



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**RECONOCIMIENTO DE ANTIGENOS SOMATICOS Y
EXCRETADOS-SECRETADOS DE LARVAS DE *Toxocara canis*
POR SUEROS DE PACIENTES CON DIFERENTES
MANIFESTACIONES CLINICAS DE TOXOCAROSIS
HUMANA**

HUGO MAURICIO CABALLERO VARGAS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUIA: DRA. GITTITH SÁNCHEZ PADILLA. DOCTOR EN CIENCIAS.

Financiamiento: Proyecto DID TNAC 24-02/02

SANTIAGO-CHILE

2005



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**RECONOCIMIENTO DE ANTIGENOS SOMATICOS Y
EXCRETADOS-SECRETADOS DE LARVAS DE *Toxocara canis*
POR SUEROS DE PACIENTES CON DIFERENTES
MANIFESTACIONES CLINICAS DE TOXOCAROSIS
HUMANA**

HUGO MAURICIO CABALLERO VARGAS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	: DRA. GITTITH SÁNCHEZ PADILLA.	:
PROFESOR CONSEJERO	: DR. FERNANDO FREDES MARTÍNEZ.	:
PROFESOR CONSEJERO	: DR. GUSTAVO FARIAS ROLDÁN.	:

SANTIAGO-CHILE

2005

Indice

Indice	iii
Resumen	iv
Summary	v
Introducción	1
Revisión bibliográfica	3
Hipótesis y objetivos	16
Material y método	17
Resultados	23
Discusión	36
Conclusiones	42
Bibliografía	43

Resumen

La toxocarosis humana es una de las helmintiasis zoonóticas más reportada en el mundo. Dependiendo del órgano afectado, pueden distinguirse varias manifestaciones clínicas: toxocarosis sistémica, que afecta a la mayoría de los órganos; toxocarosis ocular; toxocarosis asintomática y toxocarosis encubierta. Esto hace muy complicado el diagnóstico de esta enfermedad. El propósito del presente estudio es contribuir al conocimiento de la toxocarosis humana en Chile, especialmente en el diagnóstico, mediante el reconocimiento de antígenos específicos para las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad. Se usó la técnica de western blot y antígenos, tanto larvales somáticos (LS) como excretados-secretados (ES) de larvas de *Toxocara canis*, enfrentados a anticuerpos IgA e IgG. Los resultados muestran que existen antígenos definidos por su peso molecular (PM) que están presentes en ambos extractos antigénicos y que son reconocidos por las dos clases de inmunoglobulinas (27 y 20 kDa). El antígeno de 36 kDa presente en ambos extractos antigénicos y que sólo es reconocido por IgG. Otros antígenos sólo están presentes en LS (65 y 81 kDa), aunque también están presentes en otras parasitosis; o en ES (48 y 40 kDa). Algunos antígenos solamente fueron detectados cuando se utilizó un determinado extracto (LS o ES) con una clase de anticuerpos (101, 52, 45 y 15 kDa). Al seleccionar un antígeno específico en base a su PM, para cada una de las manifestaciones de toxocarosis humana, se observó que el mayor porcentaje de detección se obtuvo en la manifestación asintomática, con el antígeno de 40 kDa, en el sistema ES/IgA. También se analizó la presencia de antígenos específicos más frecuentes en una o dos manifestaciones de toxocarosis humana, determinándose paneles de antígenos específicos. Cuando se analizaron las 24 muestras de sueros de pacientes con otras parasitosis y negativas para toxocarosis humana, se observó reconocimiento cruzado de antígenos principalmente de PM superior a 50 kDa. Esto concuerda con lo reportado en literatura por otros autores y avala el uso de la técnica de western blot que permite diferenciar dichos antígenos. Se determinó que la correspondencia unívoca entre un determinado antígeno o panel de antígenos con una o dos manifestaciones clínicas de toxocarosis humana fluctúa entre 65% y 84%. Sin embargo, el hecho de encontrar antígenos específicos para algunas de las manifestaciones clínicas abre la posibilidad de optimizar las técnicas y utilizar antígenos purificados para maximizar la detección de tales antígenos.

Palabras clave: Toxocarosis humana, antígenos, western blot, manifestaciones clínicas.

Summary

The human toxocariasis is one of more reported zoonotic helminthiasis in the world. Depending on the affected organ, several clinical manifestations can be distinguished: systemic toxocariasis, that affects to most of the organs; ocular toxocariasis; asymptomatic toxocariasis and covert toxocariasis. This makes the diagnosis very complicated of this disease. The aim of the present study is to contribute to the knowledge of the human toxocariasis in Chile, especially in the diagnosis, by means of the recognition of specific antigens for the different clinical manifestations of the disease. The western-blot technique was used and larval somatic (LS) and excreted-secreted (ES) antigens of *T. canis* larvae, recognized by antibodies IgA and IgG. The results show that there exist antigens defined by molecular weight (MW) that are present in both antigenic extracts and that are recognized by the two classes of immunoglobulin (27 and 20 kDa). The antigen of 36 kDa is present in both antigenic extracts and only is recognized by IgG. Other antigens only are present in larval somatic (LS) (81 and 65 kDa), also present in other parasitosis; or in ES (48 and 40 kDa). Some antigens were only detected when a certain extract (LS or ES) with a class of antibodies was used (101, 52, 45 and 15 kDa). When selecting a specific antigen on the basis of its MW for each one of the manifestations of human toxocariasis, was observed that the greater percentage of detection was obtained for asymptomatic manifestation, with the antigen of 40 kDa, in the ES/IgA system. Also the presence of more frequent specific antigens in one or two manifestations of human toxocariasis were analysed, determining panels of specific antigens. When 24 serum samples of patients with other parasitic diseases and refusals for human toxocariasis were analysed, crossed recognition of antigens superior to 50 kDa was observed mainly. This agrees with other reports in literature and guarantees the use of western-blot technique that allows differentiating these antigens. It was determined that univocal correspondence between antigen or a panel of antigens with one or two clinical manifestations of human toxocariasis fluctuates between 65% and 84%. Nevertheless, the fact to find specific antigens for some of the clinical manifestations opens the possibility of optimising the techniques and of using purified antigens to maximize the detection of such antigens.

KEY WORDS: Toxocariasis, antigens, western-blot, clinical manifestation.

Introducción

La toxocarosis humana es una de las helmintiasis zoonóticas más reportada en el mundo (Magnaval *et al.*, 2001). A menudo la enfermedad se presenta como una infección que puede afectar a todos los órganos, particularmente el hígado, denominada toxocarosis visceral o sistémica. En otros casos puede presentarse como una pérdida de la agudeza visual, entre otros síntomas, denominándose toxocarosis ocular. La toxocarosis encubierta presenta una sintomatología inespecífica asociada a un test serológico positivo. La forma más común de toxocarosis es probablemente la asintomática, en la cual los pacientes son serológicamente positivos sin presentar signos clínicos de la enfermedad. Esto hace muy complicado el diagnóstico de la enfermedad (Bowman y Griffiths, 2000; Logar *et al.*, 2004). Esta zoonosis parasitaria es producida, principalmente, por larvas de *Toxocara canis* y *Toxocara cati*, también se le conoce como síndrome de larva migrante. El hombre se comporta como hospedador paraténico accidental, en el cual las larvas migran por los tejidos y órganos provocando daños mecánicos y toxialérgicos, por la liberación de alérgenos (Díez *et al.*, 1999; Noemí y Rugiero, 1999). El aumento de los animales de compañía y su cuidado deficiente, así como el aumento de animales callejeros, han facilitado que muchos de ellos se encuentren infectados con nemátodos, principalmente del género *Toxocara* (Noemí y Rugiero, 1999). Estudios realizados en diversos países demuestran que más del 60% de las muestras de heces procedentes tanto de perros que visitan a su médico veterinario, como de perros callejeros, contienen huevos de *Toxocara canis*. La mayor prevalencia de este parásito se encuentra en perros menores de 6 meses (Noemí *et al.*, 1984; Logar *et al.*, 2004; Magnaval, 2005). Otros estudios demuestran que la tierra de jardines y parques o plazas de zonas urbanas e incluso patios de jardines infantiles, se encuentran contaminadas con huevos de ascáridos, en muchos casos ya embrionados (Wiwanitkit *et al.*, 2004; Guimaraes *et al.*, 2005). Por lo tanto, la población está en constante peligro de adquirir esta parasitosis y dependiendo de la localización y recorrido de las larvas, será el daño causado en el hospedero, llegando incluso a la muerte. Cabe señalar que son los niños, el grupo etario en mayor riesgo de contraer esta parasitosis, debido a la alta contaminación ambiental con huevos larvados de este parásito y por los hábitos de juego e higiene (geofagia, onicofagia, etc.), aunque los adultos no están libres de contraerla (Castillo *et al.*, 2000; Anaruma *et al.*, 2002). Las heces de los animales infectados contienen gran cantidad de huevos que requieren de un período

cercano a las dos semanas, en condiciones favorables, para hacerse infectantes, pudiendo permanecer meses, incluso años, en un estado de latencia en espera de condiciones óptimas para completar su ciclo. Además, existe la transmisión transplacentaria de perras preñadas a sus crías, con lo cual estamos frente a un círculo vicioso imposible de romper y sólo controlable mediante rigurosos calendarios de desparasitación de nuestras mascotas (Magnaval *et al.*, 1994; Triviño *et al.*, 1999; Magnaval, 2005).

En nuestro país la mejor prueba serológica para el diagnóstico de esta parasitosis en humanos es la técnica de ELISA, descrita por varios autores. La extracción del antígeno de las larvas en segunda fase, se realiza *in vitro* para su utilización en la detección de los anticuerpos. La especificidad y sensibilidad de la prueba son altas y existe una buena correlación entre los títulos de antígenos y la existencia de una infección por *Toxocara canis*. Aunque en algunos pacientes con compromiso en órganos más aislados como retina y cerebro, en donde el sistema inmunológico tarda más en reconocer los antígenos, se deben realizar pruebas más específicas como muestras del humor acuoso o vítreo, scanner, etc., para determinar títulos de anticuerpos o presencia del parásito (Herzkovic *et al.*, 1986; Triviño *et al.*, 1999; Magnaval *et al.*, 2001; Logar *et al.*, 2004).

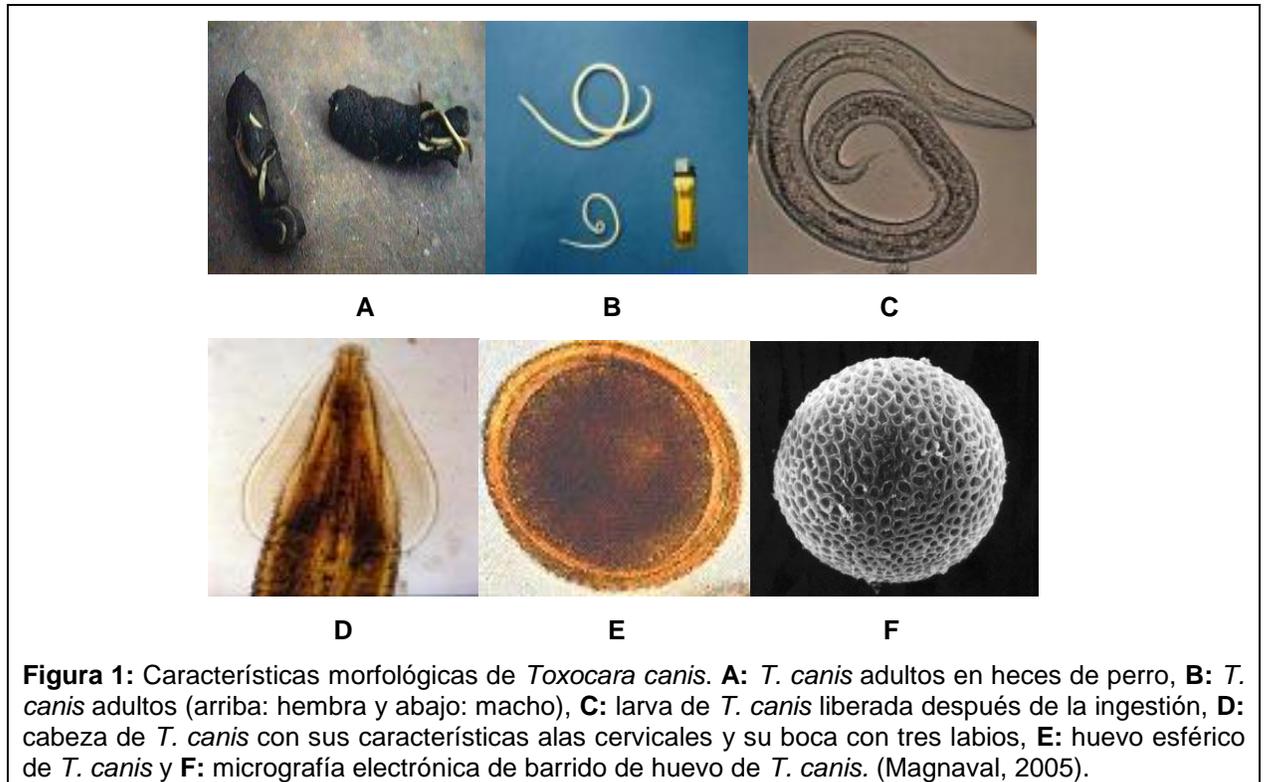
Aún es necesario entregar las bases para elaborar métodos diagnósticos más precisos, que puedan predecir el curso de la enfermedad hacia una u otra manifestación, lo que podría lograrse mediante técnicas de western blot, las que podrían revelar bandas electroforéticas específicas. En el presente trabajo, se analizó si existe relación entre diversas manifestaciones clínicas de la toxocarosis y el reconocimiento de determinados antígenos somáticos o excretados-secretados por larvas de *Toxocara canis*, mediante la técnica de western blot. Con este fin se estudiaron sueros de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de toxocarosis humana, enfrentándolos a los antígenos ya nombrados, los cuales son utilizados actualmente en el diagnóstico serológico de esta enfermedad. Además se analizó el posible reconocimiento de dichos antígenos por sueros de pacientes con otras parasitosis, descritas en la literatura (Bhattacharyya *et al.*, 2001; Romasanta *et al.*, 2003), como enfermedad de Chagas, toxoplasmosis, hidatidosis y cisticercosis.

Revisión bibliográfica

1. El síndrome de larva migrante o toxocarosis humana: es un síndrome producido en el hombre, sin importar el sexo o la edad, por la ingestión accidental de huevos infectantes larvados (L2); principalmente de *Toxocara spp*, ascáridos de perros y gatos, entre otros animales, siendo los más importantes: *Toxocara canis*, *T. cati*, *Toxascaris leonina*, *Baylisascaris procyonis* y otros. El de mayor importancia epidemiológica es *T.canis*; áscaris que parasita el intestino delgado, exclusivamente de los cánidos. Estos huevos pueden estar presentes en el ambiente, ya sea en tierra de plazas o jardines, fomites, alimentos o aguas contaminadas con heces de perro (Eberhard, 1998; Noemí y Rugiero, 1999; Logar *et al.*, 2004).

2. El parásito: *T. canis* es un nemátodo del orden Ascaridida, superfamilia Ascaridoidea y familia Ascarididae. El género *Toxocara* incluye dos especies: *T. canis* y *T. cati*, ambos parasitan exclusivamente a cánidos y félicos, domésticos y silvestres; respectivamente. Otro género y menos frecuente es el *T. leonina* que puede afectar indistintamente a cánidos y félicos (Díez *et al.*, 1999).

