

11261  
1  
T2  
J



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**ELABORACION DE ANTIGENOS DE Toxocara canis  
Y SU EVALUACION CON LA TECNICA DE ELISA**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
P R E S E N T A .

**MARIA TERESA AGUIRRE ALCANTARA**

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

## INDICE

	Pág.
1. INTRODUCCION.....	11
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1. Morfología y Biología de <u>Toxocara canis</u> .....	13
2.2. Agente Etiológico de la Larva Migratoria Visceral y Ocular	17
2.3. Patogenia y Cuadro Clínico.....	18
2.4. Diagnóstico de Larva Migratoria.....	25
2.5. Métodos Inmunológicos.....	27
2.6. Antígenos de Parásitos para el Inmunodiagnóstico.....	33
2.7. Tratamiento y Pronóstico.....	36
2.8. Profilaxis.....	38
3. JUSTIFICACION.....	39

4. HIPOTESIS.....	40
5. OBJETIVOS.....	40
6. MATERIAL Y METODOS.....	42
6.1. Obtención de Parásitos Adultos y Larvas de <u>Toxocara canis</u> .	42
6.2. Elaboración de Antígenos de <u>T. canis</u> .....	45
6.2.1. Antígenos Somáticos de Larvas (L-2).....	45
6.2.2. Antígenos Somáticos de Adultos.....	46
6.2.3. Antígenos de Superficie de Larvas (L-2).....	46
6.2.4. Antígenos de Superficie de Adultos.....	46
6.2.5. Antígenos de Excreciones y Secreciones de Larvas (L-2).	47
6.2.6. Antígenos de Excreciones y Secreciones de Adultos.....	47
6.3. Obtención de las Muestras de Suero.....	49
6.3.1. Grupos de Pacientes Parasitados.....	49
6.3.2. Muestras de Suero del Grupo Control Normal.....	50
6.4. Técnica de Inmunoensayo Enzimático (ELISA).....	51
6.4.1. Procedimiento.....	51
6.4.2. Criterio de Positividad.....	53
6.4.3. Análisis Estadístico.....	53
6.4.4. Evaluación Serológica .....	53

7. RESULTADOS.....	56
7.1. Liberación de Larvas de <u>I. canis</u> .....	56
7.2. Elaboración de Antígenos.....	61
7.3. Optimización de la Prueba de ELISA.....	62
7.4. Antígeno de Superficie de Adultos y Larvas.....	71
7.5. Antígeno Somático de Adultos y Larvas .....	75
7.6. Antígeno de Excreciones y Secreciones de Adultos y Larvas.	76
8. DISCUSION.....	86
9. CONCLUSIONES.....	93
10. RESUMEN.....	95
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	97

ELABORACION DE ANTIGENOS DE Toxocara canis  
Y SU EVALUACION CON LA TECNICA SEROLOGICA DE ELISA.

1. INTRODUCCION.

Toxocara canis (Werner, 1782) es un nemátodo cosmopolita, parásito de cachorros de perro. Su nombre proviene del griego que significa toxon = arco y kara = cabeza.

El hombre es susceptible de ser infectado por larvas de segundo estadio (L-2) de T. canis, quienes son el agente etiológico de la larva migratoria visceral (LMV) y ocular (LMO), que afecta principalmente a la población infantil (Mok, 1968; Schantz, 1979).

En otros estudios, se ha considerado a la infección con Toxocara como la causa de una amplia variedad de entidades clínicas que incluyen artritis (Bethel, 1981), miositis (Walsh y cols., 1988), pleuritis (Bruart y cols., 1987), meningitis (Gould y cols., 1985) y mielitis (Wang y cols., 1983).

En México de acuerdo a datos médicos proporcionados principalmente por oftalmólogos, ésta parasitosis es relativamente frecuente.

Un diagnóstico de LMV se debe considerar en cualquier niño con tos, fiebre, infiltración pulmonar, hepatomegalia, incremento en suero de isohemaglutininas A y B, hiperglobulinemia, leucocitosis, eosinofilia persistente y especialmente si hay geofagia (Snyder, 1961; Huntley, 1965; Zinkham, 1978).

La LMO deber se sospechada en niños con lesiones unilaterales blancas o grises en el fondo de ojo. Aunque se debe establecer diagnóstico diferencial con anormalidades congénitas, retinoblastoma y otras formas de uveítis (Wilder, 1950; Wilkinson, 1989).

La presencia de Toxocara no se detecta por exámenes de materia fecal, la confirmación diagnóstica se basa en la demostración de la larva en biopsia o necropsia de los granulomas (Glickman, 1978). Pero se requieren más de cien cortes seriados para encontrar a la larva (De Buen, 1966) y una vez encontrada deberá ser diferenciada de otras larvas de nemátodos en base a sus características morfológicas.

En ausencia de evidencia parasitológica de la infección y de que los datos clínicos y de laboratorio son generalmente inespecíficos (Ashton, 1960), el diagnóstico de la LMV y LMO se ha basado en principalmente en métodos inmunológicos.

En nuestro país, las técnicas empleadas en la actualidad y los antígenos disponibles mediante diferentes métodos de extracción, no han resuelto el problema de las reacciones cruzadas que comúnmente se observan en pacientes con helmintiasis. Esto representa dificultades diagnósticas debido a que a menudo los pacientes presentan parasitosis múltiple, por esta razón se realizó este trabajo, ya que es muy importante contar con antígenos altamente específicos y técnicas de inmunodiagnóstico sensibles, para que el diagnóstico serológico de la toxocariasis larval sea confiable.

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1. MORFOLOGIA Y BIOLOGIA DE Toxocara canis.

#### Morfología.

Los machos adultos de T. canis alcanzan 13 cm. de longitud y las hembras hasta 20 cm., ambos sexos tienen en la porción anterior aletas cervicales diferenciadas, son mucho más largas que anchas (2 a 4 mm. de largo por 0.2 mm. de ancho aproximadamente); labios prominentes que suelen presentar rebordes dentígeros finos, carecen de interlabios, en el esófago presentan un ventrículo posterior evidente pero carecen de divertículo ventricular y ciego intestinal. El esófago tiene una longitud de 5 mm., incluido el ventrículo, que mide 0.5 mm. tanto de largo como de ancho.

La cola del macho esta abruptamente reducida en diámetro y presenta 5 papilas en cada lado con aproximamente 20 pares de papilas preanales. En la hembra, la vulva se sitúa entre la quinta a sexta porción anterior del cuerpo del parásito.

Los huevos son de color pardo, y casi esféricos tienen cubierta delgada con depresiones superficiales, miden cerca de 85 por 75  $\mu$ m, no estan larvados en el momento de la postura.

#### Biología.

La toxocariasis es una parasitosis catalogada como geohelmintiasis, ya que los huevos deben permanecer de 2 a 5 semanas en el suelo, para que dependiendo de la temperatura (15 a 35°C) y la humedad se tornen infectantes. A temperaturas menores de

15°C el desarrollo se detiene y a temperaturas mayores de 35°C pierden su viabilidad.

La infección con Toxocara canis en perros y otros cánidos, se inicia al ingerir huevos infectantes de T. canis, que pasan al estómago pierden sus cubiertas, eclosionan y ya en intestino delgado las larvas invaden la mucosa intestinal, penetran los vasos linfáticos y sanguíneos, llegan a hígado en 24 a 48 horas, pasan a corazón, alcanzan pulmón y atraviezan la membrana alveolocapilar, llegan a bronquiolos, tráquea, laringe y epiglotis donde son deglutidas. En el intestino delgado sufren 2 mudas más para completar su desarrollo hasta adultos. Los huevos aparecen en materias fecales de 4 a 5 semanas después de que adquirió la infección. Otras larvas que llegan a pulmones no pasan a la tráquea sino que continúan la circulación mayor y se distribuyen a todos los órganos y tejidos principalmente pulmones, hígado, riñones, músculos, corazón, cerebro y ojo.

La edad del huésped en el momento de la infección determina la migración traqueal o somática. En animales mayores de 6 meses casi todas las larvas sobrevivientes se encuentran distribuidas en los tejidos.

La infección prenatal de cachorros ocurre cuando las larvas que están en los tejidos de la madre migran a través de la placenta, estas larvas provienen de una infección contraída durante el embarazo o de las larvas presentes en los tejidos, adquiridas de infecciones anteriores. La migración transplacentaria se lleva a cabo después del 42<sup>avo</sup> día de embarazo y posiblemente la provoque un estímulo causado por cambios hormonales.

Las larvas permanecen en el hígado de los cachorros prenatalmente infectados hasta el nacimiento, luego van a pulmones, migran a tráquea, son deglutidas y maduran en el intestino. Los huevos pueden ser expulsados con las heces al iniciarse la cuarta semana de vida (Douglas y Baker, 1966). La madre puede reinfectarse durante los primeros 10 días después del nacimiento de sus hijos por la ingestión de su materia fecal al limpiarlos, si éstas provienen de cachorros con infección masiva, presentan larvas viables que no han logrado establecerse en las crías, pero alcanzan fácilmente la madurez en el intestino de la madre.

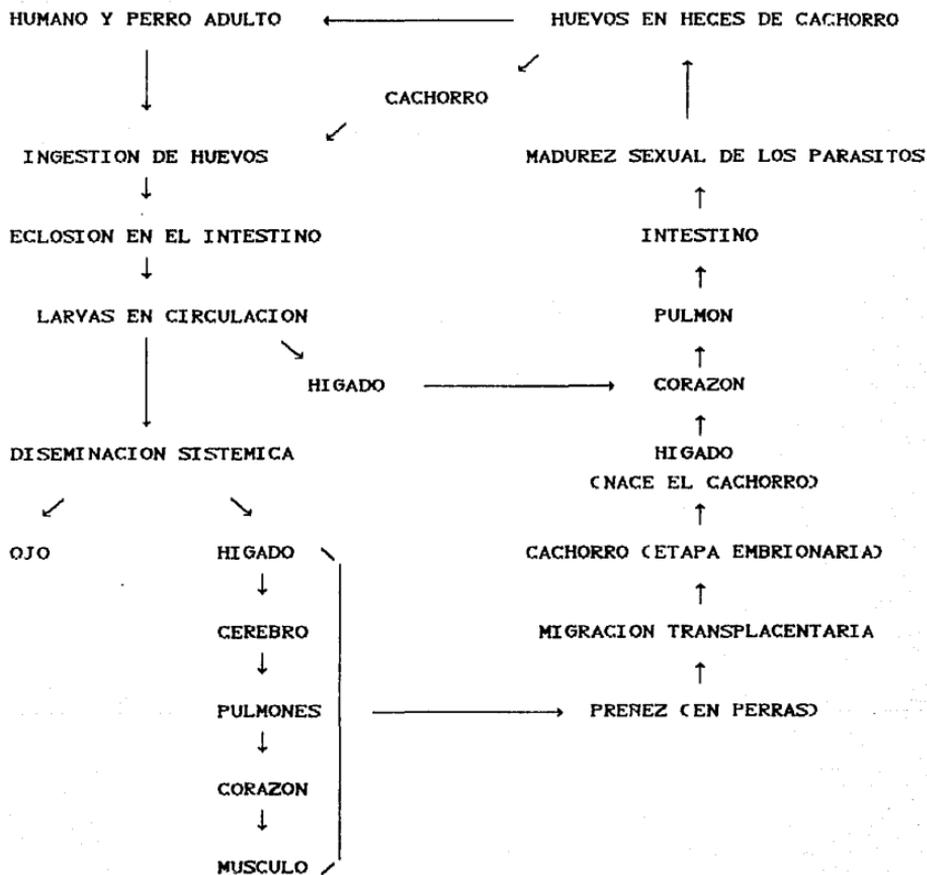
La migración transmamaria sucede cuando la hembra se infecta después de las tres cuartas partes del tiempo de gestación.

El promedio de vida de los adultos de Toxocara canis es aproximadamente de 4 meses, el huésped expulsa la mayoría de los parásitos a los 6 meses de haber contraído la infección. Se ha calculado que la hembra de T. canis puede producir hasta 200,000 huevos al día.

Otros huéspedes no caninos como las lombrices de tierra, ratones, ratas, pollos, palomas, ovejas, cerdo e incluso el hombre, pueden infectarse accidentalmente, en ellos las larvas que llegan a tener migración somática quedan alojadas en los tejidos y sobreviven por muchos años. Beaver (1966), realizó infecciones experimentales en monos, Macaca mulata, y observó que las larvas permanecen cuando menos 9 años, conservando la capacidad de completar su ciclo biológico (figura 1) si son ingeridas por el huésped canino habitual, a este fenómeno se denomina paratenésis (Schantz y Glickman, 1983).

FIGURA 1.

CICLO BIOLÓGICO DE *Toxocara canis*.



## 2.2. AGENTE ETIOLOGICO DE LA LARVA MIGRATORIA VISCERAL Y OCULAR.

Los huevos infectantes de Toxocara canis, al ser ingeridos accidentalmente por el hombre eclosionan y dan lugar a larvas que migran a través de órganos y tejidos. Beaver y cols., (1952), identificaron larvas de especies de Toxocara en la biopsia de hígado de un niño de dos años y seis meses y propusieron entonces emplear el término "larva migratoria visceral" (LMV), para describir el síndrome de eosinofilia con hepatomegalia causado por la invasión de nemátodos inmaduros en los órganos humanos, que también se le conoce con el nombre de granulomatosis visceral verminosa (Tay y cols, 1991).

Wilder (1950), describió lesiones oculares que contenían larvas de nemátodos ahora conocidas como "larva migratoria ocular" (LMO), en las cuales Smith y Beaver (1953) subsecuentemente demostraron que se debían a T. canis.

Beaver en 1962 reporta 150 casos de LMV publicados en la literatura y Glickman y Schantz en 1981 refieren más de 1900 casos de LMV Y LMO reportados en todo el mundo.

En México, Martínez y Alemán (1960), Molina y Díaz (1960), describieron el caso de un paciente con hepatomegalia, y eosinofilia que tenía granulomas en hígado en los que se encontraron larvas que posiblemente eran de T. canis. Más tarde, De Buen y cols. (1965), reportaron el primer caso de endoftalmítis por T. canis en México con estudio histopatológico y comprobado parasitoscópicamente.

### 2.3. PATOGENIA Y CUADRO CLINICO.

El síndrome de larva migratoria visceral (LMV) y ocular (LMO) en el humano, se presenta por la ingestión de huevos infectantes esferoidales de 85 por 75  $\mu\text{m}$  de diámetro de Toxocara canis que contienen la larva de segundo estadio. La eclosión de los huevos ocurre en el intestino delgado proximal, las larvas de 350 a 450  $\mu\text{m}$  de largo por 18 a 20  $\mu\text{m}$  de ancho, penetran la mucosa y submucosa, alcanzan la circulación, migran a hígado por vena porta, donde pueden quedar atrapadas o continuar a pulmones, entran a circulación sistémica y se distribuyen por todo el organismo, se localizan en cualquier tejido u órgano, incluidos hígado, pulmones, corazón y cerebro.

Cuando el tamaño de las larvas excede el diámetro de los vasos sanguíneos, perforan activamente la pared de éstos y migran desordenadamente a los tejidos circundantes, estas larvas pueden mantenerse viables en estado latente por varios años, pudiendo activarse nuevamente y continuar su migración. Eventualmente algunas larvas son encapsuladas y destruidas por la respuesta inmune del huésped.

Las manifestaciones clínicas y patológicas en la LMV resultan del daño mecánico causado por la migración de las larvas y por la frecuente y severa respuesta inflamatoria estimulada por su presencia. Los tejidos afectados muestran múltiples abscesos y granulomas eosinofílicos de tipo alérgico (Arean y cols., 1971).

La predilección de las larvas de T. canis hacia diferentes órganos o tejidos varía de especie a especie. En el hombre las

larvas se encuentran más frecuentemente en hígado, pero probablemente cualquier tejido puede ser invadido. La respuesta inmunológica del huésped puede influir en esta distribución, ya que se ha observado que en animales de laboratorio sujetos a repetidas infecciones y comparados con aquellos que recibieron una sola infección, se notó que en los primeros se retenía una mayor cantidad de larvas en el hígado, evitando con ello que éstas alcanzaran pulmones, cerebro y ojos. Las larvas muertas o agonizantes también provocan una respuesta inflamatoria más intensa que las vivas. Las observaciones clínicas sugieren que algunos factores similares están involucrados en la patogénesis de la LMV en el hombre (Schantz y cols., 1978).

Snyder (1961), Huntley (1965) y Zinkham (1978), han revisado las características de los casos clínicos en niños de uno a cuatro años de edad con historia de geofagia, la mayoría de estos casos de LMV se caracterizan por presentar síntomas como tos, respiración sibilante, bronquitis aguda, estertores, neumonitis, asma, fiebre, palidez, convulsiones, hepatomegalia, esplenomegalia, y linfadenopatía.

El síndrome de LMV es favorecido por la estrecha asociación entre humanos y perros. Usualmente ocurre en niños de 1 a 6 años y está asociado a la ingestión de tierra, propiciado por hábitos de juego a nivel del suelo o por presentar un hábito patológico que es denominado pica (Wilkinson y cols., 1971; Schantz y cols., 1979, 1980; Glickman, 1981 y Worley y cols., 1984).

La palabra pica, proviene del latín (nombre dado al ave urraca Pica pica, que tiene el hábito de recolectar una gran variedad de

alimento del suelo para saciar su intensa hambre). La definición de pica para el hombre sería la habitual ingestión de sustancias no alimenticias que puede llegar a transformarse en una seria desviación de la conducta (Blakiston, 1983). Este hábito frecuentemente se limita a la ingestión específica de sustancias tales como tierra, arcilla, heces, plástico, pintura, crayones fósforo, pelo y otros objetos.

Las manifestaciones clínicas de la migración de larvas de Toxocara canis en el hombre dependen del número de huevos infectantes ingeridos; de la frecuencia de reinfecciones; de la distribución de larvas en el organismo, así como de la intensidad de la respuesta inmune del huésped. Afortunadamente, la mayor parte de las personas afectadas probablemente sufren infecciones leves y no tienen alteraciones anatomopatológicas aparentes o que se traduzcan con manifestaciones clínicas. Aproximadamente el 2% de los individuos aparentemente sanos, tienen intradermorreacción positiva a T. canis y arriba del 13%, presentan títulos de anticuerpos compatibles con infección, pero los casos fatales han resultado de la extensa invasión larval al cerebro (Beautyman y cols., 1951, 1966; Mikhael y cols., 1974; Hill, 1985 y Ruttinger P. y cols., 1991) o miocardio (Glickman, 1979). En general los pacientes con LMV tienen antecedente de haber convivido con cachorros de perro, aunque en los casos de LMO, que no ha sucedido así es probable que la infección la hayan adquirido a través de suelos contaminados de parques u otros lugares públicos (Woodruff y cols., 1978).

