



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



"EVALUACION POR ELISA DE IgG ESPECIFICA  
CONTRA ANTIGENOS DE EXCRECION Y SECRECION  
DE LA LARVA 2 DE *Toxocara canis* EN CONEJOS  
INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE".

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**  
P R E S E N T A :  
**GENARO ADRIAN ROMERO SANCHEZ**

ASESORES: MVZ. PABLO MARTINEZ LABAT.  
DR. FERNANDO ALBA HURTADO.

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, NOVIEMBRE DEL 2007

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

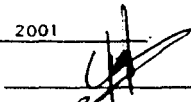
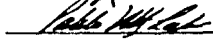


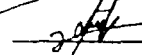
"Evaluación por ELISA de IgG Específica contra antígenos de excreción y secreción de la larva 2 de Toxocara canis en conejos inoculados experimentalmente.

que presenta el pasante: Genaro Adrián Romero Sánchez  
 con número de cuenta: 9140781-4 para obtener el título de :  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Junio de 2001

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>M.V.Z. Pablo Martfner Lebat</u>	
SECRETARIO	<u>Q.B.P. Amparo Londoño Orozco</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Ladislao Palomar Morales</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes</u>	

## **DEDICATORIAS**

**MAMA:** Te dedico este logro y al mismo tiempo te doy gracias por tu Inmenso amor, por todas las cosas que me has enseñado, por la formación que me has dado como ser humano y principalmente por que me diste la oportunidad y las herramientas para desarrollarme profesionalmente. Esta es la consumación de muchos de los esfuerzos hechos hasta ahora, pero también es uno de los primeros pasos de todas las grandes cosas por venir.

A mi **FAMILIA** en especial a mis tías Licha y Luz María y a mí abuelita,  
ya que sin su Inmensa ayuda y apoyo, mi desarrollo tanto en lo personal como  
en lo profesional hubiera sido muy difícil.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al MVZ. Pablo Martínez Labat y al Dr. Fernando Alba Hurtado por su amistad, asesoría y apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Guillermo Valdivia y al MVZ. Marco A. Muñoz Guzmán por su gran apoyo para el desarrollo de esta tesis.

Al M. en C. Alejandro Martínez y a todo el personal de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, por todo el apoyo y facilidades otorgadas para el desarrollo de este trabajo.

A todos mis amigos por brindarme lo mejor de sí.

## INDICE

ABREVIATURAS	2
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
JUSTIFICACIÓN	31
OBJETIVOS	33
MATERIAL Y MÉTODOS	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	54
APÉNDICES	55
BIBLIOGRAFÍA	63

## ABREVIATURAS

Acido peryódico de shiff	P.A.S.
Acido clorhídrico	HCl
Antígenos de excreción y secreción.	Ag-EST
Bióxido de Carbono	CO <sub>2</sub>
Buffer de carbonatos-bicarbonatos	BCB
Cloruro de Sodio	NaCl
Colaboradores	Col.
Kilodaltos	KDa.
Geles de poliacrilamida con dodesil sulfato de sodio.	SDS.PAGE
Hidróxido de Sodio	NaOH
Huevos larvados de <i>Toxocara canis</i> .	HITc
Inmunoensayo asociado a enzimas.	ELISA
Inmunoglobulina G	IgG
Larava migrans ocular	LMO
Lareva migrans visceral	LMV
Marcadores de peso molecular	MPM
Medio de cultivo celular de acuerdo a las iniciales del Roswell Park Memorial Institute	RPMI-1640
Microgramos	µg
Miliampers	MA
Mililitros	MI



Milímetros	Mm
Minutos	Min
Molar	M
Nanómetros	nm
Normal	N
Peso molecular	PM
Post-inoculación	p.i.
Solucion Salina Amortiguadora de Fosfatos	PBS
Solución Salina Fisiológica	SSF
Tris buffer salino	TBS
Volts	V

## RESUMEN

*Toxocara canis* es un nemátodo parásito que utiliza a los perros como hospederos definitivos y a otros animales incluyendo al hombre como hospedero paraténicos. En éstos, resulta importante conocer como se monta la respuesta inmunológica, ante la lógica imposibilidad de realizar inoculaciones experimentales en humanos, se ha recurrido al uso de modelos experimentales en las que el parásito tenga un comportamiento similar. Por otro lado las larvas son capaces de secretar y excretar diferentes tipos de proteínas que tienen diversas funciones. Algunas de estas proteínas son antigénicas y pueden ser utilizadas para el diagnóstico.

El objetivo del presente trabajo fue determinar por la técnica de ELISA la cinética de producción de anticuerpos séricos producidos contra antígenos de excreción y secreción de *T. canis* (Ag-EST), en conejos infestados experimentalmente. Se inocularon vía oral dos grupos de 5 conejos cada uno con 5000 y 10,000 huevos larvados de *T. canis* (hTC) respectivamente. Se colectó el suero de todos los animales a los días 0, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 y 85 postinfección y se congelaron (-20°C) hasta su uso, a los 105 días se reinocularon los dos grupos de 5 conejos cada uno con 5000 y 10,000 hTC respectivamente, se colectó el suero el día 127 a partir de la primera inoculación, el suero se congeló (-20°C) hasta su uso.

Los Ag-EST se obtuvieron al cultivar larvas 2 de *T. canis* en medios de cultivos RPMI-1640 en esterilidad, el sobrenadante se concentró 100 veces por ultrafiltración con membranas de Amicon. Con los Ag-EST concentrados se hicieron corrimientos electroforéticos en geles de SDS-pollacrilamida, finalmente se realizó la técnica de ELISA con los sueros almacenados.

Se identificaron un total de 11 bandas cuyos pesos moleculares fueron determinados con una curva patrón dada por marcadores de peso molecular de referencia. Las bandas detectadas correspondieron a los siguientes pesos moleculares 200, 120, 38, 35, 32, 28, 24, 23, 16 y tres bandas de menos de 7.5 kDa., no se observó degradación de las bandas proteicas.

Los datos de absorbancia obtenidos por la técnica de ELISA muestran que los títulos de anticuerpos contra Ag-EST en el suero de los conejos de ambos grupos empiezan a aumentar ligeramente a partir del día 8 p.i., sin embargo entre los días 8 y 15 p.i. se presenta un notable incremento en la producción de anticuerpos. A partir del día 22 p.i. y hasta el día 64 p.i. se observa una ligera disminución de la absorbancia. A partir del día 71 p.i. y hasta el día 127 p.i. se observa un aumento en el título de anticuerpos. El día 85 p.i. se reinfestaron los animales con la misma dosis, lo que ocasionó un aumento en la cantidad de antígeno circulante, pese a esto no se detectó un aumento de los títulos de anticuerpos. Con el fin de utilizar suero de conejo como referencia positiva en el diagnóstico de la toxocarasis cualquiera de las dosis utilizadas (5000 y 10000 hTC) es adecuada. Los títulos de anticuerpos séricos más altos con una inoculación se presentaron los días 15, 71 y 85. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que en el conejo se producen fácilmente altos títulos de anticuerpos séricos específicos contra Ag-EST, el cual en el inmunodiagnóstico, pudiera ser una referencia positiva a la toxocarasis.

## INTRODUCCIÓN

*Toxocara canis* es un nemátodo que en su estado adulto afecta el intestino delgado del perro y de otros cánidos. Sus fases larvianas pueden afectar diferentes especies que pueden actuar como hospederos paraténicos entre los que se encuentra el hombre (Beaver *et al.* 1986).

### **GENERALIDADES de *Toxocara canis***

Clasificación:

REINO: ANIMAL

SUBREINO: METAZOA

PHYLUM: NEMATELMINTHES

CLASE: NEMATODA

ORDEN: ASCARIDIDA

FAMILIA: ASCARIDOIDEA

GENERO: *Toxocara*

ESPECIE: *canis*

Los miembros del orden Ascaridida, familia Ascaridoidea, son por lo general relativamente grandes y están provistos de un esófago cilíndrico y músculos corporales celomarios. Los huevos tienen una cáscara gruesa y no están embrionados cuando se depositan (Inuo, 1997).

