



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

•• CUAUTITLAN ••

**OBTENCION DEL ANTIGENO ES (EXCRETOR-SECRETOR)
DE LA LARVA DE Toxocara Canis Y EL ESTUDIO
INMUNOLOGICO DEL MISMO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A N

DELIA REYES JARAMILLO

JUANA MORAIMA ORTIZ GUTIERREZ

CUAUTITLAN IZCALLI, MEXICO

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

	Página
I) Abreviaturas	1
II) Introducción	7
III) Objetivos	13
IV) Material y Métodos	16
- Muestreo de animales	16
- Obtención de huevos larvados	16
- Obtención del Ag E ²	17
- Obtención de los antígenos somáticos de T. canis	18
- Obtención de anticuerpos anti-Tromboxano canis	19
- Determinación de la actividad y especificidad del Ag E ²	20
- Medición de respuesta inmune primaria y secundaria del Ag E ²	26
V) Resultados	26
VI) Discusión	41
VII) Conclusiones	46
VIII) Resumen	47
IX) Bibliografía	48

ABREVIATURAS

- AqAntinena
- AcAnticuerpo
- SSF.....Solución salina fisiológica
- SSFF.....Solución salina fisiológica fermentada
- Aq ES.....Antígeno excretor-secretor de I. canis
- MEMM.....Medio Minimal Esencial con solución amortiguadora MEPEB
- PBS.....Solución amortiguadora de fosfatos
- L₂.....Segunda etapa larvaria de I. canis
- I. canis.....Temperatura canis
- A. suumAscaris suum
- A. lumbricoidea.....Ascaris lumbricoidea
- LMV.....Larva Migrans Visceral
- Aq H.L.....Antígeno de huevos larvados
- Aq S. de H.....Antígeno coaditivo de hombre
- Aq S. de M..... ..Antígeno coaditivo de vaca
- I.V.....Inoculación por vía intravenosa

INTRODUCCION

Toxocara canis es un acéfido que tiene como hospedador normal al perro, y que en la actualidad ha cobrado un gran interés médico, ya que se ha demostrado que sus larvas son capaces de producir infecciones viscerales en el hombre (1).

El parásito adulto macho mide de 4 a 6 cm y la hembra mide de 6,5 a 10 cm de longitud. Además de los tres labios característicos de los nemátodos, este nematodo está provisto de eletos cegicales diferenciados, que son mucho más largos que anchos y se extienden desde la extremidad a los márgenes laterales. Las papilas perianales de los gusanos son específicamente características y sus huevos son casi esféricos y de color café oscuro, midiendo 85 por 75 micras presentando muchas perforaciones sobre su superficie. Estos huevos no están embrionados en el momento de ser expulsados, presentan 4 estadios larverios, conocidos como: L₁, L₂, L₃ y L₄; de estos, L₂ es el estadio infectante, identificado por Nichols en 1950 (2), llegando a medir de 357 a 449 micras de longitud por 18 a 22 micras de diámetro (3).

En 1952, Beaver estableció el origen etiológico de I. canis y fue el primero en definir la enfermedad como Larva Migrans Visceral (LMV) demostrando la incidencia en el hombre y mostrando además, que la patogenicidad de este síndrome se debe, en parte,

o la respuesta inmune del hospedador hacia los productos que desprende el parásito en el momento de migrar (2). Dichos productos inmunogénicos han sido llamados por Thorsen en 1951 antígenos metabólicos o exoantígenos y en 1955 fueron llamados antígenos ES (excretor-secretor) por Campbell. Estos exoantígenos contienen enzimas que proceden de la secreción de las glándulas de la larva. El término antígeno secretor es quizá suficientemente descriptivo cuando se trate de componentes de excreciones y secreciones larvales de nemátodos. Catty en 1969 demostró que las secreciones larvales son los primeros antígenos que evocan una respuesta inmune, en forma notable después de la infección. Por lo que se concluye que la respuesta inmune es mayor con los antígenos metabólicos que con los antígenos secretados, los cuales representan una gran concentración de material heterogéneo (3,4). En 1969 Seaver sugiere que la definición de LMV se limite únicamente a la "migración prolongada y larga permanencia de las larvas", cuyo conducto se asemeja claramente a la de los hospedadores intermedios normales o a los hospedadores paratíficos (2).

Para que la infección ocurra, los huevos de I. canis son depositados en el suelo junto con los excretos de sus hospedadores, desarrollándose allí hasta el estado infectante para posteriormente servir de inóculo al hombre (7).

Las perros pueden ser infectados con I. canis por varios ca-

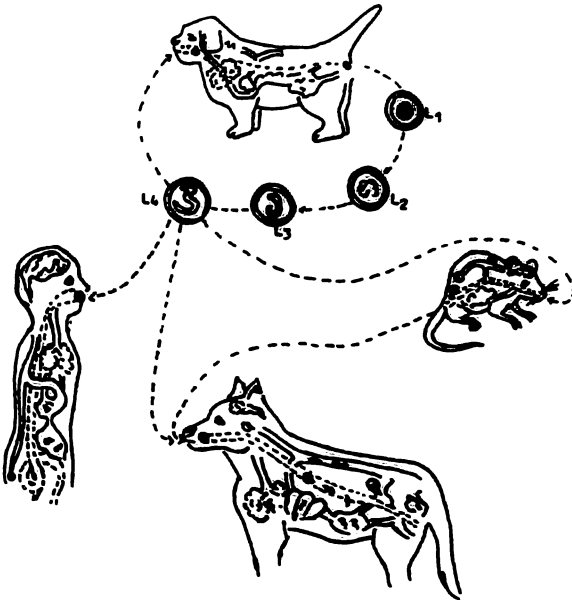
minos: ocurre infección directa con la ingestión de huevos infectantes o indirectamente por comer hospedadores paratéticos (cuyes, hamsters y ratones). Otro camino importante es cuando hembras adultas parasitadas con I. canis, por acción hormonal, liberan larvas facilitando su migración al feto por vía transplacentaria (1).

I. canis produce en perros adultos y hospedadores ceratónicos (incluyendo al hombre) la enfermedad Larva Migrans Visceral mientras que en los perros cachorros (de 3 a 6 meses de edad) no existen larvas sino el órbita adulta, por lo que se considera a los cachorros fuente de infección para el hombre. Así la infección ocurre más frecuentemente en los niños, que son los que tienen mayor contacto con los perros cachorros y gatos; el adulto es susceptible, pero en menor grado por presentar una mayor hipiasis (2,8).

Después de que los huevos han sido ingeridos por el hombre, son digeridos en el estómago por acción del jugo gástrico, facilitando así la liberación de la larva al intestino; allí atraviesa la pared intestinal y por torrente sanguíneo se disemina a los órganos blanco del hospedador que son : hígado, riñón, pulmón, cerebro, ojo y corazón, como se observa en la figure 1 . De acuerdo a Berber más de 200 casos han sido reportados desde la primera descripción de LMV reportándose lesiones oculares, consistentes en

Figura 1

Ciclo Biológico de *I. canis* en
hospedadores naturales y parásitos.



retinoblastomas y endoftalmitis crónica; 36 casos de este tipo han sido descritos y 18 confirmados histológicamente. En Inglaterra se han descrito 4 casos de infección ocular con larvas de L. canis. Debido a que el diagnóstico específico sólo puede ser hecho después de la enucleación del ojo, la infección es fácilmente confundida con endoftalmitis de otro origen.