Cypess y cols. (1977), mencionan que los casos oculares

reportados difieren de los de LMV en los siguientes aspectos:

1) La edad de estos individuos es mayor que la de los pacientes con LMV sistémica.

2) La alteración con LMO usualmente se presenta en ausencia de pica y signos o síntomas de LMV.

3) La respuesta inmune, mediada por anticuerpos en suero se observa con menor frecuencia en los casos oculares. La alteración producida por LMV rara vez es fatal; la larva puede migrar a ojos y ocasionar ceguera benigna permanente, desafortunadamente el resultado de la lesión retineal frecuentemente es confundido con retinoblastoma, que conlleva a la enucleación innecesaria del ojo (Schantz, 1979).

En un grupo de pacientes con alteraciones oftalmológicas estudiados en el Centro para el Control de Enfermedades Transmisibles de Atlanta, Georgia, EUA; se diagnosticaron 41 casos seropositivos de LMO en un periodo de 16 meses, que representó, una proporción del 37% del total de las enfermedades retineanas diagnosticadas; todos los pacientes presentaron una importante pérdida de la visión.

La endoftalmitis por Toxocara canis se clasifica de la siguiente forma:

- 1) Endoftalmitis crónica (absceso vítreo)
- 2) Granuloma del polo posterior
- 3) Masa granulomatosa periférica inflamatoria
- 4) Presentación atípica

Wilder (1950), hizo un importante descubrimiento al notar que

muchos ojos se enucleaban con diagnóstico presuntivo de retinoblastoma, exhibiendo evidencia patológica de infección parasitaria, este hallazgo se debió a un exhaustivo estudio de cientos de cortes histológicos seriados de 46 ojos que revelaron la presencia de abscesos eosinofílicos. En 24 de estos ojos se observó la existencia de larvas o restos larvales, a esta entidad anatomopatológica la llamó endoftalmitis por nemátodos. Aparentemente la mayoría de los ojos afectados presentaron una marcada inflamación del vítreo, desprendimiento de retina y leucocoria.

#### Endoftalmitis crónica.

Fue la primera forma de endoftalmitis por Toxocara canis que se describió histológicamente. La mayoría de los casos descritos por Wilder (1950) pertenecen a esta clasificación, y los ojos fueron enucleados debido a la posibilidad de retinoblastoma. La presencia de una respuesta inflamatoria densa del vítreo, una profunda reducción en la claridad de los medios y desprendimiento de retina, fueron demostrados en la mayoría de los casos.

Los pacientes con presentación de endoftalmitis por T. canis fueron ligeramente más jóvenes que aquellos en los que se presentó una respuesta granulomatosa localizada (Wilkinson, 1971).

#### Granuloma de polo posterior.

Depende sobre todo de la etapa en que es observado, aunque estos pacientes suelen presentar más frecuentemente estrabismo secundario que los pacientes con endoftalmitis crónica. Esta

variedad de infección puede presentarse inicialmente con una relativa opacidad en el vítreo y signos de inflamación aguda, en la que el granuloma del polo posterior se observa como una masa difusa mal definida, con inflamación del vítreo, sin embargo, el gel vítreo se aclara al disminuir la inflamación. En esta variedad, comienzan a aparecer masas inflamatorias subretinianas o intra-retinianas típicamente bien definidas, que son relativamente pequeñas y tienen un rango de 0.75 a 6 mm. de diámetro. Las masas granulomatosas esféricas son generalmente blancas o grises (Hagler y cols., 1981).

#### Masa inflamatoria periférica.

Esta variedad de endoftalmítis por Toxocara canis también puede ser precedida por una forma más activa y aguda pudiendo aparentar una endoftalmítis difusa. Se aprecia una masa inflamatoria densa de color blanco en la periferia de la retina, puede estar bien localizada, de configuración esférica, similar a aquellas observadas en el polo posterior. Alternativamente la inflamación puede estar difusa y semejar un "banco de nieve", como la que se observa en la típica pars planitis severa. Existen bandas de tracción intravítreas que pueden producir desprendimiento de la retina.

#### Presentación atípica.

Además de lo descrito anteriormente en las tres formas clásicas de presentación de endoftalmítis por T. canis, también se han observado formas atípicas de presentación, como son 1)

inflamación de la cabeza del nervio óptico, 2) movilidad subretiniana del nemátodo, 3) corioretinitis difusa. La afección del segmento anterior por Toxocara canis da como resultado conjuntivitis, queratitis, nódulos localizados en iris, y cambios en el cristalino.

El diagnóstico de toxocariasis ocular no es difícil cuando se asocia con una discreta masa inflamatoria y cuando se observa la típica organización epi-retiniana y vítrea. Sin embargo, en ojos con una severa opacificación del vítreo puede resultar imposible hacer un diagnóstico apropiado basándose solamente en los hallazgos morfológicos. Son de importancia en el diagnóstico diferencial de la toxocariasis ocular el retinoblastoma, otras formas de uveítis, la endoftalmitis, fibroplasia retrolental, vítreo-retinopatía exudativa familiar, enfermedad de Coats, persistencia de vítreo primario hiperplásico y neuritis óptica idiopática (Wilkinson, 1989).

#### 2.4. DIAGNOSTICO DE LARVA MIGRATORIA.

Para realizar el diagnóstico etiológico de larva migratoria visceral (LMV) y ocular (LMO), se deben tener en cuenta, entre otras cosas, los antecedentes epidemiológicos y la convivencia con cachorros de perro, además de los síntomas y signos clínicos compatibles con LMV o con LMO.

Es importante recordar que Toxocara canis no completa su ciclo biológico en el hombre, debido a que no es su huésped habitual, por esta razón los exámenes coproparasitológicos no se realizan.

Recientemente, Clarke y cols. (1992) reportaron un caso de LMV hepática descubierta por ultrasonido, sin embargo, no se ha evaluado la utilidad de esta prueba en el diagnóstico de la LMV. La confirmación diagnóstica sólo es posible cuando se demuestra la larva en biopsia o necropsia, pero se requieren cientos de cortes histológicos seriados para encontrar a la larva (Wilder, 1950) y una vez encontrada la larva de T. canis deberá ser diferenciada de otras larvas de nemátodos en base a sus características morfológicas.

En pacientes con LMV a los que se les efectúa laparotomía, las lesiones del hígado aparecen como placas blanquecinas y al estudio histopatológico se aprecia un pequeño foco de inflamación granulomatosa compuesto en su mayoría por eosinófilos, células epitelioides y células gigantes que rodean la larva, alteraciones que también se observan en pulmones y cerebros de casos de autopsia.

Las muestras para el estudio citológico del humor acuoso o del

vitreo también pueden ser de utilidad para confirmar el diagnóstico de toxocariasis ocular. La presencia de eosinófilos es compatible con LMO, mientras que otras formas de inflamación ocular se asocian con otros tipos de células inflamatorias (Wilkinson, 1989).

Los siguientes datos de laboratorio clínico, aunque inespecíficos, es común encontrarlos asociados con el síndrome de larva migratoria.

Eosinofilia.- Moderada o marcada pero persistente.

Leucocitosis.- Pueden existir cuentas de 30,000 a 100,000 leucocitos por  $\text{mm}^3$  (Schantz y Glickman, 1978).

Hiperglobulinemia.- Hay una elevación de inmunoglobulinas especialmente IgG e IgE y en menor grado IgM, este aumento puede reflejar una respuesta inmune específica contra las larvas de Toxocara canis, una respuesta inespecífica o bien daño en el tejido hepático.

Albumina.- Se pueden presentar niveles de concentración ligeramente bajos.

Anticuerpos de Forssman.- En la toxocariasis tienen una concentración alta (Huntley y cols., 1965).

Isohemaglutininas anti-A y anti-B.- Existe una moderada o marcada elevación de los títulos de isohemaglutininas anti-A y anti-B, esto se debe a que las larvas contienen polisacáridos relacionados con sustancias del grupo AB. En una encuesta realizada a 51 pacientes clínicamente compatibles con LMV, el 56.9% tenían aglutininas anti-A y el 96.1% aglutininas anti-B, sin embargo, los autores no mencionan el grupo sanguíneo de las personas que participaron en la encuesta (Huntley y cols., 1965).

## 2.5. METODOS INMUNOLOGICOS.

Debido a que los datos clínicos y de laboratorio, en general son inespecíficos en esta parasitosis, el obtener la evidencia parasitológica es prácticamente imposible, es por ésto que el diagnóstico de laboratorio fundamentalmente se ha basado en métodos inmunológicos como son los siguientes:

### Intradermorreacción

Los antígenos de Toxocara canis se han usado en intradermorreacción para toxocariasis, pero como éstos se obtienen del parásito adulto que no se encuentra en el hombre, la especificidad del método es incierta (Woodruff, 1964).

### Pruebas de precipitación.

En estas pruebas se emplean antígenos solubles relativamente puros, sin embargo, la mayoría de ellas son inadecuadas debido a la gran cantidad de antígeno que consumen. Las técnicas de precipitación más comúnmente usadas para enfermedades parasitarias básicamente se realizan en gel, como son la doble difusión (Ouchterlony), difusión radial, inmunolectroforesis y contraelectroforesis. Estos métodos relativamente simples se han considerado técnicamente adecuados para el diagnóstico de laboratorio y han sido de utilidad para entender la complejidad de la respuesta antígeno anticuerpo en las infecciones parasitarias, pero su valor práctico en inmunodiagnóstico es limitado debido a su baja sensibilidad y de que los resultados se obtienen después de 12

a 48 horas (Voller y De Savigny, 1981).

Cypess y cols. (1977), utilizando antígeno de huevos larvados, compararon la inmunodifusión (ID) con ELISA y encontraron que en ID, siete de diez pacientes con LMV fueron positivos, mientras que con ELISA los 10 pacientes presentaron la prueba positiva, por lo que concluyeron que ELISA fue más sensible para la detección de anticuerpos que el método de difusión de agar.

Un año mas tarde, Glickman y cols. (1978), reportaron con la técnica de Ouchterlony especificidad del 92.3% y sensibilidad del 65.2% inferior a la de ELISA que fue del 78.3%.

#### Método de aglutinación.

Aglutinación Pasiva.- En estas pruebas, los antígenos de parásitos solubles y potencialmente puros se unen a partículas inertes tales como eritrocitos, poliestireno (latex), carbón o bentonita. La aglutinación pasiva de las partículas portadoras sucede en presencia de cantidades de antígeno y anticuerpo reactivo equivalente, y los resultados se pueden leer visualmente.

Las pruebas de la hemaglutinación indirecta pueden dar resultados inespecíficos debido a las aglutininas heterófilas en el suero de los individuos. La preabsorción de los sueros y el uso de los eritrocitos humanos del grupo "O" reduce este problema (Voller y De Savigny, 1981).

La hemaglutinación indirecta, ha sido empleada satisfactoriamente en el serodiagnóstico, por Kagan y cols. (1959), y por Krupp (1974), para detectar anticuerpos, empleando extractos crudos de parásitos adultos, huevos embrionados y larvas de segundo

estado de Toxocara canis (Smith y cols, 1960).

Cypess y cols. (1977), emplearon la hemaglutinación indirecta (no aclaran con que antígeno sensibilizaron los eritrocitos) y encontraron una especificidad del 92.3%, igual que con ELISA y una sensibilidad del 18.2% inferior que con ELISA que fue del 78.3%.

#### Métodos con reactivos marcados.

Estas pruebas incluyen a todas aquellas en las que uno de los componentes inmunológicamente reactivos se une a un marcador que puede ser detectado y medido en mínimas cantidades, son de los métodos serológicos más sensibles de que se disponen en la actualidad. En los últimos años estas pruebas han ganado una posición dominante en la serología parasitaria. Su alta sensibilidad, su escaso requerimiento de antígeno y el permitir procesar varios sueros a la vez, han sido los principales factores de su aceptación en muchos laboratorios.

Inmunofluorescencia Indirecta.- El primero de estos métodos introducido a la parasitología, fue el de anticuerpos fluorescentes (IFI), en el que la antigamaglobulina marcada con fluoresceína se emplea para detectar la reacción anticuerpo específico que se lleva a cabo en todo el parásito o en secciones del mismo. Esta forma de antígeno puede ser fácilmente preparada y convenientemente almacenada por largos períodos, también permite la identificación de reacciones en diferentes sitios de los parásitos. Sin embargo, en helmintos se pueden presentar reacciones cruzadas. La desventaja

de la prueba IFI clásica es la necesidad del buen mantenimiento y cuidado del sistema de microscopia fluorescente y la subjetividad en la lectura al microscopio (Voller y De Savigny, 1981).

Bisseru y Woodruff (1968), usaron la reacción de inmunofluorescencia indirecta, para detectar la presencia de anticuerpos contra larvas de segundo estadio de Toxocara canis, recuperadas de ratones infectados mediante el método de Baermann y observaron que uno de cada cinco sueros normales (20%) presentaban una significativa reacción fluorescente y que de tres sueros de pacientes infectados con Ascaris lumbricoides dos fueron positivos a diluciones de 1:10 y 1:20 y uno de éstos se mantuvo positivo a una dilución de 1:5120, por lo que ellos recomiendan usar la prueba sólo en regiones donde la infección por A. lumbricoides sea relativamente rara.

Radio inmunoensayo.- En el segundo grupo de métodos con reactivos marcados se encuentra el radioinmunoensayo o ensayo inmunoradiométrico, (RIA), que se ha empleado poco en inmunodiagnóstico parasitario. La mayoría de los laboratorios parasitológicos no están bien equipados con isótopos y la vida media corta de los antígenos marcados restringe grandemente su uso en los países en vías de desarrollo. RIA ha sido útil en la investigación de enfermedades parasitarias y especialmente en la medición de la respuesta específica de IgE (Weiss y cols. 1978).

Ceska y cols. (1972), desarrollaron el ensayo radioinmunoabsorbente en celulosa activada a la cual el antígeno se enlaza en forma covalente. Esta prueba tiene una sensibilidad que

permite la detección de niveles bajos de anticuerpos circulantes en infecciones parasitarias.

Smith y cols. (1980), realizaron el ensayo radioinmunoabsorbente en papel (PRIST), para la detección de anticuerpos específicos contra Toxocara canis en sueros humanos, sin embargo, ha dejado de ser utilizado por presentar diversas complicaciones.

Inmunoensayo enzimático (ELISA).- Es el más popular de los métodos con reactivos marcados recientemente introducidos. En estas técnicas el anticuerpo puede ser marcado con una enzima sin pérdida de la capacidad enzimática o inmunológica, de este modo, la reacción inmunológica específica puede ser combinada con la sensibilidad de la amplificación enzimática. Estas pruebas son comúnmente realizadas en fases sólidas, sus resultados tienen gran objetividad y sensibilidad y se pueden obtener mediante el uso de sistemas de detección con sustratos cromogénicos o fluorogénicos (Voller y cols., 1979).

El ensayo inmunoenzimático tiene sensibilidad comparable a los métodos inmunoradiométricos, pero se puede efectuar en laboratorios modestos con equipo simple y leyendo visualmente los resultados si es necesario. Los reactivos son estables y tienen una vida media larga, de este modo, los materiales de prueba pueden ser estandarizados y transportados a áreas de trabajo distantes.

Se pueden procesar eficientemente por ELISA un gran número de muestras, esto ha sido particularmente útil en estudios epidemiológicos (Hakim y cols., 1992). ELISA requiere volúmenes pequeños de muestra y puede dar resultados cuantitativos en pruebas

de dilución simple de suero o en papel filtro con sangre eluida (Voller y De Savigny, 1981).

Según Glickman y cols., (1978), Al detectar los anticuerpos circulantes anti-Toxocara canis con la técnica de ELISA la sensibilidad fué del 78%, en comparación con hemaglutinación indirecta (IHA) 18.2%, floculación con bentonita (BF) 25.8% y Ouchterlony 65.2%. La especificidad para todos fué de 92% o más, el valor de predicción positivo fué de más del 85%.

En la actualidad la prueba de elección para demostrar infección sistémica u ocular por T. canis es la prueba de ELISA (Kagan, 1979; Shields, 1984; Schantz, 1989 y Magnaval y cols., 1992).

Aunque el Centro para el Control de Enfermedades Transmisibles de Atlanta, Georgia, EUA; considera que por ELISA títulos séricos menores de 1:32 no son significativos en el diagnóstico de toxocariasis sistémica (Worley y cols., 1984), otros autores expresan que títulos séricos de 1:8 son suficientes para apoyar el diagnóstico de toxocariasis ocular si el paciente tiene signos y síntomas compatibles con el padecimiento (Hagler y cols., 1981).

## 2.6. ANTIGENOS DE PARASITOS PARA EL INMUNODIAGNOSTICO.

En los nemátodos, durante algunos estadios larvales parasitarios los materiales antigénicos importantes son liberados, esto se acompaña por una variedad de aspectos fisiológicos y bioquímicos. La respuesta del huésped cambia tanto cuantitativa como cualitativamente. Muchos parásitos sufren una amplia migración dentro del huésped, los parásitos mas afortunados han desarrollado reducida disparidad antigénica al compartir antígenos con su huésped y con otros parásitos patógenos (De Vay y Adler, 1976). Muchos de los anticuerpos producidos durante las infecciones parasitarias no estan dirigidos contra el parásito y son de especificidad desconocida. Todas estas características convergen para hacer del inmunodiagnóstico parasitario una de las más desafiantes disciplinas en el laboratorio clínico.

### Antígenos totales y extractos.

En la preparación de antígenos para el inmunodiagnóstico parasitario ha sido común el uso de todo el organismo o su extracto crudo. Tales antígenos son imposibles de estandarizar por medios bioquímicos debido a que la reactividad sólo se presenta en una pequeña parte del parásito y se puede inhibir por la mezcla de los diversos componentes antigénicos.

### Antígenos de superficie.

Desde la introducción de la prueba de anticuerpos inmunofluorescentes para la serología parasitaria los antígenos de

superficie han tenido un propósito útil, especialmente en protozoarios. El uso de antígenos de superficie en serología es conveniente debido a que éstos son los primeros antígenos detectados por el huésped durante la infección. Desafortunadamente muchas de las defensas del parásito contra la inmunidad del huésped también se asocian con su superficie.

La mayoría de los antígenos de superficie de los helmintos poseen un alto contenido de antígenos no reactivos y/o de reacción cruzada incluyendo antígenos similares a los del huésped y otros productos heterólogos tales como sustancias del grupo sanguíneo, polisacárido C y antígenos de Forsmann (De Vay y Adler, 1976).

#### Antígenos secretorios.

El uso de excreciones y secreciones de nemátodos, pueden tener cierta ventaja para el diagnóstico cuando los parásitos se encuentran vivos en el huésped. Los productos secretados contienen pocos componentes antigénicos altamente específicos (Fife, 1971; De Savigny, 1975; Crandall y Zam, 1968). Al contener pocos componentes se simplifica cualquier paso de purificación que pudiera ser necesario para facilitar la estandarización.

