

Identificación molecular del *Toxocara canis* en caninos del cantón Salcedo, Ecuador

Molecular identification of *Toxocara canis* in canines in Salcedo canton, Ecuador



Edilberto Chacón Marcheco¹
Blanca Toro Molina¹
Marco Atamba Yépez¹
Mayra Milán Chariguaman¹
Lucía Silva Déley¹

<https://orcid.org/0000-0001-9590-6451>
<https://orcid.org/0000-0003-3772-5200>
<https://orcid.org/0000-0002-9950-1758>
<https://orcid.org/0000-0003-1087-3123>
<https://orcid.org/0000-0002-6660-8102>

¹ Universidad Técnica de Cotopaxi, UTC | Latacunga - Ecuador | CP 050101

✉ edilberto.chacon@utc.edu.ec

<http://dx.doi.org/10.26423/rctu.v9i1.679>
Páginas: 66- 74

Resumen

Los nematodos constituyen un importante problema de salud pública, por ello, la identificación del *Toxocara canis* de aislamientos en caninos del cantón Salcedo, provincia Cotopaxi, Ecuador, mediante la secuenciación de la región del segundo espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosómico (ADNr), constituye una herramienta eficaz abordada en el presente estudio. Fueron muestreados parásitos adultos del género *T. canis*. El método fenol-cloroformo permitió la extracción de ADN. La amplificación por PCR se realizó utilizando primers específicos y el producto secuenciado mediante electroforesis capilar. Fueron secuenciados 383 pb de gen ITS-2 del ADN ribosómico. La identidad de cada aislado fue confirmada mediante el algoritmo NCBI BLAST. Los árboles filogenéticos fueron construidos utilizando el programa MEGA X. Los 20 aislados de caninos se identificaron como *Toxocara canis*, cuando se compararon con secuencias previamente depositadas en el GenBank. El árbol filogenético confirmó la identidad de los aislados estudiados, como pertenecientes al género *Toxocara*, particularmente *T. canis*.

Palabras clave: nematodos, región ITS-2, ADN ribosomal, PCR

Abstract

Nematodes constitute an important public health problem, therefore, the identification of *Toxocara canis* from canine isolates in the city of Salcedo, Cotopaxi province, Ecuador, by sequencing the second internal transcribed spacer region (ITS-2) of ribosomal DNA (rDNA), constitutes an effective tool addressed in the present study. Adult parasites of the genus *T. canis* were sampled. The phenol-chloroform method allowed DNA extraction. PCR amplification was performed using specific primers and the product was sequenced by capillary electrophoresis. A total of 383 bp of the ITS-2 ribosomal DNA gene were sequenced. The identity of each isolate was confirmed using the NCBI BLAST algorithm. Phylogenetic trees were constructed using the MEGA X program. The 20 canine isolates were identified as *Toxocara canis*, when compared with sequences previously deposited in GenBank. The phylogenetic tree confirmed the identity of the studied isolates as belonging to the genus *Toxocara*, particularly *T. canis*.

Keywords: nematodes, ITS-2 region, ribosomal DNA, PCR.

Recepción: 25 marzo 2022 | Aprobación: 12 mayo 2022 | Publicación: 30 junio 2022

1. Introducción

Los nematodos constituyen un importante problema de salud pública, generan potenciales riesgos de enfermedades infecciosas o zoonóticas, como las parasitosis.

Entre los parásitos intestinales más comunes que afectan a caninos y felinos domésticos y silvestres, se encuentran el *Toxocara* y *Toxascaris*, pudiendo causar un importante impacto en la salud pública, especialmente las especies de *Toxocara* [1, 2, 3].

Los humanos son huéspedes accidentales de *Toxocara spp.* y se infectan a través de la ingestión de huevos infecciosos del medio ambiente o de artículos contaminados con heces de animales infectados, como es el caso del contacto con áreas de tierra que los contienen. Luego, las larvas liberadas en el intestino migran hacia los tejidos, provocando síntomas clínicos que incluyen larva migrans visceral, ocular larva migrans, meningoencefalitis eosinofílica, toxocariasis encubierta y toxocariasis neurológica [3].

Las características morfológicas y las preferencias del hospedero han sido empleadas para la identificación de especies, pero estas claves y descripciones existentes en ocasiones son insuficientes para el diagnóstico, particularmente cuando se requiere diferenciación dentro y entre *Toxocara spp.* y *Toxascaris spp.*, especialmente en las etapas de larva y huevo [1, 4].

