluvia que lavan la materia fecal ubicadas en calles, patios de casas, hospitales, criaderos de animales, plantas faenadoras, etc. En esta agua de desecho los huevos de los ascárides precipitan debido a su alto peso específico. Muchos de estos huevos son capaces de atravesar los filtros que se utilizan para reciclar el agua.

Si bien todos los trabajos están orientados al estudio de contaminación de plazas, parques y espacios de recreación pública, ninguno está enfocado a determinar el grado de contaminación existente en los patios de las viviendas donde son criados los cachorros que se pueden considerar los mayores contaminantes con huevos de *T. canis*. Y es justamente en esos lugares privados, y no en las vías públicas, donde los niños tienen el mayor riesgo de infección especialmente cuando los hábitos higiénicos son deficientes, el nivel sociocultural es bajo y la prevalencia de la infección en perros es elevada.

3.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

La implementación de una técnica en un laboratorio debe pasar por un análisis crítico de todos los factores que pueden influir sobre su eficiencia porque, muchas veces los resultados obtenidos difieren de los descritos en su lugar de origen. Por ello es necesario evaluar localmente toda metodología y conocerse, diferenciarse y estandarizarse al máximo las variables que pueden influir sobre ella.

La evaluación de la contaminación de la tierra por parte de los huevos de *T. canis* requiere un método seguro, rápido y fácil de realizar para poder separar los huevos de la tierra que los contiene. La eficacia de los métodos de flotación están influenciados por el tamaño de la muestra, los sitios de muestreo, textura de la tierra, grado de contaminación, solución de flotación y tiempo de flotación empleados (Nunes y col 1994). El mismo autor señala que la textura del suelo influyen la recuperación de huevos de *T. canis*, donde se registra un mayor recuento en suelos de tipo arenosos y una menor recuperación en suelos de tipo arcillosos.

De acuerdo a los tipos de métodos, la primera referencia que se tiene de lavado de tierra para la recuperación de huevos de *T. canis* es la de World Health Organisation (1964) con un 4,4% de recuperación. Quinn y col (1980), introducen una solución acuosa de detergente "Tween 80", la separación de la tierra y la solución de lavado mediante diversos filtros y una solución de sulfato de magnesio (densidad 1,27) alcanzando un 20% de recuperación. A su vez Köhler y col (1980), utilizan una solución de sulfato de zinc, el lavado de la tierra con agua corriente y el cernido a través de tres filtros de 250 μm , 100 μm y 50 μm de tamaño de poro, alcanzando una recuperación de huevos de *T. canis* de un 41,4%.

Como pre-tratamiento de una muestra de tierra o arena se considera su tamizado a través de tamices con tamaños de poro de 300 μm , 120 μm y 63 μm (Laborde y col 1980), con tamices de 250 μm , 100 μm y 50 μm (Köhler y col 1980), o con un cernidor de apertura de malla de 3 x 3 mm para separar los componentes más gruesos de la muestra (Ajala y Asaolu 1995). Al tamizar la tierra para obtener una muestra más homogénea, los huevos de *T. canis* pueden quedar adheridos a las partículas de mayor tamaño que se desechan o incluso al cedazo y así influir sobre el número de huevos encontrados. Otro pre-tratamiento consiste en la separación de los huevos de la materia orgánica e inorgánica con agua pura o bien un lavado con diferentes soluciones, como por ejemplo, solución de hipoclorito de sodio, de hidróxido de sodio, una solución acetoacética o con una solución acuosa de detergentes (World Health Organisation 1964, Quinn y col 1980, Köhler y col 1980, Laborde y col 1980, Hörchner y col 1981). Luego se procede a aclarar la muestra mediante una o más sedimentaciones con agua y decantación del sobrenadante, seguidas de una centrifugación del sedimento durante 2 a 5 minutos entre 2500 a 3000 rpm.

Posteriormente se realiza la flotación de los huevos mediante soluciones saturadas de sulfato de zinc, nitrato de sodio, hidróxido de sodio, hipoclorito de sodio, cloruro de sodio, dicromato de sodio y solución de azúcar. Estas soluciones, que tienen distintas densidades, han dado los más diversos resultados. Dada (1979) y Köhler y col (1980) obtuvieron un mejor resultado usando la solución de sulfato de zinc en comparación a dicromato de sodio, ambos con una densidad de 1,2. Ruiz de Ibáñez y col (2000) afirma que con una solución de azúcar se puede mejorar significativamente la recuperación de huevos de *T. canis* cambiando la densidad específica de 1,2 a 1,27 en que obtuvo en

muestras de 2g de tierra un 8,2% de recuperación con la primera densidad y 99,98% con la segunda. Igualmente Nunes y col (1994) obtienen una mayor recuperación de huevos con una solución de flotación de dicromato de sodio (densidad 1,35) que con la solución de flotación de sulfato de zinc (densidad 1,2); Oge y Oge (2000) atribuyen el mayor éxito a la densidad más alta de la solución de dicromato de sodio. En un trabajo paralelo Ruiz de Ibáñez y col. (2000) compararon diferentes soluciones con densidades ascendentes de azúcar (densidades de 1,20 a 1,27), de sulfato de zinc y de cloruro de sodio (densidad 1,20), de sulfato de magnesio (densidad 1,28), sulfato de magnesio + yoduro de potasio (densidad 1,32) e hidróxido de sodio (densidad 1,35) y obtuvieron los mejores resultados usando la solución de azúcar (densidad 1,27); al análisis estadístico se revelaron diferencias significativas al compararlas con las otras soluciones de flotación. Por otro lado Ajala y Asalu (1995) tienen mayor recuperación de huevos de las muestras flotadas con la solución de Nitrato de Sodio (densidad 1,35). Rego (1980) evaluó diversas técnicas y tamaños de muestras, encontrando que la técnica modificada por Splindler (1929), que utilizó dicromato de sodio, era mejor que la que estaba propuesta por Borg y Wooddruff (1979), en la que se empleó sulfato de zinc. Por otra parte, Kazacos (1983) no encontró diferencia entre las soluciones de sulfato de zinc y de nitrato de sodio. Estos diferidos resultados hacen pensar que la solución de flotación debe estar ajustada al tipo de sustrato (suelo) del cual se desee extraer los huevos.

Hasta el momento el método que ha demostrado una mejor efectividad es el de Horn y col (1990) con una recuperación de un 43,1% de los huevos. Éste método considera el uso de una máquina de lavar y el detergente Tween 80 para la homogenización de la muestra de tierra y, posteriormente, la flotación con una solución de azúcar (densidad 1,25) con dos centrifugaciones (Anexo 1).