De Savigny (1975), desarrolló un método para mantener las larvas de Toxocara canis in vitro en el que estas eliminan al medio proteínas que son útiles para la detección de anticuerpos específicos, al que llamó antígeno de excreciones y secreciones (ES).

Al comparar los extractos crudos de todo el parásito con los antígenos metabólicos de los estadios larvarios, se ha observado

que estos últimos son mejores, solo que están disponibles en mínimas cantidades y únicamente se pueden emplear en inmunoensayos altamente eficientes. La falta de técnicas adecuadas de cultivo in vitro de helmintos, ha retrasado enormemente la investigación y el uso de antígenos secretorios en serología. Además de que hay una gran necesidad de estandarizar la elaboración de antígenos de referencia internacional (Voller y De Savigny, 1981).

## 2.7. TRATAMIENTO Y PRONOSTICO.

### Tratamiento Médico.

Algunas drogas se han utilizado en el tratamiento de larva migratoria visceral (LMV), como el citrato de dietilcarbamacina (hetrazan), que puede causar elevación temporal y luego una caída en la cuenta de eosinófilos (Smith y Beaver, 1953; Snyder, 1961). Se ha observado que la dietilcarbamacina reduce gradual y notablemente el número de larvas recuperadas del hígado y otros tejidos de ratones experimentalmente infectados. Este medicamento hasta el momento se considera adecuado para el tratamiento de la LMV (Clarke y cols. 1992).

Se ha empleado también el tiabendazol, que tiene la peculiaridad de destruir la fase tisular de algunos parásitos, ha sido administrado a pacientes con larva migratoria ocular (LMO) (Nelson y cols., 1966; Mac Dougall, 1969), a dosis de 125 mg, en dos dosis por 3 días, (Gass y cols., 1978), y en una dosis de 20 a 50 mg/kg de peso por día durante 7 a 10 días (Pollard, 1979); en pacientes con larva ocular activa se ha administrado 50 mg/kg de peso al día, de 2 a 3 días (Brown, 1970).

No hay datos disponibles concernientes a los efectos del tiabendazol en pacientes con LMO, sin embargo, si se utiliza esta droga se corre el riesgo de acentuar la respuesta inflamatoria por la muerte del parásito, por lo que se recomienda el uso de antiinflamatorios del tipo de la prednisona (Zinkham W. H., 1978).

La administración de corticosteroides también es útil en las

lesiones oculares y están indicados en pacientes que presentan inflamación, con objeto de prevenir los cambios que pueden ocasionar desprendimiento de la retina (O'Connor, 1980).

Huismans (1977); Gass y cols. (1978), recomiendan la destrucción de la larva por fotocoagulación cuando es visible en el ojo y está situada en un lugar accesible.

#### Cirugía Ocular.

La principal indicación de la cirugía en casos de LMO causados por Toxocara canis, es cuando existe desprendimiento de retina. En estos casos las técnicas de vitrectomía son utilizadas para remover las membranas epiretinianas o trans-vitreas que producen tracción sobre la retina, lo que permite colocarla en su lugar (Wilkinson, 1989).

#### Pronóstico.

En la mayoría de los casos, el pronóstico eventual es favorable, a menos que haya invasión del ojo. Incluso cuando se produce ésta, las posibilidades de conservar la función ocular mediante un diagnóstico rápido y tratamiento eficaz son altas (Heaver, 1986).

## 2.8. PROFILAXIS.

Schantz y Glickman (1983), recomiendan las siguientes medidas:

- 1.- Disminuir la población de los perro sin dueño.
- 2.- Esterilizar a los animales de compañía cuando no se desee su reproducción.
- 3.- Excluir los perros de las áreas de recreación infantil.
- 4.- Promulgación de leyes, o apoyo a las ya existentes, que obligan a la utilización de arnés, collar y correa.
- 5.- Fomento del concepto de responsabilidad de los dueños de animales de compañía en cuanto al control y eliminación de materias fecales.
- 6.- Educación a la población sobre el potencial zoonótico de los parásitos caninos.
- 7.- Desparasitación periódica de los perros.
- 8.- Descontaminación ambiental.
- 9.- Evitar la geofagia en los niños.

### 3. JUSTIFICACION.

En México se desconoce la frecuencia de toxocariasis en humanos debido a que se ha trabajado muy poco en encuestas epidemiológicas dirigidas a conocer el problema, además, por que el diagnóstico parasitológico es difícil y tanto los datos clínicos como los de laboratorio son inespecíficos y pueden ser causados por diferentes agentes etiológicos. Por otra parte, la inespecificidad de las pruebas serológicas, que se utilizan actualmente, debido a las reacciones cruzadas que se obtienen, por la crudeza de los antígenos, da como resultado que el diagnóstico inmunológico sea poco confiable.

Por lo anterior, es necesario elaborar y evaluar antígenos de diferentes componentes y etapas evolutivas de Toxocara canis para ser utilizados en pruebas serológicas confiables y sensibles físicoquímicamente hablando, y realizar de esta manera un diagnóstico serológico eficiente y oportuno, que permita proporcionar un tratamiento médico adecuado, para evitar el tratamiento quirúrgico innecesario.

Por otra parte, si se cuenta con antígenos y un ensayo serológico óptimos, también será posible valorar la frecuencia con la que se presenta esta parasitosis en nuestro país, ya que los datos existentes en la literatura médica son muy escasos.

#### 4. HIPOTESIS.

El antígeno crudo extraído del adulto de Toxocara canis hasta la fecha, se ha considerado en México, como una herramienta útil en el diagnóstico serológico de la toxocariasis larval, pero es probable que si se obtienen antígenos; somático, de superficie o de excreciones y secreciones de larvas de segundo estadio de T. canis, se logrará reducir la presencia de reacciones cruzadas, que son comunes en sueros de individuos multiparasitados (situación muy frecuente en nuestro medio), y también mejorar la sensibilidad, especificidad y eficiencia en la prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA).

#### 5. OBJETIVOS.

I) Detectar perros con Toxocara canis, para aislar los parásitos.

II) Eclosionar huevos larvados de T. canis.

III) Mantener in vitro larvas de T. canis.

IV) Producir antígenos, de distintos componentes o etapas evolutivas de Toxocara canis, como son:

a) Antígenos completos crudos de adultos y de larvas de segundo estadio (L2) de T. canis.

b) Antígenos de excreciones y secreciones de adultos y de larvas (L2) de T. canis.

c) Antígenos de superficie de adultos y de larvas (L2) de T. canis.

V) Evaluar los antígenos con la técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

VI) Detectar pacientes infectados con larva migratoria de T. canis, con Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura, Fasciola hepatica, Hymenolepis nana, Toxoplasma gondii, Necator americanus y la forma larvaria de Taenia solium (Cisticerco).

VII) Determinar el grado de cruce inmunológico de cada antígeno, en sueros de individuos infectados con algunos nemátodos, cestodos, tremátodos y protozoarios.

## 6. MATERIAL Y METODOS.

### 6.1. Obtención de Parásitos Adultos y Larvas de Segundo Estadio (L-2) de Toxocara canis.

#### 6.1.1. Adultos.

Para obtener los parásitos adultos, se evisceraron cachorros de perro de 2 a 6 meses de edad, raza criolla, infectados naturalmente y sacrificados en las siguientes instituciones de la ciudad de México: Centro Antirrábico de San Francisco Culhuacán, Centro de Control Canino Luis Pasteur, Centro de Control Canino de la Delegación Venustiano Carranza y Departamento de Necropsias de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La disección longitudinal del intestino delgado de los perros para extraer a los nemátodos se realizó cuidadosamente para no lesionarlos, con unas pinzas de disección sin dientes se depositaron éstos en un frasco con solución salina isotónica (SSI, NaCl 0.15 M. pH 6.6). Se lavaron 5 veces con SSI estéril y se incubaron a temperatura ambiente, en SSI estéril, adicionada con 800 UI/mL de penicilina sódica (Lakeside) y 1 mg/mL de estreptomycin (Lakeside), durante 45 minutos. Después se lavaron nuevamente 3 veces con SSI estéril.

#### 6.1.2. Larvas.

La liberación de larvas de los huevos, se llevó a cabo en base a procedimientos descritos previamente por (De Savigny, 1975;

Stevenson y Jacobs, 1977; Smith y cols. 1980), con algunas modificaciones.

Las hembras adultas grávidas se aislaron y a cada una se le extrajo el útero, mismo que se disecó, para liberar los huevos en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 mM y NaCl 130 mM, pH 7.2), con formol al 1%. Los huevos se ajustaron a una suspensión del 10% en agua destilada y se lavaron cinco veces por centrifugación a 2500 rpm, por 3 minutos. Se les agregó el mismo volumen de NaClO al 4% (hipoclorito de sodio comercial) y se agitaron durante 10, 20, 30, 40, 50 y 60 mins, en un agitador Andreas Hettich Se DGE 2116 a 3 Hz (180 periodos por minuto).

Para quitar el excedente de cloro, se lavaron cinco veces con solución salina balanceada de Hanks estéril (HBSS, microlab 247) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación (3 hz.) durante 15, 30, 45, 75, 90, 105 y 120 minutos en HBSS, esto se realizó para cada uno de los cinco tiempos diferentes de agitación con hipoclorito de sodio, para buscar el tiempo óptimo en el que se erosionara la cubierta de los huevos sin dañar a las larvas. Se lavaron 5 veces con HBSS para desechar restos de cubiertas y larvas muertas.

En un vaso de precipitados estéril de 80 mL que contenía HBSS estéril, adicionado con 100 UI/mL de penicilina sódica (Lakeside) y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomycin (Lakeside). Se colocaron 4 cubiertas estériles de papel seda (lents cat P1055, size 4" x 6", Qty. 50 sheets, Rev. 8/80. Distributed by: American Scientific Products). Sobre las cubiertas de papel se depositaron las larvas y se

incubaron en baño María a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, se revisó que todas las larvas vivas en el papel seda hubiesen pasado a través del filtro. Con cuidado de no mover el vaso de precipitados, se quitaron las tres cubiertas de papel seda y se pasaron a otro vaso con SSI.

Las larvas, se dejaron sedimentar, se decantó el sobrenadante, y el paquete de larvas se transfirió a un tubo cónico graduado estéril. Se tomó una muestra y se observó al microscopio para corroborar la limpieza del paquete larval, ya que si no estaban limpias se volvían a filtrar. Cuando se requirieron para preparar antígeno de excreciones-secreciones, se lavaron 3 veces en medio RPMI 1640 con L-glutamina (SIGMA Cell Culture Reagents), amortiguado a pH de 7.2 con carbonato ácido de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 23 mM y con N-2-hidroxi-etil-piperacine N-2-etano ácido sulfónico (HEPES) 25 mM, además se le adicionó 80 µg/mL de gentamicina. Si las larvas se destinaban para antígenos somáticos y de superficie, los 3 lavados se efectuaban con PBS pH 7.2 estéril.

## 6.2. Elaboración de Antígenos de Toxocara canis.

### 6.2.1. Antígenos Somáticos de Larvas de Segundo Estadio (Som L-2).

Se prepararon con paquetes de larvas obtenidas de acuerdo al inciso 6.1.2., éstas se depositaron en un homogeneizador estéril, y se agregó 4 mL de solución de sacarosa 0.25 M por gramo de larvas y se maceraron en baño helado hasta que se logró la mayor dilaceración posible. La suspensión se aspiró con una jeringa de cristal de 20 mL (Becton, Dickinson de México) y aguja hipodérmica tipo raqueta del No. 19 y de 75 mm. de longitud (Sanko Industrial), se depositaron lentamente en el fondo de un frasco de boca ancha con tapón esmerilado que contenía acetona fría ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), en proporción de 16 volúmenes por homogeneizado inicial. Se tapó y se agitó vigorosamente hasta que se homogeneizó perfectamente. Se dejó reposar durante 20 minutos en baño helado.

La acetona, se decantó y se repitió el mismo procedimiento, sólo que en esta ocasión el reposo se mantuvo durante 1 hora.

Nuevamente, se decantó la acetona y el sedimento se transfirió a tubos de centrifuga de 50 mL con acetona fría, se homogeneizó y se centrifugó a 3000 rpm. durante 15 minutos.

Se decantó el sobrenadante y se liofilizó el sedimento. Este liofilizado se resuspendió en PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 mM y  $\text{NaCl}$  130 mM, pH 7.2), en proporción de 0.8 mL por volumen de homogeneizado inicial. Se agitó durante 16 horas a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ .

Se centrifugó a 15 000 rpm. durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se

colectó el sobrenadante, se dializó durante 48 horas, se agregó 1 mM de etilendiamina ácido tetracético (EDTA), y se almacenó en alícuotas de 0.5 mL a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 6.2.2. Antígenos Somáticos de Adultos (Som A).

Se prepararon con parásitos adultos que se obtuvieron de acuerdo al inciso 6.1.1. el procedimiento fué similar al anteriormente descrito para el antígeno Som L-2., sólo que en este caso el liofilizado se resuspendió en PBS (pH 7.2), en proporción de 0.4 mL por volumen de homogeneizado inicial. Y se almacenó en alícuotas de 1 mL.

#### 6.2.3. Antígenos de Superficie de Larvas de Segundo Estadio (Sup L-2).

Se prepararon con larvas vivas (ver inciso 6.1.2). Las larvas se colocaron en un tubo cónico graduado de 15 mL (PYREX), y por cada volumen de larvas se agregaron 4 volúmenes de solución 10 mM Tris, 0.5% de desoxicolato de sodio. (Tris-Doc). Se incubaron a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, con agitación ocasional. Se centrifugaron a 5000 rpm. durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se cosechó el sobrenadante, cuidadosamente para no resuspender las larvas, se agregó EDTA 1 mM y se almacenó en alícuotas de 0.5 mL a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.2.4. Antígenos de Superficie de Adultos (Som A).

Se prepararon con adultos completos y vivos (ver inciso 6.1.1). Se colocaron en un vaso de precipitados de 500 mL (PYREX), por cada volumen de adultos se agregaron 2 volúmenes de la solución 10

mM Tris, 0.5% de desoxicolato de sodio (Tris-Doc). Se incubaron a 0°C durante 30 minutos, con agitación ocasional. Se decantó la solución y se centrifugó a 5000 rpm. durante 5 minutos a 4°C. Se colectó el sobrenadante, se agregó 1 mM de EDTA, y se almacenó en alícuotas de 1 mL a -20°C.

#### 6.2.5. Antígenos de Excreciones y Secreciones de Larvas de Segundo Estadio (ES L-2).

Las larvas vivas para estos antígenos se prepararon como se indicó en el inciso 6.1.2. En tubos de 20 mL (PYREX) con tapón de rosca estériles, se colocaron aproximadamente 10<sup>5</sup> larvas en 10 mL de medio RPMI 1640 con L-glutamina (SIGMA Cell Culture Reagents), amortiguado a pH de 7.2 con carbonato ácido de sodio (23 mM) y con HEPES (25 mM) además se suplementó con 80 µg/mL de gentamicina. Se incubaron a 37 °C, y se observaron semanalmente; los tubos contaminados o con más de 5% de mortalidad se desecharon. Cada 7 días se cambió el medio y el pull de medios colectados se centrifugó a 5,000 rpm. durante 5 minutos y se filtró con una membrana de nitrocelulosa (Millipore Corporation. Tipo GS, abertura de poro 0.22 µm).

El antígeno se preparó mediante concentración y dialisis por ultrafiltración con una membrana de amicon PM 10,000, se concentró aproximadamente 30 veces de su volumen inicial, se agregó 1 mM de EDTA, y se almacenó en alícuotas de 0.5 mL a -20°C.

#### 6.2.6. Antígenos de Excreciones-Secretiones de Adultos (ES A).

Se prepararon con parásitos adultos que se obtuvieron como se

menciona en el inciso 6.1.1. y el procedimiento fué similar al ya descrito para el antígeno ES L-2, con la diferencia de que en este caso se agregaron dos volúmenes de RPMI 1640 por cada volumen de parásitos empleado y los adultos sólo se mantuvieron en el medio de cultivo por 3 días.

Después de que se elaboraron los seis antígenos se estimó el contenido total de proteínas de cada uno de ellos con el método de Lowry y cols. (1951).

### 6.3. Obtención de las Muestras de Suero.

Para efectuar las pruebas serológicas de hemaglutinación indirecta (HAI) e inmunoensayo enzimático (ELISA) a cada persona se le extrajo, mediante punción venosa, un volumen de 3 a 5 mL de sangre periférica. El suero aislado de estas muestras se dividió en dos partes iguales (una para cada prueba), se le adicionó timerosal (1:10,000) y se almacenó en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.3.1. Muestras de Suero de Pacientes Parasitados.

Las muestras de suero de las personas parasitadas se obtuvieron de diversas instituciones; Hospital Oftalmológico de Nuestra Señora de la Luz, Asociación para Evitar la Ceguera en México, Hospital Infantil de México, Hospital General e Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

Para integrar el grupo de sueros de pacientes infectados con Toxocara canis, se tomó en cuenta que tuvieran un cuadro clínico típico de larva migratoria visceral (LMV) u ocular (LMO), con leucocitosis y eosinofilia. Los cinco pacientes con LMV presentaron serología positiva a T. canis con la técnica de hemaglutinación indirecta (título de anticuerpos igual o mayor a 1:32) y en uno de los casos se encontró una larva en biopsia hepática.

En el grupo de nemátodos se incluyeron a suero de individuos parasitados con; Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura, Trichinella spiralis y Necator americanus.

El grupo de platelmintos comprendió a sueros de pacientes con Fasciola hepatica, Hymenolepis nana, cisticerco y quiste

hidatídico.

El grupo de protozoos sólo quedó integrado por sueros de personas infectadas con Toxoplasma gondii, debido a su importancia como agente etiológico de algunas patologías oculares. En estos pacientes la presencia de anticuerpos anti-Toxoplasma se detectó por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

El grupo mixto fue constituido por personas multiparasitadas.

#### 6.3.2. Muestras de Suero del Grupo Control Normal.

El grupo control normal se integró por 15 individuos aparentemente sanos, sin eosinofilia, con tres exámenes coproparasitoscópicos (CPS) negativos y títulos negativos de anticuerpos en la prueba de hemaglutinación indirecta (HAI) con antígenos de Toxocara canis, Ascaris lumbricoides, Trichinella spiralis, Fasciola hepatica y cisticerco. Este grupo se seleccionó de una población de 125 niños alumnos de la Escuela Primaria Martín Guzmán y 25 estudiantes de la Universidad Autónoma Metropolitana.

En estas dos poblaciones también se buscaron personas con CPS positivo a helmintos intestinales para incluir sus muestras de suero en este estudio.

Los exámenes coproparasitoscópicos se realizaron de acuerdo al método de Faust (Salazar y de Haro, 1980).