El cuadro clínico y patológico fue conocido por Parlingiere y György al observar que la larva invade los órganos blancos en 15 días aproximadamente, induciendo al hospedador a reaccionar enquistando la larva, así ésta, puede sobrevivir durante meses e inclusive años en íntimo contacto con el hospedador sin ser destruida totalmente. En este estado, la severidad de la infección va a depender del número de larvas que invade, del sitio de infección y de la sensibilidad del paciente al parásito. Como observación característica, alrededor de la larva se acumulan eosinófilos y monocitos, siendo gradualmente envueltas por células epiteliales y por fibroblastos. En aproximadamente 8 meses las larvas quedan envueltas en una capsula fibrosa formando nódulos que miden entre de 1 cm, aunque durante este tiempo en que la larva no es enquistada, sus movimientos llegan a producir destrucción del tejido circundante.

Se ha sugerido que los síntomas son debidos a los efectos de toxinas o alérgicas que se originan del parásito por liberación,

presentando la enfermedad Larva Migrans Visceral los siguientes síntomas: eosinofilia, que en un 80 % de los casos puede alcanzar el 90 %, siendo función importante su cronicidad, que puede durar meses por años de 2 años; anemia, con una concentración de hemoglobina de 9g/100ml o menos; hemostaseo-lis, síntoma tónico, que puede llegar a extenderse hasta el ombligo; leucocitosis, usualmente de 20 000/mm³, llegando hasta más de 40 000 leucocitos/mm³ en el 50 % de los pacientes. En un hombre experimentalmente infectado con I. canis, la cantidad de leucocitos en un mes fue de 21,800 y en 5 meses de 12, 400 con un rango de eosinofilia de 20 a 80 % (2,9).

También existen reportes de afecciones cardíacas, Dent en 1956 y Fredson y Rarveda en 1960, encuentran larvas de I. canis en el corazón, posteriores reportes de tres casos de miocarditis en niños con LMV, diagnosticados por biopsias, demuestran que dos de los niños murieron por invasión masiva de larvas, encontrándose infiltración pulmonar (fácilmente confundida con tuberculosis); granulomas consistentes en una capa interna formada principalmente por leucocitos e histiocitos, y una capa periférica constituida por células epiteliales.

En casos de encefalitis, la larva atraviesa el hemisferio cerebral y el sistema nervioso central, observándose zonas necroticas y múltiples con inflamaciones granulomatosas, incluyendo ten-

to materia gris como blanco (8). Además se ha demostrado la invasión cerebral en pacientes con poliomielitis, debido a la habilidad de la larva para penetrar cerebro. La invasión e sistema nervioso central es la responsable de los disturbios neurológicos, implicando la corteza cerebral y cerebello durante las primeras semanas post-infección. En el cerebro, generalmente no se producen los granulomas y los cambios difusos pueden o no ser observados; además puede haber hemorragias, cambios degenerativos e infiltración celular.

Es importante señalar que en los pacientes epilépticos la infección se induce fácilmente, y ésta se presenta en niños de 1 a 4 años de edad con una hiperactividad de un 25 % y con un retardo mental de un 30% (10).

Las características clínicas, serológicas y epidemiológicas de 17 casos con toxocarosis ocular fueron estudiadas y comparadas con un grupo control de 15 casos de otras enfermedades oculares. La incidencia y presencia de anticuerpos contra I. canis detectados con la técnica de ELISA, fueron mayores para pacientes con toxocarosis ocular que para el grupo control. El 45% de pacientes con toxocarosis ocular presentaron un título mayor de 1:32 y especificidad del 78% y de sensibilidad el 25% en la prueba (11, 12).

Con respecto a la respuesta inmune en contra de LPM, Lee en

1960, reportó que ratones reinfectedos pre-entaron un 20% menos de larvas que los ratones control, que recibieran una sola dosis individual, este autor notó que la reinfeción influyó en la distribución de las larvas en el cuerpo del ratón, con un gran número de larvas en el hígado, comparado con el control. La reinfeción en animales inoculados periódicamente no presentó efecto aparente sobre la extensión del encapsulamiento, pero aumentó el número de larvas encapsuladas en el hígado. Los anticuerpos contra I. canis fueron detectados aún después de 20 meses de la infección (14).

En ratones experimentalmente infectados con huevos embrionados de varias especies, el cerebro fué el órgano invadido por larvas de I. canis y no por larvas de A. suum, indicando que la larva de I. canis va al cerebro de hospedadores no comunes en un número más grande que las larvas de otras especies, pero raramente invade el cerebro en perro y gato que son hospedadores naturales (2).

Los estudios sobre el diagnóstico de esta enfermedad fueron iniciados por Fellers en 1953, quien por medio de técnicas de aglutinación y aprovechando la reacción cruzada entre los antígenos de A. lumbricoides y I. canis, logró resultados positivos (2). En 1970 Cordelle realizó una prueba cutánea con el antígeno somático de I. canis en 19 lactantes normales y 126 niñas con diver-

ses parasitosis comprobadas, con el fin de ensayar la especificidad y comparar las reacciones obteniendo información acerca de la sensibilidad a la prueba. Sus resultados indican que la reacción presenta una relativa especificidad, y que cuando se eliminan las interferencias debidas a A. luehrichoides se obtienen resultados satisfactorios (5).

En humanos, 7 de 10 pacientes con LPM tuvieron anticuerpos específicos para el antígeno de la larva de I. canis, los cuales fueron determinados por doble difusión en agar. Estudios adicionales de estos pacientes indicaron que la infección con I. canis puede distinguirse serológicamente de escuriasis, filariasis y triquinosis (14). Se conoce poco acerca de los anticuerpos reactivos de infecciones helmínticas en los animales. Para dilucidar este problema se hicieron experimentos, y los resultados mostraron que el ratón infectado con I. canis induce anticuerpos con reacción anafiláctica en la piel de conejos. Estos anticuerpos permanecen en la piel 72 horas siguientes a la sensibilización pasiva y los títulos se elevaron después de la tercera semana de la infección desapareciendo posteriormente (15).

Dentro de las técnicas que se utilizan en el laboratorio para el diagnóstico de LPM están:

Precipitación en tubo capilar. Con esta técnica se reportó que en 80 sueros de individuos sospechosos, 76 produzcan preci

pitación.

Doble difusión en agar o prueba de Ouchterlony. En esta prueba se ha utilizado antígeno somático de T. canis y en los resultados reportados se ha observado reacción cruzada con A. lumbricoides.

Prueba de microprecipitación. Se ha reportado que de 700 muestras de pacientes sospechosos de LMV 73 resultaron ser positivas, de los cuales 16 reaccionaron con antígenos de otros helmintos al utilizar la técnica de Ouchterlony, mientras que al utilizar la técnica de microprecipitación presentaron una reacción específica; lo que demuestra que la microprecipitación es más específica y sensible (1).