Para implementar y evaluar un método que permita extraer cuantitativamente huevos de *T. canis* de muestras de tierra, debe definirse que método se va a utilizar y el tipo de suelo con el cual se trabajará. Se eligió el método descrito por Horn y col (1990), ver Anexo 1, porque fue el método descrito de mayor eficiencia (43,1% de recuperación), porque es la resultante de la comparación de 11 métodos diferentes y porque se detallaban con mucha exactitud todos los pasos a seguir. Sin embargo, al implementar y realizar algunas pruebas previas de dicho método no se obtuvieron los resultados esperados y surgieron las dudas si el tipo de suelo existente en Valdivia era compatible con el detergente adquirido en el comercio nacional, si la solución de flotación iba a ser compatible con el tipo de suelo y el agua local y si era necesario homogenizar la suspensión antes de cada proceso de flotación. Además había que adaptarse al instrumental existente en el laboratorio.

El objetivo del presente trabajo fue adaptar el método de Horn y col (1990) a las condiciones de suelo valdiviano y mejorar su eficiencia. El propósito es poder contar con un método cuantitativo de eficiencia probada que permita determinar los lugares de mayor riesgo de infección para el ser humano y para el perro con huevos infectantes de *T. canis*.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. TRABAJO PREVIO:

4.1.1. Obtención muestra de tierra: En el Fundo Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile se obtuvo aprox. 8 kg de tierra a 30 cm de profundidad en un lugar con pocas probabilidades que haya sido contaminado con materia fecal de perros y huevos de *T. canis*. En el Instituto de Geociencias se clasificó como "Trumao" que es el tipo de suelo más característico y abundante de la zona. Posteriormente en el Instituto de Patología Animal, laboratorio de Parasitología, se sometió la tierra a verificación de no contaminación, mediante el método de Horn y col (1990). La tierra se tamizó mediante un cernidor metálico, marca Ilko con una apertura de malla de 2 mm, para separar piedras y las partículas de tamaño más grande y se guardó a temperatura ambiente hasta su utilización.

En bolsas de plástico polietileno (16 x 10 cm, 0,1 mm espesor) previamente siliconizadas, se pesaron 25 g de tierra mediante una balanza electrónica marca Sartorius, modelo 1413.

4.1.2. Obtención y preparación de un pool de huevos de *T. canis*: Se obtuvo materia fecal de cachorros con el antecedente de no haber sido tratados con antiparasitarios. Después de haber comprobado la presencia de huevos de *T. canis* mediante un frotis sencillo y observación al microscopio, se procedió a macerar el material fecal en un mortero y a someterlo a varios lavados y sedimentaciones con agua, hasta obtener una suspensión transparente.

4.1.3. Estandarización de las alícuotas de suspensión de huevos de *T. canis*: Con el fin de conocer la cantidad de huevos de *T. canis* en una cantidad constante de suspensión huevos se homogenizó el pool mediante un agitador magnético; con una micropipeta calibrada se obtuvo 11 alícuotas de 0,1 ml de suspensión y se contó el número de huevos por alícuota y posteriormente se obtuvo 45 alícuotas, para corroborar la regularidad de las alícuotas.

4.2. MODIFICACIONES DEL MÉTODO DE HORN Y COL (1990):

4.2.1. Modificaciones necesarias:

- a) Se reemplazó la arena como sustrato por tierra tipo "Trumao" debido a que es el tipo de tierra más frecuente en los suelos de la Xª Región (Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales 1978).
- b) Se trabajó con una muestra de 25 g de tierra tipo "Trumao" en vez de 100 g, porque la centrífuga de mayor capacidad del Laboratorio de Parasitología sólo permitía centrifugar tubos de 100 ml.
- c) Se utilizó los detergentes aniónico (ácido o básico)* debido a que el detergente noiónico "Tween 80" no se encontró en el comercio local. Además se debía conocer la efectividad del detergente al ser agregado a muestras de tierra tipo Trumao" en vez de arena.
- d) Se aumentó al doble la concentración de detergente es decir 8,3 ml de detergente en 500 ml de agua, en vez de 8,3 en 1 litro debido a que se redujo a 75 ml de solución de detergente en vez de 150 ml.
- e) En un ensayo previo se verificó que al botar el sobrenadante con detergente y rellenar el vaso de centrífuga con agua después de la centrifugación (Paso 06) se obtenían menos huevos que cuando se botaba el sobrenadante y se procedía a colocar inmediatamente la solución de flotación en cantidad suficiente para tarar los vasos de centrífuga.

4.2.1. Modificaciones realizadas por dudas metódicas: En un ensayo previo, en que la obtención de los huevos no fue satisfactoria, surgieron las siguientes dudas metódicas no descritas en la publicación original:

- 1ª Duda (referida al paso 01) no se especifica si el detergente es ácido o básico, solamente que es un detergente noiónico. Hipótesis: mediante el uso de detergente ácido se recupera un mayor número de huevos de *T. canis*.
- 2ª Duda (referida al paso 07): Al utilizar una solución de azúcar (densidad 1,25) para flotar los huevos de *T. canis* se forman abundantes burbujas de aire que dificultan su visualización. Hipótesis: mediante una solución saturada de sulfato de zinc (densidad 1,38) no se forman burbujas facilitando la visualización de los huevos de *T. canis* y aumentado la recuperación.
- 3ª Duda (referida al paso 07): Después del proceso de concentración de la muestra mediante centrifugado y decantado, se agrega solución de flotación sin homogenizar la muestra. Hipótesis: la homogenización de la suspensión antes de cada centrifugación permite una mejor flotación y recuperación de los huevos de *T. canis*.

* Detergente ácido Quix®, Detergente básico Foam Degreaser®.

4.3. PRUEBA DE LAS VARIABLES MODIFICADAS DEL MÉTODO DE HORN Y COL (1990):

Según las modificaciones y pasos descritos se realizó una serie de 160 muestras con 25 g tierra tipo "Trumao", a las que se agregó respectivamente una alícuota de 0,1 ml de suspensión de huevos de *T.canis* en una concentración de $354,4 \pm 61,0$.

- 25 g de tierra más 75 ml de solución de detergente aniónico ácido (ph 4,6) **DA**
- 25 g de tierra más 75 ml de solución de detergente aniónico básico (ph 11,5) **DB**
- Solución de azúcar (densidad: 1,25) **AZ**
- Solución saturada de sulfato de zinc (densidad: 1,38) **SZ**
- Con homogenización de la muestra previo al proceso de flotación **CH**
- Sin homogenización de la muestra previo al proceso de flotación **SH**

Las variables se combinaron de la siguiente forma:



Se realizó 20 repeticiones con cada combinación.

4.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Los análisis se realizaron con el programa Estadística 6,0. Se chequeó la normalidad de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad de varianza mediante el test de Levene's, aplicado a cada grupo.