En particular, la detección de los parásitos nematodos como *Toxocara canis*, *Toxocara cati* y *Toxocara leonina* se realiza fundamentalmente a través de análisis microscópico y pruebas serológicas. Sin embargo, ambos métodos resultan insuficientes para diferenciar especies estrechamente relacionadas como lo son el *T. canis* y el *T. cati*.

El diagnóstico molecular es un método que se encuentra en continuo desarrollo, permitiendo la detección e identificación con precisión de los nematodos ascaridoides. Las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando marcadores genéticos tanto del genoma nuclear, como mitocondrial, han evolucionado el diagnóstico parasitario hacia una mayor especificidad y rapidez. Como en el caso del segundo espaciador transcrito interno (ITS-2) utilizado para identificar nematodos en perros (*Canis lupus familiaris*), zorros (*Vulpes vulpes*) y gatos (*Felis catus*), permite la identificación precisa.

Por ello, la identificación del *Toxocara canis* de aislamientos en caninos del cantón Salcedo, provincia Cotopaxi (Ecuador), mediante la secuenciación de la región del espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosómico (ADNr), constituye el objetivo del presente estudio.

2. Materiales y métodos

La investigación se realizó en los barrios del cantón Salcedo, ubicados al sur-oriente de la provincia de Cotopaxi, en la región interandina o Sierra del Ecuador. Particularmente, en la parroquia urbana San Miguel y las parroquias rurales: Antonio José Holguín, Cusubamba, Mulalillo, Mulliquindil y Panzaleo.

2.1. Muestreo

Fueron muestreados 106 caninos domésticos (con hogar y callejeros) de diferentes edades y sectores de la zona de estudio. Creo que aquí se podría indicar si los animales son domésticos o callejeros (de ser posible).

Para determinar la presencia de *Toxocara canis* en los caninos se utilizó la técnica de flotación de Sheather (método de concentración por flotación con centrifugación en una solución de azúcar), que permite diagnosticar diversas infecciones parasitarias en perros, gatos y otras especies.

Los caninos positivos al examen coprológico fueron desparasitados, se empleó Bongo Forte (Pamoato de pirantel 75 mg, Praziquantel 25 mg, aceite de hígado de bacalao 40 mg, equivalentes a 1 ml x cada 5 kg de peso).

La recolección de los parásitos adultos se realizó al siguiente día, se obtuvieron entre 2 a 6 parásitos de cada canino, expulsados en las deposiciones. Los parásitos fueron lavados para evitar que la materia fecal dañe la estructura y afecte las siguientes fases del procedimiento. Posteriormente, los parásitos fueron colocados en frascos con alcohol al 70 %, debidamente rotulados con el código que identifica la zona y la edad del canino.

2.2. Disección de los parásitos adultos

La preparación de las muestras se realizó en el Laboratorio de Biología y Parasitología de la Universidad Técnica de Cotopaxi, fueron seleccionados parásitos adultos machos, diferenciados de las hembras por su morfología. Se colocó cada parásito en una placa de Petri, identificando la cola y diseccionando el último tercio. Con una balanza analítica se procedió a pesar la parte diseccionada, realizando varios cortes. Para el envío al laboratorio de las porciones seleccionadas, se las colocó en tubos Eppendorf (microtubo) identificados con su código Tox-S, añadiendo 1 ml de alcohol al 70 % para garantizar la conservación de las muestras hasta el análisis en el laboratorio de genética molecular.

2.3. Extracción de ADN

El análisis molecular de las muestras se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Universidad de las Américas, UDLA (Quito, Ecuador).

Fue extraído el ADN de una porción de tejido de cada parásito mediante el método fenol-cloroformo:

- Diseccionar 2 mm de la muestra de tejido y transferirla a un nuevo tubo de 1,5 mL.
- Añadir 500 µL de buffer de extracción y macerar con una punta de pipeta o pistilo por 5 minutos al interior de un bloque frío.
- Realizar mezcla (vortex) por 1 minuto y colocar 5 µL de proteinasa K (20 mg/mL).
- Incubar las muestras a 56°C toda la noche en agitación, a 300 rpm.
- Extraer las muestras del termobloque, dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 750 µL de fenol/cloroformo/isoamílico y realizar vortex hasta formar una emulsión lechosa.
- Centrifugar 10 minutos a 4°C a máxima velocidad. Transferir toda la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1,5 mL.
- Añadir a esa fase, 500 µL de cloroformo: isoamílico, homogeneizar en vortex.
- Centrifugar 10 minutos a 4°C a máxima velocidad. Transferir toda la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1,5 mL.
- Añadir al nuevo microtubo, 400 µL isopropanol 100 % y 40 µL de NaCl 3M.
- Agitar bien y dejar reposar a temperatura ambiente por dos horas.
- Centrifugar por 30 minutos a 4°C a 15 000 rpm.
- Descartar el sobrenadante con mucho cuidado de no alterar el pellet.
- Agregar 1 000 uL de etanol 70% helado y centrifugar por 15 min a 15 000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y dejar secar.
- Resuspender en 40 µL de agua Milli Q o TE e incubar la muestra a 37°C por dos horas.
- Cuantificar la concentración de ADN.