Las especies del género *Toxocara*, tienen aletas cervicales diferenciadas y

labios prominentes que suelen presentar rebordes dentígeros finos; carecen de interlabios, y tienen en el esófago un ventrículo posterior evidente, pero carecen de divertículo ventricular y ciego intestinal. El macho muestra un apéndice caudal digitiforme, y en algunas especies existen aletas caudales. Hay 5 pares de papilas caudales posteriores a la cloaca y muchas anteriores, existe una papila subventral doble posterior a la cloaca a ambos lados. La vulva de la hembra está en la porción anterior del cuerpo; los huevos presentan depresiones superficiales (Beaver *et al.* 1986).

## **MORFOLOGIA**

Los machos miden de 4-10 cm y las hembras de 5-18 cm, se han observado longitudes máximas de 13 y 20 cm. Las aletas cervicales son mucho más largas que anchas (2-4mm por unos 0.2mm), el esófago suele medir unos 5mm, incluido el ventrículo, que tiene unos 0.5mm tanto de longitud como de anchura. La vulva se sitúa a la altura del primer tercio del cuerpo (Beaver, 1986).

Los huevos son subglobulosos, de unos 85 por 75  $\mu\text{m}$ , presentan depresiones en la cáscara y no están embrionados cuando se depositan, son amarillo-blanquecino; también poseen una cubierta protéica la cuál está uniformemente formada, poseen una masa protoplásmica que ocupa completamente el interior del huevo (Georgi J.R., 1991).

## CICLO BIOLÓGICO

El ciclo de vida de *T. canis* es complejo y varía de acuerdo a la edad a la que el hospedero adquiere la infestación y a las diversas formas en que el parásito puede llegar a éste: Transplacentaria, calostrala, transmisión directa o infestación por ingestión de un hospedero paraténico (Muñoz, 1997).

El ciclo se inicia con la eliminación de huevos de *T. canis* en el excremento de los perros parasitados (principalmente cachorros), estos huevos son resistentes y duraderos en el ambiente. Sin embargo, la exposición a la luz solar y a una temperatura de 55.5°C los mata. El desarrollo de la larva infectante, requiere de 9 a 11 días a 24°C y de 3 a 5 días a 30°C, en presencia de oxígeno atmosférico y una humedad relativa del 75% (Olsen, 1974; Olsen, 1979; Beaver *et al.* 1986).

La infestación ocurre cuando los perros, humanos u otros hospederos susceptibles ingieren huevos larvados, la eclosión ocurre en el duodeno y el segundo estadio larvario atraviesa la pared intestinal; las larvas pasan al flujo linfático o a capilares sanguíneos, por la vena porta llegan al hígado dos días después. Al cuarto día llegan al pulmón viajando por la vena cava, corazón derecho y arteria pulmonar. A partir de este punto, la ruta de migración y desarrollo de las larvas varía dependiendo de que el perro sea joven o adulto, hembra gestante, humano u otra especie animal (Olsen, 1974).

En perros adultos, las larvas de segundo estadio que llegan al pulmón regresan al corazón y se distribuyen por todo el cuerpo, llegando principalmente al

músculo estriado, hígado, pulmones y riñones, donde permanecen en estado de latencia (Sprent, 1958, Beaver *et al.* 1986; Soulsby, 1982).

En cachorros, las larvas abandonan los capilares pulmonares, penetran en los alvéolos y migran por las vías respiratorias hasta la faringe (migración traqueal), en donde son deglutidas. Las larvas viven en el estómago hasta el décimo día post-infestación. A partir de este tiempo los parásitos son sexualmente maduros, se aparean y se inicia la producción de huevos fértiles entre las 4 y las 5 semanas post-infestación (Olsen, 1974; Soulsby, 1982).

Además de la infestación post-natal por la ingestión de huevos embrionados, los cachorros casi siempre se infestan prenatalmente en condiciones naturales. Esto último quizá bajo la influencia de las hormonas de las hembras en gestación, las larvas somáticas son reactivadas y penetran a los fetos entre los días 42 y 43 de la gestación (Douglas y Beker, 1959; Olsen, 1974). Esta última condición se ha podido reproducir experimentalmente al aplicar prolactina, hidrocortisona y oxitocina. Cuando las larvas alcanzan el hígado del feto tiene lugar una muda, transformándose en larvas de tercer estadio, las cuales, al nacer los cachorros, aparecen en los pulmones y así permanecen durante la primera semana de vida. La muda al cuarto estadio se produce durante la primera semana, cuando las larvas están en pulmones o posteriormente en estómago. Hacia el fin de la segunda semana, las larvas mudan al quinto estadio. En seguida, experimentan un rápido crecimiento y las formas adultas pueden encontrarse al final de la tercera semana. El período de prepatencia de las infecciones prenatales varía entre los 23

y los 40 días después del nacimiento (Soulsby, 1982; Kirk, 1984; Martínez, 1989).

Hasta ahora sólo se han mencionado las larvas de segundo estadio somático en perros adultos (adquiridas por la ingestión de huevos larvados). Estos perros raramente tienen parásitos adultos en el intestino. Sin embargo, después del parto, las larvas somáticas reactivadas pueden llegar al intestino de perras exentas de parásitos adultos. Estos parásitos maduran a los 25 o 26 días post-parto y persisten en un promedio de 60 días antes de ser expulsados espontáneamente (Shrand, 1964; Olsen, 1974). No todas las larvas somáticas abandonan los tejidos durante una primera gestación, pues las subsecuentes camadas pueden nacer infestadas, difiriéndose la infestación (Soulsby, 1982).

La reactivación de las larvas somáticas continúa en la perra lactante y las larvas ganan acceso a la glándula mamaria, siendo expulsada en la leche e infestando a la camada. La infestación postnatal de cachorros durante la lactancia es cuantitativamente tanto o más importante que la infestación prenatal *in útero* (Martínez, 1989).

El humano se puede infestar por la ingestión de huevos larvados de *T. canis*, las larvas evaden los alvéolos del pulmón y migran a diversos órganos como hígado, otras partes del pulmón, cerebro y ojo (Olsen, 1974; Cypes, 1982; Soulsby, 1982).

## EPIDEMIOLOGIA

La toxocariasis causada por *T. canis* es una de las principales enfermedades parasitarias de los perros. Su distribución geográfica es mundial, por su incidencia y patogenicidad al humano, es un importante problema de salud pública (Schantz, 1979; Soulsby, 1982).

En climas templados, la toxocariasis humana es probablemente la más común helmintiasis zoonótica, Beaver en 1951 describe el primer caso de Larva Migrans Visceral (LMV) debido a la larva de *T. canis*. El género *Toxocara* incluye a *T. canis* y *T. cati*, ascaridos del perro y gato, respectivamente, los cuales, sufren un proceso crónico cuando son muy jóvenes, el estado de susceptibilidad dura 6 meses, tras ese lapso, los gusanos desaparecen y automáticamente los animales se vuelven hospederos paraténicos, alojándose en: músculo esquelético, cerebro, bazo, hígado, riñón, pulmón, corazón (Gueglio, 1994).

Para el diagnóstico de la toxocariasis es esencial tener tanto datos epidemiológicos como biológicos, la elección de la terapia es difícil. Los experimentos realizados implican el ciclo de maduración del huevo de *T. canis* que ha sido llevado a cabo por de Savigny (1975). Esto ha permitido el desarrollo de muchas pruebas serológicas sensibles y específicas utilizando el antígeno excreción y secreción de *T. canis* (Ag-EST).

Debido a los determinantes antigénicos comunes entre los diferentes nemátodos tropicales y *Toxocara spp.*, la interpretación serológica puede ser difícil



sí el paciente ha vivido en áreas tropicales, es por esta razón que el inmunodiagnóstico de la toxocariasis es utilizado principalmente para pacientes en zonas templadas, especialmente en casos de eosinofilia (Gueglio, 1994).