El conteo de huevos de *T.canis*, fue transformado a logaritmo natural en base 10 (+ 1) para cumplir con los supuestos paramétricos (Zar 1999). Se realizó el análisis de variación, con un ANOVA múltiple con tres factores ortogonales (Detergente, Solución de Flotación y Homogenización) y dentro de cada uno de estos, dos niveles (Detergente: Detergente Ácido = DA; Detergente Básico = DB; Solución de Flotación: Azúcar = AZ; Sulfato de Zinc = SZ; Homogenización: Con Homogenización = CH; Sin Homogenización = SH).

Para determinar las diferencias específicas entre los grupos, se utilizó una prueba post-hoc de Test de Rangos de Newman Keuls.

4.5. DESCRIPCIÓN DEL METODO DE HORN Y COL (1990) MODIFICADO:

Todo material de vidrio y de plástico que entra en contacto con huevos de *T. canis*, se siliconizó para impedir al máximo su adherencia.

- Paso 01. A cada bolsa con tierra (25 g), se le agregó 75 ml de solución de detergente industrial aniónico ácido Quix® (8,3 ml detergente en 500 ml de agua).
- Paso 02. La bolsa se selló, dejando en su interior una pequeña cantidad de aire.
- Paso 03. Se colocó varias bolsas dentro de otra de mayor tamaño que las proteja y se lavó 15 minutos (30 ciclos) en una máquina lavadora automática (programa lavado de lana).
- Paso 04. Se abrió cada bolsa y se vació el contenido en un vaso de centrífuga (100 ml). Se agregó agua en cantidad suficiente para llenar el vaso y con una cucharilla se homogenizó el contenido en forma manual.
- Paso 05. Se centrifugó 3 minutos a 750 g.
- Paso 06. Se botó el sobrenadante y se agregó al sedimento, solución de flotación de Sulfato de Zinc (densidad 1,38 medidos a 25 °C), se homogenizó en forma manual.
- Paso 07. Se dejó reposar 10 a 15 minutos para que floten los huevos de *T. canis*.
- Paso 08. Sobre el borde del vaso de centrífuga, se colocó un portaobjetos y se dejó una ranura para llenar el vaso con la solución de Sulfato de Zinc, hasta que tope el portaobjetos.
- Paso 09. Pasados 30 minutos se extrajo mediante pipeta, suspensión del fondo del vaso hasta que se desprenda el menisco del portaobjetos.
- Paso 10. Se levantó e invirtió el portaobjetos, donde deben encontrarse adheridos los huevos de *T. canis* y se cubrió con un cubreobjetos.
- Paso 11. Se colocó un segundo portaobjetos y se llenó nuevamente el vaso con solución de sulfato de Zinc, para obtener una segunda flotación de los huevos de *T. canis*.
- Paso 12. Pasados los 30 minutos, se repitió el procedimiento anterior.
- Paso 13. Se observó las 2 preparaciones al microscopio y se contó los huevos del parásito.
- Paso 14. El número de huevos obtenidos, se expresó en huevos por 25 g de tierra.

Se realizó una serie con 20 repeticiones del método modificado de mayor porcentaje de recuperación (DAZSCH) y se determinó el porcentaje de recuperación de los huevos agregados a la muestra.

5. RESULTADOS

5.1. TRABAJO PREVIO:

5.1.1. Obtención muestra de tierra: Los 8 Kg de tierra tipo Trumao fueron sometidos a corroboración de no contaminación por el método de Horn y col (1990) de los cuales se tomaron 5 muestras de tierra (125 gramos) homogenizada al azar, dando el total de las muestras un resultado negativo.

5.1.2. Obtención y preparación de un pool de huevos de *T. canis*: Se obtuvo un pool de huevos de *T. canis* obtenidos de aproximadamente 26 muestras fecales de un total de 244, lo que equivale a un 10,7% de muestras positivas.

5.1.3. Estandarización de la obtención de alícuotas de suspensión de huevos de *T. canis*: Las alícuotas de 0,1 ml de suspensión se obtuvieron de la zona media y al centro de la suspensión base de huevos de *T. canis* en agua entre los 15 y los 30 segundos después de iniciada la agitación de la suspensión. En 11 conteos se obtuvo un promedio de $354,4 \pm 61,0$ huevos. Al repetir el proceso con 45 conteos de se obtuvo $351,9 \pm 63,0$ huevos.

5.2. EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES MODIFICADAS DEL MÉTODO DE HORN Y COL (1990):

En la Cuadro 1 se exponen los resultados de recuperación de huevos de *T. canis* adicionados a muestras de tierra considerando los factores detergente, solución de flotación homogenización de la muestra. El mayor porcentaje de recuperación de huevos (50,9%) se obtuvo con la combinación de adición de detergente ácido a la muestra de tierra, la utilización de una solución saturada de sulfato de Zinc para flotar los huevos y con la homogenización mecánica de la suspensión de tierra antes de cada proceso de flotación.

En el Cuadro 2 de Test de Rangos de Newman Keuls y Figura N°1 de cajas y bigotes, se expresa el análisis estadístico de la interrelación de los diferentes factores. En las 4 series en que se utilizó azúcar como solución de flotación (densidad 1,25) se obtuvo significativamente menos huevos ($p < 0,05$) que en las 4 series en que se utilizó una solución saturada de sulfato de Zinc (densidad 1,38). También hubo diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las recuperaciones de huevos al adicionar detergente ácido o detergente básico a la muestra de tierra. No se constató diferencia significativa en las series con y sin homogenización de la muestra de tierra previo a la flotación ($p = 0,137$).

Cuadro 1

Huevos de *Toxocara canis* recuperados de tierra mediante las combinaciones de los factores DA, DB, AZ, ZC, CH y SH.

Eggs of *Toxocara canis* recovered from soil by using the following combination of factors: DA, DB, AZ, ZC, CH and SH.

Factor 1	DA		DB					
Factor 2	AZ		ZC		AZ		ZC	
Factor 3	CH	SH	CH	SH	CH	SH	CH	SH
Media	12,8	8,9	180,5	119,2	6,5	4,5	141,9	77,9
Desv. est.	4,5	5,5	73,8	81,6	3,6	2,9	62,1	38,6
Coef. variac.	0,4	0,6	0,4	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5
Recuperación	3,6%	2,5%	50,9%	33,6%	1,8%	1,3%	40%	21,9%

DA = Adición a la muestra de tierra de Detergente aniónico Ácido.
Acid anionic detergent added to the soil samples.

DB = Adición a la muestra de tierra de Detergente aniónico Básico.
Basic anionic detergent added to the soil samples.