Técnica inmunométrica o ELISA. Los sueros de 8 pacientes fueron analizados con esta técnica y se ha reportado que en 5 de éstos se encontró un título de 1:6 a 1:9 (14).

Intradermorreacción. A tres niños con diagnóstico provisional de LPV se les realizó la prueba cutánea con antígenos de T. canis, el cual fue inyectado por vía intradérmica. Se reportó que en dos de los tres niños se presentó reacción de inflamación después de 3 a 8 minutos de la inyección; el tercer niño no presentó reacción a este antígeno aún después de 20 minutos (5, 10).

A la fecha, los estudios acerca de la inmunogenicidad de los antígenos metabólicos del parásito I. canis no han avanzado mucho, por lo que resulta interesante su estudio, desde la importancia de ellos durante la migración en el interior del hospedador, y en una infección de este tipo.

O B J E T I V O S

En base a los antecedentes ya citados y tomando en cuenta que en muchos países existe un alto porcentaje de perros infectados con I. canis, y que en la ciudad de México este porcentaje es del 93 % (8), creemos que existe también un alto índice de personas infectadas, ya que se ha comprobado que existe una proporción directa entre el número de perros parásitados y el número de personas infectadas (2). Por lo tanto pensamos que es importante encausar este trabajo con el fin de impulsar el estudio de este parásito en México.

Dado que la enfermedad LMV es posible diagnosticarla por medio de técnicas serológicas con una alta especificidad, cuando se utilizan antígenos metabólicos como ha sido observado por algunos investigadores (Zeever, Catty), nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Obtener el antígeno ES (excretor-secretor) de la larva.
 - a). Encontrar las condiciones óptimas de cultivo de huevos larvales.
 - b). Demostrar su presencia e inmunogenicidad.
2. Realizar pruebas serológicas con el Ag ES.
 - a) Mediante diversas técnicas inmunológicas demostrar su especificidad, inmunogenicidad y comportamiento, con la intención de mejorar los métodos diagnósticos.

MATERIAL Y METODOS

Muestras de animales. Se muestrearon aleatoriamente 50 perros cachorros (de 3 a 6 meses de edad), mediante un examen coproparasitológico, con el fin de detectar la presencia de huevos de I. canis. La técnica utilizada para la detección fue la de Willis (técnica de flotación). Para éste se colocaron aproximadamente 2 g. de materia fecal en 50 ml de solución saturada de cloruro de sodio, la muestra se homogeneizó, se calentó y se dejó reposar 15 minutos, se tomó una muestra de la superficie del sobrenadante y se colocó en un portaobjetos para observarla al microscopio compuesto con objetivo 10X.

A los perros que resultaron positivos a la presencia del parásito, se les administró un tratamiento con citrato de piperazina (200 mg/kg de peso), con el fin de obtener los parásitos adultos de I. canis. Estos parásitos se seleccionaron en hembras y machos en base a su morfología ya descrita.

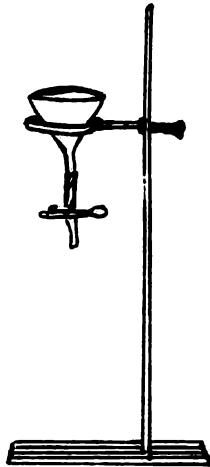
Obtención de huevos larvados . Los parásitos adultos de ambos sexos se colocaron en una solución de timarol al 0.2 % durante un día. De los parásitos adultos hembras, mediante una disección se obtuvieron los huevos de sus úteros, los cuales fueron incubados en SSFF a diferentes concentraciones, con el propósito de elegir el medio óptimo para el desarrollo de la larva infectante (L₂).

Los huevos puestos en diferentes soluciones fueron incubados a 37°C durante 21 días, realizándose periódicamente en el transcurso de éste tiempo la observación de la evolución de las larvas al microscopio, mediante la presencia de esfago filariforme (larva infectante), así como su viabilidad en PBS; para lo cual se tomaron aproximadamente 150 huevos larvados de cada una de las soluciones a probar, se lavaron 3 veces con una solución de PBS 0.01 M pH 7.2, centrifugándose a 2 000 rpm durante 5 minutos cada vez; se reemplazaron los huevos en 10 ml de PBS 0.01 M pH 7.2, mediante el recipiente mecánico, utilizando un homogenizador de vidrio (mod. pater pyrex 10 ml).

Las larvas se colocaron en un aparato de Sherman, el cual puede verse en la figura 2, sobre 4 capas de papel seda y se mantuvo la temperatura de aproximadamente 37°C, dejándose migrar durante 3 horas. La viabilidad de las larvas se midió por observación visual de la birrefringencia y movilidad. Tomando un volumen de 0.02 ml de solución se realizó el conteo de larvas, con lo cual fue posible conocer aproximadamente el número de larvas que contenía el volumen total.

Se eligió la solución en la cual se observó la máxima viabilidad de las larvas y a partir de ésta se hicieron 30 cultivos de huevos con 30,000 huevos cada uno aproximadamente.

Figure 2



APPARATO DE BERKELEY

Obtención de larvas L₂ de T. canis. Las huevas liberadas en fase L₂ (infectante), fueron liberadas 4 veces con PBS estéril 0.01 M pH 7.2, después de esto se procedió a romper los huevos (aproximadamente 15, 000 huevos cada vez), utilizando 7 ml de la misma solución amortiguadora, la liberación de las larvas se hizo mecánicamente mediante el uso de un homogenizador de vidrio. Una vez liberadas las larvas se colocaron en condiciones estériles en el aparato de Baerman para obtenerlas limpias y vivas, utilizando MEM para su migración, lo cual duró 3 horas a una temperatura de 37°C aproximadamente.

Obtención del Ag ES. La obtención del Ag ES, se realizó siguiendo la técnica de Sevigny (23), con algunas modificaciones: 5,000 larvas vivas aproximadamente obtenidas como se mencionó anteriormente, se colocaron en tubos con tapón de resaca conteniendo 5 ml de MEM e incubados a 37°C en una estufa (Blas M Electric Co.) midiendo la viabilidad diariamente y contándolas tomando aliquetos de 0.01 ml.

El medio de cultivo de cada uno de los tubos se recolectó manualmente, reemplazándolo por medio de cultivo nuevo, este medio obtenido se dializó contra una solución de PBS 0.02 M pH 7.2 en una relación 1:50, cambiando la solución dos veces al día durante 3 días. El dializado obtenido se liofilizó con el fin de conservar

verle para ser utilizado posteriormente. El procedimiento consistió en poner en frascos de 10 ml de volumen, 1.5 ml de la muestra dializada, la cual se congeló e inmediatamente se colocó en una liofilizadora durante 5 horas aproximadamente. La muestra liofilizada se guardó a -15°C .

Obtención de: antígeno específico de parásitos adultos de I. canis. 15 parásitos adultos machos y 8 parásitos adultos hembras se colocaron en una solución de timerosal al 0.2 % durante 8 horas. Después se homogenizaron mecánicamente por aspirado en 7 ml de PBS 0.01 M pH 7.2, utilizando un homogenizador de vidrio; el homogenizado obtenido se centrifugó a 2,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se almacenó en tubos de 10 ml y se conservó a -15°C hasta ser utilizado como extracto antigénico (77).