Estudios realizados en México y en otros lugares del mundo demuestran la alta incidencia de esta parasitosis en perros (Cuadros 1 y 2). Aunque éstos se realizaron de manera aislada y presentaron diferencias metodológicas en cuanto a la manera en la que se llevaron a cabo, dejan claro que los cachorros menores de seis meses son mucho más afectados por gusanos adultos que los perros adultos. Una causa de la alta incidencia de esta parasitosis es el alto poder biótico que presentan estos parásitos, ya que las hembras depositan hasta 200,000 huevos diarios, éstos son altamente resistentes a las condiciones medio ambientales y son la fuente de infestación de perros, humanos y otros hospederos paraténicos (Soulsby, 1982; Shrand, 1964; Warren *et al.* 1977).

La infestación por *Toxocara* se presenta en casi todas las crías de perros y gatos. Estos animales a menudo viven en los hogares en los que hay niños, expulsan a diario y durante muchos meses cantidades enormes de huevos en las heces, aunque estas heces se eliminan en un lapso corto, los huevos que contienen se acumulan en el entorno, los cuales cuando están protegidos de la luz solar directa y la desecación, se desarrollan hasta alcanzar la fase infectante en unas tres semanas y persisten en el suelo muchos meses. De este modo el suelo de las zonas en las que defecan los perros y gatos con toxocariasis se consideran una fuente de infestación constante. Además, debido a la acción de las lluvias, es

posible que los huevos se transporten a lugares distantes y alcancen grandes concentraciones en algunos puntos. Unos miligramos de tierra recogida de la superficie de estos sitios puede contener centenares de huevos infestantes, lo que hace posible que cuando un niño se lleve tierra a la boca, ingiera miles de éstos y que niños mayores o adultos, al ingerir cantidades imperceptibles de material altamente contaminado adquieran infestaciones ligeras. El examen del suelo de parques y campos de juego de distintas ciudades ha demostrado la presencia de huevos infestantes de *T. canis*, que constituyen una fuente de infestación para los niños y contribuyen a los elevados índices de parasitosis en perros y gatos, así como de otros hospederos (Borg & Woodruff, 1973; Dada & Linquist, 1979; Dunsmore *et al.* 1984; Duwel, 1984; Emehelu & Kakae, 1986; Salinas *et al.* 1987; Umeche, 1989; Horn *et al.* 1990; Choo, 1990; Abo-Shehada, 1994; Holland *et al.* 1991).

**CUADRO No. 1 Frecuencia de *T.canis* en perros de diferentes lugares del mundo.**

LUGAR	AÑO	# PERROS EXAMINADOS	TIPO DE EXAMEN	FRECUENCIA (%)
Canadá	1975	239	CPS	43.5
Accra, Ghana	1975	100	N	40.0
Londres, Ing.	1977	1000	CPS	7.2
Indiana, EEUU	1978	108	N	18.3
Halifax, Escocia	1978	474	CPS	26.6
Iowa st. EEUU	1978	33594	CPS	3.0
Zaria, Nigeria	1979	180	CPS	41.1
Pretoria, Sudafrica	1979	253	N	32.0
Bangkok, Tailandia	1980	107	CPS	6.5
Praga, Checoslovaquia	1982	500	CPS	4.2
Chicago, EEUU	1982	846	CPS	4.3
Sabah, Malasia	1984	175	CPS	81.0
Freetown, Sierra Leona	1984	2938	CPS	9.0
Hessian Necker Valley, Alemania	1985	155	CPS	5.8
Calabar, Nigeria	1985	254	CPS	26.7
Tenerife, España	1985	463	CPS	16.2
Baghdad, Irak	1986	20	N	40.0
Atlanta, EEUU	1987	143	CPS	12.0
La Plata, Argentina	1988	2895	CPS	14.2
Curasao, Brasil	1988	133	CPS	7.5

Grecia	1988	232	CPS	22.4
Asturias, España	1989	354	CPS	1.1
Kingston, Jamaica	1989	141	CPS	8.0
Belgica	1991	2324	CPS	17.4
Chinamora, Zinbabwe	1991	42	N	9.0
ankara, Turquía	1992	121	CPS	13.2
Ankara, Turquía	1992	269	CPS	26.0
		33	N	9.0
Montenegro, Yugoslavia	1992	15	N	30.0
Nairobi, Kenia	1993	156	N	3.0
Oklahoma EEUU	1993	21583	CPS	4.0
Dakar, Senegal	1993	72	N	8.7
Ivaraki, Japón	1993	153	N	9.4
Hannover, Alemania	1993	3329	CPS	6.9
Melbourne, Australía	1993	493	CPS	17.4
Dublin, Irlanda	1994	350	CPS	82.6
Kansas, EEUU	1994	218	CPS	4.0
Lugano, Suiza	1995	217	CPS	17.0
Sao Paulo, Brasil	1995	314	CPS	16.6
Ibaraki, Japón	1997	916	N	79.9
Amsterdan, Holanda	1997	272	CPS	2.9
Taimel, Taiwan	1997	96	N	27.0

Frecuencia de *T. canis* en perros de diferentes lugares del mundo. N= Necropsia, CPS=Coproparásitoscópico, tomado de Alba H. F., 1999.

**CUADRO No. 2 Frecuencia de *T. canis* en diferentes lugares de la República Mexicana.**

LUGAR	AÑO	# PERROS EXAMINADOS	TIPO DE EXAMEN	FRECUENCIA (%)
México, D.F.	1955	100	N	30.0
México, D.F.	1967	120	CPS	93.0
México, D.F.	1969	50	CPS	20.0
Veracruz, Ver.	1970	300	CPS	9.6
Monterrey, N.L.	1972	100	N	5.0
Guadalajara, Jal.	1973	450	CPS	16.2
Cuernavaca, Mor	1974	719	CPS	15.0
Aguascalientes	1983	294	CPS	47.6
México, D.F.	1986	200	CPS	21.0
México, D.F.	1987	176	N	58.5
México, D.F., Pungarabato y Cutzamala, Gro.	1989	106	CPS	37.7
Veracruz, Ver.	1989	447	CPS	74.0
México, D.F.	1990	463	CPS	4.9
México, D.F.	1992	240	CPS	3.6
Cullacán, Sin.	1996	100	CPS	7.0
México, D.F.	1996	47	CPS	100.0
México, D.F.	1998	100	N	15.0
México, D.F.	1998	470	CPS	19.8

Frecuencia de *T. canis* en diferentes lugares de la República Mexicana. N=Necropsia, CPS=Coproparasitoscópicos, tomado de Alba H. F., 1999.

Estudios recientes encontraron una relación entre la edad, el sexo, localización y factores de riesgo incluyendo la geofagia y las mascotas que son factores significantes con la infestación de *Toxocara canis*, de esta forma, los hombres son más susceptibles a ser infestados que las mujeres; esto es debido a que los hombres menores de 10 años tienen un mayor riesgo de infección de toxocariasis ya que éstos tienen por costumbre jugar en zonas con tierra que posiblemente están contaminadas con huevos de *Toxocara canis* y tener mayor contacto con mascotas que las niñas (Bass J.L. *et al.* 1987).

### **MECANISMOS DE ACCION PATOGENA**

El gusano adulto de *T. canis* ejerce acción expoliatriz, quimófaga, selectiva por algunos nutrientes como la vitamina C, carbohidratos y péptidos. Las infestaciones masivas, provocan un mayor o menor grado de obstrucción intestinal y a veces del colédoco, provocando estasis biliar, reflejándose en una mala digestión, las larvas también provocan irritación en diferentes tejidos como: pared intestinal, parénquima hepático, cardiaco y pulmonar con ruptura de capilares y alvéolos (Quiroz, 1988).

En forma paralela las larvas ejercen acción expoliatriz, histófaga y de líquidos tisulares, acción mecánica obstructiva, además producen un proceso de inflamación por la secreción activa de antígenos llamados antígenos excreción y secreción (Ag-EST) que pueden provocar anafilaxia (Quiroz, 1988). Las lesiones

provocadas por las larvas son el resultado de una exagerada respuesta inmunológica contra los Ag-EST y la acción traumática que produce la larva al migrar por los tejidos (Glickman *et al.* 1987).