2.4. Cuantificación y dilución de muestras de ADN

La cuantificación de las concentraciones de ADN se realizó mediante un espectrofotómetro (NanoDrop), posteriormente se procedió a diluir cada muestra hasta alcanzar una concentración final de 5 ng/uL (Tabla 1). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Tabla 1: Diluciones de las muestras de ADN de *Toxocara canis*

Diluciones			
Volúmen final (L)			20
Concentración final (ng/ L)			5
ID muestra	C. Inicial	V. ADN	V. Agua
T001	21	4,76	15,24
T002	128,5	0,78	19,22
T003	189,7	0,53	19,47
T004	42,8	2,34	17,66
T005	55,4	1,81	18,19
T006	86,8	1,15	18,85
T007	201,1	0,50	19,50
T008	99	1,01	18,99
T009	18,6	5,38	14,62
T010	130,6	0,77	19,23
T011	159,7	0,63	19,37
T012	61,6	1,62	18,38
T013	55,1	1,81	18,19
T014	89,1	1,12	18,88
T015	224,8	0,44	19,56
T016	222,3	0,45	19,55
T017	80,6	1,24	18,76
T018	54,8	1,82	18,18
T019	237,5	0,42	19,58
T020	143,8	0,70	19,30

2.5. Amplificación de los fragmentos

La amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosómico (ADNr) se realizó utilizando el par de cebadores (primers) específicos para la especie parasitaria en estudio, estos fueron diseñados por investigadores de la Universidad Técnica de Cotopaxi-UTC y la Universidad de las Américas-UDLA:

- 5'-ATCGATGAAGAACGCWGC-3' directo
- 5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3' inverso

Las reacciones de PCR fueron realizadas a un volumen final de 15 µl para cada muestra (Tabla 2).

Tabla 2: Componentes para la PCR de amplificación del ITS-2 del ADNr.

Componente	C. Inicial	C. Final	Vol. 1 Rx (µL)	Vol. 60 Rx (µL)
Agua MQ			8,8	528
Buffer	10X	1X	1,5	90
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,45	27
dNTP Mix	10 mM	0,2	0,3	18
Primer Fw	20 µM	0,5 µM	0,375	22,5
Primer Rv	20 µM	0,5 µM	0,375	22,5
Taq Polimerasa*	10 U/µL	2 U/µL	0,2	12
ADN	5 ng/µL	1 ng/µL	3	
Volúmen Final			15	

Nota: * Platinum® Taq DNA polymerase, Ref: 10966-034

Los fragmentos generados por PCR mediante el uso de termocicladores, siguieron las siguientes condiciones: temperatura inicial de desnaturalización de 94°C por 2 min (1 ciclo), seguido de 35 ciclos continuos de (desnaturalización a 94°C por 1 min, acoplamiento de los primers a 58°C por 30 seg, extensión a 72°C por 1

min y una extensión final de los productos a 72°C por 5 min), finalizando con 10 min de reposo a 4°C.

Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 2%, para verificar su presencia. Los geles fueron coloreados con SYBR Safe, sobre luz ultravioleta. En cada caso se corrió un control negativo para verificación de contaminación.

2.6. Purificación y Secuenciación

El producto amplificado fue secuenciado con kit de secuenciación BigDye v3.1 (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación fueron purificadas mediante acción enzimática, protocolo basado en resina de filtración en gel. Se empleó la matriz de secuenciación Sanger (BigDye - 3.1), desarrollando la secuenciación en electroforesis capilar.

2.7. Alineamiento de las secuencias

Las secuencias del gen ITS-2 (ADNr) de *T. canis* obtenidas en el estudio fueron editadas y alineadas inicialmente en el programa MEGA X [5], a partir de la secuencia de referencia (MK309928.1) disponible en el GenBank [6].

