ARTÍCULO ORIGINAL

Prueba de una técnica para recuperar huevos de Toxocara canis de muestras de tierra

GEROLD SIEVERS*, CLAUDIA CONCHA* y PAULA GÄDICKE**

TEST OF A TECHNIQUE TO RECOVER *Toxocara canis* EGGS FROM SOIL SAMPLES.

A technique to recovery *T. canis* eggs from soil samples described in Hannover, Germany, was adapted to local conditions in Valdivia, Chile, and it was necessary to test its efficiency. 160 «Trumao type» soil samples of 25 g were prepared adding 354.4 ± 61 eggs of *T. canis* contained in 0.1 ml of a water suspension. In the adaptation process of the technique, it was prove three variables making 20 repetitions of the following combinations: a) detergent added: acid anionic (pH 4.6), or basic anionic (pH 11.5). b) Flotation solution used: sugar solution (density: 1.25), or saturated zinc sulphate (density: 1.38). c) with or without mechanical mixing of the samples previous to the flotation process. The best result, of an average of 50.9% ($p < 0.05$) of the recovered added *T. canis* eggs from 25g of «Trumao type» soil was obtained with the addition of acid anionic detergent to the samples, the use of a saturated zinc sulphate solution for the flotation of the eggs and mixing the samples before each flotation process.

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

INTRODUCCIÓN

Toxocara canis es uno de los parásitos más frecuentes de los cánidos en todo el mundo. Los huevos infectantes de este parásito representan un riesgo para el ser humano en el cual producen el síndrome de «*larva migrans visceral*» que es especialmente grave cuando las larvas invaden el cerebro y los ojos, pudiendo causar trastornos nerviosos o de visión¹.

Los principales contaminantes del medio externo con huevos del parásito son los cachorros desde las tres semanas de vida hasta los 6 a 7 meses de edad². Los huevos de *T. canis* son casi esféricos, de 75 - 90 µm, de cáscara gruesa, rugosa y con un componente lipídico superficial que les permite adherirse a cualquier elemento.

En las heces frescas estos huevos presentan en su interior una célula única que se desarrolla a una larva en un tiempo de 10 a 15 días; concluido el desarrollo de dicha larva, el huevo tiene la capacidad de infectar³ siendo muy resistente⁴⁻⁶. Coincidiendo con la maduración de los huevos, generalmente se ha desintegrado la unidad fecal y los huevos infectantes pasan a contaminar la superficie del suelo. Allí representan un serio peligro de infección para los perros y para el ser humano⁷.

Hay trabajos que demuestran la presencia de huevos de *Toxocara* en muestras de tierra de lugares públicos que indican el riesgo de infección al que están expuestos los residentes humanos de esos lugares⁸⁻¹⁶, sin embargo, también es necesario determinar el grado de contaminación

* Laboratorio de Parasitología Veterinaria. Universidad Austral de Chile.

** Departamento de Patología y Medicina Preventiva, Universidad de Concepción.

existente en los patios de las viviendas donde son criados cachorros de perros, porque ellos son el grupo de edad que más huevos de *T. canis* elimina¹⁴. Para poder determinar objetivamente el riesgo existente en dichas áreas se requiere de una técnica que permita determinar en forma cuantitativa la presencia de huevos de *Toxocara* spp.

Hay muchas técnicas descritas para extraer huevos de ascárides de muestras de tierra o arena¹⁷⁻²⁹. En el Instituto de Parasitología de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria de Hannover, Alemania, se realizó una comparación de 11 técnicas diferentes³⁰, y los autores describen una técnica propia mejorada en la cual detallan con mucha exactitud todos los pasos a seguir y que tiene una recuperación de un 43,1% de los huevos de *T. canis* agregados a muestras de arena. Por ello se decidió armar dicha técnica el Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad Austral de Chile. Sin embargo, al analizar todos los factores que podían influir sobre su eficiencia, se decidió evaluar localmente el método para conocer, diferenciar y estandarizar al máximo las variables. El objetivo del presente trabajo fue adaptar la técnica descrita en Hannover³⁰ a las condiciones de suelo valdiviano y tratar de mejorar su eficiencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvo tierra de tipo «Trumao» a 30 cm de profundidad en un lugar no contaminado con heces de perros. Después de tamizarla se pesaron 200 muestras de 25 g de tierra y se pusieron en bolsas de polietileno autosellables (16 x 10 cm de 0,1 mm espesor) previamente siliconizadas («KIT» Silicona, Spray). A cada muestra se le agregó 0,1 ml de una suspensión acuosa con un promedio de $351,9 \pm 63,0$ huevos de *T. canis*. Las alícuotas se extrajeron de una suspensión acuosa de huevos del parásito de la zona media y al centro de la suspensión, entre los 15 y los 30 segundos después de iniciada su agitación mecánica.