En ratones infestados experimentalmente con una dosis media de 1,000 hTc (huevos larvados de *T. canis*), se han encontrado lesiones en el intestino y presencia de larvas al día uno después de la infestación, el hígado también es afectado en el primer día, pulmón y riñones en el día uno y dos respectivamente, músculo esquelético en el día tres y SNC en el día cuatro (Olson, 1966). En otro estudio, al inocular nueve monos macacos con dosis de 100,000 a 400,000 hTc, se encontró que seis de ellos presentaron poca o moderada invasión larvaria en tejidos y SNC, por lo que se generó moderada inapetencia y depresión por algunas semanas. Los otros tres monos sufrieron un cuadro grave, encontrándose, un gran número de larvas viables no solo en la cavidad torácica y abdominal, también, en el SNC. El examen hematológico de los animales infestados reveló una reducción transitoria del conteo de eritrocitos y marcada eosinofilia, incremento en la concentración de globulinas, bajos niveles de albúmina y niveles elevados de transaminasas séricas (Tomimura *et al.* 1976) . Existen evidencias experimentales de larvas que han persistido viables hasta por diez años en tejido vivo de primates (Soulsby, 1982; Bowman, 1987).

## **CUADRO CLINICO EN PERROS**

Cuando el género *Toxocara* infesta y produce enfermedad a ésta se le llama toxocariasis, la cual afecta a los cachorros de perros y gatos más que a los animales adultos (Lapage, 1976). Los cachorros sufren retraso en el desarrollo y presentan un abdomen abultado, su piel es deslúcida y áspera; hay emaciación, signos de anemia, inquietud y diarrea o constipación. Puede producirse la muerte por obstrucción intestinal aguda (Soulsby, 1982).

Otros signos relacionados pueden ser: tos con descargas nasales que pueden ser mortales o bien desaparecer en un período de tres semanas. En casos de infestación prenatal masiva, hay gran cantidad de gusanos en el intestino y estómago. En algunos casos se pueden presentar signos nerviosos consistentes en convulsiones de duración limitada provocadas por la presencia de las larvas migrando en el sistema nervioso central (Quiroz, 1988; Tomimura, 1976).

El examen hematológico de animales infestados revela un conteo reducido de eritrocitos y marcada eosinofilia, incremento en la concentración de globulinas, bajos niveles de albúmina y niveles elevados de transaminasas séricas(Soulsby, 1987). Las principales manifestaciones clínicas son astenia, dolor gástrico y enfermedades pulmonares.



## **CUADRO CLINICO EN HUMANOS**

Muchas de las infestaciones en humanos son asintomáticas, presentando sólo eosinofilia y serología positiva. Las dos principales formas clínicas de la toxocariasis humana son:

- Síndrome de Larva Migrans Visceral
- Síndrome de Larva Migrans Ocular u Oftálmica

Y un tercero, llamado Síndrome benigno o toxocariasis encubierta, el cuál ha sido descrito recientemente (Magnaval *et al.* 1991). En éste, la sintomatología no es específica, consiste en debilidad crónica asociada con moderada eosinofilia pero persistente. (Gluelio *et al.* 1994).

## **SINDROME DE LARVA MIGRANS VISCERAL**

El síndrome de larva migrans visceral descrita por Beaver en 1952, es usualmente asociada con la historia de pica, hepatomegalia, hiperglobulinemia, fiebre, dolor abdominal y expectoraciones, el sistema nervioso central se ve implicado, hay eosinofilia persistente. La mayoría de los pacientes se recuperan y solo algunos llegan a morir (Dunn, 1983; Beaver *et al.* 1986). En el hígado, la invasión larvaria causa una reacción del hospedero con la formación de granulomas, la hepatomegalia parece ser una condición característica del padecimiento.

La causa más frecuente del síndrome de LMV en humanos es *T. canis*, sin embargo otros parásitos como son: *T. cati*, *Capillaria hepatica*, *Gnathosoma spp*, *Dirofilaria spp.* y *Ascaris lumbricoides* la pueden llegar a producir, (Glickman et al. 1987).

El primero en sugerir que las larvas de nemátodos que afectan naturalmente a los animales podrían infectar a los humanos y causar enfermedad fue Fulleborn en 1921 (Glickman y Shofer, 1987). Después de casi 30 años Merck, en 1950 identificó larvas de nemátodos ascaroideos en biopsias hepáticas de niños con un síndrome caracterizado por eosinofilia, hepatomegalia, infiltración pulmonar y silvidos (Glickman y Shofer, 1987). Beaver y cols. en 1951 identificaron que la causa más frecuente de esta enfermedad eran larvas de *T. canis* y propusieron el término de larva migrans visceral.

En México el primer caso comprobado de toxocariasis humana (LMV) fue reportado en 1960 por Baez y Alemán, mediante un examen histopatológico de una muestra de tejido hepático de una paciente de 7 años de edad.

Clínicamente, la gravedad de la enfermedad varía mucho según el número de huevos larvados ingeridos, la duración de la infestación, la presencia de larvas en lugares críticos y otros factores aun no entendidos (Beaver *et al.* 1986). La mayoría de las infestaciones humanas por *T. canis* cursan asintóticamente o con síntomas muy leves (Bass *et al.* 1987). El signo más notorio es la eosinofilia crónica, algunos estudios demuestran que las secreciones y excreciones de las larvas del parásito estimulan la producción de interleucina 5 (IL-5) que es la responsable de la eosinofilia (Coffman *et al.*, 1989; Kusama *et al.*, 1995; Sugane y Ohima, 1982; Yamaguchi *et al.*, 1990).

Clínicamente algunos pacientes presentan manifestaciones de inflamación pulmonar y tos (Markell *et al.* 1986), otros cursan sin manifestaciones pulmonares (Beaver *et al.* 1986). Se ha encontrado que pacientes con asma tienen más frecuentemente anticuerpos de la clase IgE que controles sin manifestaciones asmáticas (Dosowitz, 1981; Buljs *et al.* 1994; Lokman-Hakim, *et al.* 1997). Algunos pacientes pueden presentar edema en nódulos linfoides sin otras manifestaciones (Amir *et al.* 1995). Cuando las larvas alcanzan la circulación general pueden dirigirse a los riñones, en donde hasta ahora no se han detectado en la persona viva y solo hay reportes de necropsia en personas que murieron por otras causas (Dunn, 1983). En un estudio realizado por Huntley en 1965, se encontró que en el

28% de los pacientes con LMV tenían antecedentes de convulsiones. Otros reportes indican que la infestación por *T. canis* no se asocia frecuentemente a epilepsia (Slickman *et al.* 1979; Woodruff *et al.* 1996). Además se ha asociado la seropositividad a *T. canis* con el bajo desarrollo de la inteligencia en niños (Nelson *et al.* 1996).

## SÍNDROME DE LARVA MIGRANS OCULAR

La toxocariasis ocular se observa generalmente en ausencia de otros signos y síntomas de LMV, se piensa o considera que este síndrome se presenta en personas que han sido expuestas a un número pequeño de larvas, las cuales migran libremente por varios órganos sin montar una respuesta inmune importante y accidentalmente llegan al ojo (Schantz *et al.* 1979; Glickman, 1987).

Larva migrans ocular (LMO) se define como la presencia y daño producido por larvas de *T. canis* en el ojo, este síndrome ocular fue descrito en 1950 por Wilder, el cual encontró larvas de *T. canis* en 24 de 46 pseudogliomas en ojos enucleados por endoftalmitis con aparente retinoblastoma (Wilder, 1950; Glickman *et al.* 1979; Glickman y Shofer, 1987; Small *et al.* 1989; Liolet *et al.* 1992). El primer caso de LMO en México fue reportado en 1966 por De Buen, el cual describió como una endoftalmitis causada por nemátodos. Este caso era una niña de 5 años de edad, la cual tenía falta de agudeza visual y desviación del ojo izquierdo hacia fuera; después en 1982 Equihua reportó a una niña de 9 años de edad con un diagnóstico de atrofia óptica bilateral, como secuela de toxocariasis en el sistema nervioso.

La toxocariasis ocular puede generar varios cuadros clínicos, ninguno de ellos patognomónicos, las manifestaciones que se presentan son falta de agudeza visual, estrabismo, leucorrea, irritación ocular y endoftalmitis (Shields, 1984). Las lesiones detectadas en ojos han sido granulomas ubicados cerca del disco óptico o

intrarretinales, retinocoroiditis posterior y periférica, panuveítis, papilitis óptica, uveítis, deformación o desprendimiento de retina, membranas idiopáticas epiretinales, infiltración de células inflamatorias en humor vítreo, lesiones hemorrágicas y neuroretinitis como secuela de migración de larvas en retina (Smith y Greer, 1971; Shantz *et al.* 1979; Gass y Braunstein, 1983; Sorr, 1984; Margo *et al.* 1986; Glickman, 1987; Desai *et al.* 1996).