Obtención de antígeno de huevos larvados. Se tomaron aproximadamente 10,000 huevos larvados con L_2 (larva infectante), se lavaron con PBS 0.01 M pH 7.2 y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 15 minutos, repitiendo ésto tres veces. Posteriormente se sometieron al mismo procedimiento de homogenización mecánica de los parásitos adultos, utilizando 7 ml de la misma solución amortiguadora, para la obtención del extracto antigénico de huevos larvados, el cual se conservó en congelación a -15°C hasta ser utilizado.

Obtención de anticuerpos anti-Toxocara canis. La producción de anticuerpos contra T. canis se realizó en un conejo hembra de 2.85 Kg, que fué infectado por vía oral con 2,500 huevos infectantes de T. canis, éste se repitió 2 veces con un intervalo de 15 días. La detección de anticuerpos en el suero del conejo se hizo una semana después de la segunda infección, mediante la reacción con una muestra del extracto antigénico obtenido de la homogeneización de los parásitos adultos y huevos larvados, haciendo uso de las técnicas de doble difusión en agar (técnica de Duchterlony), precipitación en tubo capilar y en microplacas.

Inmuno-difusión en gel. Para la detección de anticuerpos en el suero del conejo infectado se utilizó la técnica de Duchterlony sobre portaobjetos de 7.5 por 2.5 cm, en las cuales se depositaron 5 μ l de agar noble al 1.5 % en SSF pH 7.0 conteniendo 0.01% de ácido de sodio. En la placa de agar se hicieron 2 pozos, en uno se colocaron 10 μ l de antígeno y en el otro 10 μ l de suero del conejo infectado. La placa fué examinada periódicamente a las 6, 12, 24, y 48 horas para observar la posible precipitación.

Precipitación en tubo capilar. Para la prueba de precipitación en tubo capilar se utilizaron tubos capilares para hematocrito, poniendo partes iguales de antígeno y suero del conejo infectado, observando la precipitación en el mismo intervalo de tiempo

que para la prueba anterior.

Precipitación en microplacas. La prueba de microprecipitación se realizó haciendo por separado, tanto diluciones dobles del conejo infectado, como del antígeno, usando como diluyente 50 ul de PBS 0.05 M pH 7.2. Se adicionaron 50 ul de antígeno a cada una de las diluciones del suero del conejo infectado y 50 ul de éste a cada una de las diluciones del antígeno.

Las microplacas de la prueba fueron observadas a las 6, 12 y 24 horas, utilizando el microscopio invertido para detectar la presencia de precipitación.

Determinación de proteína de los antígenos de T. canis. Para obtener la concentración de proteína de los antígenos, se siguió el método de Devie (24), que es un método espectrofotométrico rápido y sensible, además este método tiene la ventaja de eliminar la interferencia debida a ácidos nucleicos, por medio de la detección de la absorbancia a 2 longitudes de onda (224 y 233 nm); el método detecta concentraciones de 5 a 180 ug/ml. El método consistió en hacer una curva patrón con albúmina sérica bovina, para la cual se prepararon estándares de 20, 40, 60, 80 y 100 ug/ml, solubilizados en PBS 0.1 M pH 7.0 y se determinó la absorbancia a 224 y 233 nm y de ésta manera se obtuvo la curva de calibración $A = f(c)$, que es el parámetro utilizado en el método de Devie.

Para la determinación de la concentración de proteína de los antígenos del parásito adulto hembra y macho, huevos larvales y del antígeno metabólico de I. canis, se hizo lo siguiente: Se pesaron 5.3 mg aproximadamente de la muestra liofilizada y se disolvieron en 2 ml de PBS 0.1 M pH 7.0; se tomaron alícuotas de 0.5 ml de cada uno de los antígenos y se llevaron a un volumen de 2 ml con PBS 0.1 M pH 7.0 y se les midió la absorbancia a 224 y 233 nm en un espectrofotómetro (Beckman 25 con graficador), el blanco utilizado fue la solución de PBS 0.1 M pH 7.0; se extrajo el valor de A de cada uno de los antígenos en la curva de calibración y de ésta manera se pudo determinar la concentración de proteína que contiene cada antígeno.

Determinación de la actividad y especificidad del Ag ES. Para demostrar la presencia del antígeno ES en la muestra liofilizada, se utilizó el suero del conejo infectado con larvas L₂ de I. canis. Esta determinación se realizó mediante técnicas de inmunodifusión en gel, precipitación en tubo capilar y en microplacas. Se disolvieron 15 mg de la muestra liofilizada en 1 ml de PBS 0.05 M pH 7.2 y de esta manera se utilizó en cada una de las técnicas descritas anteriormente.

Para la determinación de la especificidad del Ag ES se realizó el siguiente experimento: un conejo Nueva Zelanda blanco macho de 2.93 kg, se inyectó con 4 mg aproximadamente de la muestra liofilizada

lizada, por vía I.V. El suero del conejo se obtuvo una semana después de la inoculación.

La especificidad se midió con el antígeno de A. suum, ya que éste da reacción cruzada con I. canis, para lo cual 5 parásitos adultos de A. suum fueron homogenizados por acción mecánica con un homogenizador de vidrio, en 10 ml de PBS 0.05 M pH 7.2, se centrifugó a 2,000 rpm durante 20 minutos; se obtuvo el sobrenadante y se almacenó en refrigeración para ser utilizado posteriormente como extracto antígeno.

Para demostrar la especificidad del Ag ES se utilizaron las técnicas de precipitación en tubo capilar y en microplacas, realizándose como se muestra en la tabla siguiente.

Determinación en tubos capilares

Tubo capilar No.	Condiciones
1	Suero de conejo infectado + Ag ES
2	Suero de conejo infectado + Ag A. sum
3	Suero de conejo inoculado con Ag ES + Ag ES
4	Suero de conejo inoculado con Ag ES + Ag A. <u>sum</u>
5	Ag ES de <u>I. canis</u> + SSF
6	Ag de A. <u>sum</u> + SSF

Determinación en microplacas

No. de pozo	Condiciones
1	Suero de conejo infectado + Ag ES
2	Suero de conejo infectado + Ag A. sum
3	Suero de conejo inoculado con Ag ES + Ag ES
4	Suero de conejo inoculado con Ag ES + Ag de A. <u>sum</u>
5	Ag ES de <u>I. canis</u> + SSF
6	Ag A. <u>sum</u> + SSF

Medición de la respuesta primaria y secundaria. Para realizar estas pruebas, se tomaron dos lotes de conejos Nueve Zelando machos de 2.8 Kg de peso promedio. Todos los conejos fueron sangrados antes de inocularlos con Ag ES para determinar la posible presencia de anticuerpos contra I. canis; realizándose para tal fin, las pruebas de precipitación en tubo capilar, en microplacas y doble difusión en agar, utilizando como antígeno el Ag ES de I. canis (las técnicas se realizaron bajo las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente). Para la precipitación en tubo capilar se utilizaron 22 tubos, de los cuales, en uno se colocó Ag ES + SF en partes iguales, en 10 tubos se colocó únicamente el suero de los conejos + Ag ES en partes iguales, y en el último tubo se colocó suero de conejo infectado + Ag ES de I. canis en partes iguales. Las lecturas se hicieron a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas.