Los machos de *T. canis* miden entre 4 y 10 cm. de largo y las hembras miden de 5 a 18 cm. de largo, ambos de 2 a 3 mm de diámetro. Tienen una boca con tres labios y lateralmente dos alas cervicales y son de color blanquecino. Sus huevos esféricos miden 75-90 μm , con una cubierta rugosa y varias capas concéntricas, que lo hacen muy resistente al medio ambiente, de color marrón oscuro y su contenido ocupa totalmente el interior. Este parásito es uno de los más comunes de los carnívoros domésticos (Brunaska *et al.*, 1995; Díez *et al.*, 1999). Algunas de sus características morfológicas se pueden observar en la figura 1.



3. Ciclo biológico: como se observa en la figura 2 en su ciclo biológico se diferencian 4 posibilidades de infección: directa, mediante la ingestión de huevos embrionados; transplacentaria o prenatal; galactógena, por la leche materna; y ocasionalmente a través de la ingestión de hospedadores paraténicos, como: ratones, perros, gatos, aves, lagartijas, algunos invertebrados, etc.

En este complejo ciclo ocurre lo siguiente: de acuerdo con la edad del perro, en los menores de seis semanas el parásito realiza el ciclo de Loos o migración traqueobronquial, en el cual las larvas perforan y pasan desde el intestino delgado al hígado por vía portal, luego a corazón derecho, pulmones, bronquiolos, bronquios y tráquea donde son nuevamente deglutidas, para colonizar el intestino delgado de su hospedero. Pero durante su viaje han evolucionado a larvas de 5º estado (L5) y necesitan de 3 a 5 semanas para transformarse en machos y hembras en condiciones de generar nuevos individuos.

En cambio, en perros mayores de seis semanas, ocurre algo similar, aunque generalmente no vuelven al intestino, debido a que llegan a corazón izquierdo, donde se produce una redistribución de las larvas a todos los órganos, incluso músculos, permaneciendo en estado hipobiótico, englobadas en un granuloma inflamatorio o libres,

durante meses o años y su desarrollo se detiene. Condición que ocurre en hembras no preñadas y machos. Esta migración somática es la que ocurre en el hombre y en otros hospedadores no habituales, cuando ingieren huevos larvados de *T. canis*.

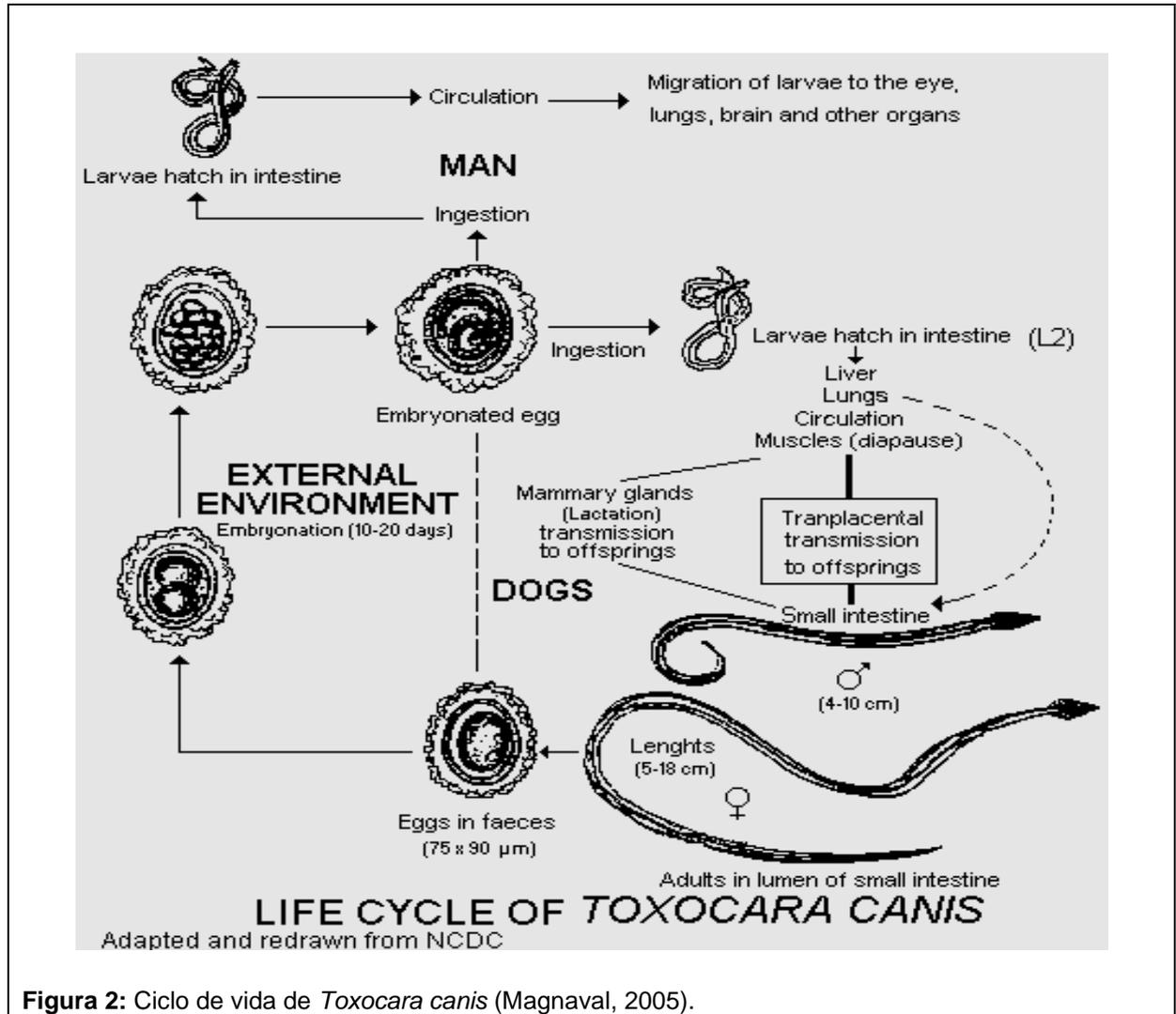


Figura 2: Ciclo de vida de *Toxocara canis* (Magnaval, 2005).

En las hembras preñadas, a partir del día 40-42 de gestación, las larvas hipobióticas, se activan movilizándose hacia la placenta y glándulas mamarias, ya sea debido a manifestaciones hormonales o estados de inmunodepresión y vía transplacentaria se traspasan a los fetos, naciendo los cachorros parasitados. También ocurre infección transmamaria en los cachorros cuando consumen el calostro y una reinfección de sus madres cuando consumen el meconio. Cabe señalar que estas son las principales vías de infección en los cachorros.

De acuerdo con este ciclo son los cachorros menores de 6 meses los más afectados; y por lo tanto, los de mayor riesgo para el contagio humano (Maizels *et al.*, 1987; Magnaval *et al.*, 1994; Corwin, 1998; Díez *et al.*, 1999; Triviño *et al.*, 1999; Magnaval *et al.*, 2001).

Los ciclos evolutivos de *T. cati* y *T. leonina* son muy similares; pero en el primero la infección prenatal de los gatitos no existe y el segundo, puede afectar tanto a gatos como a perros indistintamente, entre otras diferencias (Díez *et al.*, 1999; Noemí y Rugiero, 1999).

4. Epidemiología: nuestro país aún no tiene un programa de control o tenencia de perros y gatos y debido a la estrategia del parásito para perpetuarse en el tiempo y las condiciones inadecuadas con respecto a la tenencia de mascotas, la prevalencia de *T. canis* es muy alta. Se ha comunicado la infección en 23 a 40% de los perros de hasta un año de edad, otros estudios demuestran que estos porcentajes pueden variar entre 2 a 93% (Noemí *et al.*, 1984; Triviño *et al.*, 1999; Castillo *et al.*, 2000; Anaruma *et al.*, 2002).

Las larvas somáticas que se encuentran en las hembras caninas en edad reproductiva, son el principal reservorio de la infección. Las hembras de *T. canis* son muy prolíficas y pueden depositar alrededor de 200.000 huevos diarios, los que son eliminados en las heces y que dependiendo de condiciones ambientales, principalmente la humedad, temperatura y tensión de oxígeno, demoran alrededor de 2-5 semanas en hacerse infectantes. Estos huevos larvados son muy resistentes a las condiciones del medio ambiente y a muchos desinfectantes de uso común, permaneciendo viables desde meses hasta más de un año, en lugares contaminados (Díez *et al.*, 1999; Noemí y Rugiero, 1999).

5. Patogenia: el daño generado en el animal tiene relación principalmente con las migraciones larvarias y de su localización en diferentes tejidos y órganos, además depende principalmente de variaciones individuales de cada hospedero, por lo tanto la respuesta inmune es diferente. En su recorrido las larvas producen acciones traumáticas, obstructivas o anafilácticas, por la liberación de sustancias como resultado de la muda de estas larvas. Cuando las larvas y gusanos adultos se ubican en el intestino delgado del perro, se desarrollan cuadros digestivos de leves a graves y dependiendo de la carga parasitaria y compromiso hepático por el paso de larvas a través de este órgano, cuadros sistémicos como: raquitismo, alteraciones nerviosas, diarreas, mala condición corporal, anorexia, fiebre y hasta la muerte. Cuando las larvas realizan el ciclo de Loos puede manifestarse

sintomatología clínica respiratoria como tos y disnea debido a que la migración larval induce respuesta eosinofílica en el hospedador (Corwin, 1998; Díez *et al.*, 1999; Cuéllar *et al.*, 2001).

6. Diagnóstico: se realiza observando la sintomatología característica en los animales infectados y a través de exámenes coprológicos, para demostrar la presencia de huevos del parásito. También se pueden aplicar estudios de laboratorio: serológicos para demostrar la presencia de anticuerpos contra *T. canis*, niveles de IgA, entre otros (Matsumura *et al.*, 1983; Corwin, 1998; Díez *et al.*, 1999).

7. Tratamiento: el tratamiento de esta enfermedad en nuestros animales de compañía se logra solamente con rigurosos calendarios de desparasitación, utilizando para este efecto una amplia gama de antiparasitarios antihelmínticos en base a febendazol, praziquantel y pamoato de pirantelo o ivermectina (Corwin, 1998), muy fáciles de adquirir en el mercado.

8. Efecto del parásito en el ser humano: las infecciones del hombre producidas por ingestión accidental de larvas de nemátodos de otros animales, generalmente del perro y del gato, pueden afectar a los parénquimas de órganos como pulmones, hígado, corazón, etc. (larva migrante visceral, sistémica o toxocarosis humana). También se describe la toxocarosis humana: ocular, asintomática y encubierta (Noemí y Rugiero, 1999; Magnaval *et al.*, 2001; Logar *et al.*, 2004).

Esta parasitosis afecta principalmente a niños, por sus conductas de juegos e incipientes hábitos de higiene (geofagia o pica, onicofagia, etc.) aunque los adultos no están libres de contraerla. Es más frecuente en niños de poblados rurales o citadinos con malas conductas higiénicas, lo que es avalado por estudios realizados que indican seroprevalencias de hasta 22% (Anaruma *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2003).

Generan un daño mecánico dado por la formación de granulomas eosinofílicos, producto de la respuesta inmune del hospedador, que trata de encapsular e inmovilizar a la larva. Posteriormente se liberan antígenos excretados-secretados (ES) generados por el parásito, lo que produce la elevación de inmunoglobulinas (hipergamaglobulinemia) del tipo IgA, IgM, IgE, IgG tipo 4 e interleuquinas 4 y 5, completando la reacción inflamatoria (Noemí y Rugiero, 1999; Alonso *et al.*, 2000; Machnicka-Rowinska *et al.*, 2002; López *et al.*, 2003).

Cuando el hombre ingiere los huevos larvados de estos nemátodos, se transforma en un hospedador paraténico accidental y ocurre casi lo mismo que en el hospedero habitual: las larvas eclosionan de los huevos ingeridos y atraviesan la pared intestinal, iniciando su migración por circulación portal hacia el hígado, algunas son encapsuladas aquí y otras van prácticamente a todo el organismo, vía circulación sistémica. Pero no alcanzan su madurez sexual; por lo tanto, en pacientes con toxocarosis humana, la búsqueda de huevos en las heces no es diagnóstica (Díez *et al.*, 1999). Los signos y síntomas varían de leves a severos y pueden presentarse semanas a meses después de la infección.

La eosinofilia en pediatría es un indicador hematológico que debiera llevar a estudiar su etiología. Entre éstas las más frecuentes son parasitosis y alergias. Estadísticas indican que dentro de las causas de eosinofilia se encuentran la toxocarosis humana, el *Ascaris lumbricoides*, la leucemia linfática y la histocitosis de células de Langerhans. Estudios realizados en diversos países y también en Chile indican que entre un 30 a 40% de las eosinofílias en niños corresponden a toxocarosis (Díez *et al.*, 1999; Triviño *et al.*, 1999).

La eosinofilia periférica y tisular es un signo biológico de migración larval en las helmintiasis, ya que los eosinófilos son los mayores efectores frente a los helmintos. En la toxocarosis humana numerosos autores consideran a la eosinofilia de valor predictivo, sin embargo, otros citan casos de parasitosis asociada a cifras normales de eosinófilos circulantes. Las helmintiasis tisulares están asociadas en la mayoría de los casos con una eosinofilia elevada; en la toxocarosis el hemograma puede ser normal o presentar eosinofilia marcada con cifras cercanas al 20%, hasta un 90%, pudiendo mantenerse por años, incluso posterior al tratamiento (Díez *et al.*, 1999; Guardis *et al.*, 2002).

Dependiendo del lugar donde se localicen finalmente las larvas, será el daño causado al paciente, describiéndose diferentes manifestaciones clínicas debidas al síndrome, tales como:

A) Toxocarosis humana asintomática: generalmente no presenta síntomas, pero cuando se manifiesta clínicamente, los síntomas son inespecíficos, como debilidad, prurito, dificultad respiratoria y dolor abdominal. Puede además cursar con eosinofilia elevada (Magnaval *et al.*, 2001). Es la presentación más común según literatura y antecedentes clínicos (Altcheh *et al.*, 2003; López *et al.*, 2003).

B) Toxocarosis humana sistémica: predominante en niños de 1 a 7 años con antecedentes de geofagia y de ser dueños de mascotas. Pueden presentar signos como: anorexia, astenia e irritabilidad, fiebre (37,5-39°C), vómitos, dolor abdominal y manifestaciones **cutáneas** (eccemas, urticaria, eritema, edemas, etc.). El compromiso sistémico se manifiesta en **pulmón** (tos, asma, disnea, bronquitis obstructivas recidivantes o BOR, neumonías eosinofílicas severas, neumonitis, alteraciones en pruebas de ejercicio y espirometría, etc.); en **hígado** (hepatitis, nódulos, abscesos, hepatomegalia, alteración en pruebas hepáticas, etc.); en **bazo** (esplenomegalia); en **sistema nervioso central (SNC)** (encefalitis, meningitis, parestias, parestesias, epilepsia, convulsiones, alteraciones conductuales, hiperactividad, etc.) y en **corazón** (miocardiopatías, miocarditis e incluso insuficiencia cardiaca) (Noemí *et al.*, 1984; Minvielle *et al.*, 1999; Magnaval *et al.*, 2001; Guardis *et al.*, 2002).