El síndrome de LMO es una enfermedad típicamente unilateral que afecta principalmente a los niños, resultante de una invasión del ojo por una o más larvas, ocasionalmente esto puede ocurrir en forma bilateral en los adultos. La localización y el número de larvas dentro del ojo, determinan la naturaleza y extensión de la enfermedad (Glickman y Shofer, 1987).

## **ANTIGENOS DE EXCRECION-SECRECION (Ag-EST)**

A falta de evidencia parasitológica en la toxocarías, se ha tenido que buscar técnicas para poder diagnosticar y éstas han sido métodos inmunológicos. Ensayos de serodiagnósticos altamente sensibles y específicos han sido desarrollados usando propiedades excretoras y secretoras del parásito (de Savigny, 1975; Glickman *et al.* 1987)

De Savigny en 1975 desarrolló un método para obtener Ag-EST. En éste se incuban larvas (L2) de *T. canis* en un medio mínimo esencial, después de una semana el sobrenadante contiene proteínas que pueden ser reconocidas antigénicamente por los hospederos; estas proteínas ya habían sido identificadas en un experimento *in situ* encontrando precipitados inmunes en los orificios oral y anal de L2, a las cuales se les llamó antígenos de excreción y secreción (Ag-EST) (de Savigny, 1975). La L2 de *T. canis* tiene una gran capacidad para producir Ag-EST *in vitro* (Maizels *et al.* 1987). Diferentes autores han descrito modificaciones de estos medios de cultivo y han descrito diferentes antígenos de estos sobrenadantes.

Por medio de técnicas como lo son la electroforesis y el Western Blot se han analizado a los Ag-EST, y han demostrado que estos antígenos constituyen una serie de complejos glucoconjugados que presentan distintas características bioquímicas (Meghji y Maizels, 1986) y son de gran importancia en el diagnóstico de la toxocarías en ausencia de evidencia parasitaria (Badley *et al.* 1987). Los

Ag-EST son glicoproteínas que tienen dos azúcares importantes la N-acetilglucosamina y la galactosa, en menor abundancia están el arabinol, manosa, N-acetilglucosamida, glucosa, fucosa y xilosa (Meg: ji y Maizels, 1986).

A través de una técnica usando anticuerpos monoclonales (IFAT) se han determinado los dos principales sitios donde se encuentran los Ag-EST, estos son, las glándulas esofágicas, las cuales tienen salida al esófago y por consecuencia a la cavidad oral y una larga rama de células columnares secretoras que desembocan a el poro excretor en el exterior de la larva, por la naturaleza de estos órganos dentro de la larva, se ha propuesto que en estos lugares se producen los Ag-EST (Page *et al.* 1992b).

Los carbohidratos anteriormente mencionados, se encuentran en diferentes proporciones en los Ag-EST formando epitopos que están ligados al complejo protéico del antígeno de manera fuerte o débil. En diferentes estudios se han determinado ocho epitopos diferentes por medio de anticuerpos monoclonales, indicando que la respuesta inmunológica montada está dirigida principalmente hacia los complejos glicosilados de la molécula (Maizels *et al.* 1987), también se han encontrado lípidos pero contra éstos no hay una respuesta inmunológica y aún no sea determinado cual es su papel biológico (Niedfeld *et al.* 1993).

La adaptación fisiológica del parásito al hospedero, está en la liberación de productos antigénicos como lo son los Ag-EST, ya que éstos interfieren en los mecanismos inmunes del hospedero, afectando la adherencia inmunomediada de eosinófilos (Page *et al.* 1992b). Jane *et al.* en 1987 confrontó sueros positivos a



toxocariasis con Ag-EST purificados, dando como resultado una neutralización de algunos componentes del complemento e Inmunoglobulinas del tipo IgG que son específicas con *T. canis* y que participan en la fijación de elementos inmunológicos a la superficie de la larva. A los Ag-EST se les ha atribuido la respuesta inmune exacerbada, la eosinofilia y la activación policlonal de linfocitos B productores de IgE (Meghji y Maizels, 1986).

El éxito de estos parásitos para evadir la inmunidad puede deberse en parte a su habilidad para hacer un recambio de antígenos de superficie, anticuerpos enlazados a ésta y granulocitos adherentes *in vitro* e *in vivo*. La relación entre antígenos de superficie del parásito y la respuesta inmune del hospedero a éstos determinantes es crucial para las consecuencias de la infección. Los antígenos expuestos en la superficie de la larva infectiva de *T. canis* no están asociados íntegramente con la cutícula, sino que forman parte de una cubierta lábil de superficie, distal de la epicutícula, que ya se desprende con facilidad cuando se enlaza con anticuerpos específicos (Page *et al.* 1992b)

Los análisis y caracterización de los Ag-EST han demostrado discrepancias en el número de componentes y su peso molecular detectado por electroforesis en gel de poliacrilamida y filtración en gel, estas diferencias pueden ser altamente atribuibles a diferencias en la metodología, Speiser y Gottstein en 1984 reportaron diferencias en 2 lotes de Ag-EST obtenidos y analizados por el mismo protocolo en dos laboratorios separados. Las bases biológicas de la variación aparente no son conocidas y además no parecen afectar la sensibilidad de los antígenos cuando son

utilizados en el serodiagnóstico, (Meghji y Maizels, 1986; Badley *et al.* 1987)

En 1987, Badley detectó 15 bandas protéicas en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Las bandas más abundantes fueron las 76, 78 y 88 kDa seguidas de las bandas de 29 y 34 kDa. Otros autores mencionan que las bandas más frecuentes son las 32, 55, 70, 120 y 400 kDa (Maizels *et al.* 1984; Meghji y Maizels, 1986; Badley *et al.* 1987).

Por medio de la técnica de Western Blot se han encontrado dos patrones de Ag-EST que son reconocidos por sueros humanos positivos a toxocariasis; el primero denominado High Molecular Weight (HMW) formado por antígenos de 200, 147 y 132 kDa y el segundo llamado Low Molecular Weight (LMW) formado por antígenos de 24, 28, 30 y 35 kDa; este último patrón presenta mayor especificidad hacia *T. canis* que el patrón HMW, ya que éste puede cruzar antigénicamente con antígenos de otros helmintos como lo son: *Strongyloides sp.*, *Fasciola hepatica*, *Ascaris suum*, *Toxascaris leonina*, *Schistosoma sp.* y *Onchocerca sp.* (Magnaval *et al.* 1991, Cuellar *et al.* 1995; Stevenson y Jacobs, 1977; Nicholas *et al.* 1984). En otro estudio se encontró que los Ag-EST de 32, 70 y 120 kDa están unidos a la cutícula de las larvas de *T. canis* (Page *et al.* 1992).

## MODELOS EXPERIMENTALES

En el estudio de la toxocaríasis se han empleado modelos experimentales de diferentes especies de animales, entre las cuales podemos mencionar a los siguientes: ratones (Abo-Shelada & Herbert, 1984; Dunsmore *et al.* 1983; Ohima, 1961), ratas (Olson & Rose, 1966), monos (Tomimura *et al.* 1976), pollos (Gavin, 1964; Agnihotri *et al.* 1987; Maruyama *et al.* 1994b), codornices (Nakamura *et al.* 1991; Maruyama *et al.* 1994a), hámster (Agnihotri *et al.* 1987), cobayos (Bujis *et al.* 1994), cerdos (Stevenson & Jacobs, 1977), jerbos (Flores-Alatorre, 1993) y conejos (Glickman & Shofer, 1987). El modelo más utilizado ha sido el ratón ya que tiene las siguientes ventajas en comparación con los demás modelos experimentales: cepas singénicas, bajo costo, facilidad de mantenimiento y reproducción.