Para la doble difusión en agar se utilizaron placas de agar numeradas del 1 al 11, colocando el suero de los conejos de los dos lotes + Ag ES, y suero de conejo infectado + Ag ES respectivamente, se colocaron las placas en refrigeración y se observaron a las 8, 12 y 24 horas.

Después de comprobar la ausencia de anticuerpos contra I. canis en los conejos, se procedió a inocularlos con una dosis de

5 mg aproximadamente de la muestra liofilizada, la cual contenía 271.7 ug de proteína por cada 5 mg. Se utilizaron 0.6 ml de PBS 0.01 M pH 7.2 para disolver a la muestra; la inculcación se efectuó por vía I.V., obteniéndose el suero de los conejos de cada lote diariamente. Para medir la respuesta primaria se midió la presencia de anticuerpos diariamente durante 17 días después de la primera inmunización y la respuesta secundaria se midió después de una segunda inmunización con la misma dosis y por la misma vía durante 16 días.

Una vez colectados diariamente los sueros de los conejos inmunizados, se procedió a medir la respuesta primaria y secundaria utilizando la técnica de precipitación en microplacas (microtitulación). Para ésta se utilizó un volumen de 50 ul de solución en línea, 50 ul de suero problema y 50 ul de Ag ES de I. canis respectivamente, se hicieron diluciones dobles del suero. Las lecturas se hicieron a las 6, 12 y 24 horas.

Una de las parámetros que se utilizaron en la medición de las respuestas inmunes primaria y secundaria, fue la esfínfilia; para tal efecto se hicieron frotis de sangre de los conejos antes de inmunizarlos con el Ag ES y después de la inmunización, utilizando para este fin la tinción de Wright.

RESULTADOS

Muestras de animales. De los 50 perros cachorros muestreados mediante un examen coproparasitológico; 31 perros (62%) resultaron estar infectados con éste parásito, dichas perros fueron desparasitados con citrato de piperazina (200 mg/kg de peso) y los parásitos adultos obtenidos se lavaron y separaron en base a su morfología.

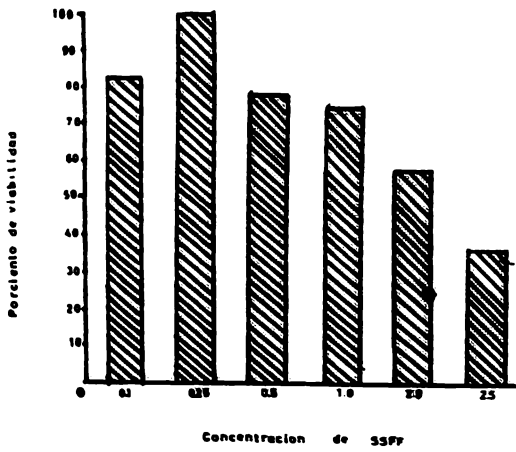
Obtención de huevos larvados. En la obtención de huevos larvados se probaron 6 soluciones con diferente concentración de formal: 0.25 %, 0.5 %, 0.1 %, 1.0 %, 2.0 % y 2.5 %. Los resultados se muestran en la figura 3, en la que se observa que la solución adecuada resultó ser la de 0.25 %, a partir de la cual se hicieron 30 cultivos de huevos de T. canis.

Obtención del antígeno ES. Una vez obtenidos las larvas y colocadas en tubos estériles con MBM, se midió su visibilidad (tabla 3) durante un mes y durante este período se obtuvo semanalmente el medio de cultivo de cada uno de los tubos, resultando un total de 500 ml, el cual se dializó y liofilizó.

Obtención de anticuerpos anti-Tempora canis. El suero del conejo infectado oralmente con 2,500 huevos larvados; se colocó, frente al antígeno semántico del parásito adulto de T. canis. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Fig. 3

Viabilidad porcentual de larvas de I. canis obtenidas de SSFF a diferentes concentraciones.



En la prueba de precipitación en tubo capilar, la reacción fué muy marcada, como se puede ver en la fotografía 1.

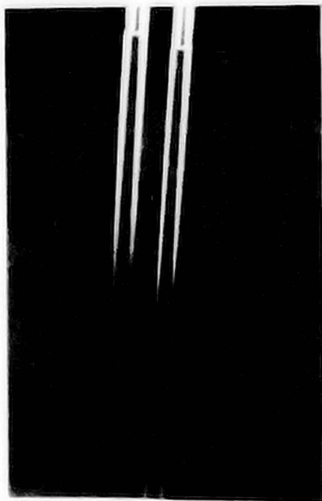
Para la prueba de precipitación en microplacas se realizaron diluciones debiles del suero problema. Se observó la presencia de una clara precipitación (fotografía 2), comprobándose con ésta la toxicidad inducida al conejo.

En la prueba de doble difusión en agar (utilizando agar al 1.5%) no se pudo observar una precipitación muy clara, como se puede ver en la figura 4.

Determinación de la actividad y especificidad del Ag ES. La actividad y especificidad del Ag ES fué demostrada comparando la reacción que existe entre suero de conejo infectado con larvas de I. canis en presencia del Ag ES y en presencia del antígeno sintético de A. gum. Los resultados que se obtuvieron al utilizar la técnica de precipitación en tubo capilar se pueden observar en la tabla II, en donde se puede ver que al colocar el Ag ES frente al suero del conejo inculado con este mismo antígeno, se presenta una precipitación clara, mientras que al poner este mismo suero en presencia del antígeno de A. gum no se observa precipitación; lo que indica la especificidad que presenta el Ag ES de I. canis. En la misma tabla se observan los resultados obtenidos en la precipitación en microplacas, en donde se obtienen resultados simi-

Detección de anticuerpos anti-Tesara canis

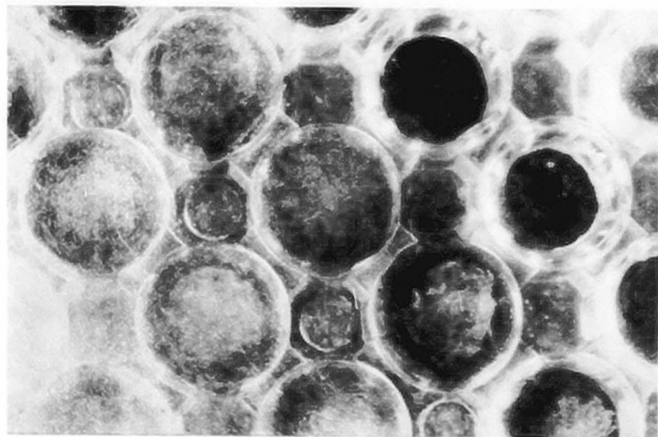
Prueba de precipitación en tubo capilar



Fotografía 1

Detección de anticuerpos contra *T. canis*

Prueba de precipitación en microplacas

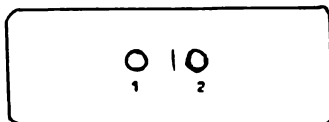


Fotografía 2

Figura 4

Detección de anticuerpos anti-Isoxysca canis en el suero de un conejo infectado con este parásito.