Estudios de laboratorio indican que el hemograma puede ser normal o presentar alteraciones como son una eosinofilia marcada y persistente, mayor a 10% (células maduras) como es el caso de la toxocarosis cerebroespinal o neurológica; leucocitosis (Magnaval *et al.*, 2001) e hipergamaglobulinemia con predominio de IgG, IgA, IgM y marcada elevación de IgE, con aumento de isohemaglutinas de tipo anti A y/o anti B, mayor a 1:1024, según el grupo sanguíneo (Magnaval *et al.*, 2001; Guardis *et al.*, 2002; Oktar *et al.*, 2002; Rubinsky-Elephant, 2004; Malbrán, 2005).

Estudios realizados por varios autores demuestran que la toxocarosis en SNC, es poco frecuente, reportándose a la fecha sólo algunos casos, lo que podría indicar que esta condición está subdiagnosticada, debido a la sintomatología inespecífica que presenta este cuadro (Magnaval *et al.*, 1997; Magnaval *et al.*, 2001; Oktar *et al.*, 2002). El cuadro hepático, también es poco frecuente debido al rápido pasaje que realizan las larvas por este órgano (Park *et al.*, 2000), antes de distribuirse al resto del organismo vía sistémica. Algunas de las lesiones características encontradas son nódulos y abscesos, producto del paso de las larvas por el hígado (Pereira *et al.*, 1999).

C) Toxocarosis humana ocular: compromiso ocular grave, afecta generalmente a niños mayores, de 6 a 14 años. Sus signos son: disminución de la agudeza visual, estrabismo, exotropía, leucocoria, inflamación de segmento anterior, desprendimiento de retina, granuloma retinal periférico o del polo posterior (signo más frecuente), retinitis exudativa, endoftalmitis difusa crónica y uveítis anterior, panuveítis difusa crónica y neurítis óptica. Las

larvas migran al ojo a través de la circulación sistémica y se quedan atrapadas en los tejidos. La muerte del parásito en el ojo origina la liberación de toxinas y productos antigénicos, que inducen una respuesta inflamatoria del hospedero. El granuloma ocular de la toxocarosis no está asociado con calcificación a diferencia del retinoblastoma (Botero *et al.*, 2001; Magnaval *et al.*, 2001; Logar *et al.*, 2004).

La migración de unas pocas larvas de *T. canis* en el SNC o en el ojo son suficientes para generar una lesión local grave, pero resultan insuficientes para provocar una eosinofilia sanguínea (Herskovic *et al.*, 1986; Magnaval *et al.*, 1992; Ramírez *et al.*, 1994; Guardis *et al.*, 2002).

Un estudio realizado en Corea (Park *et al.*, 2000), reportó cinco casos de toxocarosis ocular confirmados por una reacción positiva a dos métodos diagnósticos: ELISA con IgE y western blot. Se describió para el diagnóstico serológico de toxocarosis ocular, un patrón de bandas por western blot que detecta IgG para antígeno ES los que serían más específicos que el que utiliza IgE. ELISA con IgE, no es suficiente para un diagnóstico seguro de toxocarosis. Los patrones obtenidos por western blot que incluyen bandas de bajo peso molecular (PM), parecen ser más específicos para diagnosticar toxocarosis humana; bandas de alto PM son detectadas significativamente sólo cuando se utilizan sueros de pacientes con variadas helmintiasis, que muestran un 33% de resultados positivos (Magnaval *et al.*, 1991).

Los resultados del western blot revelaron que en los 5 casos oculares, estaban presentes bandas de pesos moleculares entre 35 y 24 kDa, que fueron específicas para toxocarosis; y además que el ELISA con IgE es un método complementario para la detección anticuerpos IgG específicos, su sensibilidad es de 67,9% y su especificidad es de 76,2% la mayor utilidad que entrega es en determinaciones para el seguimiento del post tratamiento, ya que los niveles después del tratamiento disminuyen significativamente.

Menos de un 10% de los niños afectados recupera en grado aceptable su visión. Es importante el examen de fondo de ojos para el diagnóstico acertado y el diagnóstico diferencial con otras patologías como retinoblastoma, tumores intraoculares, hiperplasia primaria persistente del humor vítreo, granuloma con retención de cuerpo extraño y otras causas. Frecuentemente, el cuadro cursa sin eosinofilia y a veces con serología negativa o positiva a títulos muy bajos, aunque pueden encontrarse anticuerpos en el humor acuoso. Por

lo tanto, la técnica serológica de ELISA, que para diagnosticar la enfermedad en nuestro país es de primera elección, en los procesos viscerales; no es confiable en casos oculares (Herskovic *et al.*, 1986; Magnaval *et al.*, 1992; Ramírez *et al.*, 1994; Guardis *et al.*, 2002).

D) Toxocarosis humana encubierta: se caracteriza por cursar con sintomatología difusa como: fiebre, vómitos, debilidad, dolor abdominal y articular, cefalea, urticaria, linfadenopatías, entre otros. Estudios realizados han demostrado que aproximadamente un 27% de los pacientes presenta altos títulos de anticuerpos contra *T. canis*, pero con conteos de eosinófilos normales (Magnaval *et al.*, 2001).

El curso hacia una u otra manifestación clínica parece depender de factores del hospedador, como: peso, calidad de la respuesta inmune inducida, tejido u órgano afectado, frecuencia de reinfecciones, etc.; y de factores del parásito, tales como su capacidad inmunogénica, cantidad de huevos infectantes ingeridos y cantidad de larvas migrantes. Por lo tanto, se debe poner especial atención en estos factores ya que influyen en la patogenia y en la clínica de la enfermedad (Noemí *et al.*, 1984; Triviño *et al.*, 1999; Cuéllar *et al.*, 2001; Magnaval *et al.*, 2001; Guardis *et al.*, 2002).

9. Epidemiología: las enfermedades parasitarias constituyen un problema de salud pública en Chile. No sólo por constituir indicadores de saneamiento ambiental de las comunidades, sino por la demanda de atención médica y de laboratorio que generan (Triviño *et al.*, 1999). La geofagia es un factor de riesgo muy asociado a la presencia de toxocarosis humana en los pacientes afectados, lo que indica el grave problema de saneamiento ambiental al que está expuesta la población infantil (Triviño *et al.*, 1999). Diferentes estudios demuestran que la mayoría de los lugares públicos como plazas y jardines, están contaminados con huevos larvados de *Toxocara spp.* (Abe *et al.*, 1997; Coelho *et al.*, 2001; Anaruma *et al.*, 2002; Guimaraes *et al.*, 2005). Castillo *et al.*, (2000), en un estudio realizado en Chile, demostraron que entre el 30 y el 70% de los lugares estudiados, fueron positivos a la presencia de huevos de *T. canis*.

10. Diagnóstico: el diagnóstico de la toxocarosis humana requiere de un alto índice de sospecha, antecedentes y conductas del paciente (geofagia, onicofagia, tenencia de mascotas, alteraciones respiratorias crónicas, anorexia, diarrea, rash cutáneo, fiebre, palidez de piel y mucosas, fondo de ojos alterado, edad de riesgo, etc.); recursos de laboratorio,

además de estudios dirigidos y seguimiento de cada caso. Puede que alguno de ellos haya sido mal diagnosticado como una hipereosinofilia idiopática. La gravedad de algunas manifestaciones clínicas hace necesario que los clínicos estén alertas, para hacer el diagnóstico oportuno y el manejo ambiental de los pacientes.

Estudios realizados en Chile destacan que al igual que lo informado en otros países, pocos casos con daño ocular presentan eosinofilia marcada. Otro problema en el diagnóstico es el punto de vista de corte usado en Chile (1:64), diversos estudios señalan que, en casos de síndrome ocular, al bajar el punto de corte de la prueba de ELISA (1:8 ó 1:2) se aumenta la probabilidad de detectar los casos. Más aún, una prueba negativa no excluye la posibilidad de toxocarosis ocular (Triviño *et al.*, 1999; Bowman *et al.*, 2000; Magnaval *et al.*, 2001; Logar *et al.*, 2004).

La confirmación en nuestro país se logra mediante la reacción de ELISA, cuya sensibilidad alcanza entre 70 y 91,3% y su especificidad oscila entre 76,9 y 100%. Se consideran positivos títulos de 1:64. Aunque se han ensayado otros métodos, la técnica de ELISA utilizando antígeno ES de *T. canis*, es la que consistentemente entrega mejores resultados (Herskovic *et al.*, 1986; Jacquier *et al.*, 1991; Ramírez *et al.*, 1994; Triviño *et al.*, 1999).

En literatura se describen además mediciones de la concentración de inmunoglobulinas en suero, como la IgG, IgM, IgE o IgA, debido a la hipergamaglobulinemia que produce la enfermedad. La IgG tiene la característica de mantenerse elevada durante todo el curso de la enfermedad y seguir así durante años; por lo tanto, no sirve para el seguimiento de los pacientes. La IgM aumenta durante la infección aguda y luego disminuye, aunque no se negativiza, por lo cual su seropositividad no es siempre indicativa de una infección reciente, más aún cuando se encuentra en títulos bajos. Los niveles de IgE al igual que los de IgM tendrían utilidad para señalar casos de infección reciente y casos de reinfección, ya que en general las concentraciones disminuyen rápidamente con la administración de antiparasitarios (Magnaval *et al.*, 2001; Machnicka *et al.*, 2002; López *et al.*, 2003). Con respecto a la IgA sus valores también son indicativos de infección aguda (Machnicka-Rowinska *et al.*, 2002; Rubinsky-Elephant, 2004; Malbrán, 2005).

A nivel internacional el diagnóstico de toxocarosis humana se realiza a través de la detección de anticuerpos por ELISA y confirmación mediante análisis de western blot (1:32), utilizando antígeno ES de *T. canis*. Una vez realizada la prueba de western blot se visualizan 7 bandas, separadas en dos grupos: un grupo de alto PM (200; 147 y 132 kDa) y otro de bajo PM (35; 30; 28 y 24 kDa). Una reacción positiva implica la aparición de las 4 bandas de menor PM. Las bandas de alto PM están presentes, además, en reacciones cruzadas especialmente con *Strongyloides*, *Oxyuros* y *Taenia saginata* (Magnaval *et al.*, 1992; Malbrán, 2005).

Como ya se mencionó existe la posibilidad de reacción cruzada con otras helmintiasis, sin embargo aunque el ELISA con IgE o IgG para antígeno ES, sea positivo en alguna de otras helmintiasis, los hallazgos del western blot no pueden ser negativos para la presencia de bandas de alto PM. Por lo tanto, la posibilidad de reacciones cruzadas puede ser fácilmente descartada mediante esta técnica (Magnaval *et al.*, 1992).

Otros estudios realizados mediante western blot obtuvieron como resultado la visualización de otras bandas, utilizando el antígeno larval somático del estadio larvario infectivo (L2). Al realizar la prueba inmunológica con los sueros positivos para *T. canis* se reveló la presencia de 9 bandas proteicas de 200; 158,5; 141,3; 112,1; 57,5; 52,5; 47,9; 30,9 y 27,5 kDa. Las proteínas de 200 y 47,9 kDa, fueron las que se encontraron con mayor frecuencia en los pacientes positivos a toxocarosis humana (Martínez *et al.*, 1998).

11. Tratamiento: en toxocarosis sistémica o encubierta se efectúa con derivados de benzimidazoles, como tiabendazol en dosis de 25-50 mg/Kg/día, por tres a siete días; el mebendazol en dosis de 20-25 mg/Kg/día, por tres semanas, reduce en un mayor porcentaje los síntomas y tiene menos efectos adversos. También se ha empleado con eficacia el tiabendazol en crema, la congelación de la larva, el cloruro de etilo, el albendazol en dosis de 10 mg por cinco días (es el más usado) o una dosis única de ivermectina de 200 µg/Kg, con alta efectividad y buena tolerancia, principalmente en toxocarosis ocular (Noemí *et al.*, 1984; Bowman *et al.*, 2000; Magnaval *et al.*, 2001).

El tratamiento de la toxocarosis ocular es de eficacia limitada, sin embargo se han conseguido buenos resultados utilizando fotocoagulación cuando las lesiones están localizadas y corticoesteroides por vía sistémica o local para evitar las reacciones inflamatorias o alérgicas (Fenoy *et al.*, 2002).

Como se expuso anteriormente la seropositividad para toxocarosis humana tiene una limitada significancia patológica. Sólo pacientes con síntomas consistentes con toxocarosis humana son candidatos para una terapia, debido a que los test inmunodiagnósticos no son capaces de distinguir entre una infección aguda o una pasada. Una prueba inmunodiagnóstica; por lo tanto, debe ser acompañada por un conteo sanguíneo de eosinófilos y si es posible por una determinación de IgE total en el suero. La detección de ambos, eosinofilia y seropositividad para toxocarosis, es indicativa de una infección activa (Magnaval *et al.*, 2001).

La detección anticuerpos IgG específicos anti toxocara por ELISA, no parece ser utilizado para monitorizar la terapia. Cuando títulos de anticuerpos IgG específicos anti toxocara por ELISA de pacientes tratados versus pacientes que no recibieron tratamiento, fueron comparados, la cinética de estos anticuerpos no fue afectada por los tratamientos antihelmínticos administrados (Bass *et al.*, 1987). Por el contrario las concentraciones séricas de anticuerpos IgE específicos anti toxocara, muestran un significativo descenso post tratamiento, si hay una marcada elevación antes de la terapia (Magnaval *et al.*, 1992), sobre todo en pacientes asintomáticos (Magnaval *et al.*, 2001).

Se debe evaluar muy bien el caso clínico antes de comenzar terapias antihelmínticas, por los efectos adversos que se pueden producir, principalmente en niños quienes son los más afectados por esta parasitosis. Cabe señalar que esta patología sobre todo en su presentación encubierta, es benigna y autolimitante, por lo tanto, se deben manejar estrategias de educación y prevención para evitar reinfecciones. El alta del paciente se realiza cuando la eosinofilia ha regresado, ya que los anticuerpos contra *Toxocara spp* persisten por mucho tiempo (Magnaval *et al.*, 2001; Logar *et al.*, 2004).

12. Prevención: se resume en la mantención responsable de las mascotas, con la consecuente desparasitación y eliminación de heces contaminadas en lugares donde no puedan tomar contacto las larvas con la piel humana, para evitar la posterior ingestión accidental de los huevos larvados. Por lo tanto se debe tener precaución sobre todo con los niños cuando estén expuestos a suelos contaminados con heces de estos animales y lo más importante, efectuar educación para la salud al paciente y a la comunidad, con el propósito de evitar adquirir esta infección parasitaria (Noemí y Rugiero, 1999).

El presente estudio pretende contribuir al conocimiento de la toxocarosis humana en Chile, con especial referencia a aspectos diagnósticos que dicen relación con el reconocimiento de bandas antigénicas específicas que puedan ser detectadas mediante western blot, utilizando para ello antígenos somáticos y excretados-secretados de larvas de *T. canis*.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Sueros de pacientes con diversas manifestaciones clínicas de toxocarosis humana reconocen diferentes antígenos somáticos y excretados-secretados de larvas de *Toxocara canis*.

Objetivo general

Estudio del reconocimiento de antígenos somáticos larvales y antígenos excretados-secretados de larvas de *T. canis* por sueros de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de toxocarosis humana, mediante la técnica de western blot.