Para estudiar la respuesta inmune humoral, particularmente hacia antígenos de excreción y secreción (Ag-EST) de *T. canis* diferentes investigadores han empleado diversas técnicas inmunológicas, por ejemplo: Western Blot, ELISA, electroforesis, anticuerpos monoclonales, etc. En lo que se refiere a los conejos se han utilizado como testigos en diferentes estudios, por ejemplo, en 1987 Badley y cols., utilizaron un conejo blanco Nueva Zelanda inmunizado con Ag-EST, del cual obtuvieron suero y le determinaron el título que contenía por medio de la técnica de ELISA, en otro estudio realizado por Magnaval en 1991, se utilizó un conejo infectado experimentalmente por vía oral con 2,000 huevos larvados de *T. canis*

(hITc), al cual posteriormente le determinó el título de anticuerpos en suero por la técnica de ELISA.

En 1987 Maizels y cols., inmunizaron conejos blancos Nueva Zelanda con Ag-EST para obtener la Ig-G sérica la cual sería utilizada para la detección de los Ag-EST circulantes en ratón por medio de la técnica de ELISA.

En un trabajo complementario al presente (Rincón, 2001) se determinó por la técnica de Western Blot los antígenos reconocidos por sueros de conejos infestados experimentalmente con larvas de *T.canis*, en este trabajo se observó un reconocimiento secuencial de los antígenos, el día 15 p.i. se reconoce un antígeno de 66 kDa de P.M. El día 22 p.i. se reconocen dos antígenos, éstos tienen un P.M. de 55 y 66 kDa respectivamente; entre los días 29 y 50 p.i. se reconocen bandas de 32, 35, 45, 55, 66 y 120 kDa. A partir del día 57 y hasta el final del experimento se observaron bandas de 32, 35, 45, 55, 66, 120 y 400 kDa de peso molecular, sin embargo, no hay un estudio que reporte sobre la cinética de producción de anticuerpos contra antígenos de excreción y secreción de las larvas de *T. canis* en conejos.

## JUSTIFICACIÓN

*Toxocara canis* es uno de los nemátodos más comunes que afectan a los perros, principalmente a cachorros, sin embargo su estudio es más importante debido a los problemas de zoonosis que presenta. Este parásito se transmite al hombre por la ingestión de huevos larvados provenientes de la materia fecal de perros afectando principalmente a niños, esta enfermedad se ha considerado un problema de salud pública. Uno de los mayores problemas que se presenta en la toxocaríasis es en el diagnóstico, ya que por técnicas parasitológicas no se puede detectar en el humano y por esto se ha implementado el inmunodiagnóstico, utilizando los antígenos de excreción y secreción de la larva (L2) de *T. canis*.

Existe un kit comercial de ELISA para el diagnóstico de la toxocaríasis humana, en donde el suero control positivo es de conejos infestados experimentalmente, sin embargo, no se menciona dosis de infestación o el tiempo después de la infestación en que se obtuvo el suero, tampoco existe en la literatura reportes de cinéticas de producción de anticuerpos en conejos ni los antígenos que reconoce el suero de estos animales.

Para desarrollar una prueba comercial de ELISA en México y no depender tecnológicamente del extranjero se requiere de controles positivos para esta prueba, ante la dificultad de conseguir suero humano positivo a toxocaríasis en cantidades suficientes para dichas pruebas comerciales, se podría también recurrir como control positivo al suero de conejos infestados experimentalmente, por lo

que en este trabajo se pretende evaluar la cinética de producción de anticuerpos y así determinar que día o días los títulos de anticuerpos contra Ag-EST son mayores y por lo tanto son los más adecuados para la obtención del suero.

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL**

- **Contribuir al desarrollo de una herramienta útil para el diagnóstico de la toxocariasis humana.**

### **PARTICULARES**

- **Obtener y purificar antígenos de secreción y excreción de la larva L2 de *Toxocara canis*.**
- **Estudiar el efecto de la inoculación en conejos de diferentes dosis de huevos larvados de *Toxocara canis* sobre la producción de anticuerpos séricos.**
- **Evaluar mediante la técnica de ELISA la cinética de producción de anticuerpos séricos contra antígenos de secreción y excreción en conejos inoculados experimentalmente con diferentes dosis de h1Tc.**

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Lugar de realización**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Parasitología y en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Cuatitlán Izcalli, Estado de México.

### **Animales**

Se utilizaron 10 conejos machos de raza Nueva Zelanda de aproximadamente 1 mes de edad y 1kg de peso corporal. Se hicieron dos lotes, el lote # 1 compuesto de 5 conejos (identificados con los números 1 al 5 respectivamente) y el lote # 2 compuesto por 5 conejos (identificados del número 6 al 10 respectivamente). Se alimentaron con alimento balanceado conegina y agua potable *ad libitum*, se colocaron en jaulas especiales y el mantenimiento de limpieza y alimentación fue diario.



## **Obtención y Mantenimiento de hITc**

Se realizaron necropsias a cachorros caninos de uno a tres meses de edad provenientes del Centro Antirrábico de Cuautitlán, Estado de México, se disecó el intestino de los cuales se obtuvieron los gusanos adultos hembras. A los gusanos obtenidos se les realizó una disección a nivel del útero para obtener los huevos. Una vez obtenidos los huevos; se utilizó un colador de poro fino para eliminar los restos y membranas del parásito; los huevos se separaron por centrifugación a 2000rpm durante 5 minutos desechando el sobrenadante por decantación, la pastilla se resuspendió en una solución de formol al 2% y se colocó en una caja Petri , se incubaron a 37° C durante 15 a 21 días (de Savigny, 1975, Bowman et al. 1987). Se verificó el porcentaje de huevos larvados, así como la viabilidad mediante la observación del movimiento larvario al microscopio compuesto.

## **Inoculación de los animales con hITc**

Una vez transcurrido el periodo de incubación, se verificó el desarrollo de la larva infestante L2, por medio de observación microscópica; se colocaron en un portaobjetos 20µL de la solución de formol al 2% de las cajas petri incubadas, se contaron los huevos larvados de *T. canis* (hITc) y los no larvados, se multiplicó por el factor 50 para obtener el número de huevos larvados y no larvados en 1mL, se sacó el porcentaje de huevos larvados y no larvados, este proceso se realizó 10

veces, para obtener el promedio; al tener un porcentaje mayor al 70% de huevos larvados de *T. canis* (hITC), se preparó una suspensión de hITC con Solución salina Fisiológica, la cual se utilizó para la inoculación de los animales. Al lote # 1 se le inoculó una carga de 5,000 hITC, al lote # 2 se le inoculó una carga de 10,000 hITC por vía oral con una sonda esofágica en el día cero y en el día 105 post-infección.

### **Obtención y almacenamiento de suero de conejo**

Se extrajo una muestra sanguínea por punción venosa a los conejos de ambos lotes en los días 0, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85 y 127 post-infección para la obtención de suero, las muestras sanguíneas se colocaron en baño maría a 37° C, se removió el coágulo con un aplicador de madera, se centrifugó a 2500 rpm durante 2 minutos, el suero se colocó en tubos ependorf los cuales se rotularon con el número de lote, identificación del conejo y fecha, para su almacenamiento se congeló a -20° C.

### **Obtención y mantenimiento de larvas infestantes (L2)**

La obtención de las larvas se efectuó siguiendo el método de Savigny y modificado por Bowman. Se partió teniendo una suspensión de hITC en solución salina fisiológica, la cual se colocó en un tubo de plástico de 60ml, se realizaron 4 lavados de la siguiente manera: se centrifugó a 4500rpm durante 5 minutos, se

decantó el sobrenadante y la pastilla se reconstituyó en solución salina fisiológica estéril; finalmente se reconstituyó la pastilla con solución de cloro al 1%, en donde se dejó reposar durante 10 minutos, después se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante; en la campana de flujo laminar la pastilla se resuspendió con medio de cultivo RPMI-1640, glucosa 1% estéril y se cambió el tubo de plástico de 60ml, se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos, realizando este último paso 4 veces y en condiciones estériles (de Savigny, 1975; Bowman *et al.* 1987).