2.8. Análisis estadísticos

2.8.1. Identificación molecular

La identidad de cada uno de los aislados fue confirmada mediante una búsqueda de similitud, al comparar su secuencia de nucleótidos con otras secuencias de nematodos ascaridoides disponibles en el GenBank, a partir del algoritmo NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.8.2. Análisis Filogenético

Los árboles filogenéticos fueron generados entre secuencias de la región del espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosómico (ADNr) de *T. canis*, pertenecientes al estudio y la comparación con otras secuencias depositadas en el GenBank con los números de acceso: MK447598, MK447599 [7], MK309928 [6], MK728991, MK728992 [8], JN617989 [9], KP406763 [10], para *Toxocara canis*; KY003089, KY003091, KY003065, KY003080 [11] para *Toxocara cati*; KT737382 [12], FJ418784 [13], KJ777160 [14], MK100346 [15] pertenecientes a *Toxocara vitulorum* y MT341323 [16] secuencia de *Ascaris suum*. La construcción de dichos árboles se desarrolló utilizando el método NJ (neighbor-joining). La confiabilidad de los árboles obtenidos se determinó con un test de replicaciones (bootstrapping) con 1 000 réplicas, mostrado junto a las ramas. Todos los análisis se realizaron en el programa MEGA X [5].

3. Resultados y discusión

La población de caninos estudiados pertenecía a diferentes edades, desarrollados en variadas condiciones de vida lo que podría afectar el grado de parasitosis. Del total de perros estudiados (106 animales), 16 resultaron positivos a la presencia de huevos de *Toxocara canis*, representado un 16.96% de prevalencia.

La distribución a nivel global de la infección por *Toxocara canis* en perros varía de 0 a 99,4%, con altas tasas de prevalencia en perros y en humanos en Latinoamérica, tal como ha sido descrito por Guarín (2014) al realizar una revisión sistemática y evaluando la situación de la toxocariasis en algunos países de Latinoamérica. Particularmente en países como Argentina se han reportado valores de prevalencia que oscilan entre 9 y 19%, Brasil en el rango de 5 – 39% y Chile de 13,5 – 19%, a partir de hallazgos reportados en estudios epidemiológicos de prevalencia de toxocariasis, encontrando parásitos adultos y huevos en muestras fecales de perros y huevos en suelos, en plazas públicas y parques de zonas urbanas, fundamentalmente. Evidenciando el problema de salud pública, que puede generarse por esta causa [17].

3.1. Identificación molecular

En el estudio fueron secuenciados un total de 383 pb de la región del gen ITS-2 del ADN ribosómico (ADNr) de *T. canis* aislados de caninos del cantón Salcedo, en Cotopaxi.

Los 20 aislados se identificaron como *Toxocara canis* cuando se compararon con secuencias previamente depositadas en el GenBank mediante el algoritmo BLAST (Figura 2), mostrando un 100% de identidad para *T. canis* en relación a las secuencias MK728991 y MK728992, reportadas por Gnani [8] quien desarrolló la detección y caracterización molecular de helmintos de importancia zoonótica transmitidos por el suelo, en Andhra Pradesh, India.

Los resultados han servido como análisis primario para la confirmación de los aislamientos en caninos del cantón Salcedo como *T. canis* y pudiera constituirse como la primera caracterización molecular en adultos de *T. canis* en el Ecuador.

Siendo de mayor importancia, al considerar los criterios de Huang *et al.* (2017), quienes demuestran que las herramientas moleculares como la PCR convencional resultan de gran importancia en el diagnóstico de especies parasitarias como los nematodos, debido a su elevada especificidad y sensibilidad [18], muy útiles en casos donde las similitudes entre los huevos y los estados larvarios de los helmintos entorpecen la identificación entre especies.

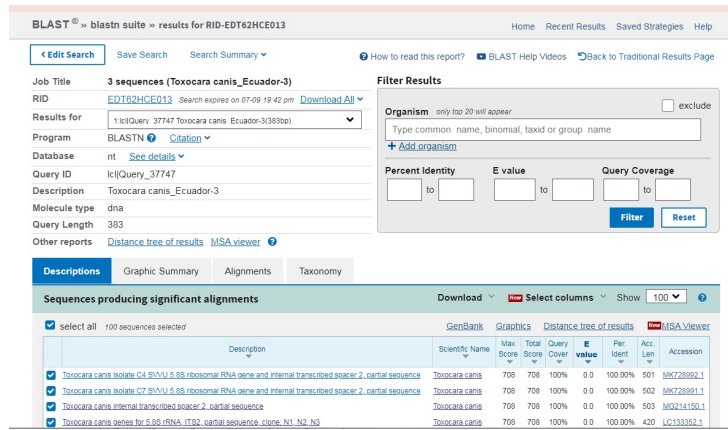


Figura 1: BLAST (porcentaje de identidad) entre secuencias de ITS-2 del ADNr (383 pb) de los aislados *Toxocara canis* y otras secuencias recuperadas del GenBank

El presente estudio confirmó que la secuencia de la región del espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosómico (383 pb) de *T. canis*, es una región muy conservada (Figura 2), tal como había sido planteado en otros estudios donde se describe que la región ITS contiene dos regiones no codificadoras variables que se encuentran dentro de las repeticiones altamente conservadas del ADNr, entre la subunidad pequeña, la región para 5.8S y los genes para ADNr de la subunidad grande [19].