Al armar el método original descrito en Hannover³⁰, hubo que reemplazar la arena por tierra tipo «Trumao» debido a que es el tipo de

tierra más frecuente en los suelos de la X^a Región³¹. Además, se trabajó con una muestra de 25 g en vez de 100 g, porque la centrifuga del Laboratorio sólo permitía centrifugar tubos de 100 ml. Las variables que se evaluaron para determinar la eficiencia de recuperación de huevos de *T. canis* fueron las siguientes:

a) Tipo de detergente: aniónico ácido* (DA) y aniónico básico# (DB); ambos detergentes se utilizaron al doble de la concentración indicada. El detergente no iónico «Tween 80» descrito en el método original no se encontró en el comercio local y además, debía conocerse su efectividad al procesar muestras de tierra tipo «Trumao».

b) Solución de flotación para flotar los huevos de *T. canis*: solución saturada de sulfato de zinc (ZN) de una densidad 1,38, y la solución de azúcar (AZ) de una densidad 1,25.

c) Homogenización de la muestra después de cada proceso de centrifugación: Con Homogenización (CH) y Sin Homogenización (SH).

Se hicieron 20 repeticiones con cada combinación de factores realizada de la siguiente forma:

Los análisis se realizaron con el programa Statistix 6,0³². Se chequeó la normalidad de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad de varianza mediante el test de Levene aplicado a cada grupo.

Los conteos de huevos de *T. canis*, fueron transformados a logaritmo natural en base 10 (+1) para cumplir con los supuestos paramétricos³³. Se realizó el análisis de varianza con tres factores ortogonales (Detergente, Solución de Flotación y Homogenización) y dentro de cada uno de estos, dos niveles. Para determinar las diferencias específicas entre los grupos, se utilizó la prueba de Rangos de Newman Keuls con una significación del 0,5%. Además se determinó el porcentaje de recuperación de los huevos agregados a la muestra después del primer, del segundo y del tercer proceso de centrifugación-flotación.

RESULTADOS

El 50,9% de recuperación de huevos ($p < 0,05$) se obtuvo con la combinación de adición

* Quix®, (pH 4,6)

Foam Degraser®, (pH 11,5)

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 centrifugación (Tabla 1).

En la Figura 1, de gráfico de cajas y bigotes, se presenta la interrelación de los diferentes factores. En las 4 series en que se utilizó azúcar como solución de flotación se obtuvo significativamente menos huevos ($p < 0,05$) que en las 4 series en que se utilizó una solución saturada de sulfato de Zinc. 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 ($p = 0,137$).

Mediante 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*. En una serie adicional de 10 muestras con tres flotaciones se obtuvo respectivamente 30,3%, 19,3% y 10,6% de recuperación de huevos. No se recuperaron huevos de *T. canis* en las muestras de la tierra utilizada a las cuales no se les había agregado huevos.

DISCUSIÓN

La textura del suelo es una variable importante, ya que hay diferencias significativas entre las obtenciones de huevos de *T. canis* de arena, suelo arenoso, lodo arcilloso y arcilla lodosa²⁶. En este estudio se utilizó tierra tipo «Trumao»

Figura 1. Análisis de la interrelación de los factores mostrado mediante el diagrama de cajas y bigotes de: Adición a la muestra de tierra de Detergente aniónico Ácido (DA) o de Detergente aniónico Básico (DB); Utilización de solución de flotación de Azúcar (AZ) o de Sulfato de Zinc (ZC); Con Homogenización mecánica de la muestra previo al proceso de flotación (CH) o sin Homogenización (SH).

que, según el Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales³¹, se encuentra en el 86% de los suelos de la Provincia de Valdivia. Es un suelo que deriva de cenizas volcánicas cuyo principal componente es silicio y arcilla; es de consistencia altamente porosa, que no permite la acumulación de agua pero que es capaz de retener una gran cantidad de humedad. Esto último puede ser un factor importante para la conservación de los huevos de *T. canis*.