AZ = Utilización de solución de flotación de Azúcar.
Sugar solution used as flotation medium.

ZC = Utilización de solución de flotación de Sulfato de Zinc.
Zinc sulphate solution used as flotation medium.

CH = Con Homogenización mecánica de la muestra previo al proceso de flotación.
Mix the sample previous to the flotation process.

SH = Sin Homogenización mecánica de la muestra previo al proceso de flotación.
Without mix the sample previous to the flotation process.

Cuadro 2

Nivel de significancia de cada una de las combinaciones de los factores DA, DB, AZ, ZC, CH y SH mediante la prueba post-hoc de Test de Rangos de Newman Keuls.

Significance level of each one of the combinations of the factors DA, DB, AZ, ZC, CH and SH obtained with the post-hoc Test of Ranks of Newman Keuls.

deter	flotac	agitac	DAAZCH	DAAZSH	DASZCH	DASZSH	DBAZCH	DBAZSH	DBSZCH	DBSZSH
DA	AZ	CH		*	***	***	***	***	***	***
DA	AZ	SH	*		***	***	NS	***	***	***
DA	SZ	CH	***	***		***	***	***	NS	***
DA	SZ	SH	***	***	***		***	***	*	NS
DB	AZ	CH	***	NS	***	***		*	***	***
DB	AZ	SH	***	***	***	***	*		***	***
DB	SZ	CH	***	***	NS	*	***	***		**
DB	SZ	SH	***	***	***	NS	***	***	**	

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; NS = No significativo.

DA = Adición a la muestra de tierra de Detergente aniónico Ácido.
Acid anionic detergent added to the soil samples.

DB = Adición a la muestra de tierra de Detergente aniónico Básico.
Basic anionic detergent added to the soil samples.

AZ = Utilización de solución de flotación de Azúcar.
Sugar solution used as flotation medium.

ZC = Utilización de solución de flotación de Sulfato de Zinc.
Zinc sulphate solution used as flotation medium.

CH = Con Homogenización mecánica de la muestra previo al proceso de flotación.
Mix the sample previous to the flotation process.

SH = Sin Homogenización mecánica de la muestra previo al proceso de flotación.
Without mix the sample previous to the flotation process.

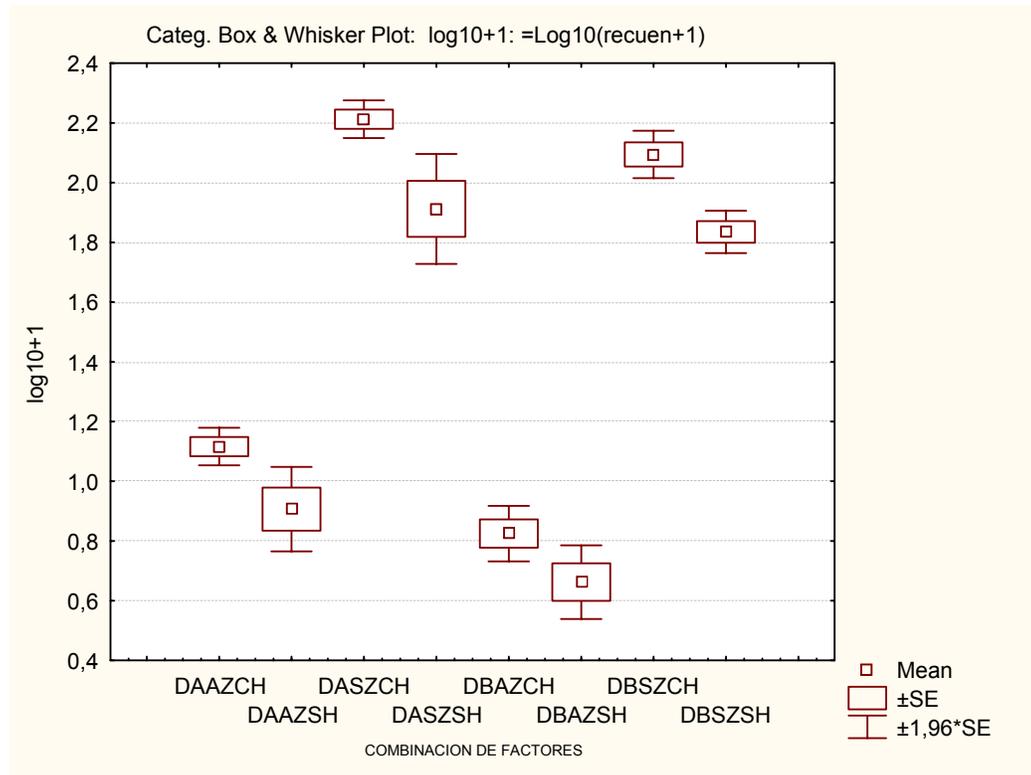


Figura N°1: Análisis estadístico de la interrelación de los factores DA, DB, AZ, ZC, CH y SH mostrado mediante el diagrama de cajas y bigotes.

Figure N°1: Statistical analysis of the interrelation of the factors DA, DB, AZ, ZC, CH and SH showed with the box and whisker diagram.

DA = Adición a la muestra de tierra de Detergente aniónico Ácido.
 Acid anionic detergent added to the soil samples.

DB = Adición a la muestra de tierra de Detergente aniónico Básico.
 Basic anionic detergent added to the soil samples.

AZ = Utilización de solución de flotación de Azúcar.
 Sugar solution used as flotation medium.

ZC = Utilización de solución de flotación de Sulfato de Zinc.
 Zinc sulphate solution used as flotation medium.

CH = Con Homogenización mecánica de la muestra previo al proceso de flotación.
 Mix the sample previous to the flotation process.

SH = Sin Homogenización mecánica de la muestra previo al proceso de flotación.
 Without mix the sample previous to the flotation process.

5.2.1. Corroboración de la combinación de factores: El método de Horn y col, (1990) describe dos flotaciones de cada muestra con las soluciones respectivas y al realizar una serie de 20 muestras con la mejor combinación de factores se obtuvo 30,6% de los huevos en la primera flotación y un 20,3 en la segunda flotación, dando un total de 50,9% de recuperación de huevos de *T. canis* (Cuadro 3).

Cuadro 3

Recuperación de huevos de *Toxocara canis* en la primera (1ª) y la segunda (2ª) flotación con sulfato de Zinc, utilizando la adición de detergente aniónico ácido y homogenizando mecánicamente la suspensión de tierra antes del proceso de flotación.

Recovery of *Toxocara canis* eggs in the first (1ª) and second (2ª) flotation procedure with Zinc sulphate solution, by using acid anionic detergent and mixing mechanically the soil suspension before the flotation process.