Por ello, estas regiones del ADNr son las comúnmente estudiadas entre los tres genes codificantes (18S, 5.8S, y 28S) y los dos espaciadores internos (ITS1 e ITS2). Aspecto también descrito por Wickramasinghe *et al.*, (2009) a partir de la caracterización molecular, discriminación y análisis filogenético del *Toxocara canis* y *Toxocara vitulorum*, basado en genes mitocondriales y ribosomales, entre ellos el ITS-2 y 28S [13].

Estudios basados en el ADN para identificar las especies de nematodos, particularmente utilizando fragmentos de la región ITS del ADN ribosomal demuestran la eficacia de las técnicas moleculares en estudios epidemiológicos [20]. Otros análisis genéticos desarrollados en la provincia de Guangdong en China, permitieron dilucidar la epidemiología, la genética y la biología del *Toxocara cati* [11]. Es por ello que, las secuencias altamente conservadas del gen 5.8S, han sido utilizadas como punto de unión de cebadores universales para amplificar las regiones espaciadoras flanqueantes, y que el ITS1 e ITS2 resultan de gran utilidad para establecer relaciones filogenéticas. Quedando demostrado la importancia de los estudios basados en el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa, ya sea utilizando marcadores genéticos del ADN ribosómico y/o del ADN mitocondrial, por ser efectivos en la identificación y diferenciación de ascaridoides a nivel de especie [5].

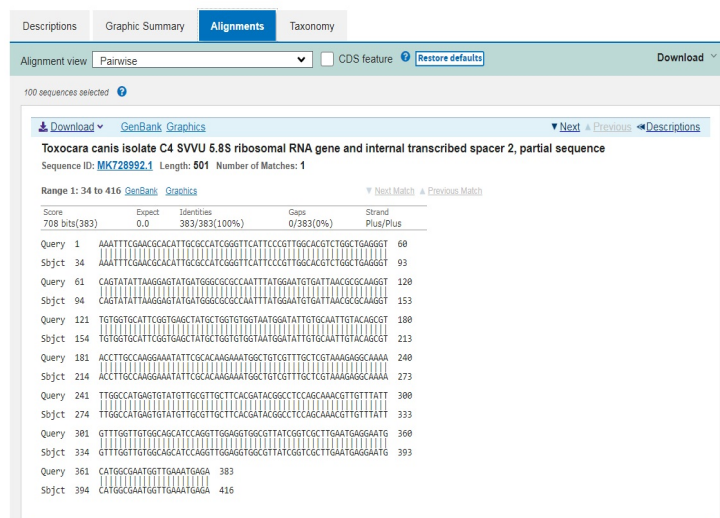


Figura 2: Alineamiento entre secuencias de ITS-2 del ADNr (383 pb) de los aislados *Toxocara canis* y otras secuencias recuperadas del GenBank

Coincidiendo con Pérez (2009) sobre la importancia de la identificación de parásitos cuando se suman otras técnicas como las moleculares, ya que permiten investigar diferencias entre algunas especies crípticas de parásitos [21], siendo aplicadas por ejemplo para estudiar la variación intraespecífica entre las secuencias ITS de *Toxocara canis*, *Toxocara cati* y *Toxascaris leonina* de diferentes especies hospedantes en el suroeste de Polonia, amplificando las regiones del espaciador transcrito interno (ITS)-1 e ITS-2 del ADN ribosómico, identificando con eficacia aspectos asociados a la variabilidad intraespecífica [20].

3.2. Análisis Filogenético

En estudios sobre filogenética de especies parasitarias, autores como Pérez-Tris *et al.*, (2007) y Hellgren *et al.*, (2007) han referido la trascendencia de las técnicas moleculares como apoyo de la taxonomía tradicional, donde las especies morfológicas forman grupos de linajes recíprocamente monofiléticos: grupos cuyos miembros descienden todos de un ancestro común [21, 22].