Se resuspendió la pastilla con medio RPMI-1640 con agitación por medio de una plancha magnética durante 15 a 20 minutos, para inducir la eclosión de la larva infestante L2, se monitoreó por observación microscópica el porcentaje de eclosión de L2, al tener una eclosión  $\geq 80\%$  se detuvo la agitación y se transfirieron las larvas a un microaparato de Baermann estéril, compuesto de un tubo de plástico y un cono hecho con cuatro capas de papel limpia lentes, colocado de tal forma, que tenga contacto con el medio RPMI-1640, se incubó a 37° C durante 24 horas en un estufa de CO<sub>2</sub>, posteriormente las larvas viables se encontraban en el fondo del tubo de plástico, se realizó un conteo de larvas viables, se recolectaron y se distribuyeron en cajas Falcon ( $\pm 10,000$  larvas viables (L2)/10ml de medio RPMI-1640 glucosa 1%), se rotularon las cajas Falcon con fecha, y se incubaron a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

## **Obtención de Ag-EST**

Cada semana se colectó el medio RPMI-1640 glucosa 1% de las cajas Falcón por medio de sedimentación por gravedad y aspiración aséptica, se colectaron 8 ml aproximadamente de medio conteniendo las proteínas liberadas por las larvas L2 de *T. canis* a las cuales se les conoce como Ag-EST o antígenos de excreción-secreción. Después se restituyó medio de cultivo fresco a las cajas Falcon.

Con el medio colectado semanalmente se formó un lote, el cual se congeló a  $-20^{\circ}$  C, después por medio de una ultrafiltración con un sistema AMICON utilizando una membrana de  $0.2\mu$ , se concentró el medio RPMI-1640 glucosa 1%, se formaron alícuotas de  $500\mu$ L y se almacenaron en tubos ependorf, se congelaron a  $-20^{\circ}$  C hasta su utilización.

La cantidad de proteínas (Ag-EST) se cuantificaron por el método de Bradford, en un laboratorio externo (Laboratorios VALAR,S.A.).

## **Electroforesis de proteínas (SDS.PAGE)**

-Para la caracterización del perfil de proteínas de los Ag-EST se utilizaron geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS.PAGE), la separación de los componentes protéicos se llevó a cabo con algunas modificaciones por el método descrito por Laemli en 1970.

Se preparó un gel separador de acrilamida al 10%, 0.375M Tris de pH=8.8 y un gel concentrador de acrilamida al 4% 0.125M Tris de pH=6.8 por medio de una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN II electrophoresis cell (Bio-Rad Labs.), el tamaño del gel fue de 7cm de largo, 8 cm de ancho y 0.5 mm de espesor, se corrió el Ag-EST con un carril de comparación con marcadores de peso molecular (MPM) preteñidos a 120V con 120mA para el gel concentrador por 15 minutos aproximadamente y a 100V con 70mA para el gel separador durante 75 minutos.

Una vez terminado el corrimiento electroforético se realizó una tinción con nitrato de plata; los PM de los antígenos obtenidos se determinaron por medio de una curva patrón, graficando el logaritmo del PM de los marcadores preteñidos, contra su migración electroforética a través del gel expresado en centímetros. Los PM de los marcadores de peso molecular son: Miosina 203kDa,  $\beta$ -galactosidasa 118kDa, albúmina sérica bovina 86kDa; ovalbúmina 51kDa; anhidrasa carbónica 34kDa; inhibidor de la tripsina 29kDa; lisosima 19kDa y aprotinina 7.5kDa.

## **Ensayo inmunoenzimático (ELISA)**

Las pruebas se realizaron por triplicado de acuerdo a la técnica descrita por Colligan y cols. en 1994 con algunas modificaciones.

Se sensibilizaron las placas de poliestireno de 96 pozos marca NUNC con 50µl de Ag-EST de una concentración de 1.25µg/ml durante 18 a 24 horas a 4 ° C, posteriormente se lavó 3 veces con PBS cada 5 minutos y 1 vez con agua destilada. Se bloqueó la placa toda la noche a 4 ° C con 200 µl de una solución de albúmina sérica bovina al 3% en BCB (Buffer de carbonatos-bicarbonatos), posteriormente se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0.1% y una vez con agua desionizada. A continuación se agregaron 50µl de tres diferentes diluciones de los sueros de conejo en PBS (1:50, 1:100, 1:500), las placas se incubaron a 37 °C durante 2 horas, enseguida las placas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con PBS-Tween 20 al 0.1% y una vez con agua desionizada por 5 minutos.

Posteriormente las placas fueron incubadas una hora a 37 °C con 50 µl de un anticuerpo secundario (α-IgG de conejo) marcado con peroxidasa a una dilución de 1:8000 . Después de lavar tres veces con PBS-Tween 20 al 0.1% y una vez con agua desionizada, se adicionaron 100µL de solución desarrolladora de color (solución reguladora de citratos, OPD, y agua destilada), las placas se mantuvieron en obscuridad por un periodo de diez minutos, después se adicionó 50µL de solución de paro (ácido o-fosfórico), se agitaron las placas por 25 segundos y se leyeron en un lector de ELISA Multiskan Ascent a una longitud de onda de 492nm.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los principales problemas que se presenta para el diagnóstico de la toxocariasis en humanos es la falta de eliminación de fases parasitarias detectables en materia fecal u otras secreciones por las técnicas parasitológicas convencionales. Lo anterior, ha estimulado el desarrollo de técnicas de inmunodiagnóstico como ELISA.

Durante algún tiempo se utilizaron antígenos solubles de adultos de *T. canis* o de la ruptura de huevos larvados para el inmunodiagnóstico de la toxocariasis (Cypess et al. 1977; Enayat & Pezeshki, 1977; Smith et al. 1982). En 1975 DeSavigny reportó que larvas 2 de *T. canis* mantenidas durante largos periodos en medios nutritivos libres de suero y suplementados con glucosa, producían grandes cantidades de antígenos de secreciones y excreciones de *T. canis* (Ag-EST). Posteriormente se demostró que estos antígenos tenían una especificidad mayor que los antígenos solubles o totales (Magnaval et al. 1991; Sugane & Ohima, 1983). Por lo anterior, en el presente trabajo se utilizaron Ag-EST que son considerados actualmente los de mayor especificidad.

Se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos de larvas, se concentraron y se consideraron como los Ag-EST. Se obtuvieron 8 cajas con 10,000 larvas viables cada una aproximadamente, las cuales se mantuvieron por un período de más de 4 meses en condiciones de esterilidad y con un bajo porcentaje de mortalidad, semanalmente se recolectó un promedio de 64 ml de sobrenadante,

los cuales se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , al terminar el periodo de recolección se tenían un volumen de aproximadamente 500ml de sobrenadante, el cual se concentró hasta un volumen aproximado de 20 ml, obteniendo una concentración final de  $100\mu\text{g}$  de proteína /ml, con una producción de  $1\eta\text{g}$  de proteína por larva por día, de Savigny en 1975, reportó que las larvas se pueden mantener viables por más de 18 meses con una producción de 4 a  $8\mu\text{g}$  de proteína por larva por día. La diferencia se puede deber al tipo de medio de cultivo empleado, ya que de Savigny utilizó un medio mínimo esencial, y en este trabajo se utilizó medio RPMI-1640, la diferencia entre estos medios es que el utilizado por de Savigny proporciona a las larvas una cantidad menor de nutrientes que el utilizado para este trabajo. En otro estudio, realizado por Smith en 1983, reporta una concentración de proteína de  $0.2\text{mg/ml}$ , es decir  $200\mu\text{g/ml}$ , esto puede deberse a que utilizaron huevos embrionados totalmente y los suspendieron en PBS hasta obtener el segundo estado larvario (L2), después las larvas (L2) fueron mantenidas *in vitro* con un medio mínimo esencial de Eagle balanceado con sales de Hank's. Para evaluar la pureza e integridad de dichos antígenos, éstos se corrieron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se tiñeron con nitrato de plata. En este trabajo se identificaron un total de 11 bandas, cuyos pesos moleculares fueron determinados con una curva patrón dada por marcadores de peso molecular de referencia. Las bandas detectadas correspondieron a los siguientes pesos moleculares 200, 120, 38, 35, 32, 28, 24, 23, 16 y 3 bandas de menos de 7.5 kDa., no se observó degradación de las bandas proteicas. Las bandas mas



fuertemente teñidas fueron las de 23 y 24 kDa de peso molecular, lo que indica que son las proteínas más frecuentes del aislado.