1ª	2ª	Total	
123	108	231	
90	101	191	
116	47	163	
63	76	139	
211	148	359	
73	55	128	
93	63	156	
180	103	283	
179	117	296	
224	82	306	
84	63	147	
66	57	123	
116	41	157	
61	37	98	
92	44	136	
67	45	112	
83	51	134	
80	63	143	
71	66	137	
96	74	170	
108,4	72,1	180,45	Promedio
30,6	20,3	50,9	% Recuperación

5.2.2. Determinación de la recuperación de huevos con tres flotaciones de la misma muestra: Se repitió el experimento realizando una tercera flotación a 10 muestras de tierra (Cuadro 4). La recuperación de huevos fue 30,3, 19,3 y 10,6% de los huevos en las tres flotaciones respectivamente.

Cuadro 4

Recuperación de huevos de *Toxocara canis* en la primera (1ª) en la segunda (2ª) y una tercera (3ª) flotación con sulfato de Zinc, utilizando la adición de detergente aniónico ácido y homogenizando mecánicamente la suspensión de tierra antes del proceso de flotación.

Recovery of *Toxocara canis* eggs in the first (1ª), second (2ª) and third (3ª) flotation procedures with Zinc sulphate solution, by using acid anionic detergent and mixing mechanically the soil suspension before the flotation process.

1ª	2ª	3ª	Total	
77	54	28	159	
103	78	46	227	
89	61	34	184	
118	80	36	234	
156	82	66	304	
100	55	34	189	
93	87	40	220	
102	64	32	198	
122	55	31	208	
114	67	28	209	
107,4	68,3	37,5	213,2	Promedio
30,3	19,3	10,6%	60,2	% Recuperación

6. DISCUSIÓN

En este estudio se utilizó tierra tipo "Trumao" que, según el Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales (1978), se encuentra en aproximadamente el 86% de los suelos de la Provincia de Valdivia. El suelo tipo Trumao deriva de cenizas volcánicas y la mayor parte de su componente es silicio; posee una gran cantidad de arcilla, altamente porosa, que no permite la acumulación de agua (alta velocidad de filtración) y, a su vez, es capaz de retener una gran cantidad de humedad, lo que puede ser un factor importante para la conservación de los huevos de *T. canis*. Según Nunes y col (1994), la textura del suelo es una variable importante, ya que constataron diferencias significativas entre las obtenciones de huevos de *T. canis* de los siguientes tipos de suelo: arena, suelo arenoso, lodo arcilloso y arcilla lodosa; también encontraron diferencias al utilizar Sulfato de Zinc y Dicromato de Sodio como soluciones de flotación. El porcentaje de huevos que recuperaron de arena y tierra arenosa eran mayores que los recuperados de lodo arcilloso y arcilla lodosa. También había menos variación en el número de huevos recuperados de suelos arenosos que de tierra arcillosa, ello probablemente debido a que el mayor tamaño de las partículas de arena no permiten la adhesión de los huevos, en cambio si a las partículas más pequeñas e irregulares de la arcilla. Para realizar el presente trabajo se obtuvo la tierra de tipo "Trumao" a 30 cm de profundidad en un lugar en que no circulaban perros. Por ello se puede asegurar que era tierra exenta de huevos de *T. canis*, cosa que se corroboró en el análisis realizado a 5 muestras de esa tierra, una vez establecida la técnica.

Para poder adicionar una cantidad exacta de huevos de *T. canis* a las muestras de tierra hubo que realizar un arduo trabajo previo. Se revisó un total 244 muestras fecales de las cuales sólo 26 (10,7%) estaban positivas a huevos del parásito. En un principio se trabajó con muestras fecales de perros que provenían de dos clínicas veterinarias de la ciudad de Valdivia, pero al obtener muy pocas muestras positivas, se procedió a trabajar con muestras fecales de perros provenientes de los campamentos "Miraflores", "Amor y Esfuerzo" y "2000" situados en el sector Corvi de la misma ciudad. Degregorio y col (1997) describen que obtienen eficientemente huevos de hembras adultas de *T. canis* obtenidas de intestino de cachorros necropsiados, pero ello no fue posible en el presente trabajo. Mediante el lavado y concentrado de las muestras fecales se obtuvo un pool de huevos de *T. canis* lo suficientemente grande como para poder establecer la cantidad de huevos en las alícuotas y posteriormente poderlas adicionar a las muestras de tierra. La regularidad con que se lograron contar los huevos en 0,1 ml de suspensión dio la seguridad que la cantidad adicionada a las muestras de tierra era la misma obtenida en los 11 recuentos previos y los 45 recuentos realizados posteriormente.

De los detergentes usados para la recuperación de huevos de *T. canis* de muestras de tierra de tipo "Trumao", resultó ser mejor el detergente aniónico ácido que el aniónico básico (Cuadro 1, Cuadro 2 y Figura N°1). En la literatura se cita el detergente "Tween 40, 60 y 80" como el más utilizado para ser agregado a las muestras de tierra (Quinn y col 1980, Boreham y Capon 1982, Dunsmore y col 1984, Horn 1986, Dubin y col 1975, Childs 1985 y Kazacos 1983). Como no se pudo obtener dicho producto en el mercado nacional, se buscó entre los existentes, encontrándose que habían detergentes de dos tipo: los

aniónicos ácidos y los aniónicos básicos y se formuló la duda con cuál se obtendrían los mejores resultados. El detergente "Tween 40, 60 y 80" se describe como un surfactante noiónico atóxico fabricado a partir de azúcar y aceites (Salager 2002). Por otro lado Tharaldsen (1982) utilizó el detergente comercial "Spüli" (que es aniónico ácido), pero Horn y col (1990) al compararlo con once métodos que utilizaban el detergente "Tween", solamente obtuvo un 6,3% de recuperación. Se concluye que el detergente de uso comercial Quix® agregado en una solución (8,3 ml de detergente en 500 ml de agua), es más apropiado que el detergente Foam Degreaser® para obtener huevos de ascárides de muestras de tierra de tipo Trumao. También se pudo concluir que el no botar el sobrenadante con detergente después de cada centrifugación, contrario a lo descrito en el paso 06 del método de Horn y col (1990), mejoraba la recuperación de los huevos a un 50,9%.

En relación a la solución de flotación, se decidió comparar la solución saturada de sulfato de Zinc (densidad 1,38) con la solución de azúcar (densidad 1,25) que se describía en el método original de Horn y col (1990). Resultó significativamente más eficiente ($p < 0,05$) la solución de sulfato de Zinc como elemento de flotación de los huevos de *T. canis* a partir de una muestra de 25g de tierra de tipo "Trumao" (Cuadro 1, Cuadro 2 y Figura N°1). Al no existir un método estandarizado para un cierto tipo de tierra, no es posible comparar los resultados obtenidos con la gran variedad existentes en la literatura.