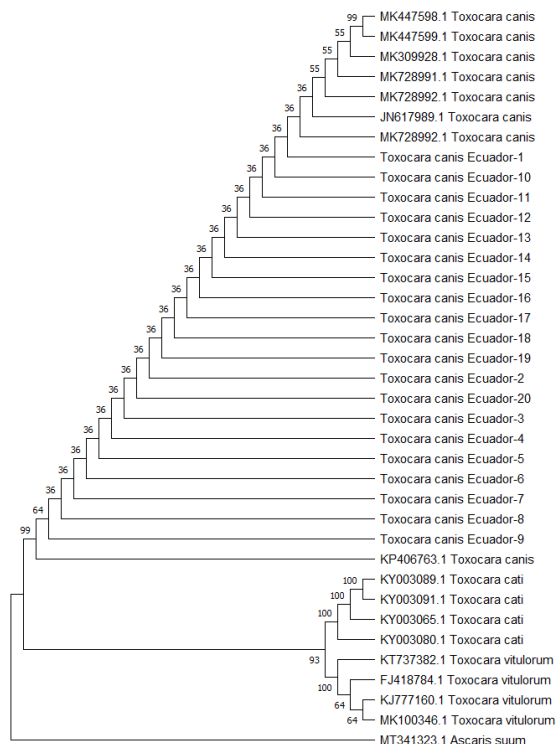
De esta forma, al realizar análisis que incluyen simultáneamente varias fuentes de información como es el caso de caracteres morfológicos y la secuenciación de ADN nuclear o mitocondrial, se

logran mayores resultados, pues implica mayor rigor en la prueba de corroboración de caracteres.

A decir de Villalobos-Cid (2019), la comparación de topologías de árboles (como están unidas las ramas o el patrón de ramificación) puede ser utilizada para explorar la historia evolutiva global de la especie, abriendo la posibilidad de una evaluación más amplia [23].

En este sentido, el árbol filogenético resultante de esta investigación y basado en secuencias ITS-2 (Figura 3) muestra la formación de dos agrupamientos principales, el primero de ellos para las secuencias de *Toxocara canis* de aislamientos en caninos del cantón Salcedo junto a las secuencias de referencia de *T. canis* reportadas por varios autores [6, 10], confirmando la identidad de los aislados estudiados como pertenecientes al género *Toxocara*, particularmente la especie *T. canis*.

Las secuencias de *Toxocara cati* [12] y de *Toxocara vitulorum* [13, 14] se muestran distantes formando grupos independientes, lo cual corrobora la identificación del *T. canis*. La secuencia de *Ascaris suum* [16] se emplea como taxón externo al grupo de estudio.



Nota: Los valores de Bootstrap para 1000 réplicas se muestran para cada agrupamiento.

Figura 3: Árbol de relaciones filogenéticas según el algoritmo neighbor-joinin, basado en las secuencias de ITS-2 del ADNr (383 pb) de los aislados *Toxocaras canis* y otras secuencias recuperadas del GenBank.

Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Mahdy *et al.*, (2020) quien al realizar la caracterización molecular y el análisis filogenético de especies de *Toxocara* en perros, bovinos y búfalos en Egipto, concluyen que el gen ITS-2 es una buena herramienta sensible para la identificación de gusanos adultos de *Toxocara spp.*, diferenciando al *T. vitulorum* del *T. canis* en su estudio [24].

De igual manera, Pawar *et al.*, (2012) realizaron estudios del ADN amplificando la región del espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosómico, una región génica más apropiada y válida para diferenciar entre especies de *Toxocara* (*Toxascaris leonina* y *Toxocara cati*) [25].

En relación a este criterio otros autores demostraron que el ADN ribosómico (ADNr) es un marcador valioso, empleado frecuentemente para conseguir la identificación de parásitos de especies en *Toxocara* y *Toxascaris* [4, 6].

El árbol de relaciones filogenéticas desarrollado por Mahdy *et al.*, (2020), demuestra de forma clara el *T. vitulorum* y el *T. canis* forman dos agrupaciones, evidenciando la existencia de dos linajes diferentes [24].

4. Conclusiones

La secuenciación del gen ITS-2 del ADN ribosómico muestra ser una herramienta eficaz en la identificación del *Toxocara canis* aislados en caninos del cantón Salcedo, permitiendo esclarecer su epidemiología y caracterización genética.