Prueba de doble difusión en agar



1- 10 ul de suero de conejo infectado

1- 10 ul de antígeno sensitivo de parásito
adulto de I. canis

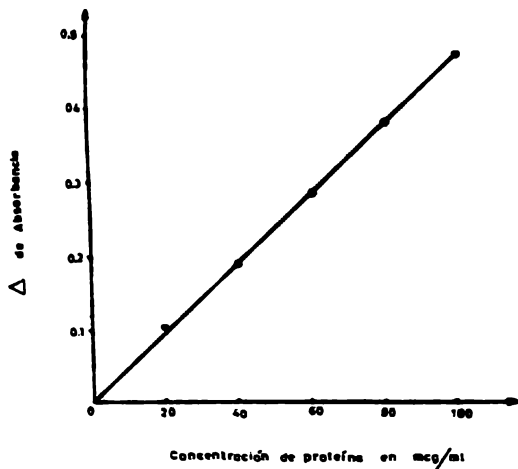
Tabla II
Determinación de la especificidad y actividad
del Ag ES de I. canis.

Determinación en tubos capilares		
^a Tubo capilar No.	Condiciones	Reacción de precipitación
1	Suero de conejo infectado + Ag ES	+
2	Suero de conejo infectado + Ag <u>A. suum</u>	+
3	Suero de conejo inoculado con Ag ES + Ag ES	+
4	Suero de conejo inoculado con Ag ES + Ag <u>A. suum</u>	-
5	Ag ES de <u>I. canis</u> + SSF	-
6	Ag <u>A. suum</u> + SSF	-
Determinación en microplacas		
^a No. de pozos		
1	Suero de conejo infectado + Ag ES	+
2	Suero de conejo infectado + Ag <u>A. suum</u>	+
3	Suero de conejo inoculado con Ag ES + Ag ES	+
4	Suero de conejo inoculado con Ag ES + Ag <u>A. suum</u>	-
5	Ag ES de <u>I. canis</u> + SSF	-
6	Ag <u>A. suum</u> + SSF	-

^aTodas las pruebas se realizaron por duplicado.

Fig. 5

Curva patrón de albúmina en la determinación de proteína por el método de Davis.



leras a los presentados en los tubos capilares, por lo que se comprueba la observación hecha por Weinstein (3), de que el Ag ES de I. canis es más específico, en comparación con los antígenos semánticos. Por otro lado, se observa que el antígeno ES obtenido en condiciones in vitro (cultivos de larvas L₂ en MEM*), es capaz de reaccionar con anticuerpos inducidos in vivo, de un animal infectado con este parásito.

Determinación de la concentración de proteína de los antígenos de I. canis. En la figure 5 y tablas III y IV se presentan los resultados del método de Davis y se observa que el antígeno que contiene mayor cantidad de proteína es el antígeno semántico de hombre.

Medición de la respuesta primaria y secundaria. La realización de la prueba se llevó a cabo utilizando 2 lotes de conejos Nueva Zelanda machos, cada lote con 5 conejos; cada uno de los conejos fué cuarenteado antes de ser inmunizado (tabla V), para detectar aquellos que resultaran positivos; para tal fin se hicieron pruebas de precipitación en tubo capilar y doble difusión en agar, poniendo el Ag ES en presencia de cada uno de los sueros de los conejos de los dos lotes. En la figure 6 se puede ver la gráfica obtenida, en la que se observa una elevación de anticuerpos a partir del cuarto día después de la primera inoculación y

Table III

Curva patrón de proteína

A_{224}	A_{233}	$A_{224-233}$	Concentración de proteína ($\mu\text{g/ml}$)
0.398	0.278	0.12	20
0.404	0.209	0.195	40
0.597	0.311	0.286	60
0.788	0.408	0.38	80
0.991	0.515	0.476	100

^aDatos de absorbencia para las soluciones estándares
de albúmina sérica bovina.

TABLA IV

Concentración de proteínas de los antígenos obtenida a partir de la curva patrón de albúmina sérica bovina.

A ²²⁴	A ²³³	A ²²⁴⁻²³³	Concentración de proteína (mcg/ml)
0.508	0.345	0.163	36 Ag ES
0.334	0.287	0.157	12 Ag H.L.
1.165	0.911	0.254	56 Ag S. de H.
0.207	0.143	0.064	16 Ag S. de M

^aDatos de absorbancia obtenidos para los diferentes antígenos.

Afectando por el factor de dilución, la concentración de proteína de los antígenos queda:

Ag ES 36 $\mu\text{g/ml}$ X $\frac{2\text{ml}}{0.5\text{ml}}$ = 74 $\mu\text{g/ml}$
 Ag H.L. 12 $\mu\text{g/ml}$ X $\frac{2\text{ml}}{0.5\text{ml}}$ = 48 $\mu\text{g/ml}$
 Ag S. de H. 56 $\mu\text{g/ml}$ X $\frac{2\text{ml}}{0.5\text{ml}}$ = 22 $\mu\text{g/ml}$
 Ag S. de M. 16 $\mu\text{g/ml}$ X $\frac{2\text{ml}}{0.5\text{ml}}$ = 64 $\mu\text{g/ml}$

Tabla V

^aDeterminación del estado inmune de conejos a
I. canis.

tubo capilar No.	Condiciones	Precipitación ^b
1	Ag ES	-
2-11	Suero de los conejos + Ag ES	-
12-21	Suero de los conejos	-
22	Suero de conejo <u>infectado</u> + Ag ES	+
<hr/>		
No. de placa		
1-10	Suero de los conejos + Ag ES	-
11	Suero de conejo <u>infectado</u> + Ag ES	+

^aLa determinación se realizó en 2 lotes de 5 conejos antes de ser inoculados con Ag ES de I. canis .

^bPromedio de todas las pruebas.

un máximo de título de anticuerpos en el octavo día (respuesta primaria); la segunda inculación se realizó el día 77 como se puede ver en la tabla VI, utilizando la misma cantidad de antígeno y la misma vía de inculación. Se puede observar que en el día 22 se encontró el máximo título de anticuerpos, representando éste 16 veces más que el máximo título obtenido en la respuesta primaria, y este título disminuyó en el transcurso de 9 días.

Con respecto a la obtención en la eridición de la esinefilia, se observó que la inmunización con Ag ES de *T. canis* no alteró el nivel de esinefilia que presentaron los conejos, ya que el porcentaje de éstas células se mantuvo dentro de los niveles normales, de 2 a 3%, en todos los animales durante los 31 días de experimentación, éste indica que el Ag ES no induce esinefilia en los conejos inmunizados con éste.

Medición de la respuesta primaria y
secundaria.