La homogenización de la suspensión antes de ser centrifugada frente a la no homogenización, no arrojó diferencia significativa ($p > 0,05$), lo que coincide con otros autores (Köhler y col 1980, Deumer 1984, Kazacos 1983, Dada 1979), que señalan que la homogenización o agitación de la tierra contaminada después de la adición de la sustancia de flotación no es de importancia. Sin embargo, se optó por incluir la homogenización de la muestra después de cada centrifugación porque los resultados eran levemente superiores.

Para ver si la recuperación de huevos era constante se realizaron 20 muestras adicionales (Cuadro 3) con la combinación de factores detergente ácido, solución de flotación de sulfato de Zinc y homogenización de la muestra (DASZCH). Se corroboró el mismo porcentaje de recuperación (50,9%), lo que le da a la técnica probada un alto margen de seguridad.

Quedaba la duda si con un proceso de centrifugación-flotación adicional se lograba una mayor recuperación de los huevos y se realizó una serie adicional de 10 muestras con tres procesos medidos separadamente (Cuadro 4). Con dos centrifugaciones se obtuvo nuevamente un porcentaje de recuperación muy similar al anteriormente mencionado (49,6%) y con la tercera flotación sólo se obtuvo un 10,6% adicional. Al realizar un análisis costo de trabajo versus recuperación regular de huevos, se concluyó que dos flotaciones de una misma muestra son suficientes, ya que una tercera flotación de la muestra significa aprox. 3 horas adicionales de trabajo. Incluso el regular porcentaje de recuperación después de la primera flotación (30,6% y 30,3%) permite inferir que una sola flotación podría ser suficiente para determinar el grado de contaminación de una muestra y hacer la corrección respectiva. Ello permitiría simplificar la técnica y ahorrar tiempo, porque las flotaciones son una parte muy demorosa del proceso. Sin embargo, es recomendable volver a corroborar el resultado obtenido.

Si bien en Chile se han realizado trabajos sobre el grado de contaminación de lugares públicos con huevos de *T. canis* analizando muestras de tierra (Tagle 1962, Alcaíno y Tagle 1970, Arias 1974, Castillo y col 2000, Armstrong 2003), ninguno de los trabajos indica la prueba local previa de la efectividad de los métodos utilizados.

Se concluye que:

- El presente trabajo cumplió con los objetivos de implementar, adaptar localmente, probar y perfeccionar el más eficiente y documentado de los métodos encontrados en la literatura (Horn y col 1990) para obtener huevos de ascárides de muestras de tierra.
- Se obtuvo un 50,9% de recuperación de huevos de *T. canis* de tierra tipo "Trumao" mediante el método de Horn y col 1990 modificado.
- Resultó más eficiente la combinación: a) adición de detergente ácido a la muestra de tierra, b) utilización de una solución saturada de sulfato de zinc, y c) homogenización de la suspensión de tierra con huevos antes de cada proceso de centrifugación-flotación.
- Fue más efectivo el detergente ácido que el básico. También se concluyó que al no botar el líquido sobrenadante con detergente, aumentaba la recuperación de huevos.
- Fue significativamente ($p < 0,05$) más eficiente la solución saturada de sulfato de zinc que la solución de azúcar.
- No hubo diferencia significativa ($p > 0,05$) al homogenizar la muestra antes del proceso de centrifugación-flotación en comparación con la homogenización de la muestra.
- Con dos procesos de centrifugación-flotación de cada suspensión se recupera regularmente el 50,9% de los huevos de *T. canis*. Un proceso adicional sólo mejora el método en un 10,6%.

PROYECCIÓN DEL TRABAJO.

Mediante la técnica se podrá determinar el mayor o menor riesgo que existe para el ser humano de infectarse con huevos infectantes de *Toxocara canis* y adquirir el síndrome de *larva migrans visceral*. La evidencia científica de los lugares de mayor riesgo de infección, especialmente para niños, será un valioso antecedente para que los Médicos Veterinarios, los Médicos Humanos y los Servicios de Salud puedan recomendar medidas preventivas de la enfermedad.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acha P, B Szyfres. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. *O.P.S Washington DC Publicación Científica* 503, 844–849.
- Ajala M, S Asaolu. 1995. Efficiency of the salt flotation technique in the recovery of *Ascaris lumbricoides* eggs from the soil. *J Helminthol* 69, 1–5.
- Alcaíno H, I Tagle. 1970. Estudios sobre enteroparasitosis del perro en Santiago. *Bol Chil Parasitol* 25, 5–8.
- Arias J. 1974. Contribución al estudio de los metazoos parásitos del perro. *Agri Tec* 4, 59–71.
- Armstrong W. 2003. Presencia de parásitos del perro (*Canis familiaris*) en parques y plazas públicas de la ciudad de Temuco, IX Región, Chile. Tesis M.V., Facultad de Acuicultura y Ciencias Veterinarias, Universidad Católica de Temuco.
- Barriga O. 1988. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocariasis and the possibilities of immunological control. *Vet Parasitol* 29, 195–234.
- Barriga O. 1991. Rational control of canine toxocariasis by the Veterinary practitioner. *J Am Vet Med Assoc* 198, 216–221.
- Boch J, R Supperer. 1992. Parasitología en Medicina Veterinaria. Editorial Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires.
- Boreham P, A Capon. 1982. Environmental contamination with canine zoonotic helminths in Brisbane. *Austr Vet Pract* 12, 14–18.
- Borg O, A Woodruff. 1973. Prevalence of infective ova of *Toxocara* species in public places. *Br Med J* 4, 470–472.
- Bozdech V. 1981. Zur Larven-Toxocarose des Menschen. I. Eifunde in Prager Parkanlagen. *Angew Parasitol* 22, 71–77.
- Castillo D, C Paredes, C Zañartu, G Castillo. 2000. Contaminación ambiental por huevos de *Toxocara sp.* en algunas plazas y parques públicos de Santiago de Chile. 1999. *Bol Chil Parasitol* 55, 86–91.
- Childs J. 1985. The prevalence of *Toxocara* species ova in backyards and gardens of Baltimore, Maryland. *Am J Public Health* 75, 1092–1094.