5. Referencias

- HAJIPOUR, N. A survey on the prevalence of *Toxocara cati*, *Toxocara canis* and *Toxascaris leonina* eggs in stray dogs and cats' faeces in Northwest of Iran: a potential risk for human health. *Trop Biomed.* 2019, vol. 36, n.º 1, págs. 143-151. PMID: 33597434. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33597434/>.
- MA, Guangxu; HOLLAND, Celia; WANG, Tao; HOFMANN, Andreas; FAN, Chia; MAIZELS, Rick; HOTEZ, Peter y GASSER, Peter. Human toxocaríasis. *The Lancet Infectious Diseases.* 2018, vol. 18, págs. 14-24. Disp. desde DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30331-6.
- TORRES, Gabriela; COSTA, Paula; DE LIMA, Paula; AIRES, María y SCAINI, Carlos. Human toxocaríasis: Prevalence and factors associated with biosafety in research laboratories. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2016, vol. 95, n.º 6, pág. 1428. Disp. desde DOI: 10.4269/ajtmh.16-0196.
- FOGT-WYRWAS, Renata; DABERT, Mirosława; JAROSZ, Wojcieh; RZAD, Izabela; PILARCZYK, Bogumiła y MIZGAJSKA-WIKTOR, Hanna. Molecular data reveal cryptic speciation and host specificity in *Toxascaris leonina* (Nematoda: Ascarididae). *Veterinary parasitology.* 2019, vol. 266, págs. 80-83. Disp. desde DOI: 10.1016/j.vetpar.2019.01.002.
- KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; LI, Michael; KNYAZ, Chirstina y TAMURA, Koichiro. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution.* 2018, vol. 35, págs. 1547-1549. Disp. desde DOI: 10.1093/molbev/msy096.
- XIE, Yue; LI, Xiaobin; LIU, Yunjian; ZHOU, Xuan; WANG, Lu; HE, Ran; PENG, Xuerong y YANG, Guangyou. Molecular characterization of ascaridoid parasites from captive wild carnivores in China using ribosomal and mitochondrial sequences. *Parasites & vectors* [En línea]. 2020, vol. 13, n.º 1, págs. 1-16. Disp. desde DOI: 10.1186/s13071-020-04254-4.
- VALIZADEH, M.; TAHVILDAR, F.; SHAHROKHI, S.; GHANIMATDAN, M. y NAGAHZ, A. Sequencing and phylogenetic analysis of mitochondrial Cox1 and Nad1 genes in *Toxocara canis* and *Toxascaris leonina* isolates from Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine.* 2021, vol. 24, n.º 2.
- GNANI, Charitha. *Detection and molecular characterization of soil transmitted helminths of zoonotic significance in Andhra Pradesh.* (Doctoral Dissertation, Sri Venkateswara Veterinary University). Tirupati-517502. India, 2019.
- SHENG, Zhong. Characterization of *Toxascaris leonina* and *Toxocara canis* from cougar (*Panthera leo*) and common wolf (*Canis lupus*) by nuclear ribosomal DNA sequences of internal transcribed spacers. *African Journal of Microbiology Research.* 2021, vol. 24, n.º 2. Disp. desde DOI: 10.5897/AJMR12.414.
- BAUTISTA, L. *Detection and molecular characterization of soil transmitted helminths of zoonotic significance in Andhra Pradesh.* Universidad Autónoma del Estado de México, 56900, México, 2014.
- HE, Xi; LV, Meng; LUI, Guo y LIN, Rui. Genetic analysis of *Toxocara cati* (Nematoda: Ascarididae) from Guangdong province, subtropical China. *Mitochondrial DNA Part A.*