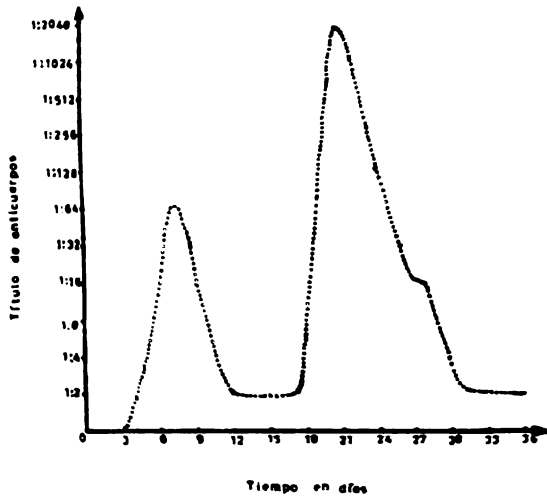
Día	Nº. de animales	Título de anticuerpos		Promedio
		Lote I	Lote II	
* 0	Todos	0	0	0
1	1	0	0	0
2	2	0	0	0
3	3	0	0	0
4	4	1:2	1:2	1:2
5	5	1:2	1:2	1:2
6	1	1:32	1:8	1:16
7	2	1:32	1:128	1:64
8	3	1:8	1:128	1:32
9	4	1:4	1:64	1:16
10	5	1:2	1:8	1:4
11	1	1:2	1:2	1:2
12	2	1:2	1:2	1:2
13	3	1:2	1:2	1:2
14	4	1:2	1:2	1:2
15	5	1:2	1:2	1:2
** 16	1	1:2	1:2	1:2
17	2	1:2	1:2	1:2
18	3	1:16	1:16	1:16
19	4	1:16	1:64	1:32
20	5	1:32	1:128	1:64
21	1	1:2048	1:2048	1:2048
22	2	1:2048	1:512	1:1024
23	3	1:256	1:256	1:256
24	4	1:128	1:128	1:128
25	5	1:64	1:64	1:64
26	1	1:64	1:16	1:32
27	2	1:16	1:16	1:16
28	3	1:16	1:16	1:16
29	4	1:8	1:8	1:8
30	5	1:4	1:4	1:4
31	1	1:2	1:2	1:2
32	2	1:2	1:2	1:2
33	3	1:2	1:2	1:2

* Primera inoculación

** Segunda inoculación

Fig. 6

Medición de la respuesta inmune primaria
y secundaria.



D I S C U S I O N

La obtención de los antígenos metabólicos, su purificación y actividad inmunogénica, pueden tener importancia para el diagnóstico de LPMV; por tal motivo se buscaron las condiciones óptimas de cultivo para el desarrollo de la larva L₂ de *I. canis*, encontrándose que es necesario mantener a los huevos en SBFF al 0.25 % como se puede ver en la figura 9; otros autores (3) reportan una viabilidad óptima de larvas cuando utilizan formal al 1%. El uso de formal a bajas concentraciones actúa endureciendo la membrana del huevo, evitando una posible destrucción de la larva por acción bacteriana, mientras que al utilizar soluciones con concentraciones altas de formal, éste actúa directamente sobre la larva disminuyendo su viabilidad e impidiendo la obtención del antígeno metabólico.

Para obtener el Ag ES se utilizó la técnica de Sevigny con algunas modificaciones: La liberación de las larvas se hizo mediante acción mecánica, con un homogenizador de tejidos, sin la utilización de presiones de CO₂ y H₂; además se disminuyó el tiempo de liberación de las larvas.

La técnica de liberación de las larvas resultó ser adecuada, por ser un método fácil y rápido de realizar, dada la falta de condiciones requeridas para seguir la técnica de Sevigny, sin en-

Este método presenta algunos desventajas, como son el hecho de obtener una mayor cantidad de larvas muertas y gran cantidad de impurezas; debido a lo anterior fue necesario modificar las condiciones de migración como: el tiempo y el número de capas de papel seda, encontrándose que las condiciones adecuadas en la obtención de larvas libres y limpias fueron: un tiempo de migración de tres horas y tres capas de papel seda.

La obtención de Ag ES se logró utilizando PDMH como medio de cultivo de las larvas y cada cultivo contenía de 5,000 a 6,000 larvas, manteniéndolas a una temperatura de 37°C. La viabilidad de las larvas se midió diariamente y se mantuvo en 100 % durante un mes, como puede observarse en la tabla II. Sin embargo, Savigny (23) reporta que es posible mantener la viabilidad de las larvas durante 18 meses, lo cual en nuestro caso no fue posible debido a la facilidad con que el medio de cultivo puede contaminarse con hongos y bacterias, a cambios en la temperatura, a la falta de condiciones estrictamente estériles, a una posible lesión (traumatismo) de las larvas en el momento de la liberación mecánica y al uso de concentraciones inadecuadas de antibióticos y anticéticos adicionados al medio de cultivo.

La existencia del Ag ES en la muestra liofilizada se demostró al hacer reaccionar éste con anticuerpos anti-Isacapsa canis,

sin embargo al cuantificar la concentración de proteína presente en la muestra, resultó que ésta no contenía un 100 % de proteína, como es reportado por Savigny (23), quien demostró que el Ag ES es de naturaleza proteica. Creemos que el hecho de no haber obtenido el Ag ES se debe al método de liberación de las levuras que utilizamos.

Uno de los aspectos que involucran los objetivos planteados, es el de demostrar la especificidad que presenta el Ag ES, y éste se llevó a cabo al hacer reaccionar anticuerpos contra I. canis con Ag ES y Ag de A. suum, los resultados presentados en la tabla III indican que sí existe una reacción cruzada con el Ag de A. suum y anticuerpos contra I. canis, así mismo, en trabajos que anteriormente realizamos, se observó que cuando se involucran cruceos con antígeno somático de I. canis, los anticuerpos producidos contra éste, reaccionan con antígenos somáticos de A. suum. Sin embargo, en este trabajo se encontró que anticuerpos producidos contra Ag ES no reaccionan con el Ag somático de A. suum. De lo anterior se deduce que el Ag metabólico de I. canis es más específico que los antígenos somáticos del mismo, lo cual concuerda con lo reportado por Savigny y Tizard (3). Se ha reportado que al utilizar antígenos metabólicos en técnicas como:

Hemaglutinación e Inmuno fluorescencia; los títulos de anti-

cuorpos detectados son muy altos; con esto se demuestra que el antígeno ES posee una alta sensibilidad y especificidad, por lo que pensamos que el utilizar este antígeno en técnicas serológicas para el diagnóstico de LRV, resultaría más conveniente, ya que descarta la posibilidad de tener reacciones falsamente positivas frente a parasitosis debidas al género *Isospora*.

Dentro del estudio inmunológico del Ag ES, se observa que la elevación de anticuerpos en la respuesta primaria es rápida pero no se mantiene, ya que disminuye rápidamente y lo mismo sucede en la respuesta secundaria, como se puede ver en la figura 6. Con estos resultados se observa que el Ag ES sí es inmunogénico, y el hecho de que el título de anticuerpos no se haya mantenido se debe principalmente a la vía de inoculación que se utilizó (i.v.), ya que al utilizar esta vía el antígeno es metabolizado y eliminado fácilmente del organismo, por lo que la producción de anticuerpos es pobre. Se prefirió esta vía, ya que el objetivo era demostrar la inmunogenicidad del antígeno en cuestión sin importar el tiempo de presencia de anticuerpos en circulación.