- Chieffi P, E Müller. 1978. Estudo da variacao mensal na contaminacao do solo por ovos de *Toxocara sp.* na zona urbana do municipio de Londrina, estado do Paraná, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz* 38, 13–16.
- Dada B. 1979. Studies On flotation techniques for the recovery of helminthes eggs from soil and the prevalence of eggs of *Toxocara spp* in some Kansas public places. *J Am Vet Med Assoc* 174, 1208–1210.
- Dada B, W Lindquist. 1979. Prevalence of *Toxocara spp.* Eggs in some public grounds and highway rest areas in Kansas. *J Helminthol* 53, 145–146.
- Degregorio O, I Sommerfelt, A Cousandier, C López, A Franco. 1997. Evolución de huevos de *Toxocara canis* a su estado infectante. *Avances en Ciencias Veterinarias* 2, 101–102.
- Deumer R. 1984. Untersuchungen über den Endoparasitenbefall von Hunden in München. Die Kontamination von öffentlichen Sandspielplätzen mit parasitären Entwicklungsstadien und ihr Verhalten gegenüber Umwelteinflüssen. Tesis Dr. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover, Alemania.
- Docmac R. 1981. Estudio de registros clínicos en caninos, Hospital Veterinario, Universidad Austral de Chile; Valdivia, periodo 1976 – 1979. Tesis M.V., Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Dubin S, S Segall, J Martindale. 1975. Contamination of soil in two city parks with canine nematode ova including *Toxocara canis*, a preliminary study. *Am J Public Health* 65, 1242–1245.
- Dunsmore J, R Thompson, I Bates. 1984. Prevalence and survival of *Toxocara canis* in the urban environment of Perth, Australia. *Vet Parasitol* 16, 303–311.
- Ernst S, C Veuthey, R Martin. 1987. Toxocariasis canina: edad, sexo y raza como factores de riesgo. Estudio retrospectivo de registros clínicos. *Bol Chil Parasitol* 42, 90–92.
- Enigk K. 1979. Resistenz der Dauerformen von Endoparasiten der Haustiere. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 92, 491–497.
- Glickman T, P Schantz. 1981. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidem Rev* 3, 230.
- Herskovic P, B Astorga. 1985. Toxocariasis humana en Chile. *Rev Med Chile* 113, 18–221.
- Horn K, T Schnieder, M Stoye. 1990. Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. *J Vet Med B* 37, 241–250.
- Hörchner F, J Unterholzner, K frese. 1981. Zum Vorkommen von *Toxocara canis* und anderer Endoparasiten bei Hunden in Berlin (West). *Berl Münch Tierärztl Wschr* 94, 220–223.

- Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales. CORFO–Universidad Austral de Chile. 1978. Suelos Provincia de Valdivia. Universidad Austral de Chile.
- Kayes S. 1997. Human toxocarosis and the visceral larvae migrans syndrome: correlative immunopathology. *Chem Immunol* 66, 99–124.
- Kazacos K. 1983. Improved method for recovering ascarid and other helminth eggs from soil associated with epizootic and during survey studies. *Am J Vet Res* 44, 896–900.
- Köhler G, R Jörren, F Van Kapen. 1980. Untersuchungen zur Kontamination von Spielkastensänden mit Eiern von Flieschfresseraskariden. *Bundesgesundheitsblatt*. 23, Nr. ½.
- Lamina J. 1974. Immunodiagnosis of “visceral larva migrans” in man. Soulsby E.J.L. Parasitic Zoonosis. Clinical and Experimental Studies. Academic Press Inc. New York.
- Laborde C, J Bussieras, R Chermette .1980. Recherche des oeufs de *Toxocara spp.* dans le sol des Jardins Public de Paris. Prophylaxis des infestations humaines. *Rec Med Vet* 145, 611–627.
- Leyan M. 1978. Estudio de la fauna helmintológica del perro doméstico (*Canis familiaris*) en la ciudad de Valdivia, Chile. Tesis M.V., Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Liebmann H. 1970. Der heutige Stand der Reinigung von Schlachthofabwässer mit besonderer Berücksichtigung der Veterinär–parasitologischen Probleme. *J Vet Med B* 10, 312–315.
- Linfati C. 1979. Estudio de la fauna helmintológica del perro (*Canis familiaris*) en el sector rural de Máfil, provincia de Valdivia, Chile. Tesis M.V., Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Martin P. 1980. Estudio de la fauna helmintológica del perro (*Canis familiaris*) en el sector urbano de la comuna de Máfil, provincia de Valdivia, Chile. Tesis M.V., Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Navarrete N, E Rojas. 1998. Seroprevalencia de toxocarosis en donantes de sangre. *Arch med vet* 30, 153–156.
- Nunes C, I Sinhorini, S Ogassawara. 1994. Influence of soil texture in the recovery of *Toxocara canis* eggs by flotation method. *Vet Parasitol* 53, 269–274.
- Oberg C, R Franjola, V Leyan. 1979. Helminthos del perro doméstico en la ciudad de Valdivia, Chile. *Bol Chil Parasitol* 34, 21–26.
- Oge H, S Oge. 2000. Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. *Vet Parasitol* 92, 75–79.

- Pegg J.1975. Dog roundworms and public health. *Vet Res* 97, 78.
- Quinn R, HV Smith, RG Bruce, RW Girwood. 1980. Studies on the incidence of *Toxocara* and *Toxascaris spp.* ova in the environment. 1. A comparison of flotation procedures for recovering *Toxocara spp.* ova from soil. *J Hyg Camb* 84, 83-89.
- Rego A.1980. Comunicacao do dolo de parques e pracas de Lisboa por ovos de *Toxocara* e outros helmintos. *An. Escola sup. Med Vet Lisboa* 22, 151-162.
- Ruiz de Ibáñez M, M Garijo, M Goyena, F Alonso. 2000. Improved methods for recovering eggs of *Toxocara canis* from soil. *J Helminthol* 74, 349-353.
- Salager J. 2002. Surfactantes tipos y usos. Universidad de los Andes, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química. Mérida, Venezuela segunda edición Venezuela.
- Schaffert R .1978. Die Umwelthygienische Bedeutung des Hundekotes im Lebensraum einer Grosstadt. Tesis Dr. med. vet., Diss. Hohenheim. Alemania.
- Schantz P, L Glickman. 1983. Ascáridos de perros y gatos: un problema de salud pública y de medicina veterinaria. *Bol. Of. Sanit. Panam* 94, 571-585.
- Schantz P, J Steher-Green. 1988. Toxocaral larva migrans. *J Am Vet Med Assoc* 192, 28-32.
- Schulz S, A Kroeger. 1992. Soil contamination with *Ascaris lumbricoides* eggs as an indicator of environmental hygiene in urban areas of north – east Brazil. *J Trop Med Hyg* 95, 95-103.
- Software Statistica 6,0. 1999. Start Soft Cop OK, Windows 2000.
- Soulsby E.J.L. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ª Edición. Nueva Editorial Interamericana S.A., México D.F.
- Splindler L.1929. On the use of a method for the isolation of *Ascaris* eggs from soil. *Am J Hyg* 10, 157-164.
- Tagle I.1962. Importancia del Género *Toxocara*, en la producción del síndrome “larva migrans visceral”. *Bol Chil Parasitol* 17, 77-79.
- Torres P, M Ramos, L Carrasco, M Neumann, R Franjola, N Navarrete, L Figueroa.1974. Protozoos, helmintos y artrópodos parásitos del perro doméstico en la ciudad de Valdivia, Chile. *Bol Chil Parasitol* 29, 18-23.
- Torres P, R Franjola, J Pérez, S Auad, C Hermosilla, L Flores, J Riquelme, S Salazar, J Miranda, A Montefusco.1995. Geohelminthosis intestinales en el hombre y animales domésticos de sectores ribereños de la cuenca del río Valdivia, Chile. *Bol Chil Parasitol* 50, 57-66.