- 2018, vol. 29, n.º 1, págs. 132-135. Disp. desde DOI: 10.1080/24701394.2016.1258404.
12. CHELLADURAI, Jeba; BADER, Chris; SNOBL, Tymbric; MAGSTADT, Drew; COOPER, Vickie y BREWER, Matt. *Toxocara vitulorum* infection in a cohort of beef calves in Iowa. *Veterinary parasitology*. 2015, vol. 214, n.º 1-2, págs. 96-99. Disp. desde DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.10.004.
 13. WICKRAMASINGHE, Susiji; YATAWARA, Lalani; RAJAPAKSE, R. y AGATSUMA, Takeshi. *Toxocara canis* and *Toxocara vitulorum*: molecular characterization, discrimination, and phylogenetic analysis based on mitochondrial (ATP synthase subunit 6 and 12S) and nuclear ribosomal (ITS-2 and 28S) genes. *Parasitology research*. 2009, vol. 104, n.º 6, págs. 1425-1430. Disp. desde DOI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19221796/>.
 14. JEEVA, K.; CHATTERJEE, N.; BERA, A.; MAITI, S.; RAM, HIRA; BANERJEE, P.; GOSWAMI, T.; DAS, P.; CHAMUA, J.; MILTON, A.; ARAVIND, M.; BHUVANAPRIYA, G.; THILAGAVATHI, K.; GHOSH, S.; DEB, S. y BHATTACHARYA, D. *An initial molecular signature of Indian isolates of Toxocara*. 2015, vol. 85, n.º 7, págs. 709-713. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/280738152_An_initial_molecular_signature_of_Indian_isolates_of_Toxocara.
 15. CHAMUAH, J. *Toxocara vitulorum* isolate Medziphema, Nagaland 5.8 S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. India, 2018. Disponible en: <https://krishi.icar.gov.in/jspui/bitstream/123456789/28445/1/Toxocara%20vitulorum%20isolate%20Medziphema%2C.pdf>.
 16. KARADJIAN, Grégory; KAESTNER, Carolyn; LABOUTIÈRE, Lisa; ADICÉAM, Emilie; WAGNER, Tom; JOHNE, Annette; THOMAS, Myriam; POLACK, Bruno; MAYER-SCHOLL, Anne y VALLÉE, Isabelle. A two-step morphology-PCR strategy for the identification of nematode larvae recovered from muscles after artificial digestion at meat inspection. *Parasitology Research*. 2020, vol. 119, n.º 12, págs. 4113-4122. Disp. desde DOI: 10.1007/s00436-020-06899-7.
 17. GUARÍN, Camilo. *Situación de la Toxocariasis en algunos países de Latinoamérica: Revisión sistemática*. UNCol. Instituto de Salud Pública, Departamento de Salud Pública Bogotá, Colombia, 2020. N.º 12. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/50419>.
 18. HUANG, Danqiong; YAN, Guiping y SKANTAR, Andrea. M. Development of real-time and conventional PCR assays for identifying stubby root nematode. *Paratrichodorus allius*. *Plant disease*. 2017, vol. 101, n.º 6, págs. 964-972. Disp. desde DOI: 10.1094/PDIS-10-16-1431-RE.
 19. FERNÁNDEZ, Jenyfer; NANTÓN, Ana y MÉNDEZ, Josefina. Sequence characterization of the 5S ribosomal DNA and the internal transcribed spacer (ITS) region in four European Donax species (Bivalvia: Donacidae). *BMC genetics*. 2018, vol. 19, n.º 1, págs. 1-13. Disponible en: <https://bmcbgenomdata.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12863-018-0684-x>.
 20. FOGT-WYRWAS, R.; MIZGAJSKA-WIKTOR, H.; PACÓN, J. y JAROSZ, W. Intraspecific variation between the ITS sequences of *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* from different host species in south-western Poland. *Journal of Helminthology*. 2013, vol. 87, n.º 4, págs. 432-442. Disp. desde DOI: 10.1017/S0022149X1200048X.
 21. PÉREZ, Javier. La parasitología ecológica en la era de la genética molecular. *Ecosistemas*. 2009, vol. 18, n.º 1, págs. 52-59. Disponible en: <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/76>.
 22. HELLGREN, Olof; KRIZANAUSKIENE, Asta; VALKIUNAS, Gediminas y BENSCH, Staffan. Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome B lineages from six morphospecies of avian Haemoproteus (Haemosporida: Haemosporidae). *Journal of Parasitology*. 2007, vol. 93, n.º 4, págs. 889-896. Disp. desde DOI: 10.1645/GE-1051R1.1.
 23. VILLALOBOS, Manuel; SALINAS, Francisco; KESSI, Eduardo; DE CHIARA, Matteo; LITI, Gianni Liti; INOSTROZA, Mario y MARTÍNEZ, Claudio. Comparison of phylogenetic tree topologies for nitrogen associated genes partially reconstruct the evolutionary history of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microorganisms*. 2019, vol. 8, n.º 1, pág. 32. Disp. desde DOI: 10.3390/microorganisms8010032.
 24. MAHDY, A.; MOUSA, W.; ABDEL-MAOGOOD, S.; NADER, S. y ABDEL-RADI, S. Molecular characterization and phylogenetic analysis of species in dogs, cattle and buffalo in Egypt. *Helminthologia*.

- 2020, vol. 57, n.º 2, pág. 83. Disp. desde DOI: 10.2478/helm-2020-0013.
25. PAWAR, Rahul; LAKSHMIKANTAN, Uthandaraman; HASAN, Shakir; POORNACHANDAR, Anantula y SHIVAJI, Sisinthy. Detection and molecular characterization of ascarid nematode infection (*Toxascaris leonina* and *Toxocara cati*) in captive Asiatic lions (*Panthera leo persica*). *Acta Parasitologica*. 2012, vol. 57, n.º 1, págs. 67-73. Disp. desde DOI: 10 . 2478 / s11686 - 012 - 0012-y.



Artículo de **libre acceso** bajo los términos de una **Licencia Creative Commons Atribución - No comercial - Sin derivar 4.0 Internacional**. Se permite, sin restricciones, el uso, distribución, traducción y reproducción del documento, siempre que la obra sea debidamente citada.