#### 6.4. Técnica de Inmunoensayo Enzimático (ELISA).

##### 6.4.1. Procedimiento.

En la prueba de ELISA (Engvall y Perlmann, 1972) se emplearon placas de poliestireno para microtitulación con 96 pozos, de fondo en U (Immulon Cooke Microtiter, Alexandria, VA, USA), conforme a lo reportado por Voller y cols. (1979) y por Bowman y cols. (1987), con algunas modificaciones.

La concentración de proteínas de cada antígeno fue diferente y se determinó mediante diluciones con amortiguador de carbonatos (CBC,  $\text{NaHCO}_3$  45 mM;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  18 mM, pH 9.6), de acuerdo al método de Voller y cols. (1979), en forma de tablero de ajedrez.

Cada pozo se sensibilizó con 50  $\mu\text{l}$  del antígeno correspondiente y se incubó durante toda la noche a 4°C.

Las placas se lavaron tres veces durante 1 minuto y se dejaron en reposo durante 5 minutos con PBS (pH 7.2)-TWEEN 20 al 0.05%.

Para bloquear las placas a cada pozo se agregó 150  $\mu\text{l}$  de albúmina sérica bovina (ABS, Sigma Chemical Company) al 1% diluida con amortiguador de carbonatos y con incubación de una hora a 37°C.

Se lavó tres veces durante 1 minuto y se incubó durante 5 minutos con PBS (pH 7.2)-TWEEN 20 al 0.05%.

Se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de suero diluido 1:500 en PBS-TWEEN 20 al 0.05% y se incubó 30 minutos a 37°C.

El control positivo consistió en una mezcla de sueros de pacientes con toxocariasis.

El control negativo se hizo a base de una mezcla de sueros de

pacientes aparentemente sanos.

Como control de referencia, el Dr. Peter M. Schantz del CDC de Atlanta Georgia, EUA, evaluó muestras de sueros de pacientes con sospecha clínica de toxocariasis y de individuos aparentemente sanos, lo que confirmó la positividad o negatividad de los controles empleados en la prueba de ELISA.

Después de la incubación con suero, los pozos se lavaron tres veces durante 1 minuto y con 5 minutos en reposo con PBS-TWEEN 20 al 0.05%.

En cada pozo se depositaron 50  $\mu$ l de antigamaglobulina humana conjugada con peroxidasa (Anti-humana IgG,  $\gamma$ -chain specific, peroxidase conjugate, Sigma Chemical Company 1 mL 6 peroxidase units per mL), diluida 1:900 y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Las placas se lavaron tres veces durante 1 minuto y se dejaron en reposo durante 5 minutos con PBS (pH 7.2)-TWEEN 20 al 0.05%.

Se agregó a cada pozo 150  $\mu$ l del sustrato ortofenilendiamina (OPD, Sigma Chemical Company) disuelto a una concentración de 0.04 % en amortiguador de citratos (PCB, Acido cítrico 24 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 51 mM, pH 5.0) adicionado con 0.012% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se incubó en obscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos.

La reacción se detuvo con 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 M.

La placa se leyó en un lector de ELISA (Dynatech 300, USA).

Los resultados se reportaron como cocientes de densidad óptica (CDO) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$CDO = \frac{DOP}{DON}$$

Donde DOP es la densidad óptica a 492 nm. del problema y DON es la media más dos desviaciones estándar de las densidades ópticas obtenidas con el suero normal utilizado como control de acuerdo a la técnica de Gómez-Priego y cols. (1991).

#### 6.4.2. Criterio de Positividad en la prueba de ELISA.

El criterio de positividad (valor de corte) para cada antígeno se determinó con la suma de la media más tres desviaciones estándar de los CDO de los sueros de grupo control obtenidos con la prueba de ELISA.

#### 6.4.3. Análisis estadístico:

Para observar la significancia de las diferencias de las medias de los CDO obtenidas con cada grupo de sueros, se recurrió al método gráfico de Dice y Leraas (1936). Para determinar la significancia estadística de las medias antes mencionadas, se empleó la prueba de  $t$  de Student.

#### 6.4.4. Evaluación serológica.

Se realizó de acuerdo a lo publicado por Glickman y cols. (1974), Morrow (1981), y por Méndez y cols. (1984).

Los parámetros serológicos (figura 2) se determinaron de la siguiente forma:

##### Sensibilidad.

Es la capacidad de una prueba para detectar a los verdaderamente enfermos (proporción de verdaderos positivos). Se

obtiene al dividir el número de verdaderos positivos entre el número total de casos que tienen la parasitosis.

#### Especificidad.

Es la capacidad de una prueba para detectar a los verdaderamente sanos (proporción de verdaderos negativos). Obtenida al dividir el número de casos verdaderos negativos, entre el total de casos que no tienen la parasitosis.

#### Valor de predicción para un resultado positivo.

Es la probabilidad de que un resultado positivo en la prueba de ELISA indique una verdadera infección. Este valor se estimó dividiendo el número de verdaderos positivos entre el número total de casos seropositivos.

#### Valor de predicción para un resultado negativo.

Es la probabilidad de que un resultado negativo en la prueba de ELISA indique verdaderamente ausencia de la parasitosis. Este resultado se estimó dividiendo el número de verdaderos negativos entre el número total de casos seronegativos.

#### Reactividad cruzada.

Proporción de sueros de individuos infectados con uno o varios parásitos diferentes a Toxocara canis que fueron positivos a la prueba.

FIGURA 2.

PRUEBA DE ELISA.

T O X O C A R I A S I S		(+)	(-)	Totales
	(+)	a	b	a + b
(-)	c	d	c + d	
Totales	a + c	b + d	a + b + c + d	

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + b} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{c + d} \times 100$$

$$\text{Valor de predicción positivo} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Valor de predicción negativo} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

$$\text{Falsas negativas} = \frac{b}{a + b} \times 100$$

$$\text{Falsas positivas} = \frac{c}{c + d} \times 100$$

$$\text{Eficiencia} = \frac{a + d}{a + b + c + d} \times 100$$

a = Verdaderos positivos

b = Falsos negativos

c = Falsos positivos

d = Verdaderos negativos

a + b = Infectados

c + d = No infectados

a + c = Seropositivos

b + d = Seronegativos

## 7. RESULTADOS.

### 7.1. Liberación de larvas de Toxocara canis.

Para obtener los antígenos larvarios somático, de superficie y de excreciones y secreciones, fue necesario estandarizar una técnica de eclosión para huevos larvados y los resultados fueron los siguientes:

Las figuras 3 a, 3 b, 4 a, 4 b, 5 a y 5 b, muestran los diferentes tiempos (10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos) de agitación con hipoclorito de sodio (NaClO) al 4 %. En cada experimento se compararon los tiempos (15, 30, 45, 75, 90, 105 y 120 minutos) de agitación en solución salina balanceada de Hanks (HBSS), con el objeto de buscar el tiempo óptimo de incubación tanto en hipoclorito de sodio como en HBSS para erosionar la cubierta de los huevos de T. canis y liberar a las larvas sin dañarlas. El tiempo cero (0) en cada gráfica, corresponde al momento final de los lavados, posteriores a la incubación en hipoclorito de sodio; durante este proceso de lavado, se libera una cantidad importante de larvas, como se aprecia en las diferentes gráficas.

En la figura 3 a, con 10 minutos de agitación en hipoclorito de sodio y durante 15, 30, 45, 60, 90, 105 y 120 minutos en HBSS, se observa que el tiempo en hipoclorito de sodio fue insuficiente, ya que hay una gran cantidad de huevos larvados (HL) desde el tiempo cero (0), hasta los 120 minutos de incubación en HBSS, en donde se nota un aumento de larvas inmóviles (LI), debido al proceso de agitación.

En la figura 3 b, con 20 minutos de agitación en hipoclorito

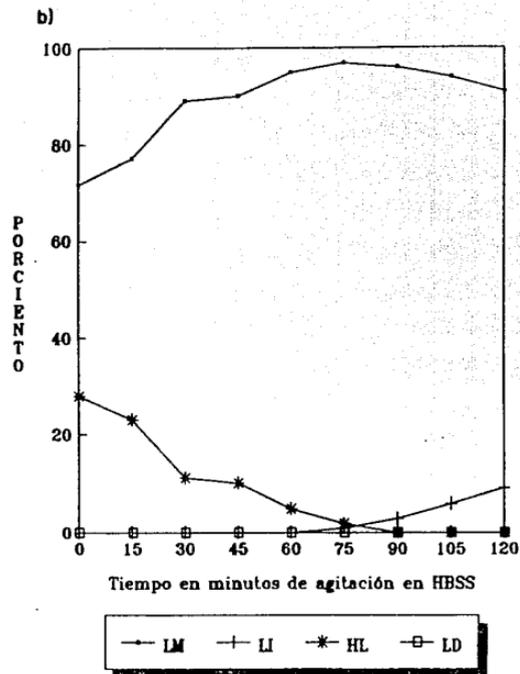
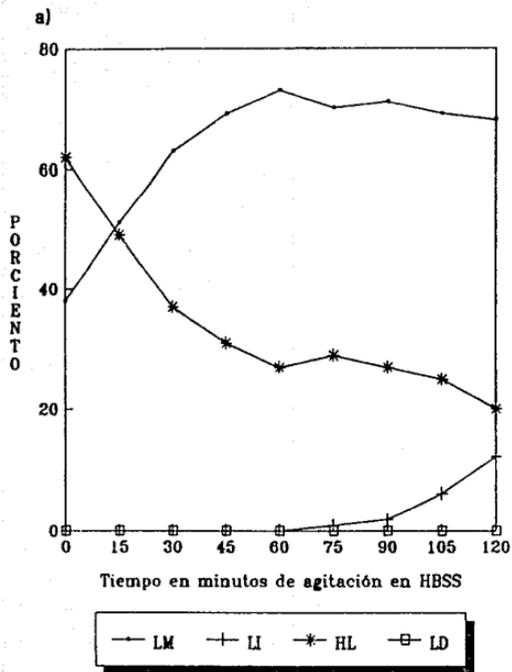


FIGURA 3.

Porcentajes obtenidos de larvas móviles (LM), larvas inmóviles (LI), huevos larvados (HL) y larvas desintegradas (LD) en muestras de Toxocara canis con agitación en hipoclorito de sodio durante 10 mins. (Fig. 3 a) y 20 mins. (Fig. 3 b) con agitación posterior en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) a diferentes intervalos de tiempo.

de sodio y durante 15, 30, 45, 60, 90, 105 y 120 minutos en HBSS, se observa un porcentaje de larvas vivas o móviles (LM), casi desde el inicio de incubación en HBSS, aunque el porcentaje más alto se presentó de los 30 a 75 minutos. También se aprecia que durante este tiempo casi no hay huevos larvados, pero sí una mínima presencia de larvas inmóviles.

En la figura 4 a, con agitación de 30 minutos en hipoclorito de sodio y durante 15, 30, 45, 60, 90, 105 y 120 minutos en HBSS, con media hora en hipoclorito de sodio aumenta más la cantidad de larvas móviles en relación a la obtenida con 20 mins. de agitación. Así mismo, disminuye aún más la presencia de huevos larvados y también de larvas inmóviles, esta tendencia se observó a partir de los 30 minutos de incubación en HBSS.

En la figura 4 b, con agitación de 40 minutos en hipoclorito de sodio y durante 15, 30, 45, 60, 90, 105 y 120 minutos en HBSS. Hay larvas móviles, pero desde el principio se ven larvas inmóviles, y se empieza a notar larvas desintegradas (LD).

En la figuras 5 a y 5 b, con 50 y 60 minutos de agitación (respectivamente) en hipoclorito de sodio y durante 15, 30, 45, 60, 90, 105 y 120 minutos en HBSS, en ambas gráficas se nota como baja el porcentaje de larvas móviles y el de larvas inmóviles se incrementa. Además se acentuó el fenómeno de destrucción de larvas, ya que tanto en la solución de hipoclorito de sodio como en HBSS había partículas de materia orgánica en suspensión por las larvas desintegradas que alcanzan una proporción hasta del 71%, lo que influyó para que las gráficas mostraran una imagen irregular.

Se observó que el tiempo más adecuado para la agitación en

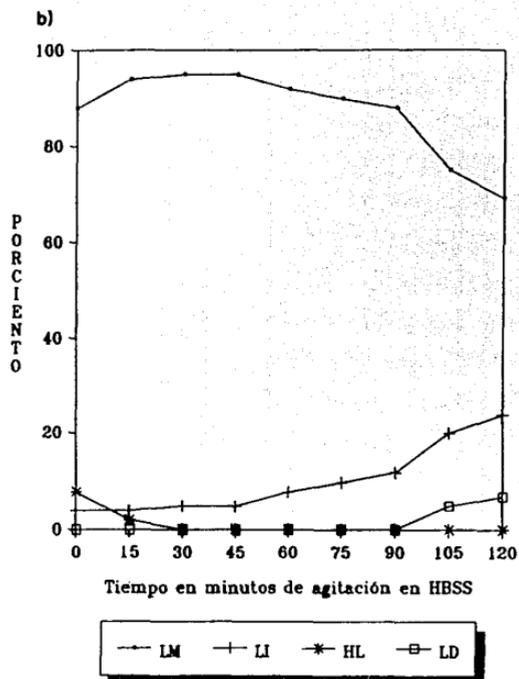
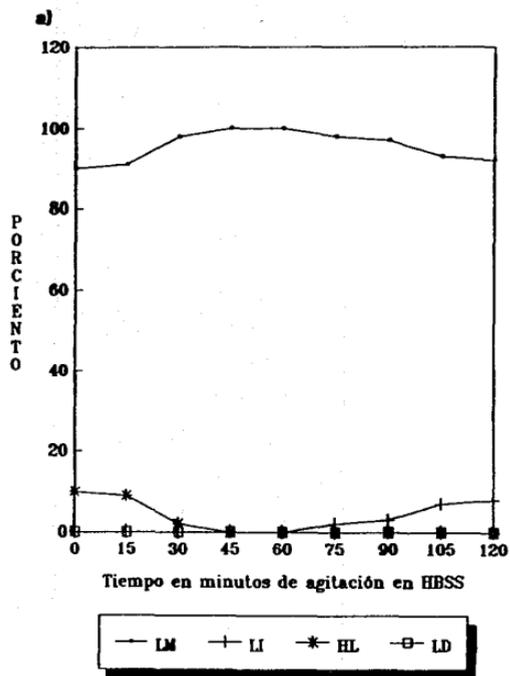


FIGURA 4.

Valores en por ciento obtenidos de larvas móviles (LM), larvas inmóviles (LI), huevos larvados (HL) y larvas desintegradas (LD) en muestras de huevos de *Toxocara canis* con agitación en hipoclorito de sodio durante 30 mins. (Fig. 4 a) y 40 mins. (Fig. 4 b) con agitación posterior en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) a diferentes intervalos de tiempo.

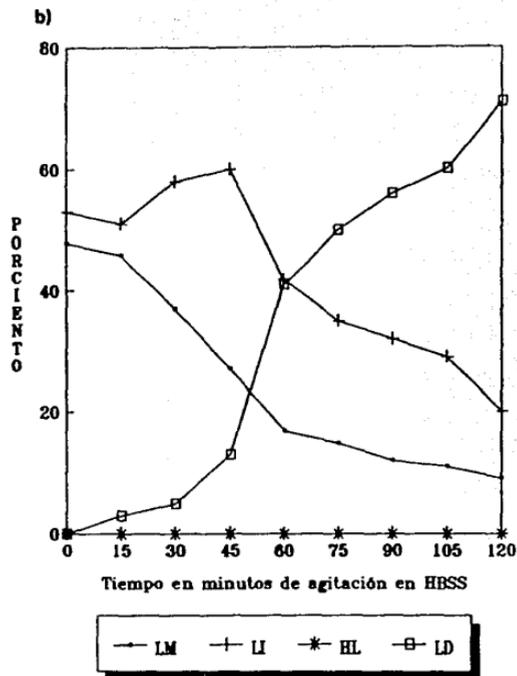
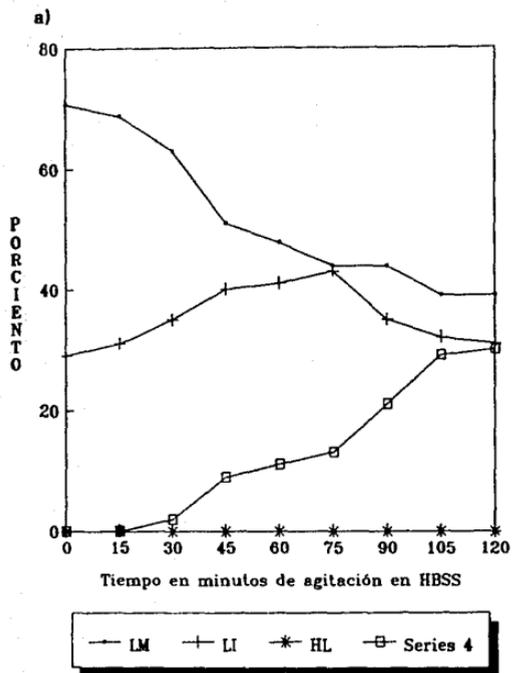


FIGURA 5.

Porcentajes obtenidos de larvas móviles (LM), larvas inmóviles (LI), huevos larvados (HL) y larvas desintegradas (LD) en muestras de huevos de Toxocara canis con agitación en hipoclorito de sodio durante 50 mins. (Fig. 5 a) y 60 mins. (Fig. 5 b) con agitación posterior en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) a diferentes de tiempos.

hipoclorito de sodio fue de a 30 minutos y para la incubación en HBSS de 45 a 60 minutos, en base a esto se decidió agitar los huevos larvados durante 30 minutos con hipoclorito de sodio y 60 minutos con HBSS.

## 7.2. Elaboración de antígenos.

En total se elaboraron seis antígenos que fueron los siguientes: antígeno somático de larvas (Som L), de excreciones y secreciones de larvas (ES L), de superficie de larvas (Sup L), somático de adultos (Som A), de excreciones y secreciones de adultos (ES A) y el de superficie de adultos (Sup A).

Al terminar la elaboración de cada antígeno, se procedió a cuantificar la concentración de proteínas (Lowry, 1951).

Para obtener el antígeno somático de adultos el método fue laborioso pero no hubo grandes complicaciones ya que se empleó el parásito adulto completo, además de que en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Medicina. UNAM se tiene experiencia en la elaboración de este tipo de antígenos. El antígeno somático de adultos tuvo una concentración total de proteínas de 5,700  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

El antígeno somático de larvas se elaboró con el mismo método que el antígeno de adultos. Este antígeno fue posible realizarlo hasta que se estandarizó la técnica de eclosión de huevos larvados y se pudo reunir una cantidad suficiente de huevos larvados como para lograr un paquete de 1 mL de larvas vivas, del que se obtuvo 3.2 mL de antígeno con una concentración de proteínas de 330  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

El antígeno de superficie de adultos es relativamente sencillo

por la disponibilidad del material biológico (la concentración de proteínas fue de 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), en cambio el antígeno de superficie de larvas fue difícil ya que de 1 mL de larvas se obtienen 3 mL de antígeno con una concentración de 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Por lo que se refiere al antígeno de excreciones y secreciones de adultos, se contó con la ventaja de que se obtuvo en buena cantidad, lo que no sucedió con el antígeno de excreciones y secreciones de larvas, sin embargo, lo que equilibró hasta cierto punto la situación, fue que algunos de los cultivo larvarios mantuvieron su viabilidad hasta por 5 meses a diferencia de los adultos que a los 5 días comenzaban a morir. La concentración de proteínas para el antígeno de excreciones y secreciones de adulto fue de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y para el de larvas de 87.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Para el cultivo in vitro de los parásitos fue importante extremar las condiciones de esterilidad para evitar el riesgo habitual de contaminación bacteriana y fúngica que se tiene al manejar medios de cultivo.