Objetivos específicos

1. Analizar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, en condiciones denaturantes, las proteínas presentes en antígenos somáticos larvales y antígenos excretados-secretados de larvas de *T. canis*.
2. Comparar el reconocimiento de antígenos somáticos larvales y antígenos excretados-secretados de larvas de *T. canis* por sueros de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de toxocarosis humana, mediante western blot.
3. Determinar si existen reacciones cruzadas de reconocimiento de antígenos somáticos larvales y antígenos excretados-secretados de larvas de *T. canis*, en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas, toxoplasmosis, hidatidosis y cisticercosis; mediante western blot.

Material y método

1. Antígeno larval somático (LS) y antígeno excretado-secretado (ES) de *Toxocara canis*: los gusanos se recolectaron de muestras de heces de perros infectados, provenientes de diferentes regiones del país y de ellos se obtuvieron antígenos somáticos y excretados-secretados de larvas de *T. canis*, mediante el siguiente proceso: los úteros de las hembras y sus contenidos fueron incubados en una solución salina que contenía formalina, a 37,5°C, durante 21 días. Los huevos y larvas recolectados fueron lavados con una solución salina estéril y centrifugados a 270 g, en frío durante 2 minutos; se esperó hasta que todas las larvas eclosionaran, se lavaron y se incubaron en medio de cultivo; de donde cada dos semanas fueron retirados sus productos de excreción y secreción, que corresponden a glicoproteínas que conforman el antígeno ES, habitualmente usado en las reacciones de diagnóstico mediante ELISA; se mantuvo congelado, luego de ser liofilizado.

El material sobrante como huevos no eclosionados, larvas muertas y otras sustancias, componen el extracto crudo larval, el que luego de ser congelado a -80°C y descongelado a temperatura ambiente, sucesivamente por 10 veces, fue homogenizado en buffer fosfato salino; se le adicionó inhibidor de proteasas PMSF cuya concentración final fue de 1 mM y fue centrifugado a 6780 g, en frío y durante 35 minutos. Se recuperó el sobrenadante que fue liofilizado para ser utilizado como antígeno LS (Bowman *et al.*, 1987; Maizels *et al.*, 1987; Villanueva y Kozek, 1994).

Posteriormente, se mezcló el antígeno (LS o ES), en proporción 1:1 con una solución de sample buffer, siendo finalmente sometido a ebullición durante 5 minutos. Las soluciones antigénicas se distribuyeron en alícuotas de 300 µl en tubos eppendorf y se conservaron a -20°C hasta su uso.

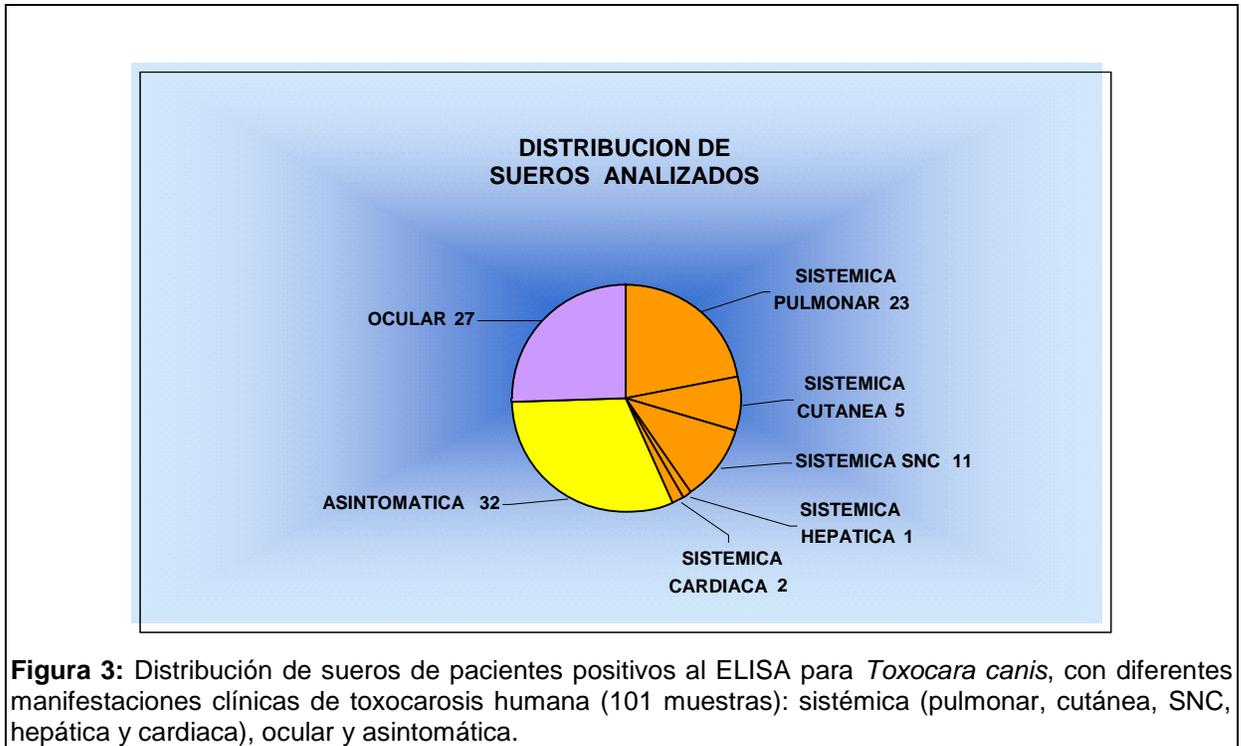
2. Sueros: entre Agosto de 2001 y Agosto de 2003 fueron obtenidas muestras de sueros de pacientes con toxocarosis humana diagnosticados en la unidad de parasitología del Hospital Luis Calvo Mackenna. Se analizaron 101 muestras de pacientes con un promedio de edad de 7 años, cuyo diagnóstico de toxocarosis había sido realizado por diagnóstico clínico y confirmado por ELISA, con antígeno ES de *T. canis* y con inmunoglobulinas tipo IgG (Jacquier

et al., 1991). La clasificación de los sueros en estudio correspondió al siguiente: a) con serología positiva para antígenos ES de *T. canis*, b) con serología negativa para antígenos ES de *T. canis*, como controles y c) con serología positiva para otras parasitosis, que se detallarán más adelante.

a) Los 101 sueros con toxocarosis humana fueron divididos según diagnóstico clínico en:

- 32 sueros de pacientes con toxocarosis encubierta o asintomática, es decir, sin sintomatología específica, pero con serología positiva al ELISA con antígenos ES para *T. canis*.
- 42 sueros de pacientes con cuadro clínico sistémico, con sintomatología divididas según cuadro clínico:
 - 23 sueros de pacientes con cuadro clínico a nivel pulmonar.
 - 5 sueros de pacientes con cuadro clínico a nivel cutáneo.
 - 1 suero de paciente con cuadro clínico a nivel hepático.
 - 11 sueros de pacientes con cuadro a nivel del SNC.
 - 2 sueros de pacientes con cuadro clínico a nivel cardiaco.
- 27 sueros de pacientes con toxocarosis ocular.

Las muestras de sueros de pacientes con toxocarosis clasificados según manifestación clínica de la enfermedad, se grafica en la figura 3.



Como se observa, el mayor número de casos correspondió a la manifestación clínica asintomática con un $n=32$ y el menor número de casos a la manifestación clínica hepática y cardíaca con un $n=1$ y $n=2$, respectivamente. Esta casuística está en concordancia con la literatura puesto que se describe que la presentación asintomática como una forma frecuente y que estaría en aumento (Altcheh *et al.*, 2003), por el contrario el cuadro hepático es de difícil detección debido al rápido pasaje de las larvas por este órgano (Pereira *et al.*, 1999, Park *et al.*, 2000) y la presentación cardíaca es rarísima. Además de la asintomática las presentaciones más comunes son la sistémica pulmonar y la sistémica cutánea. Las presentaciones ocular y en SNC son poco frecuentes (Magnaval *et al.*, 2001, Oktar *et al.*, 2002; Cerva y Noemí, 2004¹). Sin embargo, en el Laboratorio de Parasitología del Hospital Luis Calvo Mackenna, se logró recopilar un importante número de casos lo que nos permitió contar con muestras de la mayoría de las manifestaciones clínicas de la enfermedad para nuestro estudio.

b) Como controles se analizaron 10 sueros de pacientes aparentemente sanos con serología negativa por ELISA y 10 sueros de pacientes con toxocarosis, que recibieron tratamiento

¹ Comunicación personal (Agosto, 2004) Hospital Luis Calvo Mackenna, Laboratorio de Parasitología.

específico, cuyas muestras se tomaron durante el tratamiento o posterior a éste y que presentaban reacción negativa por ELISA.

c) Con el fin de detectar reacciones cruzadas con otras parasitosis, descritas en la literatura, se analizaron 24 sueros de pacientes con otras parasitosis, con un promedio de edad de 13 años provenientes del Hospital Luis Calvo Mackenna, cuyo diagnóstico había sido realizado por diagnóstico clínico y confirmado por ELISA. Todas ellas negativas a toxocarosis humana por prueba de ELISA, con antígeno ES e IgG. En cada suero se determinó el reconocimiento de antígenos LS y de antígenos ES por parte de anticuerpos específicos IgG e IgA, mediante la técnica de western blot. La distribución de estas muestras se detalla a continuación:

- 6 sueros de pacientes con enfermedad de Chagas.
- 6 sueros de pacientes con toxoplasmosis.
- 7 sueros de pacientes con hidatidosis.
- 5 sueros de pacientes con cisticercosis.

Todos los sueros fueron utilizados en dilución 1:40 en tampón TBS 1% leche descremada.

3. Método de Bradford para la determinación de proteínas: esta técnica corresponde a un micrométodo fotométrico, ya que la cantidad de muestra necesaria para cuantificar proteínas es pequeña (Bradford, 1976). Se determinó la concentración de proteínas en el extracto LS (15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y en el extracto ES (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

4. Técnica de Western blot.

4.1. Electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida 7,5%: el proceso electroforético se realizó en minigeles al 7,5% de poliacrilamida inmersos en buffer de corrida, en presencia de SDS (Laemmli, 1970). Para realizar la electroforesis se utilizó la cámara que se observa en la figura 4.

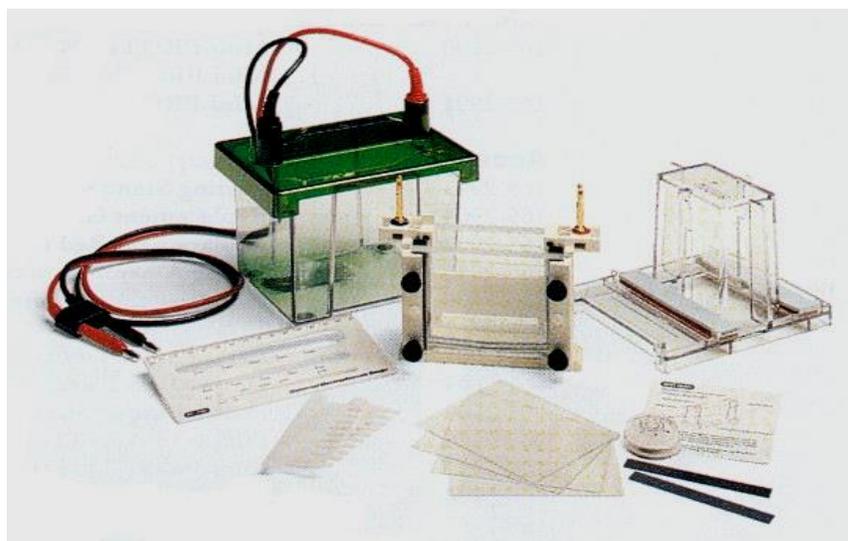


Figura 4: Cámara de electroforesis MINI PROTEAN II Bio-Rad modelo 1000/500. (Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 2002).

Se llevó a cabo en minigeles en condiciones denaturantes, con un gel concentrador de 3,5% de acrilamida y un gel de corrida 7,5% acrilamida, según técnica de Zingales *et al.* (1982). La muestra correspondió a 280 μ l por carril, para cada antígeno en estudio (LS o ES). La electroforesis se realizó a 100 volts por una hora. En cada minigel fue incluido un estándar de PM (EPM): Chemichrome western control (C 4236 SIGMA), como marcador de PM, de los cuales se cargaron 2,5 μ l.

Tinción con azul de Coomassie: una vez terminada la electroforesis, se fijaron las proteínas al gel por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación, en una solución que contenía 50% V/V de metanol y 10% V/V de ácido acético. Posteriormente se tiñieron las proteínas incubando el gel por 30 minutos en una solución de 0,2% P/V azul de Coomassie (R-250) en solución de fijación. Finalmente se procedió a desteñir el gel incubando varias veces con la solución de desteñido que contenía 10% V/V de metanol y 7% V/V de ácido acético.

4.2. Inmunoelectrotransferencia: se utilizó la técnica descrita por Godin y Handman (1984). Una vez terminada la separación electroforética, se procedió a realizar la electrotransferencia de los geles sin teñir a la membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m de poro, usando Sartoblot según manual (Sartoblot, 1987) (Trans blot BIO-RAD modelo 200/2.0). El procedimiento general se realizó del siguiente modo: se lavaron suavemente las placas de grafito del Sartoblot, con agua bidestilada. Luego, evitando la formación de burbujas se colocaron dos

papeles filtros empapados en tampón cátodo. Sobre los papeles filtro se colocó cuidadosamente el gel y sobre éste se depositó la nitrocelulosa, previamente lavada en agua bidestilada. Sobre la nitrocelulosa se puso un papel filtro empapado en tampón ánodo 2. Finalmente se colocaron dos papeles filtro empapados en tampón ánodo 1. Se realizó la transferencia a temperatura ambiente por 20 minutos a 50 mA/gel.

Posterior a la electrotransferencia se realizó el bloqueo de la membrana de nitrocelulosa con tampón TBS 4% leche descremada en baño de agitación por dos horas. Luego se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno, con tampón TBS para eliminar el exceso de solución bloqueadora. A continuación se agregó una dilución 1/40 del suero en estudio en TBS con 1% leche descremada y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche con agitación suave y constante. Posteriormente se realizaron 3 lavados también de 10 minutos cada uno, con tampón TBS para luego incubar con anti IgG o anti IgA humana (SIGMA), conjugada a fosfatasa alcalina en dilución 1/1000 en tampón TBS con 1% leche descremada. Se realizaron tres lavados con tampón TBS por 10 minutos cada uno y un lavado con tampón AP pH 9,5. El revelado se realizó incubando las tiras de nitrocelulosa transferidas, en total oscuridad y a temperatura ambiente por 5 a 20 minutos, con los sustratos de la enzima: BCIP y NBT; en tampón AP pH 9,5. Finalmente se procedió a lavar la nitrocelulosa con agua bidestilada para detener la reacción y se secó sobre papel filtro (Moriearty, 1984).

4.3. Estimación de los pesos moleculares (PM) (Hames y Rickwood, 1990): los PM de las bandas de interés, reveladas en las membranas de nitrocelulosa por western blot, fueron estimados en base a su migración relativa en la electroforesis, utilizando marcadores coloreados de PM (Chemichrome western control SIGMA C 4236), como estándares para construir una curva de calibración, cuyos PM fueron de: 220, 100, 60, 45, 30, 20, 12 y 8 kDa.