La regularidad con que se contaron previamente los huevos en 56 alícuotas de 0,1 ml de suspensión ($351,9 \pm 63,0$), dio la seguridad que la cantidad de huevos adicionada a las muestras de tierra que se sometieron al análisis era comparable.

Tabla 1. Huevos de *Toxocara canis* recuperados de tierra mediante las combinaciones de los factores: Adición a la muestra de tierra de Detergente aniónico Ácido (DA) o de Detergente aniónico Básico (DB); Utilización de solución de flotación de Azúcar (AZ) o de Sulfato de Zinc (ZC); Con Homogenización mecánica de la muestra previo al proceso de flotación (CH) o sin Homogenización (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%

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 (Quix®) que el aniónico básico (Foam Degreaser®). En la literatura se cita el detergente «Tween 40, 60 y 80» como el más utilizado para ser agregado a las muestras de tierra^{13,20,25,34,37}. 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. Se concluyó que el detergente Quix® en una solución de 8,3 ml en 500 ml de agua, es más apropiado para obtener huevos de ascárides de muestras de tierra de tipo Trumao. No se pudo encontrar una razón al resultado obtenido. También se concluyó que el no botar el sobrenadante con detergente después de cada centrifugación, contrario a lo descrito en el paso 06 de la técnica descrita en Hannover³⁰, mejoraba la recuperación de los huevos a un 50,9%. Es posible que en el sobrenadante se encuentre una cantidad de huevos en suspensión y resultó ser buena la decisión de no botar el sobrenadante y sólo rellenar el tubo con una pequeña cantidad para permitir la próxima flotación y adición de los huevos al portaobjetos.

Al comparar la solución saturada de sulfato de Zinc con la solución de azúcar que se describía en la técnica original³⁰, 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 25 g de tierra de tipo «Trumao». Es posible que la mayor densidad haya sido decisiva, pero también hay que mencionar que con la solución de azúcar se formaban muchas burbujas que entorpecían la visualización de los huevos. No es posible comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con los de la literatura revisada y sólo se puede recomendar probar la solución de flotación elegida utilizando el tipo de tierra más frecuente del sector que se desea muestrear.

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^{11,15,18,25}, que señalan que la homogenización o agitación de la tierra contaminada después de la adición de la sustancia de flotación no es de importancia. Ello probablemente se deba a que los huevos son

menos densos que las partículas de tierra y durante el proceso de centrifugación formen una capa sobre el sedimento compactado y que es susceptible a flotarse fácilmente. Sin embargo, se optó por incluir la homogenización de la muestra después de cada centrifugación porque los resultados eran levemente superiores.

Para comprobar la constancia de la recuperación de huevos se realizaron 20 muestras adicionales 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 indica 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. 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 por muestra aproximadamente 10 minutos 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 es 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 tierra³⁸⁻⁴², ninguno de los trabajos indica la prueba local previa de la efectividad de las técnicas utilizadas. El presente trabajo cumplió con los objetivos de armar, adaptar localmente, probar y perfeccionar la más eficiente y documentada de las técnicas encontradas en la literatura³⁰ para obtener huevos de ascárides de muestras de tierra.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA MODIFICADA EN LA UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE:

Todo el material de vidrio o de plástico que entra en contacto con huevos de *T. canis*, debe siliconizarse. Puede utilizarse cualquier silicona en forma de spray.

Paso 01. A cada bolsa con 25 g de tierra tipo «Trumao», se le agrega 75 ml de solución de detergente industrial aniónico ácido Quix® (8,3 ml detergente en 500 ml de agua).

Paso 02. Las bolsas se sellan, dejando en su interior una pequeña cantidad de aire.

Paso 03. Las bolsas se lavan 15 minutos (30 ciclos) en una máquina lavadora automática con el programa de lavado de lana.

Paso 04. El contenido de cada bolsa se vacía en un vaso de centrifuga de 100 ml. Se agrega agua y con una baqueta se homogeniza el contenido en forma manual.

Paso 05. Se centrifuga 3 minutos a 750 G, y luego se bota el sobrenadante.

Paso 06. Se agrega la solución de Sulfato de Zinc (densidad 1,38 a 25 °C) al sedimento y nuevamente se homogeniza en forma manual.

Paso 07. Se deja reposar 15 minutos para que floten los huevos de *T. canis*.