### 7.3. Optimización de la prueba de ELISA.

Se titularon los antígenos, mediante diluciones conforme al método de Voller y cols. (1979), en forma de tablero de ajedrez para determinar la concentración de proteínas óptima de trabajo para cada antígeno (cuadro I).

Se realizaron diversos experimentos para determinar las concentraciones y los tiempos de incubación óptimos de los seis antígenos; de la albúmina sérica bovina; del sustrato; de la dilución de los sueros y del conjugado. Todos estos datos se

concentraron en el cuadro I para su mejor comprensión.

Después de que se estandarizó la técnica de ELISA se probaron, con cada uno de los antígenos, seis grupos de sueros que se integraron y clasificaron de la siguiente forma: grupo A) individuos aparentemente sanos al que se le denominó control sano (N = 20); grupo B) pacientes infectados con Toxocara canis con diagnóstico clínico de larva migratoria visceral y ocular (N = 14); grupo C) pacientes con sospecha clínica de toxocariasis (N = 19); grupo D) con infecciones intestinales o tisulares causada por otros nemátodos (N = 23); grupo E) con platelmintos tisulares o intestinales (N = 11) y grupo F) al que se le llamó protozoos pero sólo estuvo integrado con sueros de individuos parasitados con Toxoplasma gondii (N = 10).

El criterio de positividad para los seis antígenos (figuras 6 a, 6 b, 7 a, 7 b, 8 a y 8 b) fue a partir del valor de la media más tres desviaciones estandar (Kurstak, 1985) de los coeficientes de densidad óptica (CDO) del grupo control. Los valores de corte en CDO para los antígenos fueron:

Antígeno	Valor de corte
Superficie de adultos	2.140
Superficie de larvas	4.440
Somático de adultos	2.217
Somático de larvas	2.061
Excreciones y secreciones de adultos	1.113
Excreciones y secreciones de larvas	2.717

CUADRO I

DESARROLLO DE LA TECNICA DE ELISA PARA LOS ANTIGENOS DE *Toxocara canis*

Parámetros técnicos	Compuesto	Concentración	Amortiguador	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación
S	A Som L	1.0 µg/ml	Carbonato-bicarbonato: 60 mM, pH 9.8	Toda la noche (18 hrs.)	4°C
	A Sup L	3.0 µg/ml			
E	A ES L	1.5 µg/ml	"	"	"
	A Som A	1.0 µg/ml			
C	A Sup A	8.0 µg/ml	"	"	"
	A ES A	8.0 µg/ml			
E	Bloqueador	ABS	"	1 hs.	37°C
N	Anticuerpo	Suero	Salina de fosfatos 150 mM, pH 7.2, Tween-20, 0.051	30 min	37°C
C	Conjugado	Bn cabre antigama- globulina humana	1:900	"	30 min 37°C
I	Substrato	Ortofenilendiamina	0.4 µg/ml	Citrato-Fosfato 76 mM, pH 5.0	20 min obscuridad Ambiente (18-24°C)
A	Interruptor	Acido sulfúrico	2.5 M	-	- Ambiente (18-24°C)

A Som L = Antígeno somático de larvas  
A Sup L = Antígeno de superficie de larvas  
A ES L = Antígeno de excreciones secreciones de larvas  
A Som A = Antígeno somático de adultos  
A Sup A = Antígeno de superficie de adultos  
A ES A = Antígeno de excreciones secreciones de adultos

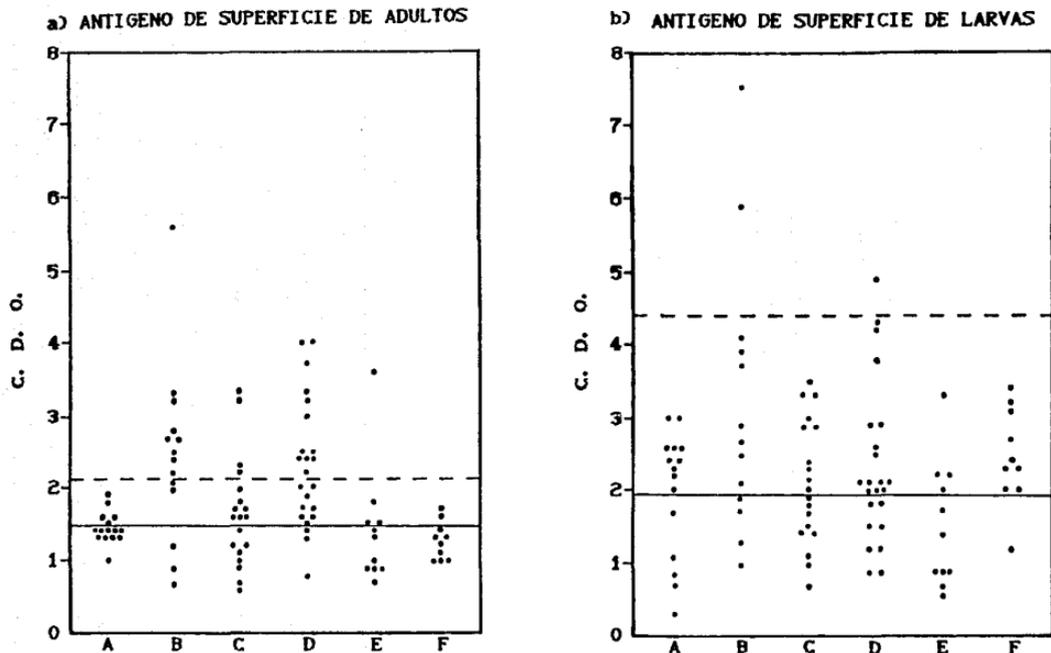


FIGURA 6.

Distribución de los cocientes de densidad óptica (CDO) obtenidos en ELISA con antígenos de superficie de parásitos adultos (Fig. 6 a) y de larvas (Fig. 6 b) de *Toxocara canis*, con sueros de individuos: A) normales, B) con diagnóstico de LHV y LMO, C) con sospecha clínica de toxocariasis, D) con infecciones intestinales o tisulares causadas por otros nemátodos, E) con platelmintos tisulares o intestinales y F) con protozoos (*Toxoplasma gondii*). La línea continua representa el valor de la media de sueros de individuos normales y la línea punteada corresponde al valor de la media más tres veces la desviación estandard.

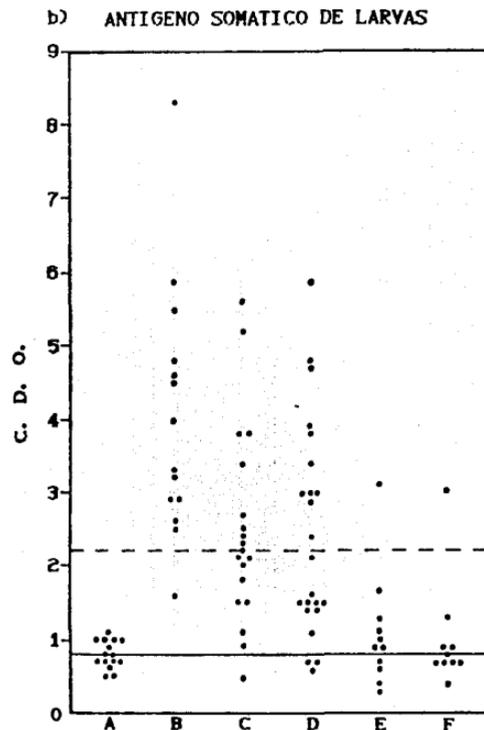
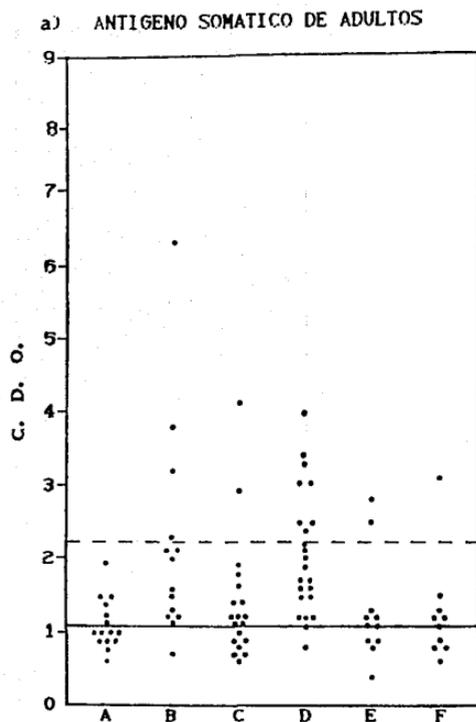


FIGURA 7.

Cocientes de densidad óptica (CDO) obtenidos en ELISA con antígenos somáticos de parásitos adultos (Fig. 7 a) y de larvas (Fig. 7 b) de *Toxocara canis* con sueros de individuos: A) normales, B) con diagnóstico de LMV y LMO, C) con sospecha clínica de toxocaríasis, D) con infecciones intestinales o tisulares ocasionadas por otros nemátodos, E) con platelmintos tisulares o intestinales y F) con protozoos (*Toxoplasma gondii*). La línea continua representa el valor de la media de sueros de individuos normales y la línea punteada indica el valor de la media más tres veces la desviación estandar.

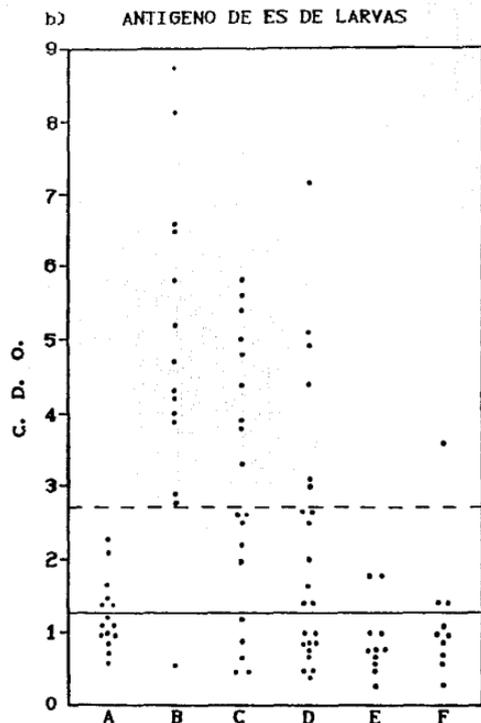
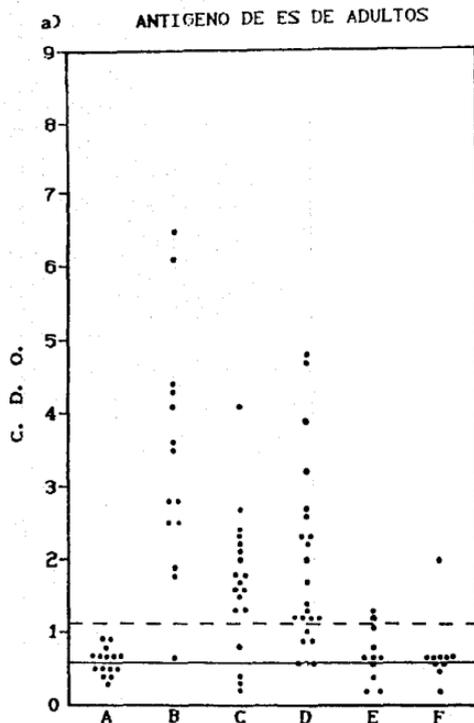


FIGURA 8.

Distribución de los cocientes de densidad óptica (CDO) obtenidos en ELISA con antígenos de excreciones y secreciones (ES) de gusanos adultos (Fig. 8 a) y de larvas (Fig. 8 b) de *Toxocara canis* con sueros de individuos: A) normales, B) con diagnóstico de de LMV y LMO, C) con sospecha clínica de toxocariasis, D) con infecciones intestinales o tisulares causadas por otros nemátodos, E) con platelmintos tisulares o intestinales y F) con protozoos (*Toxoplasma gondii*). La línea continua indica el valor de la media de sueros de individuos normales y la línea punteada corresponde al valor de la media más tres veces la desviación estandar.

La respuesta serológica medida en coeficientes de densidad óptica muestra una dispersión amplia (figuras 6 a, 6 b, 7 a, 7 b, 8 a y 8 b) en todos los grupos. Casi con todos los antígenos el grupo control sano mostró menor grado de dispersión y por consecuencia el coeficiente de variación fue inferior al de los demás grupos de sueros (tabla I).

Las figuras 6 a, 6 b, 7 a, 7 b, 8 a y 8 b permiten apreciar la positividad serológica presente en cada grupo de sueros, la que se resumió en la tabla II en donde los valores, de positividad más altos fueron para el grupo de pacientes infectados con Toxocara canis y con los antígenos de excreciones y secreciones de larvas y adultos. En los seis antígenos se observaron valores de positividad inferiores, en primer término para el grupo de protozoos (integrado por pacientes parasitados con Toxoplasma gondii), seguido por el grupo de platelmintos (en el que se incluyeron pacientes con cisticercosis).

Una vez que se cuantificaron los sueros positivos y negativos de los 36 grupos, se aplicaron las fórmulas de la figura 2 incluida en la parte de método y se determinaron los parámetros serológicos de sensibilidad, especificidad, valor de predicción positivo, negativo y eficiencia en la prueba de ELISA cuyos resultados se muestran en las tablas III y IV.

Los datos estadísticos fundamentales como son media, media  $\pm$  dos veces el error estandar y los valores máximos y mínimos, de los grupos control sano, infectados con T. canis, sospecha clínica de toxocariasis, nemátodos, platelmintos y protozoos, registrados para cada uno de los antígenos en el ensayo, se presentaron en forma

TABLA I

COEFICIENTE DE VARIACION EN LA PRUEBA DE ELISA CON SEIS ANTIGENOS DE <i>Toxocara canis</i> .							
GRUPO	N	AG SUP L	AG SUP A	AG BS L	AG BS A	AG SOM L	AG SOM A
C. SANO	15	42.08	15.88	36.54	26.81	63.93	25.94
TC. INP.	14	54.31	49.37	42.52	44.85	63.54	73.87
TC. SOSP.	19	38.47	43.02	57.77	52.30	38.66	58.96
NEMAT.	23	45.18	36.78	80.56	62.62	56.15	38.92
PROTOZ.	10	52.53	53.72	50.90	48.70	67.10	53.62
PLATBLM.	11	25.60	18.26	73.25	59.65	69.14	53.12

TABLA II

POSITIVIDAD SEROLOGICA EN LA PRUEBA DE ELISA CON SEIS ANTIGENOS DE <i>Toxocara canis</i> .							
GRUPO	N	AG SUP L	AG SUP A	AG BS L	AG BS A	AG SOM L	AG SOM A
		+ %	+ %	+ %	+ %	+ %	+ %
C. SANO	15	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TC. INP.	14	2 (14.29)	9 (64.29)	13 (92.86)	13 (92.86)	13 (92.86)	4 (28.57)
TC. SOSP.	19	0 (0)	4 (21.05)	9 (47.37)	15 (78.95)	10 (52.63)	2 (10.53)
NEMAT.	23	1 (4.35)	12 (52.17)	6 (26.09)	17 (73.91)	11 (47.83)	8 (34.78)
PROTOZ.	10	0 (0)	0 (0)	1 (10.00)	1 (10.00)	1 (10.00)	1 (10.00)
PLATBLM.	11	0 (0)	1 (9.09)	0 (0)	2 (18.18)	1 (9.09)	2 (18.18)

TABLA III

EVALUACION SEROLOGICA DE LA PRUEBA DE ELISA  
 CON ANTIGENO DE LARVAS DE Toxocara canis

PARAMETRO	AG SUP L-2 %	AG ES L-2 %	AG SOM L-2 %
SENSIBILIDAD	14.29	92.86	92.86
ESPECIFICIDAD	100.00	100.00	100.00
VALOR DE PREDICION (+)	100.00	100.00	100.00
VALOR DE PREDICION (-)	55.56	93.75	93.75
EFICIENCIA	58.62	96.55	96.55

TABLA IV

EVALUACION SEROLOGICA DE LA PRUEBA DE ELISA  
 CON ANTIGENO DE ADULTOS DE Toxocara canis

PARAMETRO	AG SUP A %	AG ES A %	AG SOM A %
SENSIBILIDAD	64.29	92.86	28.57
ESPECIFICIDAD	100.00	100.00	100.00
VALOR DE PREDICION (+)	100.00	100.00	100.00
VALOR DE PREDICION (-)	75.00	93.75	60.00
EFICIENCIA	82.76	96.55	65.52

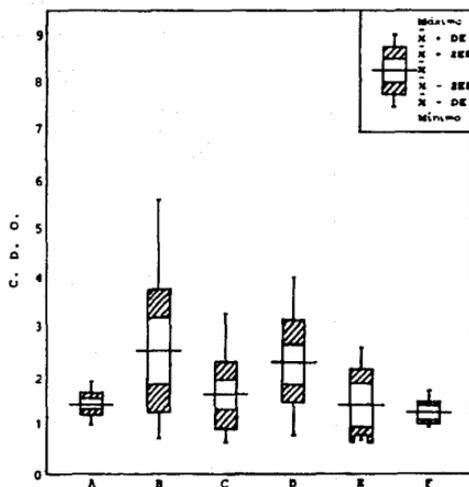
gráfica de acuerdo al método de Dice y Leraas (1936), lo que se observa en las figuras 9 a, 9 b, 10 a, 10 b, 11 a y 11 b. También se empleó la prueba estadística de t de Student para evaluar la significancia estadística, sólo que con el método gráfico de Dice y Leraas el análisis estadístico es más fácil de entender.

#### 7.4. Antígenos de Superficie de Adultos y Larvas.

En la figura 9 a, para el antígeno superficie de adultos, se aprecia que las áreas blancas ( $\bar{X} \pm 2 \text{ EE}$ ) de los grupos control, platelmintos, protozoos y el de sospecha clínica de toxocariasis, se traslapan, por lo tanto, entre las medias de los CDO de estos grupos no hay diferencia estadística significativa. En los grupos de infectados con Toxocara canis y nemátodos no presentan diferencia significativa entre sí, lo que indica la presencia de reacción cruzada entre estos grupos.