Resultados

1. **Análisis de las proteínas presentes en el extracto larval-somático y excretadas-secretadas espontáneamente “*in vitro*” por larvas de *T. canis*:** en la figura 5 se muestra el perfil de bandas de proteína obtenidas por electroforesis en geles de poliacrilamida 7,5% en condiciones desnaturalantes (PAGE-SDS). La mayor parte de ellas se encontraban en el rango de PM entre 100 y 8 kDa.

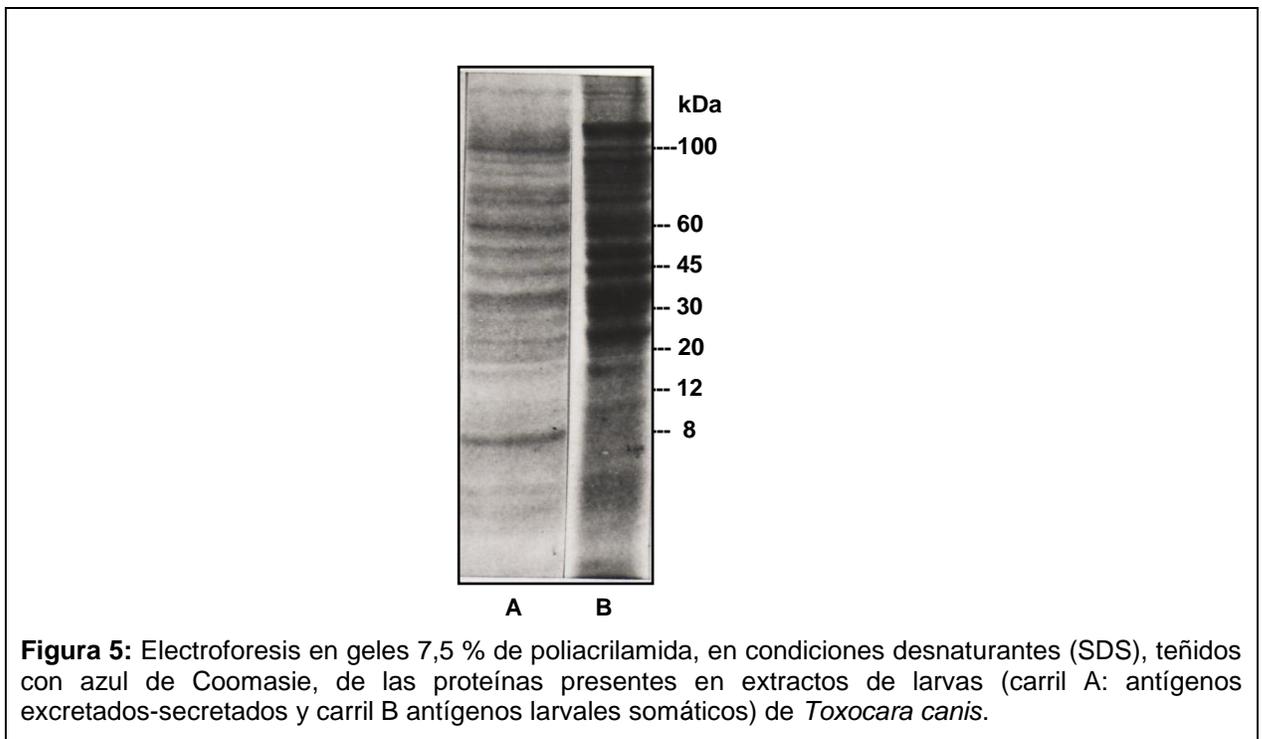


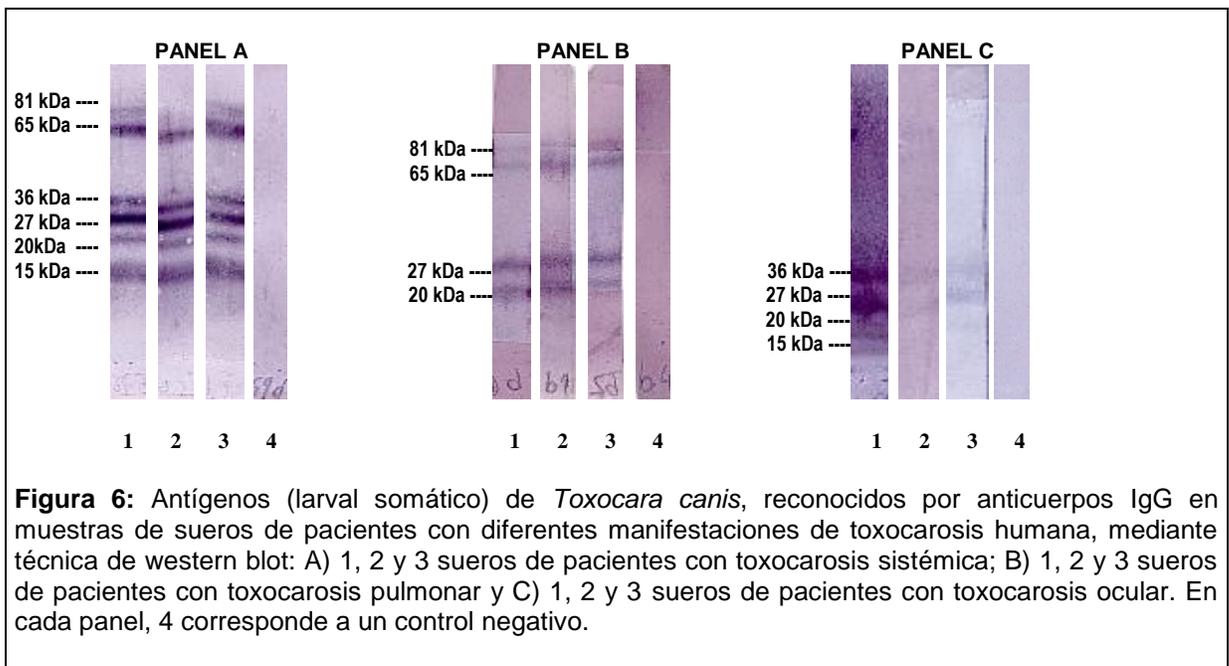
Figura 5: Electroforesis en geles 7,5 % de poliacrilamida, en condiciones desnaturalantes (SDS), teñidos con azul de Coomasie, de las proteínas presentes en extractos de larvas (carril A: antígenos excretados-secretados y carril B antígenos larvales somáticos) de *Toxocara canis*.

2. Reconocimiento de proteínas larvales-somáticas y excretadas-secretadas de larvas de *T. canis*, por sueros de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de toxocarosis humana (n=101): para el análisis mediante la técnica de western blot, se utilizaron como antígenos, proteínas LS y ES por larvas de *T. canis*, las cuales fueron reconocidas por 2 clases de inmunoglobulinas: IgG e IgA. Es decir, con el objetivo de visualizar si existen diferencias en el reconocimiento de dichos antígenos por anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad, para cada suero se hicieron cuatro determinaciones en las siguientes condiciones:

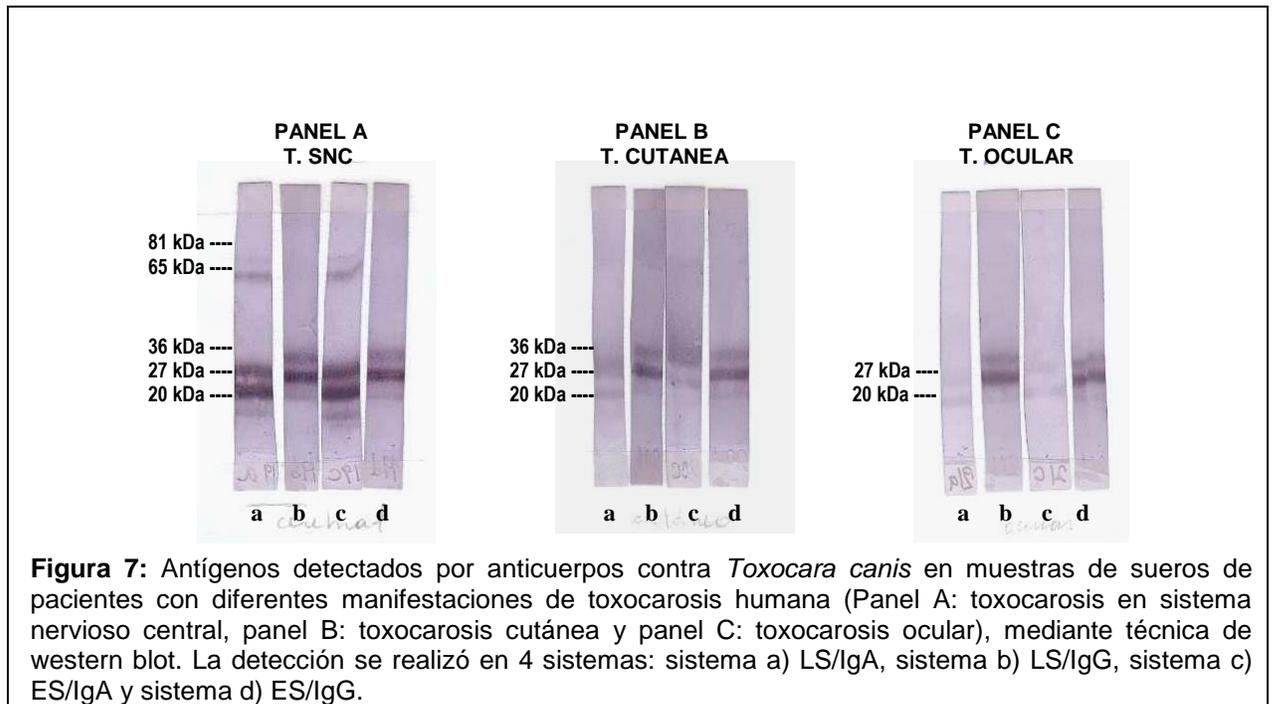
- Sistema LS/IgA: Antígeno Larval Somático reconocido por la clase de inmunoglobulina IgA.
- Sistema LS/IgG: Antígeno Larval Somático reconocido por la clase de inmunoglobulina IgG.
- Sistema ES/IgA: Antígeno Excretado-Secretado reconocido por clase de inmunoglobulina IgA.
- Sistema ES/IgG: Antígeno Excretado-Secretado reconocido por clase de inmunoglobulina IgG.

Por lo tanto, los resultados que se presentan a continuación corresponden a 404 determinaciones, todas ellas realizadas por lo menos dos veces. El análisis posterior se realizó determinando los PM de los antígenos reconocidos por las dos clases de inmunoglobulinas. Además se analizaron 10 muestras de sueros de pacientes aparentemente sanos y 10 muestras de pacientes que habían recibido tratamiento contra la toxocarosis (80 determinaciones) y 24 muestras de sueros de pacientes con otras parasitosis (96 determinaciones). Estos 3 grupos negativos por ELISA para toxocarosis. El total de determinaciones fue de 580 como mínimo.

En las siguientes figuras se muestran algunas de las tiras de nitrocelulosa transferida, obtenidas mediante western blot. En la figura 6 se observa antígenos de *T. canis*, que son reconocidos cuando se utiliza sólo un sistema de detección (LS/IgG) por sueros de pacientes con toxocarosis humana sistémica, pulmonar y ocular. Los PM fueron estimados en cada banda antigénica, manteniéndose constantes en las diferentes manifestaciones clínicas, las bandas de 27 y 20 kDa.



En la figura 7 se muestran los antígenos detectados en los cuatro sistemas de detección utilizados, por sueros de pacientes con toxocarosis humana en SNC, cutánea y ocular. Los PM fueron estimados en cada banda antigénica, observándose antígenos de 81, 65, 36, 27 y 20 kDa.



Cuando se analizó el total de muestras sin ser clasificadas según manifestación clínica, se observó que bajo los 4 sistemas en que fueron analizados los sueros, no fue posible detectar el total de ellos como positivos (Cuadro 1). El máximo de sueros detectados (81%), se obtuvo cuando se usó el antígeno LS reconocido por anticuerpos IgG y el mínimo (19%) con antígeno ES por anticuerpos IgA.

Como se observa en el cuadro 1, hay antígeno definidos por su PM presentes en ambos extractos antigénicos que son reconocidos por las dos clases de inmunoglobulinas (27 y 20 kDa), otros antígenos que son reconocidos por anticuerpos IgA e IgG en LS (81 y 65 kDa) o en ES (48 y 40 kDa). El antígeno de 36 kDa se detecta sólo con IgG, pero en ambos extractos antigénicos. Algunos antígenos solamente fueron reconocidos cuando se utilizó un determinado extracto antigénico con una clase de inmunoglobulina (101, 52, 45 y 15 kDa).

El panel de antígenos caracterizados por su PM fue seleccionado para cada sistema y corresponde al grupo de antígenos que fueron detectados con mayor frecuencia y que permitiera detectar sobre el 90% de los sueros positivos por western blot. Estos paneles se observan en la segunda columna, en la primera columna se observa el sistema de detección utilizado. En el sistema LS/IgA con el panel de antígenos de 27, 20, 65, 81 y 15 kDa, se detectan 40 de las 43 muestras positivas por western blot, lo que representa un 93% de detección. En la última columna se expresa el valor de las 43 muestras positivas por western blot, para este sistema, sobre el total de muestras positivas por ELISA, lo que representa un 43%. Cada panel de antígenos está ordenado de acuerdo al número de detecciones dentro del total de muestras estudiadas, por lo tanto, el primero de la lista es el más frecuente y así sucesivamente.

Cuadro 1: Antígenos de *Toxocara canis* más frecuentes, detectados mediante western blot en muestras de sueros de pacientes con toxocarosis humana.

Sistema Ag-Ac	Panel de antígenos más frecuentes (kDa)	Muestras + / Total + (WB) (%)	Muestras + / n (E) (%) n = 101
LS/IgA	27 20 65 81 15	40 / 43 (93)	43 / 101 (43)
LS/IgG	27 20 65 36 81 52 101	82 / 82 (100)	82 / 101 (81)
ES/IgA	40 27 20 48	18 / 19 (95)	19 / 101 (19)
ES/IgG	45 40 27 20 48 36	52 / 52 (100)	52 / 101 (51)

Análisis de sueros clasificados según manifestación clínica:

1. Muestras de sueros de pacientes con toxocarosis humana sistémica.

1.1. Muestras de sueros de pacientes con toxocarosis pulmonar (n=23): el máximo de sueros positivos (74%) se logró al utilizar el sistema LS/IgG y el mínimo con el sistema ES/IgA (17%). El panel de antígenos que se requiere para detectar el mayor porcentaje de los sueros que resultaron positivos para cada una de las cuatro condiciones ensayadas, se muestra en el cuadro 2. Se destacan antígenos que son reconocidos por anticuerpos IgA e IgG en LS (27 kDa) y en ES (48 y 20 kDa).

Cuadro 2: Antígenos de *Toxocara canis* más frecuentes, detectados mediante western blot en muestras de sueros de pacientes con toxocarosis humana pulmonar.