Paso 08. Sobre el borde del vaso de centrifuga, se coloca un portaobjetos y se llena el vaso con la solución de Sulfato de Zinc hasta que tope el portaobjetos.

Paso 09. Pasados 30 minutos se extrae mediante una pipeta parte de la suspensión del fondo del vaso de precipitado hasta que se desprende el menisco del portaobjetos.

Paso 10. Se levanta e invierte el portaobjetos, donde deben encontrarse adheridos los huevos de *T. canis*, y se cubre la muestra con un cubreobjetos.

Paso 11. Se coloca un segundo portaobjetos y se llena nuevamente el vaso con solución de sulfato de Zinc, para obtener una segunda flotación de los huevos de *T. canis*.

Paso 12. Las 2 preparaciones se observan al microscopio y se cuentan los huevos encontrados que se expresan en «huevos por 25 g de tierra».

RESUMEN

Con el fin de armar una técnica 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 una técnica descrita en Hannover, Alemania, 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 de la técnica 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% ($p < 0,05$) 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 Hannover se aumentó su sensibilidad y es posible recuperar regular y cuantitativamente huevos de *T. canis* de muestras de suelo de tipo Trumao.

REFERENCIAS

- 1.- KAYES S. Human toxocariosis and the visceral larvae migrans syndrome correlative immunopathology. *Chem immunol* 1997; 66: 99-124.
- 2.- SOULSBY E J L. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ª Edición. Nueva Editorial Interamericana S.A., México D.F 1987.
- 3.- GLICKMAN T, SCHANTZ P. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidem Rev* 1981; 3: 230.
- 4.- LIEBMANN H. Der heutige Stand der Reinigung von Schlachthofabwässer mit besonderer Berücksichtigung der Veterinärparasitologischen Probleme. *J Vet Med B* 1970; 10: 312-5.
- 5.- ENIGK K. Resistenz der Dauerformen von Endoparasiten der Haustiere. *Berl Munch Tierärztl Wschr* 1979; 92: 491-7.
- 6.- VAN KNAPEN F, FRAICHMONT J, OTTER G. Steam Sterilization of sandpits infected with *Toxocara* eggs. *Br Med J* 1979; 1: 1320.
- 7.- SCHULZ S, KROEGER A. Soil contamination with *Ascaris lumbricoides* eggs as an indicator of environmental hygiene in urban areas of north-east Brazil. *J Trop Med Hyg* 1992; 95: 95-103.