Con el antígeno de superficie de larvas (figura 9 b), las medias de los CDO fueron para el grupo control sano de 1.95, para el de platelmintos 1.53, para nemátodos 2.34, para protozoos 2.45 y para el grupo de infectado con T. canis 3.12. A pesar de que el valor de la media de el grupo infectado con T. canis es superior al del grupo control sano las áreas blancas que corresponden a la media  $\pm$  dos veces el error estándar ( $\bar{X} \pm 2 \text{ EE}$ ) de dichos grupos se traslapan un poco. En este caso al realizar la prueba t de Student se determinó que la diferencia entre las medias era estadísticamente significativa, es decir que la media del grupo infectado con T. canis fue mayor ( $p < 0.005$ ) a la del grupo control sano.

a) ANTIGENO DE SUPERFICIE DE ADULTOS



b) ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LARVAS

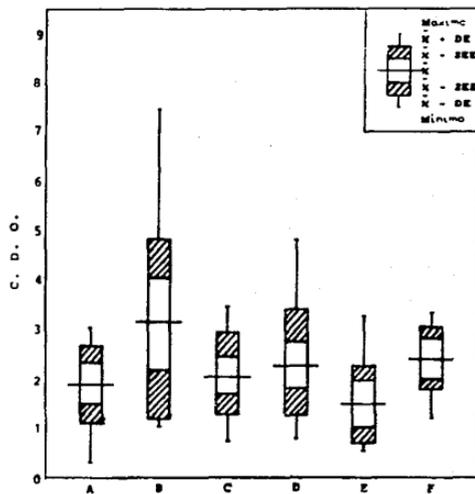


FIGURA 9.

Comparación en base al método de Dice y Leeras de los cocientes de densidad óptica (CDO) obtenidos en ELISA con antígenos de superficie de parásitos adultos (Fig. 9 a) y de larvas (Fig. 9 b) de Toxocara canis con sueros de individuos: A) normales, B) con diagnóstico de larva migratoria, C) con sospecha clínica de toxocariasis, D) con infecciones intestinales o tisulares ocasionadas por otros nemátodos, E) con platelmintos tisulares o intestinales y F) con protozoos (Toxoplasma gondii). Cuando las áreas blancas se traslapan las diferencias son significativas.

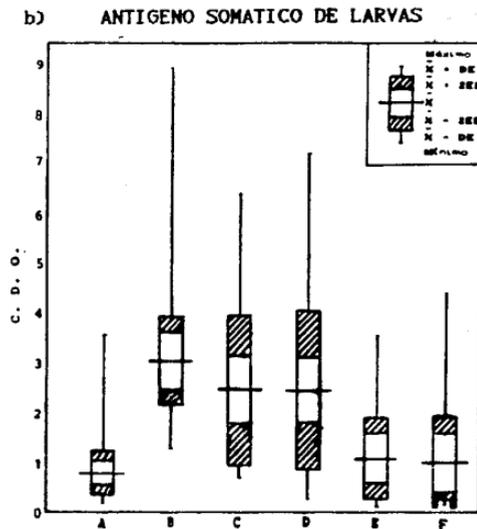
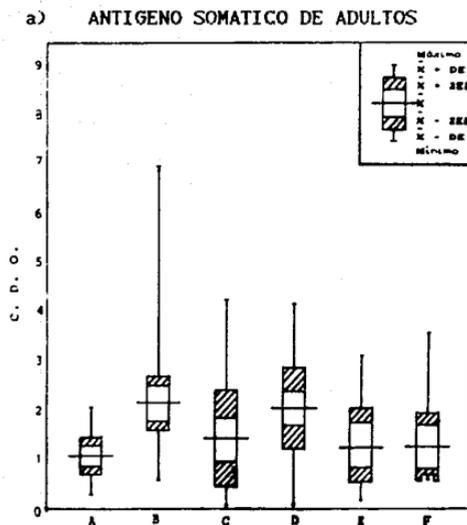


FIGURA 10.

Apreciación visual (Según el método de Dice y Leeras, 1936) de las diferencias de los cocientes de densidad óptica (CDO) obtenidos en ELISA, con antígenos somático de parásitos adultos (Fig. 10 a) y de larvas (Fig. 10 b) de *Toxocara canis* con sueros de individuos: A) normales, B) con diagnóstico de larva migratoria, C) con sospecha clínica de toxocariasis, D) con infecciones intestinales o tisulares causadas por otros nemátodos, E) con platelmintos tisulares o intestinales y F) con protozoos (*Toxoplasma gondii*). Cuando las áreas blancas se entrecruzan las diferencias son significativas.

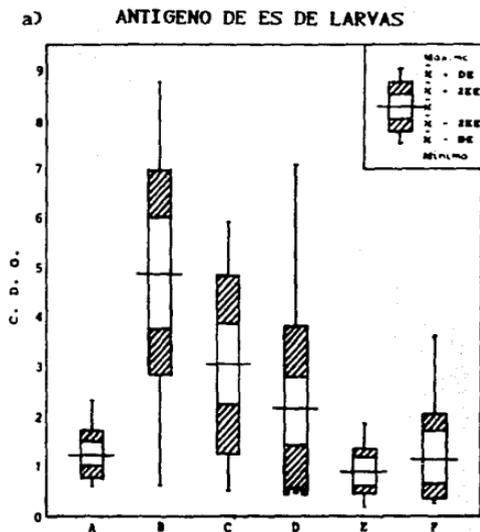
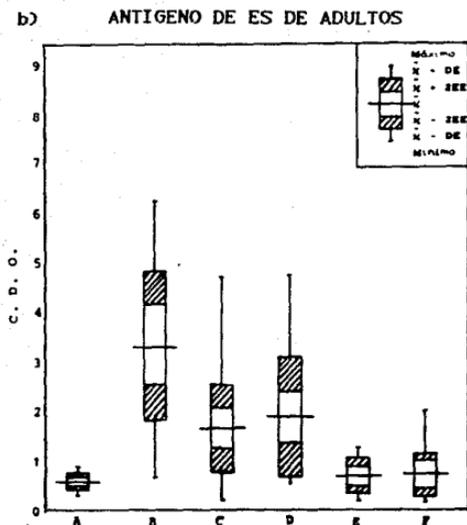


FIGURA 11.

Comparación de los datos estadísticos fundamentales (ángulo superior derecho), de los cocientes de densidad óptica (CDO) obtenidos en ELISA con antígenos de excreciones y secreciones (ES) de gusanos adultos (Fig. 11 a) y de larvas (Fig. 11 b) de *Toxocara canis* con sueros de individuos: A) normales, B) con diagnóstico de larva migratoria, C) con sospecha clínica de toxocariasis, D) con infecciones intestinales o tisulares ocasionadas por otros nemátodos, E) con platelmintos tisulares o intestinales y F) con protozoos (*Toxoplasma gondii*). Cuando las áreas blancas se traslapan las diferencias son significativas.

En estos resultados se aprecia que con el antígeno de superficie de larvas, al igual que lo observado con el de adultos, se puede establecer una diferencia diagnóstica del grupo de pacientes infectados con Toxocara canis, sin cruce inmunológico con platelmintos y protozoarios, pero sí con nemátodos, aunque en menor grado que con el antígeno de superficie de adultos.

#### 7.5. Antígenos Somáticos de Adultos y Larvas.

En las figuras 10 a y 10 b, para los antígenos somáticos de adultos y larvas, se observa que las áreas blancas ( $\bar{X} \pm 2 \text{ EE}$ ) de los grupos control, platelmintos y protozoos, se entrecruzan, lo cual indica que entre las medias de estos grupos no hay diferencia estadísticamente significativa, en cambio con los grupos de infectados con T. canis y el de nemátodos, las áreas blancas no se traslapan con el área blanca del grupo control, observando que existe diferencia entre las medias de los CDO de los grupos infectados con T. canis y nemátodos en relación al grupo control. Entre los infectados con T. canis y con nemátodos las áreas blancas se entrelapan (no hay diferencia estadística entre las medias debido a la reacción cruzada que se presenta en los nemátodos).

Con el antígeno de somático larvas la diferencia entre las medias de los CDO de los grupos infectados con T. canis, y el de sospecha clínica de toxocariasis son mayores ( $t$  Student  $p < 0.005$ ) que la del grupo control sano, en el caso del antígeno somático de adultos la diferencia entre el grupo infectado con T. canis, y el control sano no es tan marcada como con el antígeno larvario y la medias de los grupos sospecha clínica de toxocariasis y del control

sano estadísticamente son similares.

#### 7.6. Antígenos de Excreciones y Secreciones de Adultos y Larvas.

En la figura 11 a, para el antígeno de excreciones y secreciones de adultos, el área blanca se sobrecruza entre el grupo control, el de platelmintos y el de protozoos, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias. Los grupos infectados con Toxocara canis y el de sospecha clínica de toxocariasis son superiores ( $t$  de Student  $p < 0.005$ ) a la del grupo control sano.

En la figura 11 b, para el antígeno de excreciones y secreciones de larvas, la media de los CDO del grupo control fue de 1.27, la de los grupos de infectados con T. canis, nemátodos, platelmintos y protozoos de 4.89, 2.12, 0.91 y 1.19 respectivamente, las áreas blancas ( $\bar{x} \pm 2 EE$ ) de los grupos control, nemátodos, platelmintos y el de protozoos se entrelapan, lo que pone de manifiesto que la diferencia entre las medias de los CDO de estos grupos no es significativa, en cambio la media del CDO de los sueros de los pacientes infectados con T. canis fue casi 4 veces mayor que la del grupo control, lo que demuestra, que con este antígeno se establece una marcada diferencia entre el grupo control y el de infectados con T. canis.

En los parámetros serológicos para los antígenos larvarios se obtuvo una especificidad similar para los tres antígenos, la sensibilidad de 92.86% fue igual para los antígenos somático y de excreciones y secreciones y fue inferior (14.29%) para el antígeno

de superficie de larvas. La eficiencia también fue mayor para los antígenos somático y para el de excreciones y secreciones de larvas (96.55%) seguida por la del antígeno larvario de superficie (58.62%) (tabla III).

Por lo que se refiere a los antígenos de adultos, también la especificidad fue igual para los tres antígenos. Sin embargo, se apreció una mayor sensibilidad para el antígeno de excreciones y secreciones de adultos (92.86%) y mayor eficiencia (96.55%) que para los otros dos antígenos (tabla IV).

En las figuras 12, 13 y 14, al comparar los antígenos de adultos con los de larvas, en términos generales los parámetros serológicos (sensibilidad y eficiencia) son superiores para los antígenos larvarios que para los antígenos de adultos. En las mismas figuras se puede apreciar que la reactividad cruzada de los antígenos de superficie (2.27%) y de excreciones y secreciones (15.91%) de larvas fue inferior a la de los antígenos de superficie (29.55%) y de excreciones y secreciones (45.45%) de adultos, y la del antígeno somático de larvas (29.55) fue ligeramente superior a la del antígeno somático de adultos (25.00).

En general se evaluó la respuesta serológica con la técnica de ELISA de cada uno de los sueros de los pacientes infectados con Toxocara canis. Primero se compararon los CDO obtenidos con el antígeno de superficie de larvas contra el antígeno de superficie de adultos, después el antígeno de excreciones y secreciones de larvas contra el antígeno de excreciones y secreciones de adultos y por último el antígeno somático de larvas contra el antígeno somático de adultos. En los tres casos la respuesta serológica más elevada a

# ANTIGENOS DE SUPERFICIE LARVAS VS ADULTOS

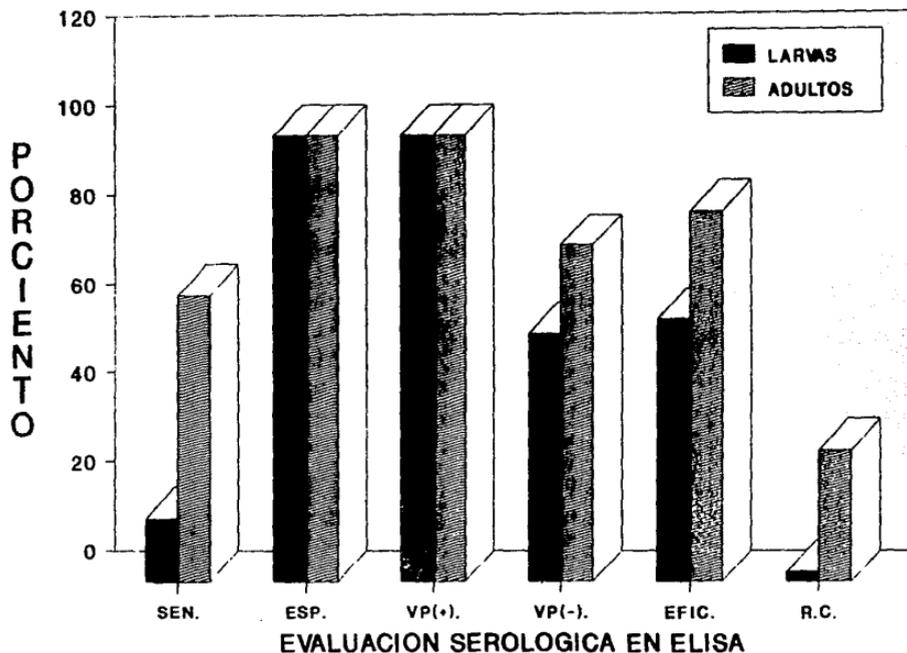


FIGURA 12.

Comparación de los parámetros de sensibilidad (SEN.) , especificidad (ESP.), valores de predicción positivo (VP +) y negativo (VP -), eficiencia (EFIC.) y reactividad cruzada (R. C.) en la prueba de ELISA, de los antígenos de superficie de larvas y adultos.

# ANTIGENOS SOMATICOS

## LARVAS VS ADULTOS

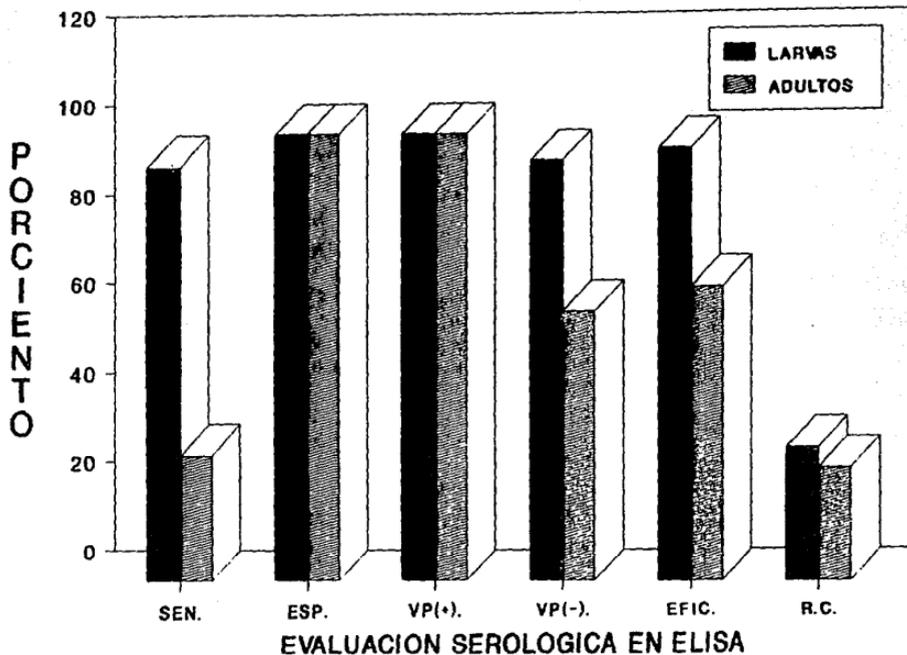


FIGURA 13.

Diferencias entre los parámetros de sensibilidad (SEN.), especificidad (ESP.), valores de predicción positivo (VP +) y negativo (VP -), eficiencia (EFIC.) y reactividad cruzada (R. C.) en la técnica de ELISA, de los antígenos somáticos de larvas y adultos.

# AG's DE EXCRECIONES Y SECRECIONES

## LARVAS VS ADULTOS

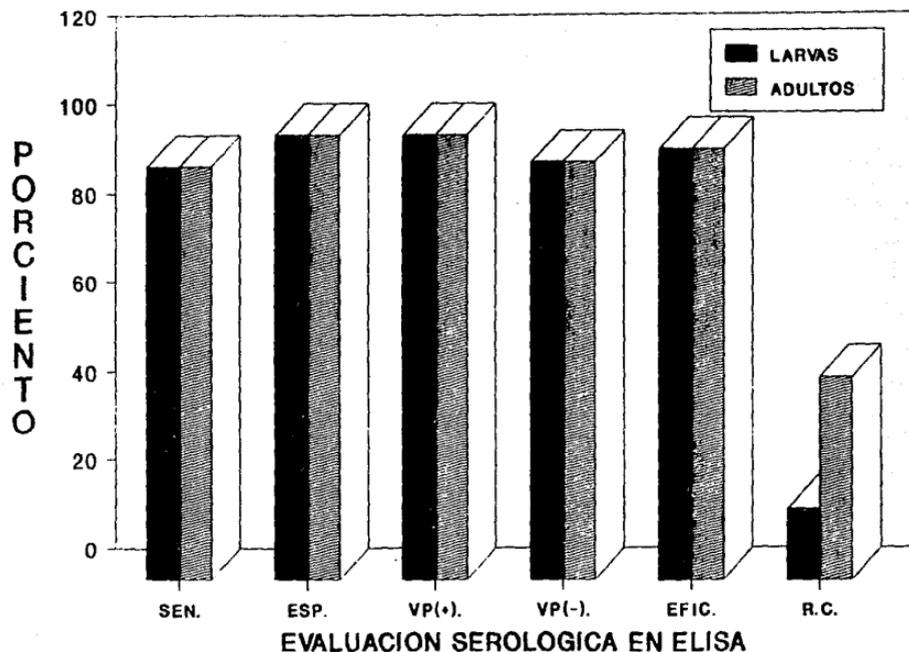


FIGURA 14.

En el histograma se comparan los parámetros de sensibilidad (SEN.) , especificidad (ESP.), valores de predicción positivo (VP +) y negativo (VP -), eficiencia (EFIC.) y reactividad cruzada (R. C.) con el método de ELISA, de los antígenos de excreciones secreciones de larvas y adultos.

los antígenos larvarios indica una mayor reactividad de los sueros hacia estos antígenos (figuras 15, 16 y 17).

Se trazó una línea continua a través de los puntos obtenidos con los CDO de cada suero del grupo de infectados con Toxocara canis con cada uno de los seis antígenos y se obtuvo la imagen de la figura 18 en donde se evidenció claramente una mayor reactividad serológica de los sueros de los pacientes infectados con T. canis a los tres antígenos de larvas de T. canis. Es importante notar que en cada bloque de antígenos de larvas y de adultos el punto de mayor reactividad fue para los antígenos de excreciones y secreciones de larvas y de adultos.