Sistema Ag-Ac	Panel de antígenos más frecuentes (kDa)	Muestras + / Total + (WB) (%)	Muestras + / n (E) (%) n = 23
LS/IgA	20 27 65	8 / 8 (100)	8 / 23 (35)
LS/IgG	27 87 52	17 / 17 (100)	17 / 23 (74)
ES/IgA	20 48	4 / 4 (100)	4 / 23 (17)
ES/IgG	20 48 45	13 / 13 (100)	13 / 23 (57)

1.2. Muestras de sueros de pacientes con toxocarosis cutánea (n=5): el máximo de sueros positivos (100%) se logró al utilizar dos sistemas, LS/IgG y ES/IgG. Por otra parte el mínimo se logró con los sistemas LS/IgA y ES/IgA (80%). En el cuadro 3 puede observarse que el antígeno de 27 kDa está presente en ambos extractos antigénicos y que es reconocido por las dos clases de anticuerpos.

Cuadro 3: Antígenos de *Toxocara canis* más frecuentes, detectados mediante western blot en muestras de sueros de pacientes con toxocarosis humana cutánea.

Sistema Ag-Ac	Panel de antígenos más frecuentes (kDa)	Muestras + / Total + (WB) (%)	Muestras + / n (E) (%) N = 5
LS/IgA	27	4 / 4 (100)	4 / 5 (80)
LS/IgG	27	5 / 5 (100)	5 / 5 (100)
ES/IgA	27	4 / 4 (100)	4 / 5 (80)
ES/IgG	27 75	5 / 5 (100)	5 / 5 (100)

1.3. Muestras de sueros de pacientes con toxocarosis en SNC (n=11): el máximo de sueros positivos (73%) se logró al utilizar el sistema LS/IgG y el mínimo con ES/IgA (9%). El panel de antígenos que se requiere para detectar el 100% de los sueros que resultaron positivos para cada una de las cuatro condiciones ensayadas, se muestra en el cuadro 4. El antígeno de 27 kDa está presente en ambos extractos antigénicos, pero no es reconocido por inmunoglobulinas de clase IgA, en ES.

Cuadro 4: Antígenos de *Toxocara canis* más frecuentes, detectados mediante western blot en muestras de sueros de pacientes con toxocarosis en SNC.

Sistema Ag-Ac	Panel de antígenos más frecuentes (kDa)	Muestras + / Total + (WB) (%)	Muestras + / n (E) (%) N = 11
LS/IgA	27	3 / 3 (100)	3 / 11 (27)
LS/IgG	27 81	8 / 8 (100)	8 / 11 (73)
ES/IgA	20	1 / 1 (100)	1 / 11 (9)
ES/IgG	27 48	3 / 3 (100)	3 / 11 (27)

1.4. Muestras de sueros de pacientes con toxocarosis hepática (n=1): En la única muestra de suero que nos fue proporcionada, se detectó un antígeno de 20 kDa, presente en ambos extractos antigénicos y fue reconocido por las dos clases de inmunoglobulinas.

1.5. Muestras de sueros de pacientes con toxocarosis cardiaca (n=2): Correspondieron a 2 sueros con toxocarosis cardiaca, siendo detectado el antígeno de 27 kDa en los cuatro sistemas de análisis aplicados. Además, los sistemas LS/IgA y LS/IgG reconocen un antígeno de 59 kDa y el sistema ES/IgG un antígeno de 20 kDa.

2. Muestras de sueros de pacientes con toxocarosis humana ocular (n=27): el máximo de sueros positivos (85%) se logró al utilizar el sistema LS/IgG y el mínimo con ES/IgA (7%). El panel de antígenos que se requiere para detectar el 100% de los sueros que resultaron positivos para cada una de las cuatro condiciones ensayadas, se muestra en el cuadro 5. El antígeno de 27 kDa está presente en ambos extractos antigénicos, pero no es reconocido por inmunoglobulinas de clase IgA en ES. Por otra parte el antígeno de 20 kDa está presente en ambos extractos antigénicos, pero no es reconocido por anticuerpos IgG; en cambio el antígeno de 36 kDa está presente en ambos extractos antigénicos, pero no es reconocido por anticuerpos IgA, sólo por anticuerpos IgG.

Cuadro 5: Antígenos de *Toxocara canis* más frecuentes, detectados mediante western blot en muestras de sueros de pacientes con toxocarosis ocular.

Sistema Ag-Ac	Panel de antígenos más frecuentes (kDa)	Muestras + / Total + (WB) (%)	Muestras + / n (E) (%) n = 27
LS/IgA	27 20 81 65	11 / 12 (92)	12 / 27 (44)
LS/IgG	27 36 65 52 101	22 / 23 (96)	23 / 27 (85)
ES/IgA	20 40	2 / 2 (100)	2 / 27 (7)
ES/IgG	45 36 27	12 / 12 (100)	12 / 27 (44)

3. Muestras de sueros de pacientes con toxocarosis humana asintomática (n=32): el máximo de sueros positivos (81%) se logró al utilizar el sistema LS/IgG y el mínimo con ES/IgA (28%). El panel de antígenos que se requiere para detectar el 100% de los sueros que resultaron positivos para cada una de las cuatro condiciones ensayadas, se muestra en el cuadro 6. El antígeno de 27 kDa está presente en ambos extractos antigénicos y es reconocido por las dos clases inmunoglobulinas, en cambio el de 65 kDa sólo está presente en el extracto antigénico de tipo LS y es reconocido por las dos clases de inmunoglobulinas. Algo similar ocurre con el antígeno de 40 kDa presente sólo en el extracto antigénico de tipo ES y es reconocido también por las 2 clases de inmunoglobulinas.

Cuadro 6: Antígenos de *Toxocara canis* más frecuentes, detectados mediante western blot en muestras de sueros de pacientes con toxocarosis asintomática.

Sistema Ag-Ac	Panel de antígenos más frecuentes (kDa)	Muestras + / Total + (WB) (%)	Muestras + / n (E) (%) n = 32
LS/IgA	27 65 15 75	16 / 16 (100)	16 / 32 (50)
LS/IgG	27 65 36	26 / 26 (100)	26 / 32 (81)
ES/IgA	40 27 93	9 / 9 (100)	9 / 32 (28)
ES/IgG	40 27 52	17 / 17 (100)	17 / 32 (53)

Al seleccionar aquel antígeno con mayor porcentaje de detección en base a su PM, presente sólo en una manifestación de toxocarosis, el mayor porcentaje de detección se obtuvo en la manifestación asintomática, donde el antígeno de 40 kDa, fue detectado en 7 de 9 muestras de sueros positivos, en el sistema ES/IgA, lo que representa un 78% del total positivo, detectado por western blot.

En el cuadro 7 se presenta otro análisis de los resultados obtenidos, donde se observa la presencia de antígenos más frecuentes, presentes en una o dos manifestaciones clínicas de toxocarosis humana, determinados por su PM. Se eliminaron los antígenos de 20 y 27 kDa, comunes a todas las manifestaciones de toxocarosis humana y se determinaron paneles de antígenos con mayor detección por los sueros en estudio. La manifestación en la que se obtuvo el mayor porcentaje de detección, nuevamente fue la asintomática, con un 84%, en el panel de antígenos de 40 y 36 kDa, el antígeno de 40 kDa está presente en 13 de las 32 muestras analizadas y el de 36 kDa en 27 de las 32 muestras. Los 13 casos en los cuales se detectó el antígeno de 40 kDa están incluidos en los 27 que reconocen el de 36 kDa. Si bien el antígeno de 36 kDa, fue detectado además en otras parasitosis, esto ocurrió en 2 de los 24 sueros analizados, la misma situación se produjo con el antígeno de 65 kDa.

Cuadro 7: Paneles de antígenos presentes con mayor frecuencia en 1 ó 2 manifestaciones clínicas de toxocarosis humana determinados mediante western blot.

Antígenos más frecuentes				
TOXOCAROSIS (+/N)	65	45	40	36
PULMONAR (15/23) (65%)	9/23 LS/IgAG	5/23 LS/IgG		
OCULAR (18/27) (67%)		10/27 LSES/IgG		14/27 LSES/IgAG
ASINTOMÁTICA (27/32) (84%)			13/32 ES/IgAG	27/32 LS/IgAG

4. Muestras de sueros de pacientes con toxocarosis humana sometidos a tratamiento y cuyo resultado de ELISA posterior a la terapia resultó negativo (n=10): el máximo de sueros positivos (100%) se logró al utilizar el sistema LS/IgG y el mínimo con ES/IgA (10%). Como se observa en el cuadro 8, el antígeno de 27 kDa está presente en ambos extractos antigénicos, pero no es reconocido por inmunoglobulinas de clase IgA en LS. El antígeno de 20 kDa es detectado sólo en el sistema LS/IgA, lo contrario ocurre con el antígeno de 45 kDa que sólo es detectado en el sistema ES/IgG.

Cuadro 8: Antígenos de *Toxocara canis* más frecuentes, detectados mediante western blot en muestras de sueros de pacientes con toxocarosis humana tratada y negativos al ELISA.

Sistema Ag/Ac	Panel de antígenos más frecuentes (kDa)	Muestras + / Total + (WB) (%)	Muestras + / n (E) (%) n = 10
LS/IgA	20	4 / 4 (100)	4 / 10 (40)
LS/IgG	27	10 / 10 (100)	10 / 10 (100)
ES/IgA	27	1 / 1 (100)	1 / 10 (10)
ES/IgG	27 45	3 / 3 (100)	3 / 10 (30)

5. Muestras de sueros de pacientes aparentemente sanos cuyo resultado de ELISA para toxocarosis resultó negativo (n=10): no se detectaron antígenos en ninguna de las muestras analizadas, bajo las 4 condiciones utilizadas en el presente estudio.

6. Reconocimiento de proteínas larvales-somáticas y excretadas-secretadas de *T. canis*, por sueros de pacientes con otras parasitosis (n=24): El máximo de sueros detectados (33%), se obtuvo cuando se usó el antígeno LS reconocido por anticuerpos IgG y el mínimo (8,3%) con antígeno ES reconocidos por anticuerpos IgA (cuadro 9). Los antígenos de 81, 65, 52 y 36 kDa, también están presentes en las muestras de suero de pacientes con toxocarosis, lo que podría estar evidenciando una reacción cruzada de estos antígenos.

Cuadro 9: Antígenos de *Toxocara canis* más frecuentes, detectados mediante western blot en muestras de sueros de pacientes con otras parasitosis.

Sistema Ag/Ac	Panel de antígenos más frecuentes (kDa)	Muestras + / n (%) n = 24
LS/IgA	106 65 36	4 / 24 (17)
LS/IgG	106 93 81 56 36	8 / 24 (33)
ES/IgA	87	2 / 24 (8,3)
ES/IgG	106 81 52	4 / 24 (17)

6.1. Análisis de sueros clasificados según parasitosis:

6.1.1. Muestras de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas (n=6): el máximo de sueros positivos (33%) se logró al utilizar el sistema LS/IgG y el mínimo con LS/IgA y ES/IgG (17%). En el sistema ES/IgA no hubo detección. El panel de antígenos que se requiere para detectar el 100% de los sueros que resultaron positivos para cada una de las cuatro condiciones ensayadas, se muestra en el cuadro 10. Se destacan antígenos que son reconocidos por anticuerpos IgA e IgG en LS (36 kDa). El antígeno de 81 kDa reconocido sólo en LS/IgG. Ambos antígenos también detectados en sueros de pacientes con toxocarosis.

Cuadro 10: Antígenos de *Toxocara canis* más frecuentes, detectados mediante western blot en muestras de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas.

Sistema Ag/Ac	Panel de antígenos más frecuentes (kDa)	Muestras + / n (%) n = 6
LS/IgA	36	1 / 6 (17)
LS/IgG	81 36	2 / 6 (33)
ES/IgA	NO HUBO DETECCION	0 / 6 (0)
ES/IgG	106	1 / 6 (17)

6.1.2. Muestras de sueros de pacientes con toxoplasmosis (n=6): el máximo de sueros positivos (50%) se logró al utilizar el sistema LS/IgG y por otra parte el mínimo se logró con el sistema LS/IgA (33%). En ES/IgA y ES/IgG no hubo detección de ningún antígeno. El panel de antígenos que se requiere para detectar el 100% de los sueros que resultaron positivos para cada una de las cuatro condiciones ensayadas, se muestra en el cuadro 11. Se destacan antígenos que son reconocidos por anticuerpos IgA e IgG en LS (106 kDa). Además se observan antígenos que se detectaron frecuentemente en sueros de pacientes con toxocarosis (81 y 65 kDa)

Cuadro 11: Antígenos de *Toxocara canis* más frecuentes, detectados mediante western blot en muestras de sueros de pacientes con toxoplasmosis.

Sistema Ag/Ac	Panel de antígenos más frecuentes (kDa)	Muestras + / n (%) N = 6
LS/IgA	106 65	2 / 6 (33)
LS/IgG	106 81 56	3 / 6 (50)
ES/IgA	NO HUBO DETECCION	0 / 6 (0)
ES/IgG	NO HUBO DETECCION	0 / 6 (0)

6.1.3. Muestras de sueros de pacientes con hidatidosis (n=7): el máximo de sueros positivos (43%) se logró al utilizar los sistemas LS/IgG y ES/IgG, el mínimo se obtuvo con LS/IgA (14%). El panel de antígenos que se requiere para detectar el 100% de los sueros que resultaron positivos para cada una de las cuatro condiciones ensayadas, se muestra en el cuadro 12. El antígeno de 81 kDa está presente en ambos extractos antigénicos, pero sólo es reconocido por anticuerpos de tipo IgG, que junto a los antígenos de 65 y 52 kDa, también son reconocidos en la toxocarosis humana. Además se observa un antígeno de 87 kDa, detectado en ambos extractos antigénicos, sólo por IgA.

Cuadro 12: Antígenos de *Toxocara canis* más frecuentes, detectados mediante western blot en muestras de sueros de pacientes con hidatidosis.

Sistema Ag/Ac	Panel de antígenos más frecuentes (kDa)	Muestras + / n (%) n = 7
LS/IgA	106 87	1 / 7 (14)
LS/IgG	81 52	3 / 7 (43)
ES/IgA	87	2 / 7 (29)
ES/IgG	81 65	3 / 7 (43)

6.1.4. Muestras de sueros de pacientes con cisticercosis (n=5): Sólo se detectó 1 suero positivo, de los 5 en estudio, el cual reconoció el antígeno de 93 kDa al utilizar el sistema LS/IgG.

Discusión

La toxocarosis humana es una de las infecciones helmínticas más reportadas en todo el mundo. Los estudios de prevalencia efectuados en áreas urbanas de países desarrollados varían entre un 2% a un 15% y es más alta en sectores rurales llegando a un 92,8% aproximadamente, en países como Italia, Corea, Suecia, Escocia, Polonia, Brasil, Argentina, entre otros, y Francia donde es considerada endémica (Ajayi *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2001; Anaruma *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2004; Guimaraes *et al.*, 2005).

Identificar antígenos específicos de *T. canis* es una tarea importante a desarrollar, puesto que permitiría lograr mejores técnicas diagnósticas y de evaluación de la eficacia del tratamiento quimioterapéutico (Morales *et al.*, 2002). Una técnica que permite abordar este problema es la de western blot.