Tharaldsen J. 1982. Parasitter fra hundo og katt i prover fra sandkesser i daginstitusjoner i Oslo. *Nord Vet* 94, 251–254.

Uga S, W Nagnae, V Chongsuvivatwong. 1997. Contamination of soil with parasite eggs and oocysts in Southern Thailand, Southeast Asian. *J Trop Med Public Health* 24, 14-17.

Van Knapen F, J Fraichmont, G Otter. 1979. Steam Sterilization of sandpits infected with *Toxocara* eggs. *Br Med J* 1, 1320.

Viens P. 1977. Visceral larva migrans in Montreal: the tip of the iceberg. *Bordeaux Medical* 10, 697–698.

World Health Organisation. 1964. Soil transmitted helminths. Technical Report. 277, 1-69.

Zar JH. 1999. Biostatistical analysis. Fourth edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

8. ANEXOS

Anexo 1

Descripción del método de Horn y col (1990):

Todo material de vidrio y de plástico que entra en contacto con huevos de *T. canis*, se debe siliconizar para impedir al máximo su adherencia. Los pasos a seguir son los siguientes:

- Paso 01. A una bolsa de plástico se le agrega 100g de arena y 150 ml de solución de detergente no iónico Tween 80 (8,3 ml detergente en 1000 ml de agua).
- Paso 02. La bolsa de plástico se sella, dejando en su interior una pequeña cantidad de aire.
- Paso 03. Se colocan varias bolsas con muestras en otra de mayor tamaño y se procede a agitar dicha bolsa acumulativa en una máquina lavadora con el programa lavado de lana durante 15 minutos con 30 ciclos de agitación.
- Paso 04. Se abre cada bolsa y se vacía el contenido en un vaso de centrífuga (100 ml). Se agrega agua en cantidad suficiente para llenar el vaso y con una cucharilla se homogeniza el contenido en forma manual.
- Paso 05. Se centrifuga 3 minutos a 600 g.
- Paso 06. Se bota el sobrenadante y se agrega agua hasta llenar nuevamente el vaso de centrífuga, se homogeniza y se centrifuga nuevamente el contenido en la misma forma.
- Paso 07. Se bota el sobrenadante y se agrega al sedimento, solución de azúcar (800 g azúcar en un litro de agua, densidad 1,25 medidos a 25° C.).
- Paso 08. Se deja reposar 10 a 15 minutos para que floten los huevos de *T. canis*.
- Paso 09. Sobre el borde del tubo de centrífuga se coloca un portaobjetos y se deja una ranura que permita llenar el vaso con la solución azucarada, hasta que tope el portaobjetos.
- Paso 10. Pasados 30 minutos se extrae mediante pipeta, algo de suspensión del fondo del vaso hasta que se desprenda el menisco del portaobjetos.
- Paso 11. Se levanta e invierte el portaobjetos, donde deben encontrarse adheridos los huevos de *T. canis* y el líquido se cubre con un cubreobjetos.
- Paso 12. Se coloca un segundo portaobjetos y se llena nuevamente el vaso con solución de azúcar, para obtener una segunda flotación de huevos de *T. canis*.
- Paso 13. Pasados los 30 minutos, se repite el procedimiento anterior.
- Paso 14. Se observan las 2 preparaciones al microscopio y se cuentan los huevos del parásito.
- Paso 15. El número de huevos obtenidos, se expresa en huevos por 100g de tierra.

Anexo 2

Detalle del número de huevos de *Toxocara canis* recuperados de tierra mediante las combinaciones de los factores DA, DB, AZ, ZC, CH y SH.

Factor 1	DA				DB			
Factor 2	AZ		ZC		AZ		ZC	
Factor 3	CH	SH	CH	SH	CH	SH	CH	SH
	10	9	231	140	9	6	84	119
	8	15	191	146	13	9	111	74
	12	5	163	100	18	5	106	50
	6	22	139	165	11	3	177	61
	13	7	359	132	6	6	161	191
	13	11	128	148	4	1	170	50
	19	9	156	150	6	1	325	71
	9	7	283	137	7	2	83	69
	12	17	296	143	7	9	77	50
	8	4	306	134	8	2	84	121
	17	8	147	134	4	6	197	59
	11	6	123	48	5	7	41	62
	13	3	157	20	3	5	136	48
	7	17	98	4	7	6	173	50
	20	8	136	45	3	4	141	35
	10	1	112	19	2	3	183	89
	15	9	134	123	4	3	102	81
	18	8	143	389	4	10	197	135
	12	11	137	68	7	1	140	48
	22	0	170	140	2	0	149	95
Media	12,8	8,9	180,5	119,2	6,5	4,5	141,9	77,9
Desv. est.	4,5	5,5	73,8	81,6	3,6	2,9	62,1	38,6
Recuperación	3,6%	2,5%	50,9%	33,6%	1,8%	1,3%	40%	21,9%

DA = Adición a la muestra de tierra de Detergente aniónico Ácido.

DB = Adición a la muestra de tierra de Detergente aniónico Básico.

AZ = Utilización de solución de flotación de Azúcar.

ZC = Utilización de solución de flotación de Sulfato de Zinc.

CH = Con Homogenización mecánica de la muestra previo al proceso de flotación.

SH = Sin Homogenización mecánica de la muestra previo al proceso de flotación.

9. AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a:

- Dr. Gerold Sievers, profesor patrocinante, por toda la colaboración y ayuda presentada en la realización de mi Memoria.
- Médico Veterinario Paula Gädicke, por su gran colaboración en la parte estadística de mi Memoria.
- A mis padres Diva y Ricardo, por su amor, comprensión e infinito apoyo.
- A mi querida hermana Diva y a Jorge.
- A Don Belisario Monsalve, “Don Beli”, por toda su buena voluntad, ayuda y cooperación en la realización de esta investigación.
- Por último, a todas las personas, sin nombrar para no omitir a nadie, que de una u otra forma colaboraron desinteresadamente en la realización de este trabajo.