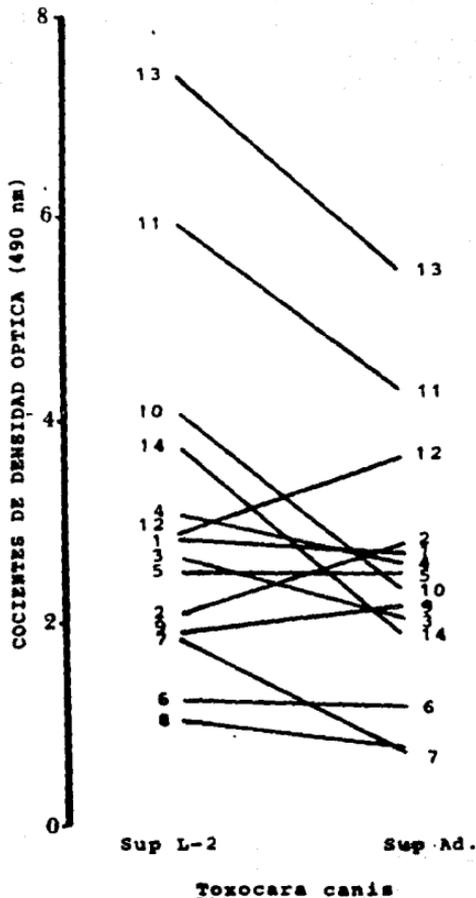


FIGURA 15.

Comparación de la respuesta serológica en ELISA en cocientes de densidad óptica (CDO) contra antígenos de Superficie de larvas (Sup L-2) y Superficie de parásitos adultos (Sup Ad) de Toxocara canis obtenida con 14 sueros de pacientes con toxocaríasis clínicamente diagnosticada. La respuesta más acentuada hacia el antígeno de Sup L-2, indica una mayor reactividad de los sueros hacia este antígeno.

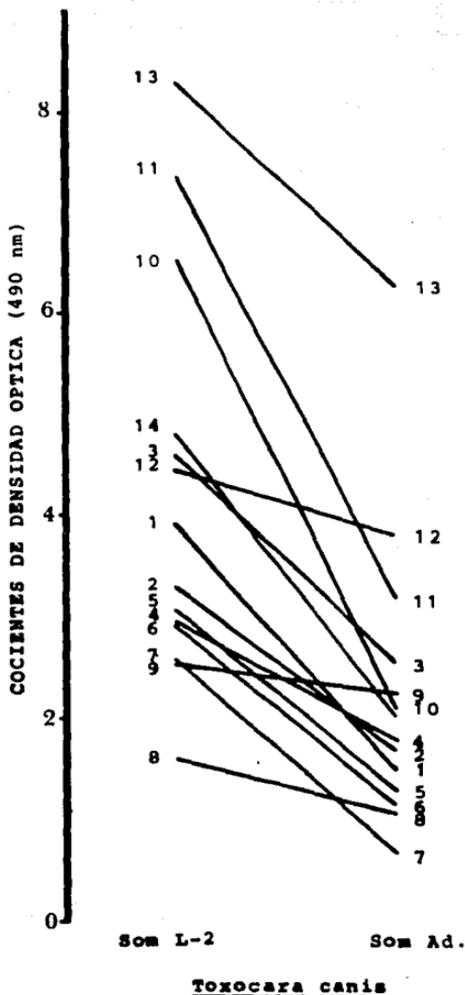
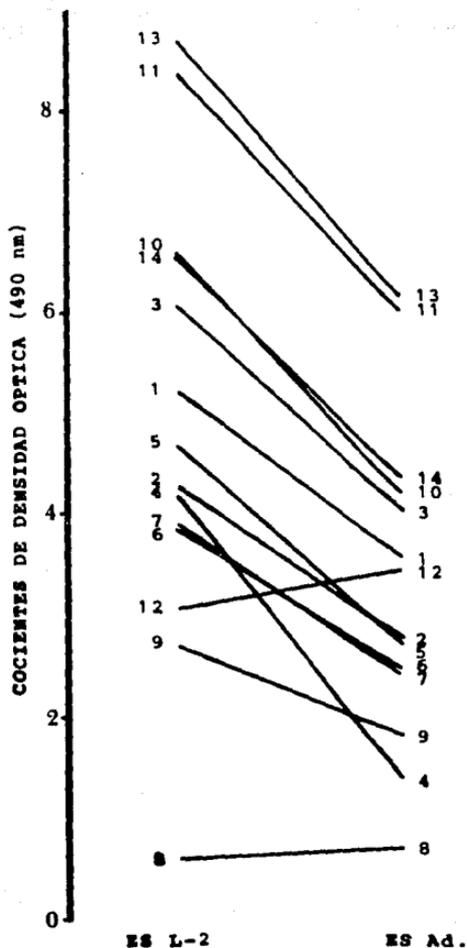


FIGURA 16.

En la gráfica se compara la respuesta serológica en ELISA en cocientes de densidad óptica (CDO) contra antígenos somáticos de larvas (Som L-2), y antígenos somáticos de parásitos adultos (Som Ad) de Toxocara canis obtenida con 14 sueros de pacientes con toxocariasis clínicamente diagnosticada. La respuesta es más notable para el antígeno Som L-2, debido a que hay una mayor reactividad de los sueros hacia este antígeno.



Toxocara canis

FIGURA 17.

Respuesta serológica en ELISA en cocientes de densidad óptica (CDO) contra antígenos de Excreciones Secreciones de larvas (ES L-2) y Excreciones Secreciones de parásitos adultos (ES Ad) de Toxocara canis obtenida con 14 sueros de pacientes con toxocariasis clínicamente diagnosticada. La respuesta más marcada para el antígeno de ES L-2, indica una mayor reactividad de los sueros hacia este antígeno.

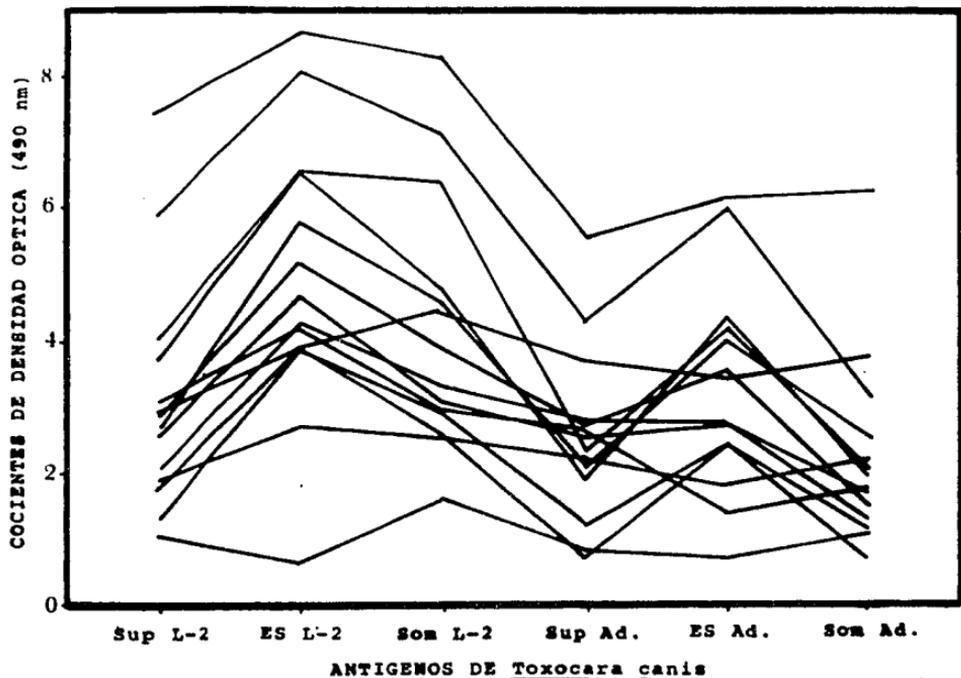


FIGURA 18.

Comparación de la respuesta serológica en ELISA (cocientes de densidad óptica a 490 nm.) contra seis antígenos de *Toxocara canis* (antígeno de Superficie de larvas = Sup L-2, antígeno de Excreciones Secreciones de larvas = ES L-2, antígeno Somático de larvas = Som L-2, antígeno de Superficie de parásitos adultos = Sup Ad., antígeno de Excreciones Secreciones de gusanos adultos = ES Ad., y antígeno Somático de parásitos adultos = Som Ad). En general se aprecia mayor reactividad con los antígenos larvarios que con los de adultos y el pico de mayor actividad en ambos casos fué para el antígenos de ES.

## 8. DISCUSION.

Para elaborar los antígenos somáticos, de superficie y de excreciones y secreciones tanto de adultos como de larvas, se requirió una cantidad importante de parásitos adultos de Toxocara canis, por lo que se intentó iniciar y mantener una cepa de estos parásitos, en cachorros de perro en el bioterio de la Facultad de Medicina, pero por falta de espacio y de personal que pudiera encargarse del cuidado y alimentación de los cachorros, después de varios intentos fallidos no fue posible efectuar este propósito por lo que se optó por acudir a los Centros Antirrábicos y de Control Canino, para eviscerar los cachorros ahí sacrificados y aislar a los parásitos.

La cubierta de los huevos de los integrantes del orden Ascaridata, al que pertenecen tanto T. canis como Ascaris lumbricoides, constan de cuatro capas; una capa de lípidos interna (membrana vitelina), una capa quitinosa, una capa vitelina externa y una elaborada por las secreciones de las células uterinas, por lo que no es sencillo liberar a las larvas de este tipo de huevos en condiciones experimentales.

En este trabajo se introdujo la modificación de agitar los huevos larvados, a la metodología propuesta por Olson y Jones (1974), de Savigny (1975), Stevenson y Jacobs (1977) y Smith y cols. (1980), lo que permitió obtener en el mismo día una buena cantidad de larvas viables, ya que ellos reportan la obtención en dos días. Esto muy probablemente se deba a que al agitar los huevos larvados con hipoclorito de sodio (NaClO) al 4%, se elimine más

rápido la cubierta exterior formada por las secreciones de las células uterinas y se erosione la capa quitinosa de los huevos.

Es evidente que si se prolonga el tiempo de agitación por más de 30 minutos, se pueden desintegrar las cuatro capas que constituyen a los huevos y al quedar las larvas liberadas en este medio tan agresivo, pueden morir e incluso ser destruidas (ver figuras 5 a y 5 b).

Para que las larvas logren romper la cubierta de los huevos, se requiere que secreten enzimas, como son las proteinasas y estererasas que junto con el movimiento que estas larvas tienen dentro del huevo es factible su liberación (Schmidt y cols., 1985).

Después de lavar los huevos para quitar el exceso de cloro, se agitaron en solución salina balanceada de Hanks (HBSS), entre 30 y 60 minutos, es posible que con el movimiento al que se someten las larvas durante la agitación, con la entrada de los minerales y la glucosa que contiene el medio de Hanks (Hanks y cols., 1949) se incrementen su actividad motora y secretora, lo que también pudo contribuir a su pronta eclosión.

De acuerdo a lo observado en este trabajo, el proceso de agitación en HBSS se puede prolongar hasta por dos horas sin afectar a las larvas (figura 4 a).

Una vez elaborados los seis antígenos se evaluaron con la técnica de ELISA.

El método Dice y Leraas (1936), se empleó para simplificar el análisis estadístico debido a que permite representar en forma gráfica los datos estadísticos como son: media, media  $\pm$  dos veces el error estandar y los valores máximos y mínimos, de los grupos

control sano, infectados con Toxocara canis, sospecha clínica de toxocariasis, nemátodos, platelmintos y protozoos, registrados en el ensayo para cada uno de los antígenos (figuras 9 a, 9 b, 10 a, 10 b, 11 a y 11 b). La apreciación visual coincidió con los resultados obtenidos al aplicar la prueba estadística de t Student.

En términos generales para los seis antígenos se observa el entrecruzamiento de las áreas blancas ( $\bar{X} \pm 2 \text{ EE}$ ) de los grupos: control, con los de platelmintos y los de protozoos, lo que significa que no existe diferencia significativa entre las medias, pero si se aprecia con el grupo de infectados con T. canis, por lo que se deduce que no hay cruce inmunológico entre los sueros de individuos parasitados con T. canis, con los sueros de la personas infectadas con platelmintos y con protozoos.

También se aprecia que no hay diferencia estadística entre las medias de los grupos de infectados con T. canis y con las medias de los grupos parasitados con otros nemátodos, lo que indica que en mayor o menor proporción existe reacción cruzada en los seis antígenos. Estos resultados se deben a la relación filogenética que tienen los nemátodos entre sí.

Por otra parte, las medias de los grupos de sospecha clínica de toxocariasis son mayores que la de los grupos control sano, para los antígenos somático de larvas (figura 10 b), de excreciones y secreciones de de adultos y de larvas (figuras 11 a y b), sin embargo, el grupo de sueros de pacientes con sospecha clínica de toxocariasis es difícil de analizar ya que no se tiene la certeza de que la patología ocular sea debida a T. canis.

Realmente lo que determinó la superioridad de un antígeno o de

otro fueron los parámetros de sensibilidad, especificidad, reactividad cruzada, eficiencia, valor de predicción positivo y negativo, los cuales dependieron del nivel al que se estableció el valor de corte.

El valor de corte para cada uno, se determinó con el valor de la media más tres desviaciones estandar del grupo control (figuras 6 a, 6 b, 7 a, 7 b, 8 a y 8 b), fue por este criterio que en los seis antígenos se obtuvo una especificidad del 100% con lo cual disminuyó la sensibilidad de los antígenos somático de adultos, superficie de larvas y de adultos, que se hubieran visto relativamente más favorecidos en este parámetro si el valor de corte se hubiera determinado con la media más dos desviaciones estandar. Se empleó un criterio estricto debido a que México es una población muy expuesta a la infección por Toxocara canis, entre otros parásitos por lo que es difícil obtener un alto porcentaje en la especificidad y a la vez en la sensibilidad.

Solo en Islandia, fue fácil establecer la especificidad de ELISA para T. canis, ya que la legislación prohíbe los perros (De Savigny, 1982).

Mackenzie y cols. (1978), encontraron en nemátodos, antígenos de superficie especie y estadio específicos, por otra parte Philipp y cols. (1980) y Parkhouse y cols. (1981), reportaron que los antígenos de superficie marcados, pueden dar como resultado un inmunoensayo más específico.

Nuestros resultados no coinciden del todo con estos investigadores ya que los antígenos de superficie de larvas y de adultos muestran (tablas III y IV) en la prueba de ELISA igual

especificidad y valor de predicción positivo, sin embargo, la sensibilidad, valor de predicción negativo y eficiencia, fueron más altos para el antígeno de superficie de adultos que para el antígeno de superficie de larvas, lo que pudo ser debido a que este último antígeno se obtuvo en poca cantidad, la concentración de proteínas fue muy baja (3 µg/mL) e insuficiente para que los sueros reaccionaran adecuadamente, lo que constituye una desventaja para utilizarlo en el diagnóstico clínico de laboratorio y aún más en encuestas seroepidemiológicas.

Con el antígeno de superficie de adultos se apreció una mayor sensibilidad (64.2%) que con el antígeno somático de adultos (28.57%) y la reactividad cruzada no fue muy diferente, además el primero es más sencillo elaborarlo, por lo que se podría considerar mejor que antígeno somático de adultos.

Cypess y cols. (1977), trabajaron la doble inmunodifusión de Ouchterlony con antígeno somático de adultos y de huevos larvados, observando que el antígeno somático de huevos larvados presentó mayor especificidad.

Con la técnica de ELISA, en este trabajo se compararon más parámetros, como fueron: sensibilidad (92.86% vs 28.27%), especificidad (100% vs 100%) y eficiencia (96.55% vs 65.52%) de los antígenos somático de larvas y somático de adultos respectivamente (tablas III y IV). A pesar de haber empleado diferentes técnicas, en ambos casos los resultados demuestran que los antígenos somáticos procedentes de larvas son superiores a los de adultos.

Varios investigadores, entre ellos (Voller, 1981), han mencionado que la desventaja de los extractos crudos es que

contienen una mezcla importante de antígenos que incluyen a los antígenos no reactivos, poco reactivos y de cruce, que pueden inhibir la función de cualquier antígeno presente. En los resultados con los dos antígenos somáticos, se apreció que este inconveniente fue más evidente para el antígeno somático de adultos, ya que los valores de sensibilidad, especificidad, valor de predicción positivo y eficiencia en la prueba de ELISA, fueron en general más bajos que para los otros cinco antígenos.

Con los antígenos de excreciones y secreciones de adultos y de larvas, se establece una notable diferencia en la respuesta serológica en los grupos de pacientes infectados con Toxocara canis y sospecha clínica de toxocariasis.

En el histograma (figura 14), donde se comparan los antígenos de excreciones y secreciones, vemos que ambos tienen una aceptable sensibilidad (92.86%), especificidad (100.00%), valor de predicción positivo (100.00%) y eficiencia (96.55%), sin embargo, el antígeno de excreciones y secreciones de adultos presentó mayor reactividad cruzada (45.45%) que el antígeno de excreciones y secreciones de larvas (15.91%). Biglan (1979), Glickman (1978) y Schantz (1979), reportan para el antígenos de excreciones y secreciones de larva, en la prueba de ELISA sensibilidad del 78% y especificidad del 92%, aunque ellos no refieren que porcentaje de reactividad cruzada obtuvieron.

Llama la atención el hecho de que los antígenos de excreciones y secreciones de larvas y adulto tuvieron los mejores parámetros serológicos de su grupo, esto se debe según Fife (1971), De Savigny (1975) y Cypess y cols. (1977), a que son la mezcla de pocos

antígenos funcionales y biológicamente importantes por lo que su especificidad antigénica tiende a ser alta.

No obstante las ventajas de los antígenos de excreciones y secreciones, la reactividad cruzada aún persiste en mayor o menor grado. La pregunta sería, si en estos pacientes multiparasitados todo el porcentaje corresponde a una reactividad cruzada originada por otros nemátodos diferentes a Toxocara canis, o si además albergan a este último, lo cual es muy probable, debido a la estrecha convivencia que se tiene con cachorros de perro ya que según Styles (1967), los perros de la ciudad de México presentan parasitación por T. canis en un 93%, y en estudios realizados por Schantz y Biagi (1968), en esta misma ciudad, se reporta una incidencia del 75.6% de T. canis en cachorros de perro. La frecuencia de este nemátodo hasta hoy en día es elevada de acuerdo a lo observado al eviscerar los cachorros para obtener el material biológico.

Para resolver ésta y otras interrogantes, es necesario continuar con los estudios sobre el serodiagnóstico de larva migratoria visceral y ocular, ya que se requiere realizar trabajos de inmunoelectrotransferencia para determinar las entidades moleculares que detectan anticuerpos específicos contra la larva de T. canis, y las que cruzan con los anticuerpos producidos para otros nemátodos.