Con respecto a la preparación de los antígenos utilizados en la técnica de western blot, Robertson *et al.*, (1989) describieron enzimas proteolíticas que son secretadas por cultivos *in vitro* de larvas de *T. canis* y propusieron que algunas especies de nemátodos, incluyendo *Toxocara spp*, tienen actividad de proteasas en sus productos ES. En condiciones naturales probablemente estas proteasas estarían involucradas en la invasión y migración de la larva en el hospedero. Adicionalmente, estas proteasas secretadas *in vitro* son capaces de degradar componentes antigénicos, causando una pérdida de capacidad de reacción en inmunoensayos. Por esta razón en el presente estudio los antígenos utilizados fueron procesados en presencia de inhibidores de proteasas.

El test serológico más comúnmente utilizado para el diagnóstico de la toxocarosis humana es el ensayo de ELISA utilizando el antígeno ES (Jacquier *et al.*, 1991). Un ensayo de ELISA positivo para *Toxocara* puede ser confirmado por western blot que según literatura sería tan sensible como ELISA y muy específico cuando se utilizan bandas de bajo PM (de 24 a 35 kDa) (Magnaval *et al.*, 1991). Los sueros analizados que fueron positivos por ELISA a toxocarosis humana utilizando antígeno ES e inmunoglobulinas de clase IgG, mostraron, en los sistemas utilizados y mediante la técnica de western blot, una positividad de un máximo de 81% del total de sueros, lo cual se obtuvo cuando se utilizó el sistema LS/IgG. Es decir la

sensibilidad del western blot fue menor en comparación al test de ELISA. Una explicación podría ser que existe un porcentaje importante de anticuerpos en los sueros de los pacientes que están dirigidos contra antígenos nativos, que no son detectados por la técnica de western blot, ya que los antígenos que se utilizaron fueron denaturados con detergente (SDS) y reducidos con β -mercaptoetanol.

Sin embargo 10 muestras de sueros de pacientes que habían recibido tratamiento específico para toxocarosis humana y que mostraban pruebas de ELISA negativas, fueron positivos por western blot en el sistema LS/IgG, siendo el antígeno de 27 kDa detectado en todas las muestras, sugiriendo que se trata de un antígeno que no estaría evidenciando infección activa. Al utilizar el sistema ES/IgG, que corresponde al antígeno y a la clase de inmunoglobulina utilizada en el ensayo de ELISA, sólo 3 de los 10 sueros en estudio, resultaron positivos.

En las 10 muestras de sueros de personas aparentemente sanas y con reacción negativa al ELISA para toxocarosis humana, no hubo detección de antígenos en ninguno de los cuatro sistemas utilizados. Pese a los datos de seroprevalencia de la enfermedad obtenidos en literatura.

Cuando se analizaron las 24 muestras de sueros de pacientes con otras parasitosis y negativas para toxocarosis humana mediante ELISA. Se observó reconocimiento cruzado de antígenos principalmente de PM superior a 50 kDa (106, 93, 87, 81, 65, 56, 52 y 36 kDa), esto concuerda con lo reportado en literatura por otros autores (Smith *et al.*, 1982, Vergara, 1991, Maruyama *et al.*, 1997, Bhattacharyya *et al.*, 2001, Romasanta *et al.*, 2003), lo que avala el uso de la técnica de western blot que permite diferenciar los antígenos que son reconocidos por los anticuerpos. Cabe señalar que los antígenos de 106, 93 y 87 kDa fueron detectados minoritariamente (4% de los sueros con toxocarosis), en cambio los antígenos de 81, 65, 52 y 36 kDa, tuvieron una detección mayor en sueros con toxocarosis.

Santillán (2000), realizó un estudio en toxocarosis humana, en el que detectó bandas específicas mediante western blot, utilizando antígeno ES de L2, estas correspondieron a antígenos de 120, 70, 55, 32 y 30 kDa, siendo el triplete de aproximadamente 120 kDa el responsable de actividad cruzada con otras parasitosis. Estudios realizados en varios países purificando el antígeno obtuvieron antígenos de 150, 120, 70, 50, 37, 30, 26, 25 y 24 kDa, los

autores concluyen que cuando se observan bandas de alto PM (150, 120, 70 y 50 kDa) puede tratarse de una infección reciente o una reacción cruzada con otras helmintiasis (Bowman *et al.*, 1987; Magnaval *et al.*, 1991; Courtade *et al.*, 1995; Mercado *et al.*, 2002).

Morales *et al.*, (2002), realizaron un estudio en conejos, utilizando antígeno ES, en el que se observó una correlación entre el patrón de bandas por western blot y el estado de la infección; en el primer mes después de la infección se observan antígenos específicos de 200 y 116 kDa, mientras que antígenos de 80, 66, 45, 31 y 28 kDa aparecen después. Sólo los antígenos de 92 y 35 kDa se mantuvieron durante todo el curso de la enfermedad. Por otro lado, mostraron concordancia entre los resultados de ELISA y western blot.

Similarmente, Magnaval *et al.*, (1991), en un estudio acerca de la aplicación del western blot para el diagnóstico de toxocarosis humana, demostraron una correlación entre estos dos métodos inmunológicos. Hasta el momento, no han sido reportados en la literatura estudios en los que se utilicen los cuatro sistemas analizados en el presente trabajo.

Nuestros resultados muestran la presencia de antígenos de 27 y 20 kDa, presentes en ambos extractos antigénicos del estadio larvario L2, que son reconocidos por las dos clases de anticuerpos y otros antígenos que son reconocidos por anticuerpos IgA e IgG en LS (81 y 65 kDa) o en ES (48 y 40 kDa). El antígeno de 36 kDa es detectado en ambos extractos antigénicos, pero sólo con IgG. Además algunos antígenos solamente fueron reconocidos cuando se utilizó un determinado preparado antigénico con una clase de inmunoglobulinas (101, 52, 45 y 15 kDa). De estos, los antígenos de 81, 65, 52 y 36 kDa, también son reconocidos por sueros de otras parasitosis, en 4, 2, 1 y 2 sueros, de los 24 en estudio, respectivamente.

Al comparar los antígenos utilizados (LS y ES), la mayor detección se logra con LS, independiente de la clase de anticuerpo (IgG e IgA). Por otra parte si la presencia de IgA determinara la fase aguda de la infección, como se describe en literatura, nuestros resultados mostrarían que el máximo de casos agudos detectados sería el 43%, cuando se utiliza el antígeno LS y un mínimo de 19% con ES. Estos porcentajes son concordantes con los reportados por la clínica y en literatura (aproximadamente 30%) (Minvielle *et al.*, 1999; Cerva y Noemí, 2004²).

² Comunicación personal (Agosto, 2004) Hospital Luis Calvo Mackenna, Laboratorio de Parasitología.

Ya que en literatura el único sistema utilizado en western blot es ES/IgG, sólo podemos hacer comparaciones con respecto a este sistema. En este sentido, nuestros resultados son concordantes con los de otros autores, que señalan que los antígenos de bajo PM serían específicos para toxocarosis (Magnaval *et al.*, 1991). Las bandas de bajo PM que principalmente detectamos fueron de 45, 40, 36, 27 y 20 kDa. Aunque el antígeno de 36 kDa también fue detectado en sueros con otras parasitosis. Los antígenos más comunes en todas las manifestaciones clínicas correspondieron a 27 y 20 kDa, detectadas en los cuatro sistemas utilizados. Antígenos de mayor PM fueron detectados en los sistemas LS/IgA y LS/IgG, los cuales han sido señalados en literatura como responsables de las reacciones cruzadas (Smith *et al.*, 1982; Vergara, 1991; Bhattacharyya *et al.*, 2001). Romasanta *et al.*, (2003) demostraron que las proteínas de 190, 160 y 33 kDa, se pueden detectar en sueros de pacientes con *F. hepática*, *T. canis* y *A. suum*.

Magnaval *et al.*, (1991), aplicando la técnica de western blot para el inmunodiagnóstico de la toxocarosis humana, clasificaron en 2 grupos los 7 antígenos que detectaron: un grupo de alto PM (200, 147 y 132 kDa) y otro de bajo PM (35, 30, 28 y 24 kDa), ellos sugieren que el grupo de alto PM puede asociarse con reacciones cruzadas, mientras que las de bajo PM parecen ser más específicas para *Toxocara spp.*

Jacob *et al.*, (1995), observaron 4 bandas con PM entre 210 y 29 kDa y notaron que la de 66 kDa fue también identificada en algunos pacientes cuyos sueros habían sido utilizados como controles negativos. Nunes *et al.*, (1997), observaron numerosos antígenos en pacientes con signos de toxocarosis humana, de los cuales 5 antígenos fueron los principales: sobre 205 kDa, cerca de 205 kDa, de 116 a 97 kDa, 55 a 50 kDa y 35 a 29 kDa. En concordancia con otros estudios las fracciones de bajo PM no presentan ninguna reacción cruzada con otros antígenos de ascáridos.

Hasta el momento en la literatura no se han reportado trabajos en los que se evalúe la posible asociación entre anticuerpos específicos antitoxocara y las diversas manifestaciones clínicas de toxocarosis humana mediante la técnica de western blot.

El porcentaje de casos en la población infantil, reportados en hospitales de nuestro país, varía según la manifestación clínica de la enfermedad, observándose diferentes

prevalencias. La toxocarosis ocular es la de más difícil diagnóstico, porque la prueba de ELISA específica para toxocara, utilizando el sistema ES/IgG, es menos sensible que para otra manifestación clínica (Glickman *et al.*, 1986). Otro problema podría ser el punto de corte usado para el diagnóstico de toxocarosis humana. Diversos estudios señalan que, en caso de síndrome ocular, al bajar el punto de corte de la prueba de ELISA (1:8 ó 1:2) aumenta la probabilidad de detección de casos. Más aún, una prueba negativa no excluye la posibilidad de toxocarosis humana ocular (Gillespie *et al.*, 1993).

El objetivo principal del presente estudio fue buscar la posible relación entre diversas manifestaciones clínicas de toxocarosis humana y el reconocimiento de antígenos específicos y exclusivos para cada presentación. Al respecto la única asociación encontrada fue en la presentación asintomática, con el antígeno de 40 kDa en el sistema ES/IgA. Este hecho podría ser relevante puesto que, según literatura, la presencia de anticuerpos IgA contra antígenos de *T. canis*, sería indicativo de fase aguda; por lo tanto, resultaría importante su detección en individuos que no presentan sintomatología clínica específica.

La importancia de realizar el análisis de los antígenos específicos más frecuentes presentes en una o dos manifestaciones de toxocarosis humana, determinados por su PM, es poder inferir la manifestación de toxocarosis mediante la detección del panel característico y por lo tanto dirigir el diagnóstico.

Puesto que la elección de los antígenos específicos para cada una de las manifestaciones de toxocarosis humana fue estricta, en cuanto a que debe ser detectado solamente por sueros de pacientes que presenten una determinada manifestación, el número de sueros que tienen esta correspondencia unívoca es bajo.

Si bien no se encontraron antígenos que fueran detectados por la mayoría de los sueros estudiados, correspondientes a cada una de las manifestaciones de toxocarosis humana, el hecho de encontrar antígenos específicos para algunas manifestaciones abre la posibilidad de optimizar las condiciones de las técnicas y utilizar antígenos purificados, que maximicen su detección por los sueros de los pacientes.

Entre las nuevas perspectivas para el diagnóstico inmunológico de la toxocarosis, puede ser previsto el desarrollo de nuevas metodologías que permitan un diagnóstico

temprano y más práctico. Yamasaki *et al.*, (2000), propone el desarrollo de un antígeno recombinante de *T. canis*, el cual es altamente específico, en comparación al convencional antígeno ES de *T. canis* (Morales *et al.*, 2002).

Conclusiones

- Mediante la técnica de western blot, la detección de antígenos por sueros de pacientes con toxocarosis, fue mayor en el extracto larval somático que en el excretado-secretado. Las inmunoglobulinas de clase IgG, fueron las más detectados, en comparación con IgA.
- La utilización de la técnica de western blot es recomendable para visualizar las reacciones cruzadas que se producen principalmente con algunos antígenos con peso molecular sobre 50 kDa, lo que no se logra mediante ELISA.
- El 30% de los sueros reconoció antígenos de *Toxocara canis* con inmunoglobulinas de la clase IgA, que según literatura estaría indicando infección aguda. Esto coincide con los porcentajes esperados, según antecedentes clínicos, de casos agudos de toxocarosis.
- Al seleccionar el antígeno presente sólo en una manifestación de toxocarosis, el mayor porcentaje se obtuvo en la manifestación clínica asintomática, el antígeno de 40 kDa, fue detectado en el sistema ES/IgA. Esto sería relevante puesto que este antígeno permitiría orientar el diagnóstico de esta manifestación clínica en la fase aguda de la enfermedad.
- La correspondencia de antígenos frente a una o dos manifestaciones clínicas de toxocarosis fluctúa entre 65% y 84%. Sin embargo el hecho de encontrar antígenos específicos para algunas manifestaciones abre la posibilidad de optimizar las condiciones de la técnica y utilizar antígenos purificados o recombinantes, que optimicen su detección por sueros de pacientes con toxocarosis humana.
- La importancia de realizar el análisis de los antígenos específicos más frecuentes presentes en una o dos manifestaciones de toxocarosis humana, determinados por su PM, es poder inferir la manifestación de toxocarosis mediante la detección de un panel característico y por lo tanto, dirigir el diagnóstico.

Bibliografía

1. ABE, N.; YASUKAWA, A. (1997) Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in sandpits of parks in Osaka city, Japan, with notes on the prevention of egg contamination by fence construction. *J. Vet. Med. Sci.* **59** (1): 79-80.
2. ALONSO, J.; BOJANICH M.; CHAMORRO, M.; GORODNER, J. (2000) Brief Communication *Toxocara* Seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **42** (4): 235-237.
3. ALONSO, J.; LÓPEZ, M.; BOJANICH, M.; MARULL, J. (2004) Seroprevalencia de toxocariasis entre donantes de sangre de la ciudad de Resistencia (Argentina). *Comunicaciones científicas y tecnológicas. Universidad nacional del nordeste. Res.:* M-051. 3 h.
4. AJAYI, O.; DUHLINSKA, D.; AGWALE, S; NJOKU, M. (2000) Frequency of human Toxocariasis in Jos, Plateau state, Nigeria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro.* **95** (2): 147-149.
5. ALTICHEH, J.; NALLAR, M.; CONCA, M.; BIANCARDI, M.; FREILIJ, H. (2003) Toxocariasis: aspectos clínicos y de laboratorio en 54 pacientes. *An. Pediatr. Asociación Española de Pediatría.* **58** (05): 425-431.
6. ANARUMA, F.; CHIEFFI, P.; CORREA, C.; CAMARGOS, E.; SILVEIRA, E.; ARANHA, J.; RIBEIRO, M. (2002) Human toxocariasis: A seroepidemiological survey in the municipality of Campinas (SP) Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* **44** (6): 303-307.
7. BASS, J.; MEHTA, K.; GLICKMAN, L.; BLOKER, R.; EPPES, B. (1987) Asymptomatic Toxocariasis in children: a prospective study and a treatment trial. *Clin. Pediatr.* **26**: 441-446.
8. BHATTACHARYYA, T.; SANTRA, A.; GUHA, D.; CHATERJEE, B. (2001) Possible approach for serodiagnosis of ascariasis by evaluation of immunoglobulin G4 response using *Ascaris lumbricoides* somatic antigen. *American Society of Microbiology. J. Clin. Microbiol.* **39** (8): 2991-2994.
9. BOTERO, J.; HURTADO, M.; OCAMPO, N.; CAÑAS, L.; BRAVO, J.; LOPERA, M. (2001) Frecuencia de toxocarosis ocular en menores de edad remitidos al servicio de parasitología intestinal Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia. Medellín. *Acta Médica Colombiana.* **26** (6).
10. BOWMAN, D., MIKA-GRIEVE, M.; GRIEVE, R. (1987) *Toxocara canis*: Monoclonal antibodies to larval excretory-secretory antigens that bind with genus and species specificity to the cuticular surface of infective larvae. *Exp. Parasitol.* **64**: 458-465.
11. BOWMAN, D.; GRIFFITHS, J. (2000) Larval Toxocariasis. Current treatment options in infectious diseases. Department of microbiology and immunobiology, Cornell University.