En cuenta a la comprobación de si el Ag ES por sí solo es capaz de producir eosinofilia, se encontró que éste no es el responsable de la producción de eosinófilos, entonces se puede pensar que los antígenos que elevan la producción de éstos, son de otro

tipo e quizá se deba a la simple presencia de la larva. Esto no concuerda con lo observado por Beaver, ya que dice que la patogenidad del síndrome LPU se debe en parte, a la respuesta inmune del hospedador hacia los productos metabólicos que desprende la larva en el momento de migrar.

CONCLUSIONES

1. La concentración de formal que resultó ser la más adecuada para el cultivo de huevos y la obtención de la larva L₂ de I. canis, fué la de 0.25 %, obteniéndose una viabilidad del 100 % durante un mes.
2. El Ag ES de I. canis obtenida en cultivos de larvas in vitro, es capaz de reaccionar con anticuerpos inducidos in vivo por el parásito, cuando se provoca LMV en conejos y perros por el solo no es capaz de producir esinefilia en animales de experimentación, indicando que no es un antígeno inductor de reacciones de hipersensibilidad.
3. El Ag ES es inimmunogénico y específico, ya que no da reacción cruzada con los antígenos de A. suum como lo dan los antígenos somáticos de I. canis, por tal motivo es más confiable en su método diagnóstico.

R E S U M E N

El propósito de este trabajo consistió en obtener el antígeno metabólico (Ag ES) de la larva infectante del parásito T. ganis. Dicha larva produce la enfermedad conocida como Larva Migrans Visceral en hospedadores no naturales, incluyendo al hombre. Para la obtención del Ag ES fué necesario tener cultivos adecuados para la maduración y viabilidad óptimas de la larva infectante dentro del huevo, por lo que se probaron soluciones de diferente concentración de formal, resultando ser la más adecuada la SSFF al 0.25 %. La obtención del antígeno se llevó a cabo extrayendo semanalmente el medio sobrenadante del cultivo de larvas, el cual posteriormente se dializó y liofilizó, comprobándose la existencia del Ag ES en la muestra liofilizada, al ponerla en contacto con suero de conejo infectado, mediante las pruebas de precipitación en tubo capilar, en placas y doble difusión en agar. En todas las pruebas se observó una reacción positiva. El estudio inmunogénico del antígeno ES con respecto al tiempo, se realizó inmunizando 2 lotes de conejos, determinando el título de anticuerpos en la respuesta primaria y secundaria, obteniéndose un título máximo de anticuerpos al día 8 en la respuesta primaria y en el día 22 en la respuesta secundaria. Se demostró que el Ag ES es altamente específica en comparación con los antígenos somáticos y por lo tanto lo recomendamos para detectar la enfermedad LMV.

B I B L I O G R A F I A

1. Soulsby E.J.L.
Parasitic Zoonoses.
Academic Press, Inc.; 305-325, 1975.
2. Selding D.L.
Textbook of Parasitology.
Third Edition.
Ed. Interamericana: 432-436, 1977.
3. Savigny D.M. y Tizard I.R.
Visceral Larva Migrans.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.; 71: 501-507, 1977.
4. Jenks C. L.
Antigenic Analysis of a cestode parasite, Texascaris canis.
Exp. Parasitol.; 21: 38-50, 1967.
5. Cordelle G.
Larva Migrans Visceral.
Rev. Colomb. Pediat.; 28: 13-17, 1958.
6. Marvel N. y J. de Marvel M.
Toxocarosis experimental (larva migrans), en ratones C57/BL.
Rev. Ib. Parasitol.; 39: 191-201, 1967.
7. Faust, C.L., Russell P.F. y Jung R.C.
Parasitología Clínica.
Primer edición.
Ed. Interamericana: 344-347, 1978.
8. Mikhael N.Z., Orizaga M., Vital J.A.M. y Harry C.
Toxocara canis infestation with encephalitis.
Can. Neurol. Sci.; 1: 114-120, 1974.
9. Warren M.S. y Mahmoud A.A.F.
algorithms in the diagnosis and management to zotic diseases.
J. Infect. Dis.; 135: 868-872, 1977.
10. Glickman L.T., Cypess E.H., Crossine P.K. y Glittin D.A.
Toxocara infestation and epilepsy in children.
J. Pediatr.; 94: 75-78, 1979.

11. Shantz P.M., Meyer D. y Glickman L.T.
Clinical serologic and epidemiologic characteristics of ocular toxocarosis.
Am. J. Trop. Med. Hyg.; 28: 24-28, 1979.
12. Glickman L.T., Cypess R.M., Miles D. y Gessner P.
Toxocara specific antibody in the serum and aqueous humor of patients with presumed ocular and visceral toxocarosis.
Am. J. Trop. Med. Hyg.; 28: 29-36, 1979.
13. Soulsby E.J.L.
Immunity to animal Parasites.
Academic Press Inc.; 228-233, 1972.
14. Cypess R.M., Meryl H.M., Zidian L.J. y Glickman T.L.
Larva-specific antibodies in patients with visceral larva migrans.
J. Infect. Dis.; 135: 633-646, 1977
15. Tribouly D.G., Tribouly J., Apprieux M. y Tassier J.M.
Mise en evidence d'anticorps au de la toxocarose experimental a l'aide d'un extrait antigenique prepare a partir du parasite adulte.
C.R. Sds. Sec. Biol. Fil.; 170: 349-352, 1976
16. DeFelle A.A.
The serodiagnosis of human toxocarosis by capillary tube precipitating test,
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.; 69: 146-147, 1975.
17. Jenks E.L.
Purification and immunochemical analysis of a genus-specific cuticular antigen of *Toxocara canis*.
J. Parasitol.; 55: 465-471, 1969.
18. Collins R.F. e Ivey H.M.
Specificity and sensitivity of skin test reactions to extracts of *Toxocara canis* and *Oncocera spp.*
Am. J. Trop. Med. Hyg.; 26: 455-459, 1975.
19. Krupp I.M.
Hemagglutination test for detection of antibodies specific for ascaris and toxocara antigens in patients with suspected visceral larva migrans.
Am. J. Trop. Med. Hyg.; 27: 378-384, 1974.

20. Glickman L.T., Chantz P., Ombreske R. y Cypess R.M.
Evaluation of serodiagnostic tests for visceral leishmaniasis.
Am. J. Trop. Med. Hyg.; 27: 492-498, 1978.
21. Zyngier F.R.
Difficulties in the differential serological diagnosis employing a Leishmania canis antigen.
Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo; 18: 427-432, 1976.
22. Hogarth Scott A. y Feary B.J.
The specificity of nematode allergens in the diagnosis of human VLP.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.; 54: 317-327, 1976.
23. Savigny D.M.
In vitro maintenance of Leishmania canis larvae and a simple method for the production of Leishmania ES antigen for use as simple serodiagnostic tests for visceral leishmaniasis.
J. Parasitol.; 61: 781-782, 1976.
24. Graves M.E., Davis F.C. y Selles B.M.
Spectrophotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference.
Anal. Biochem.; 22: 195-200, 1968.