## 9. CONCLUSIONES.

La cubierta de los huevos larvados de Toxocara canis, se erosiona adecuadamente sin dañar a las larvas, a los 30 minutos de incubación con agitación constante en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 4%. Por otra parte, después de eliminar el exceso de hipoclorito de sodio, la incubación a temperatura ambiente durante 45 a 60 minutos con HBSS resultó ser eficaz para la total eclosión de los huevos.

En cuanto a la disponibilidad del material biológico, en general los antígenos de adultos son más sencillo de obtener que los de larvas, y comparando los tres antígenos larvarios, fue relativamente más fácil de obtener el antígeno de excreciones y secreciones de larvas y el más difícil de todos fue el antígeno de superficie de larvas.

Es posible utilizar la técnica de ELISA para el diagnóstico serológico de la toxocariasis humana.

Para los tres antígenos de adultos probados en la técnica de ELISA, con el antígeno de excreciones y secreciones, se obtuvieron los mejores valores de reactividad, sensibilidad y mayor eficiencia que para los antígenos somático de adulto y superficie de larvas.

Referente a los antígenos de larvas, el antígeno de

excreciones y secreciones en ELISA, mostró mayor reactividad que los otros dos antígenos y al igual que con el somático, se obtuvieron valores superiores de sensibilidad y eficiencia en relación al antígeno de superficie de larvas.

No obstante, que los anticuerpos de reacción cruzada producidos por otros nemátodos intestinales o tisulares son detectados en ELISA con los seis antígenos, esto sucede en menor proporción cuando se emplean antígenos de superficie, y de excreciones y secreciones de larvas.

La evaluación de los antígenos con la prueba de ELISA indica que los mejores valores de cada parámetro se obtienen en primer lugar con el antígeno de excreciones y secreciones de larvas, luego con el antígeno somático de larvas y finalmente con el antígeno de excreciones y secreciones de adultos.

Los resultados confirman que en el 90% de los casos es posible diferenciar serológicamente con los seis antígenos, a los pacientes con cuadro clínico ocular causado por la larva de Toxocara canis de los infectados por Toxoplasma gondii.

## 10. RESUMEN.

Se evisceraron cachorros de perro en Centros Antirrábicos y de Control Canino. Se separaron los adultos de Toxocara canis y con ellos se prepararon 3 diferentes antígenos: de superficie, somático y de excreciones y secreciones.

Por otra parte se aislaron hembras de T. canis sexualmente maduras, a quienes se les extrajeron huevos fértiles del útero los que se incubaron hasta su estadio de huevo larvado.

Las larvas de T. canis, se liberaron de los huevos mediante una técnica de eclosión con hipoclorito de sodio, solución salina balanceada de Hanks y agitación mecánica. Con las larvas se elaboraron 3 antígenos: de superficie, somático y de excreciones y secreciones.

Se estimó la concentración total de proteínas de cada uno de los antígenos y después se titularon, tanto antígenos como sueros mediante diluciones de acuerdo al método de Voller y cols. (1979).

Con cada uno de los antígenos se probaron en la técnica de ELISA, 15 sueros de individuos normales, 14 con diagnóstico de LMV y LMO, 19 con sospecha clínica de toxocariasis, 23 con infecciones intestinales o tisulares causada por otros nemátodos, 11 con platelmintos tisulares o intestinales y 10 con protozoos (Toxoplasma gondii). Con los sueros normales se determinó el valor

de corte para cada antígeno y posteriormente se obtuvieron los parámetros de sensibilidad, especificidad, reactividad cruzada, eficiencia, valor de predicción positivo y negativo.

Los datos estadísticos fundamentales como son media  $\pm$  dos veces el error estandar y los valores máximos y mínimos de cada grupo de sueros con cada antígeno, se presentan en forma gráfica con el modelo de Dice y Leraas (1936).

Se graficaron los cocientes de densidad óptica obtenidos con los sueros de pacientes con larva migratoria visceral y ocular y se comparó la reactividad serológica con cada antígeno.

En la evaluación serológica de cada antígeno con la prueba de ELISA, los valores más adecuados de los diferentes parámetros se obtuvieron cuando se usó en primer término el antígeno de excreciones y secreciones de larvas, luego con el antígeno somático de larvas, y finalmente con el antígeno de excreciones y secreciones de adultos.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Arean VM, Crandall CA, 1971. Toxocariasis. In R. A. Marcial-Roja [ed]. Pathology of protozoal and helminthic diseases. R E Krieger, New York, 302-342.

Ashton N, 1960. Larval granulomatosis of the retina due to Toxocara. Br. J. Ophthalmol. 44: 129-148.

Beautyman W, Woolf AL, 1951. An Ascaris larva in brain in association with acute anterior poliomyelitis. J Pathol Bact 63: 635-47.

Beautyman W Beaver PC Buckley JJC and Woolf. AL, 1966. Review of case previously reported as showing an ascarid larva in the brain. Journal of Pathology and Bacteriology. 91 271-273.

Beaver PC, 1952. The detection and identification of some comon nematode parasites of man. Am J Clin Pathol 22: 481-94.

Beaver PC, 1962. Toxocariasis (VLM) in relationship to tropical eosinophilia. Bull Soc Patho Exot 55: 555-76.

Beaver PC, 1966. Zoonoses with particular reference to parasite of veterinary importance. Soulsby E JL, ed. Biology of parasites. New York: Academic Press, pp. 215-227.

Beaver PC, Jung RC, Cupp EW, 1986. Parasitologia Clinica. 2a. ed. Editorial Salvat 346, 347, 351-361.

Bethel RG, 1981. Arthritis and arthralgia associated with toxocaral infestation. Br Med J (Clin Res) 283: 729.

Biglan AW, Glikman LT, Lobes LA Jr, 1979. Serum and vitreous Toxocara antibody in nematode endophthalmitis. Am J Ophthalmol 88: 898-901.

Bisseru B, Woodruff AW, 1968. The detection of circulating antibody in human Toxocara infections using the indirect fluorescent antibody test. J Clin Pathol 21: 449-55.

Blakiston, 1983. Diccionario Breve de Medicina. Ed. La Prensa Médica Mexicana, S. A. México 1<sup>a</sup> ed. 1014.

Bowman DD, Mika-Grieve RB, 1987. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with Toxocara canis. Am J Trop Med Hyg 36: 75-82.

Brown DH, 1970. Ocular Toxocara canis. Part II. Clinical review. J Pediatr Ophthalmol 7: 182-91.

Bruart J, Remacle P, Henneghien C, Jonckheer J, 1987. Pleural effusion and Toxocara canis. Rev Mal Respir 4: 35-37.

Ceska M, Eriksson, Varga JM, 1972. Radioimmunosorbent assay of allergens. J Allergy Clin Immunol 49 (1): 1-9.

Clarke HM, Hinde FR, Manns RA. 1992. Case report: hepatic ultrasound findings in a case of toxocariasis. J Clin Radiol 46 (2): 135-6.

Grandall RB, Zam SG, 1968. Analysis of excretory-secretory products of Trichinella spiralis Larvae by Disc electrophoresis and immunodiffusion. Am J. Trop Med Hyg 17: 747.

Cypess RH, Karol MH, Zidian JK, Glickman LT, Glitin D, 1977. Larva-specific antibodies in patients with visceral larva migrans. J Infect Dis 135: 633-40.

De Buen S, Biagi F, Tamayo P, 1966. Primer caso de Toxocariasis ocular en México (Endoftalmitis por nemátodo). La Prensa Médica Mexicana XXXI (4-5): 168-71.

De Savigny DH, 1975. In vitro maintenance of Toxocara canis larvae and a simple method for the production of Toxocara ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. J Parasitol 61: 781-82.

De Savigny DH, 1982. Predictive value concepts: Their use in Design and Evaluation of Diagnostic Test. Seminar in Lab Sci Selected Laboratory Services Branch. Ontario. (1): 1-15.

De Vay JE, Adler HE, 1976. Antigens common to host and parasites. *Ann. Rev Microbiol* 30: 147.

Dice, L, Leraas H, 1936. A graphic method for comparing several sets of measurements. *Contributions to Laboratory Vertebrate Genetics* 3(1): 1-3.

Douglas JR, Baker NF, 1966. Some host parasite relationships of canine helminths. In *Host-Parasite Relationships*. Edited by JE. McCauley Corvallis, Oregon State University Press. 97-115.

Engvall E, Perimann P, 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J Immunol* 109: 129-35.

Fife EE, 1971. in: *Immunology of Parasitic Infections*, eds. S Cohen and EH Sadun (Blackwell, London) 77.

Flores B L, 1955. Helminths de los perros Canis familiaris y gatos Felis catus en la ciudad de México. *An Esc Nac Cien Biol* 8: 159-202.

Gass JD, Gilbert WR Jr, Guerry RK, Scelfo R, 1978. Diffuse unilateral subacute neuroretinitis. *Ophthalmology* 85: 521-45.

Glickman LT, Chaudry IU Costantino J Clack FB Cypess RH,

Winslow L, 1981. Pica patterns, Toxocariasis and elevated blood lead in children. Am J Trop Med Hyg 30 (1): 77-80.

Glickman LT, Schantz PM, 1981. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. Epidemiol Rev 3: 230-50.

Glickman LT, Schantz PM, Cypess R, 1979. Canine and Human Toxocariasis: Review of Transmission, Pathogenesis and Clinical Disease JAVMA 175 (12): 1265-9.

Glickman LT, Schantz PM, Dombroske R, Cypess R, 1978. Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. Am J Trop Med Hyg 27 (3): 492-98.

Gómez-Priego A, Godínez HL, Gutiérrez QM, 1981. Detection of serum antibodies in human Hymenolepis infection by enzyme immunoassay. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 85: 645-7.

Gould IM, Newell S, Green SH, George RH, 1985. Toxocariasis and eosinophilic meningitis. Br Med J (Clin Res) 291: 1239-1240.

Hagler WS, Pollard ZF, Jarrett WH, Dorrelly EH, 1981. Results of surgery for ocular Toxocara canis. Ophthalmology 88: 1081-6.

Hakim SL, Mak JW, Lam PL, Nazma S, Normaznah Y. 1992. Seroprevalence of Toxocara canis antibodies among Orang Asli

(aborigines) in Peninsular Malaysia. Southeast Asian J Trop Med Public Health 23(3): 493-6.

Hanks JH, Wallace RE, 1949. Relation of Oxygen and Temperature in the Preservation of Tissues by Refrigeration. Proc Exp Biol Med 71: 196-200.

Hill IR, Denham DA, Scholtz CL, 1985. Toxocara canis larvae in the brain of a British child. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 79: 351-4.

Huismans H, 1977. Über das Solitärgranulom bei okularer Toxocara canis Infektion (Hundespulwurm). Ophthalmologica 174: 10-3.

Huntley CC, Costas MC, Lyerly A, 1965. Visceral larval migrans syndrome: clinical characteristics and immunologic studies in 51 patients. Pediatrics 36: 523-36.

Kagan IG, 1979. Diagnostic, Epidemiologic and experimental parasitology: immunologic aspects Am J Trop Med Hyg 28, 429-39.

Kagan IG, Norman L, Allain DS, 1959. Studies on the serology of visceral larva migrans. I. Haemagglutination and flocculation tests with purified Ascaris antigens. J Immunol 83: 297-301.

Kurstak E, 1985. Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design and interpretation. Bull of the World Health Organization 63(4): 793-811.

Krupp IM, 1974. Haemagglutination test for the detection of antibodies specific for Ascaris and Toxocara antigens in patients with suspected visceral larva migrans Am J Trop Med Hyg 23: 378-84.

Lowry OH, Rosebrough JJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-75.

MacDougall LG, 1969. Thiabendazol therapy in visceral larva migrans: Report of a case. Am J Trop Hyg 18: 902-906.

Mackenzie CD, Preston PM, Ogilvie BM, 1978. Immunological properties of the surface of nematodes. Nature (London) 276: 826.

MagnaVal JF, Fabre R, Maurieres P, Charlet JP, De Larrard B. 1992. Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-Toxocara immunoglobulin E for diagnosis and posttreatment follow-up of human toxocariasis. J Clin Microbiol 30 (9): 2269-74.

Martínez BM, Alemán P, 1960. Larva migrans visceral. Primer caso comprobado en México. I. Estudio histopatológico. Rev Inst Salubr Enferm Trop 20: 65-72.

Méndez RI, Namihira GD, Moreno AL, Sosa MC, 1984. El protocolo de investigación. Lineamientos para su elaboración y análisis. Ed. Trillas. México: p 20.

Milhael NZ, Monpetit VJA, Orizaga M, Rowsell HC, Richard MT, 1974. Toxocara canis infestation with encephalitis. Canadian of Neurologic Sciences 1: 114-20.

Mok, CH, 1968. Visceral larva migrans -a discussion based on a review o the literature. Clin Pediatr 7: 565-73.

Molina PC, Díaz MA, 1960. Larva migrans visceral. Primer caso comprobado en México. II. Estudio clínico. Rev Inst Salubr Enferm Trop 20: 74-80.

Morrow RH, 1981. Diagnostic measures in tropical diseases. Epidemiological perspectives. In: Report on an informal consultation on further development of diagnosis methods for tropical disases. Morrow (editor). Geneva: UNDP/world Bank/WHO. Special programe for research and training in tropical diseases. 39-43.

Nelson JD, McConnell TH, Moore DV, 1966. Thiabendazole Therapy of visceral larva migrans: A case report. Am J Trop Med Hyg 18: 902-6.

O'Connor GR, 1980. Chemotherapy of toxoplasmosis and toxocariasis, In: Ocular Therapeutics. Srinivasan BD, (editor). New York, Maston Publishing 51-7.

Olson LJ, Jones FR, 1974. Preparation of sterile Toxocara canis larvae. J Parasitol 60: 941.

Parkhouse RME, Philipp M, Olgilvie BM, 1981. Characterization of surface antigens of Trichinella spiralis infective larvae. Parasite Immunology 3: 339.

Parsons JC, 1987. Ascarid infections of cats and dogs. Vet Clin North Am [Small Anim Pract] 17: 1307-1339.

Philipp M, Parkhouse RME, Olgilvie BM, 1980. Changing proteins on the surface of a parasitic nematode. Nature (London) 287: 538.

Pollard ZF, 1979. Ocular Toxocara in siblings of two families. Diagnosis confirmed by ELISA test. Arch Ophthalmol 97: 2319-2320.

Ruttinger PH, 1991. MRI in cerebral toxocaral disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry; 54(4); 361-2.

Salazar PM, De Haro AI, 1980. Manual de técnicas para el diagnóstico morfológico de las parasitosis. 1a ed. México: Ed Méndez Cervantes. México: pp 983-96.

Schantz PM, 1989. Toxocara larva migrans now. Am J Trop Hyg 4(3) Suppl. 21-34.

Schantz PM, Biagi FF, 1968. Coexistence of Toxocara and Toxascaris in dogs in Mexico City J Parasit 54 (1): 185-6.

Schantz PM, Glickman LT, 1978. Toxocaral Visceral Larva

Migrans. The New Eng J of Med 298 (8), 436-9.

Schantz PM, Glichman LT, 1983. Ascaridos de Perros y Gatos un Problema de Salud Pública y de Medicina Veterinaria. Bol of Saint Panam 94(6): 571-85.

Schantz PM, Meyer D, Glickman LT, 1979. Clinical, serologic, and epidemiologic characteristics of ocular toxocariasis. Am J Trop Med Hyg 28: 24-28.

Schantz PM, Weis PE, Pollard ZF, White MC, 1980. Risk factors for toxocaral ocular larva migrans: a case-control study . Am J Public Health 70: 1269-72.

Schmidt GD y Roberts LS, 1977. Fundamentos de Parasitología. Primera edición. México: Ed. Compañía Editorial Continental SA, 442-3.

Shields JA, 1984. Ocular toxocariasis: A review. Surv Ophthalmol 28: 361-381.

Smith HV, Quinn R, Bruce RG, Girwood RWA, 1980. A paper radioimmunosorbent test (PRIST) for the detection of larva-specific antibodies to Toxocara canis in human sera. J Immunol Methods 37: 47-55.

Smith MHD, Beaver PC, 1953. Persistence and distribution of

Toxocara larvae in the tissues of children and mice. *Pediatric* 12: 491-6.

Snyder CH, 1961. Visceral larva migrans - ten years' experience. *Pediatrics* 28: 85-91.

Stevenson P, DE Jacobs, 1977. Toxocara infection in pigs. The use of indirect fluorescent antibody tests an in vitro larval precipitate test for detecting specific antibodies. *Journal of Helminthology* 51, 149.

Styles TJ, 1967. Incidence of Toxocara canis and other helminth parasites of dogs in Mexico city. *J Parasit* 53(4): 822-3.

Tay ZJ, Lara AR, Velasco CO y Gutierrez QM, 1991. *Parasitología Médica*. 5a ed. Mexico: Ed Méndez Cervantes, 382.

Voller A, De Savigny DH, 1981. Diagnostic Serology of Tropical Parasitic Diseases. *J Immunol Methods* 46: 1-29.

Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, 1979. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Laboratories INC Alexandria Virginia USA. 125.

Walsh SS, Roboson WJ, Hart CA, 1988. Acute transient myositis due to Toxocara. *Arch Dis Child* 63: 1087-1088.

Wang C, Huang CY, Chan PH, Preston P, Chau PY, 1983. Transverse myelitis associated with larva migrans: Finding of larva in cerebrospinal fluid. Lancet I: 423.

Weiss ND, Sturchler D, Dietrich FM, 1978. Radioallergosorbent and indirect fluorescent antibody test in immunodiagnosis of schistosomiasis. Lancet II: 1231.

Wilder HC, 1950. Nematode endophthalmitis. Trans Am Acad Ophthalmol 55: 99-109.

Wilkinson CP, Schachat AP, Murphy RP, Patz A, 1989. In Retina. Ryan SJ (editor). The CV Mosby Company. St. Louis Baltimore Toronto. Vol. 2, pp 575-82.

Wilkinson CP, Welch RB, 1971. Intraocular Toxocara. Am J Ophthalmol 71: 921.

Woodruff AW, De Savigny D, Jacobs DE, 1978. Study of toxocaral infection in dog breeders. Br Med J 2: 1747-48.

Woodruff AW, Thacker CK, Shah AI, 1964. Infection with animal helminths. British Medical Journal 1: 1001-5.

Worley G, Green JA, Frothingham TE, Sturmer RA, Walls KW, Pakalnis VA, Ellis GS Jr, 1984. Toxocara canis infection: clinical and epidemiological associations with seropositivity in kindergarten

children, The Journal of Infectious Diseases 149 (4): 591-7.

Zinkham WH, 1978. Visceral larval migrans. A review and reassessment indicating two forms of clinical expression: visceral and ocular. Am J Dis Child 132: 627-33.