- 8.- CHIEFFI P, MÜLLER E. 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 1978; 38: 13-6.
- 9.- BORG O, WOODDRUFF A W. Prevalence of infective ova of *Toxocara* species in public places. Br Med J 1973; 4: 470-2.
- 10.- PEGG J. Dog roundworms and public health. Vet Res 1975; 97: 78.
- 11.- VIENS P. Visceral larva migrans in Montreal: the tip of the iceberg. Bordeaux Medical 1977; 10: 697-8.
- 12.- DADA B, LINDQUIST W. Prevalence of *Toxocara spp.* Eggs in some public grounds and highway rest areas in Kansas. J Helminthol 1979; 53: 145-6.
- 13.- DUBIN S, SEGALL S, MARTINDALE J. Contamination of soil in two city parks with canine nematode ova including *Toxocara canis*, a preliminary study. Am J Public Health 1975; 65: 1242-5.
- 14.- BARRIGA O. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocarasis and the possibilities of immunological control. Vet Parasitol 1988; 29: 195-234.
- 15.- DEUMER R. 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 1984.
- 16.- BOZDECH V. Zur Larven-Toxocarose des Menschen. I. Eifunde in Prager Parkanlagen. Angew Parasitol 1981; 22: 71-7.
- 17.- WORLD HEALTH ORGANISATION. Soil transmitted helminths. Technical Report 1964; 277: 1-69.
- 18.- DADA B. Studies on flotation techniques for the recovery of helminth eggs from soil and the prevalence of eggs of *Toxocara spp* in some Kansas public places. J Am Vet Med Assoc 1979; 174: 1208-10.
- 19.- WOODRUFF A W, SHAH A J. Improved method of recovery species ova from soil. Brit Med J 1976; 3: 621.
- 20.- QUINN R, SMITH HV, BRUCE RG, GIRWOOD RW. 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 1980; 84: 83-9.
- 21.- KÖHLER G, JÖRREN R, VAN KAPEN F. Untersuchungen zur Kontamination von Spielkastensänden mit Eiern von Flieschfresseraskariden. Bundesgesundheitsblatt 1980; 23:
- 22.- LABORDE C, BUSSIERAS J, CHERMETTE R. Recherche des oeufs de *Toxocara spp.* dans le sol des Jardins Public de Paris. Prophylaxis des infestations humaines. Rec Med Vet 1980; 145: 611-27.
- 23.- REGO A. Comunicacao do dolo de parques e pracas de Lisboa por ovos de *Toxocara* e outros helmintos. An. Escola sup. Med Vet Lisboa 1980; 22: 151-62.
- 24.- HÖRCHNER F, UNTERHOLZNER J, FRESE K. Zum Vorkommen von *Toxocara canis* und anderer Endoparasiten bei Hunden in Berlin (West). Berl Münch Tierärztl Wschr 1981; 94: 220-3.
- 25.- KAZACOS K. Improved method for recovering ascarid and other helminth eggs from soil associated with epizootic and during survey studies. Am J Vet Res 1983; 44: 896-900.
- 26.- NUNES C, SINHORINI I, OGASSAWARA S. Influence of soil texture in the recovery of *Toxocara canis* eggs by flotation method. Vet Parasitol 1994; 53: 269-74.
- 27.- AJALA M, ASAOLU S. Efficiency of the salt flotation technique in the recovery of *Ascaris lumbricoides* eggs from the soil. J Helminthol 1995; 69: 1-5.
- 28.- RUIZ DE IBÁÑEZ M, GARIJO M, GOYENA M, ALONSO F. Improved methods for recovering eggs of *Toxocara canis* from soil. J Helminthol 2000; 74: 349-53.
- 29.- OGE H, OGE S. Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. Vet Parasitol 2000; 92: 75-9.
- 30.- HORN K, SCHNIEDER T, STOYE M. Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. J Vet Med B 1990; 37: 241-50.
- 31.- INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE RECURSOS NATURALES. CORFO-UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE. Suelos Provincia de Valdivia. Universidad Austral de Chile 1978.
- 32.- SOFTWARE STATISTICA 6.0. 1999. Start Soft Cop OK, Windows 2000.
- 33.- ZAR J H. Biostatistical analysis. Fourth edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 1999.
- 34.- BOREHAM P, CAPON A. Environmental contamination with canine zoonotic helminths in Brisbane. Austr Vet Pract 1982; 12: 14-8.
- 35.- DUNSMORE J, THOMPSON R, BATES I. Prevalence and survival of *Toxocara canis* in the urban environment of Perth, Australia. Vet Parasitol 1984; 16: 303-11.
- 36.- HORN K. Untersuchungen über das Vorkommen exogener Stadien humanpathogener Darmhelminthen der Fleischfresser im Sand öffentlicher Kinderspielplätze in Hannover. Tesis Dr. med. vet. Tierärztliche Hochschule Hannover, Alemania 1986.
- 37.- CHILDS J. The prevalence of *Toxocara* species ova in backyards and gardens of Baltimore, Maryland. Am J Public Health 1985; 75: 1092-4.
- 38.- TAGLE I. Importancia del Género *Toxocara*, en la producción del síndrome "larva migrans visceral". Bol Chil Parasitol 1962; 17: 77-9.
- 39.- ALCAÍÑO H, TAGLE I. Estudios sobre enteroparasitosis del perro en Santiago. Bol Chil Parasitol 1970; 25: 5-8.
- 40.- ARIAS J. Contribución al estudio de los metazoos parásitos del perro. Agri Tec 1974; 4: 59-71.
- 41.- CASTILLO D, PAREDES C, ZAÑARTU C, CASTILLO G. Contaminación ambiental por huevos de *Toxocara sp.* en algunas plazas y parques públicos de Santiago de Chile. 1999. Bol Chil Parasitol 2000; 55: 86-91.
- 42.- ARMSTRONG W. Presencia de parásitos del perro (*Canis familiaris*) en parques y plazas públicas de la ciudad de Temuco, IX Región, Chile. Tesis Med. Vet. Facultad de Acuicultura y Ciencias Veterinarias, Universidad Católica de Temuco. 2003.

Correspondencia a:
e-mail: gsievers@uach.cl