Tower road. Ithaca, NY 14853-6401, USA. Copyright by Current Science Inc. ISSN 1523-3820. **2**: 70-77.

12. BRADFORD, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.
13. BRUNASKA, M.; DUBINSKY, P.; REITEROVA, K. (1995) *Toxocara canis*: ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs. *Int. J. Parasitol.* **25** (6): 683-690.
14. CAMPOS, D.; RUBINSKY, G.; MELO, E.; GANDOLFI, L.; ABE, C.; TOFETI, A.; PRATESI, R. (2003) Frequency of seropositivity to *Toxocara canis* in children of different socioeconomic strata. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **36** (4).
15. CASTILLO, D.; PAREDES, C.; ZAÑARTU, C.; CASTILLO, G.; MERCADO, R.; MUÑOZ, V.; SCHENONE, H. (2000) Environmental contamination with *Toxocara* sp. Eggs in public square and parks from Santiago, Chile. *Bol. Chil. Parasitol.* **55** (3-4): 86-91.
16. COELHO, L.; DINI, C.; MILMAN, M.; OLIVEIRA, S. (2001) *Toxocara* spp. Eggs in public squares of Sorocaba, Sao Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **43** (4).
17. COURTADE, H.; RECCO, P.; MAGNAVAL, J.; CHARLET, J.; SEGUELA J. (1995) Etude comparative de deux test: ELISA toxocara vis a vis de western blot. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* **13**: 38-53.
18. CORWIN, R. Gusanos redondos (Ascariasis). (1998) En: TILLEY, L.; SMITH, F.; MACMURRAY, A. La consulta veterinaria en 5 minutos canina y felina. Editorial Inter-médica. 691.
19. CUÉLLAR, C.; FENOY, S.; DEL AGUILA, C. GUILLÉN, J. (2001) Isotype specific Immune Responses in Murine Experimental Toxocariasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Print ISSN 0074-0276. **96** (4).
20. DEL VALLE, M.; RADMAN, N.; BURGOS, L.; FONROUGE, R.; ARCHELI, S. (2002) *Toxocara canis*: Migración larval y eosinofilia en el hospedador paraténico. *Parasitol. Latinoam.* **57**: 46-49.
21. DÍEZ, P.; DÍEZ, N.; MORRONGO, M. (1999) Nematodosis: Toxocarosis, Toxoascariosis, Ancilostomatidosis, Tricuriosis, Estrongiloidosis, Espirocercosis y Olulanosis. En: Cordero, M.; Rojo, F.; Martínez, A.; Sánchez, C.; Hernández, S.; Navarrete, J.; Díez, P.; Quiroz, H.; Carvalho, M. *Parasitología Veterinaria.* Mc Graw-Hill. Interamericana. Madrid. 636-642.
22. EBERHARD, M.; ALFANO, E. (1998) Adult *Toxocara cati* infections in U.S. children: report of four cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59** (3): 404-406.
23. FENOY, S.; GUILLÉN, J.; DEL AGUILA, C. (2002) Toxocariosis ocular: la realidad de un problema poco conocido. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* **10**.
24. GILLESPIE, S.; DINNING, W.; VOLLER, A. (1993) The spectrum of ocular Toxocariasis. *Eye.* **7**: 415-418.

25. GLICKMAN, L.; SCHANTZ, P.; GRIEVE, R. (1986) Toxocariasis. Immunodiagnosis of parasitic diseases. Helminthic diseases, Walls KW., Schantz PM. (Eds) New York. Academic press, NYC, USA. **1**: 201-231.
26. GODING, J.; HANDMAN, E. (1984) Electrophoretic analysis of protein antigens. I: Genes and antigens of Parasites. A laboratory Manual (C. Morel Eds.) Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Río de Janeiro. 383-415.
27. GUIMARAES, A.; ALVES, E.; REZENDE, G.; RODRÍGUEZ, M. (2005) *Toxocara* sp. Eggs and *Ancylostoma* sp. Larva in public parks, Brazil. Rev. saude publica. **39** (2): 293-295.
28. HAMES, B.; RICKWOOD, D. (1990) Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. Oxford University Press. New Cork. 2º ED. **16**.
29. HERSKOVIC, P.; LEIVA, S.; ASTORGA, B., MAZOUKA, E.; CEPEDA, V. (1986) Toxocariasis humana en Chile. Evaluación del diagnóstico mediante ELISA. Parasitol. al Día. **10**: 76-80.
30. JACOB, C. (1995) Análise evolutiva dos parâmetros clínico-laboratorais de toxocaríase visceral na infância. Tese de doutoramento. Faculdade de Medicina da USP. São Paulo. 86 h.
31. JACQUIER, P.; GOTTSTEIN, B.; STINGELIN, Y.; ECKERT, J. (1991) Inmunodiagnosis of toxocarosis in humans: Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. J. Clin. Microbiol. **29** (9): 1831-1835.
32. LAEMMLI, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 nature. **227**: 680-685.
33. LOGAR, J.; SOBA, B.; KRAUT, A.; STIRN-KRANJC, B. (2004) Seroprevalence of *Toxocara* antibodies among patients suspected of ocular Toxocariasis in Slovenia. Korean J. Parasitol. **42** (3): 137-140.
34. LÓPEZ, M.; ALONSO, J.; BOJANICH, M.; CHAMORRO, M.; FALIVENE, G. (2003) Aspectos inmunológicos de la infección infantil por *Toxocara canis* en el área del Gran Resistencia (Argentina). Comunicaciones científicas y tecnológicas. Universidad nacional del nordeste. Res.: M-017. 4 h.
35. MACHNICKA-ROWINSKA, B.; KOLODZIEJ, M.; DZIEMIAN, E., BOROSKOVA, Z.; DVOROZNAKOVA, E. (2002) Local and systemic immune response in mice after single and multiple infections with *Toxocara canis*. Helminthología. **39** (4): 185-191.
36. MAGNAVAL, J. (2005) Ojo y parásitos viscerales de los órganos. Orden de nemátoda. *Toxocara canis*. Laboratoire de Parasitologie CHU Purpan 31053. Toulouse, Francia. [en línea]. 3 h. <http://www.cdfound.to.it/HTLM/dir3.htm> (Consulta Agosto, 2005).
37. MAGNAVAL, J.; FABRE, R.; MAURIERES, J., CHARLET, J.; LARRARD, D. (1991) Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human Toxocariasis. Parasitol. Res. **77** (8): 697-702.

38. MAGNAVAL, J.; FABRE, R.; MAURIERES, J.; CHARLET, J.; LARRARD, D. (1992) Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-toxocara immunoglobulin E for diagnosis and post treatment follow-up of human Toxocariasis. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2269-2274.
39. MAGNAVAL, J.; MICHAULT, A.; CALON, N.; CHARLET, J. (1994) Epidemiology of human Toxocariasis in La Reunion. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**: 531-533.
40. MAGNAVAL, J.; GALINDO, V.; GLICKMAN, L.; CLANET, M. (1997) Human Toxocara infection of the central nervous system and neurological disorders: a case-control study. *Parasitology*. Cambridge University Press. United Kingdom. **115**: 537-543.
41. MAGNAVAL, J.; GLICKMAN, L.; DORCHIES, P.; MORASSIN, B. (2001) Highlights of human Toxocariasis. *Korean J. Parasitol.* **39** (1): 1-11.
42. MAIZELS, R.; KENNEDY, M.; MEGHJI, M.; ROBERTSON, B.; SMITH, H. (1987) Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigens of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *J. Immunol.* **139** (1): 207-214.
43. MALBRÁN, C. Departamento de parasitología sanitaria. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Buenos Aires. Argentina. [en línea] 11 h. <http://www.msal.gov.ar/htm/site/pngcam/normas/Anexo6.PDF> (Consulta Septiembre, 2005).
44. MARTÍNEZ, R.; MIRANDA, E.; CASTILLO, R.; LÓPEZ, M.; SÁEZ, M.; CABRERA, W. (1998) Presencia de proteínas reactivas por Western blot en suero de pacientes con *Toxocara canis*. Laboratorio de parasitología. Facultad de ciencias biológicas. Universidad nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Perú. 1 h.
45. MARUYAMA, H.; NODA, SH.; CHOI, W.; OHTA, N.; NAWA, Y. (1997) Fine binding specificities to *Ascaris suum* and *Ascaris lumbricoides* antigens of the sera from patients of probable visceral larva migrans due to *Ascaris suum*. *Parasitol. Int.* **46**: 181-188.
46. MATSUMURA, K.; KATSUTA, Y.; ENDO, R.; TANAKA, K. (1983) The IgA antibodies activities in relation to the parasitologic status of *Toxocara canis* in dogs. *Zentralbl Bakteriell Microbiol Hyg (A)*. **256** (2): 239-243.
47. MERCADO, R.; JERCIC, M.; TORRES, P.; ALCAYATA, S.; MARTÍNEZ, F.; COSTA, J.; UETA, M. (2002) Inmunodiagnóstico de las infecciones por *Strongyloides stercoralis* en Chile utilizando la prueba de ELISA. *Rev. Méd. Chile.* **130**: 1358-1364.
48. MINVIELLE, M.; NIEFELD, G.; CIARMELA, M.; FALCO, A.; GHIANI, H.; BASUALDO, J. (1999) Asma y toxocarosis encubierta. *Medicina*. (Buenos Aires). **59** (3): 243-248.
49. MORALES, O.; LÓPEZ, M.; NICHOLLS, R.; AGUDELO, C. (2002) Identification of *Toxocara canis* antigens by Western blot in experimentally infected rabbits. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **44** (4): 213-216.
50. MORIEARTY, P. (1984) Characterization of antigens by Western-blotting. *Genes and Antigens of parasites a laboratory manual*. ED. C.M. Mem. Inst. Oswaldo Ríos. R. Janeiro. 365-372.

51. NOEMÍ, I.; RUGIERO, E. (1999) Larvas Migrantes. En: ATÍAS, A. Parasitología Médica. Publicaciones Mediterraneo, Ltda. **38**: 332-337.
52. NOEMÍ, I.; SCHUH, W.; HERSKOVIC, P.; RÍOS, E.; CERVA, L.; TORRES, M.; TASSAR, R.; URZÚA, M.; DAL BORGIO, P.; GUTIÉRREZ, C. (1984) Larva migrans visceral en niños. Rev. Chile Ped. **55**: 244-247.
53. NUNES, C.; TUNDISI, R.; GARCÍA, J.; HEINEMANN, M.; OGASSAWARA, S.; RICHTZENHAIN, L. (1997) Cross-reactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of Visceral Larva Migrans by Western blotting technique. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. **39** (5): 253-256.
54. OKTAR, N.; BARÇIN, E.; KAZANDI, A.; KORMAZ, M. (2002) Cerebral *Toxocara* mimicking a malignant glioma. J. Neurol. Sci. (Turkish). NOROL BIL D. **19**:2.
55. PARK, H.; LEE, S.; HUH, S.; KONG, J.; MAGNAVAL, J. (2002) A seroepidemiological survey for Toxocariasis in apparently healthy residents in Gangwon-do, Korea. Korean J. Parasitol. **40** (3): 113-117.
56. PARK, S.; PARK, I.; PARK, H.; LEE, S.; HUH, S.; MAGNAVAL, J. (2000) Five cases of ocular Toxocariasis confirmed by serology. Korean J. Parasitol. **38** (4): 267-273.
57. PEREIRA, F.; MUSSO, C.; CASTELO J. (1999) Pathology of pyogenic liver abscess in children. Pediatr. Dev. Pathol. **2**: 537-543.
58. RAMÍREZ, E.; GALLARDO, J.; GONZÁLEZ, C.; CRESPO, F. (1994) Un caso de Toxocarosis ocular. Parasitol. al Día. **18**: 134-136.
59. ROBERTSON, B.; BIANCO, A.; MCKERROW, J.; MAIZELS, R. (1989) *Toxocara canis* proteolytic enzymes secreted by the infective larvae *in vitro*. Exp. Parasit. **69**: 30-36.
60. ROMASANTA, A.; ROMERO, J.; ARIAS, M.; SÁNCHEZ, R.; LÓPEZ, C.; SUÁREZ, J.; DÍAZ, P.; DÍEZ, P.; MORRONGO, P.; PAZ, A. (2003) Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays analysis of cross reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis* and *Ascaris suum*. Immunol. Invest. Taylor & Francis. **32** (3): 131-142.
61. RUBINSKY-ELEPHANT, G. (2004) Human Toxocariasis: humoral response (IgG, IgA and IgE) anti-*Toxocara canis* and clinical-laboratorial correlation in patients following chemotherapy. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. **46** (2): 76-78.
62. SANTILLÁN, G. (2000) Caracterización de proteínas específicas para el diagnóstico de *Toxocara canis*. [en línea] Tesis de la maestría en biología molecular. Revista electrónica de la escuela de posgrado de la UNMSAM. Perú. 10 h. <http://www.e-mag.posgrado.unsam.edu.ar/R0202/santillan.htm> (Consulta Agosto, 2005).
63. SARTOBLLOT (1987) Electrobloeting. Manual Sartorius. Publication N° FE 6007. 19 h.

64. SMITH, H.; QUINN, R.; BRUCE, R.; GIRWOOD, R. (1982) Development of the serological response in rabbits infected with *Toxocara canis* and *Toxascaris leonina*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **76** (1): 89-94.
65. TRIVIÑO, X.; BEDREGAL, P.; TORRES, M.; CANALES, M.; ALVARADO, C.; HERNÁNDEZ, R. (1999). Toxocarosis en Chile: Serie clínica en un centro de pediatría ambulatoria. Parasitol. al Día. Santiago. **23** (3-4): 113-117.
66. VERGARA, U.; VIDAL, S. (1991) Identificación y caracterización de antígeno de excreción-secreción de *Toxocara canis*. Tesis (Magíster en Ciencias Biológicas mención en Parasitología) Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Medicina. Escuela de Post grado. pp: 2-9, 34-46.
67. VILLANUEVA, E.; KOZEK, W. (1994) A method for the recovery of infective larvae from *Toxocara canis* eggs for collection of larval secretory-excretory products. Ann. N.Y. Sci. 211-216.
68. WIWANITKIT, V.; WAENLOR, W. (2004) The frequency rate of *Toxocara* species contamination in soil samples from public yards in an urban area "Payathai", Bangkok, Thailand. Rev. inst. Med. Trop. S. Paulo. **46** (2):113-114.
69. YAMASAKI, H.; ARAKI, K.; LIM, P. (2000) Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human Toxocariasis. J.clin. Microbiol. **38**: 1409-1413.
70. ZINGALES, B.; ANDREWS, N.; KUWAJIMA, V.; COLLI, W. (1982) Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi* possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. Mol. Biochem. Parasitol. **6**:1.