La mayoría de las bandas encontradas corresponden a las reportadas por otros autores (Alba, 1999; Maizels et al. 1984; Meghji & Maizels, 1986), aunque no son idénticas. El análisis y la caracterización de los antígenos obtenidos en cultivo siempre ha tenido variaciones y discrepancias entre diferentes autores en cuanto a su número de componentes y peso molecular, ésto puede deberse en gran parte a diferencias en las metodologías empleadas. Se han reportado diferencias entre dos lotes de Ag-EST obtenidos y analizados bajo el mismo protocolo en dos laboratorios distintos. La variación de los Ag-EST obtenidos en diferentes lugares no tiene una base biológica definida, aunque aparentemente no afecta la sensibilidad de las pruebas diagnósticas si constituye una desventaja para el estudio aislado de cada antígeno (Badley et al. 1987).

Los sueros obtenidos de los conejos infestados con 5000 y 10000 hITc fueron titulados por ELISA. Los datos de absorbancia se presentan en los cuadros 3 y 4 y en las gráficas 1 y 2. En éstas, se muestran que los títulos de anticuerpos contra Ag-EST en el suero de los conejos de ambos grupos empiezan a aumentar ligeramente a partir del día 8 p.i., sin embargo, éste aumento no es estadísticamente significativo. Entre los días 8 y 15 p.i. se presenta un notable incremento en la producción de anticuerpos. A partir del día 22 p.i. y hasta el día 64 p.i. se observa una ligera disminución de la absorbancia, en estos días se aprecian diferencias e igualdades estadísticas (según la prueba de TUKEY) en

ambos grupos, éstas se presentan en el cuadro 3 y 4. A partir del día 71 p.i. y hasta el día 127 p.i. se observa un aumento en el título de anticuerpos.

La respuesta de anticuerpos en un principio, se asemeja a una respuesta primaria clásica contra un antígeno (Bach, 1984). En ésta, el periodo de latencia que se define como el lapso de tiempo que transcurre desde que se introduce el antígeno hasta la detección de los primeros anticuerpos fué de 8 días, tiempo en el que se comenzaron a detectar los anticuerpos. La fase de aumento de la concentración de anticuerpos séricos fue entre el día 8 p.i. y el día 15 p.i.. Un primer pico de la respuesta se observó en el día 15 p.i.. Posteriormente, hay una ligera reducción de los títulos de anticuerpos que no corresponde a una fase de reducción de una respuesta primaria porque los anticuerpos no desaparecen, sino que tienden a mantenerse estables hasta el día 64 p.i.. La ausencia de fase de reducción seguramente se debe a la continua estimulación del sistema inmunológico por la presencia de larvas en los tejidos (Glickman & Shofer, 1987) y la consecuente eliminación de Ag-EST.

Las curvas de producción de anticuerpos contra Ag-EST observadas en este trabajo son similares a las observadas en otros modelos experimentales, como ratones, gerbos y cerdos (Havasiová-Reiterová et al. 1995, Alba, 1999 y Helwigh et al. 1999). En humanos no se conoce ninguna cinética de producción de anticuerpos contra Ag-EST, sin embargo se sabe que los títulos de anticuerpos se pueden mantener en niveles altos durante largos periodos. (Arias-Irigoyen et al. 1995) de modo similar al observado en el presente estudio.

A partir del día 71 p.i. se detectó un incremento de los títulos de anticuerpos específicos contra Ag-EST (gráficas 1 y 2), este aumento probablemente se debe a una mayor actividad y a nuevas migraciones de larvas dentro de los tejidos, ésto aunque no se ha estudiado en conejos, si se ha demostrado en ratones y jerbos en donde incluso estas nuevas migraciones se asocian a picos de eosinofilia (Sugane et al. 1982; Alba, 1999). Además, el día 85 p.i. se reinfestaron los animales con la misma dosis, lo que ocasionó una elevación en la cantidad de antígeno circulante, pese a esto, no se detectó un aumento de los títulos de anticuerpos por lo que probablemente se llegó a un estado de máxima producción de anticuerpos.

Con la finalidad de evaluar si existen diferencias entre las diluciones utilizadas (1:50, 1:100 y 1:500) se realizó un análisis de las varianzas. Se observaron diferencias numéricas de absorbancia entre las diluciones usadas, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $\alpha = 0.05$ ). Lo anterior hace pensar que hay una gran cantidad de anticuerpos en el suero de los conejos y que para observar diferencias entre diluciones, estas deben ser mayores.

Se compararon los títulos de anticuerpos séricos de los dos grupos (inoculados con 5000 y 10000 hITc respectivamente), no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha = 0.05$ ) entre ambos grupos (tablas 5 y 6). Esto probablemente se debe a que como se mencionó anteriormente, se llegó a un estado de máxima producción de anticuerpos, si bien por lógica, las larvas producidas por 5000 hITc y la cantidad de antígenos producidos por éstas son

menores que los producidos por 10000 hITc, es probable que en ambos casos se rebase el umbral de máxima estimulación. Lo anterior, parece comprobarse por el hecho de que aun en una segunda reinfestación los títulos de anticuerpos séricos no aumentan.

Con el fin de utilizar suero de conejo como referencia positiva en el diagnóstico de la toxocariasis cualquiera de las dosis utilizadas (5000 y 10000 hITc) es adecuada pues no hay diferencias estadísticas entre las dos. Con respecto al tiempo p.i., se pueden obtener sueros con altos títulos de anticuerpos específicos contra Ag-EST a partir del día 15 p.i. y cuando menos hasta el día 85 p.i.. Los títulos de anticuerpos séricos más altos con una inoculación se detectaron los días 15, 71 y 85 p.i. por lo que estos días serian los mas recomendados para la obtención del suero.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que en el conejo se generan fácilmente altos títulos de anticuerpos séricos específicos contra Ag-EST, aunado esto a su bajo costo y facilidad de mantención, nos permiten considerar al conejo como un modelo en el que se puede obtener sueros de referencia positivos a la toxocariasis para su posible uso en inmunodiagnóstico.

FIGURA 1.

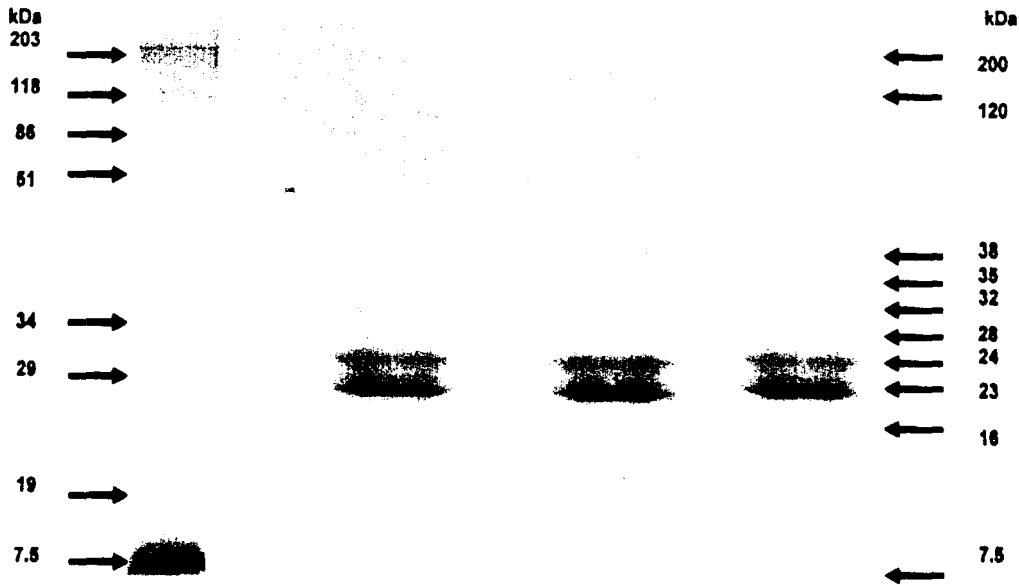
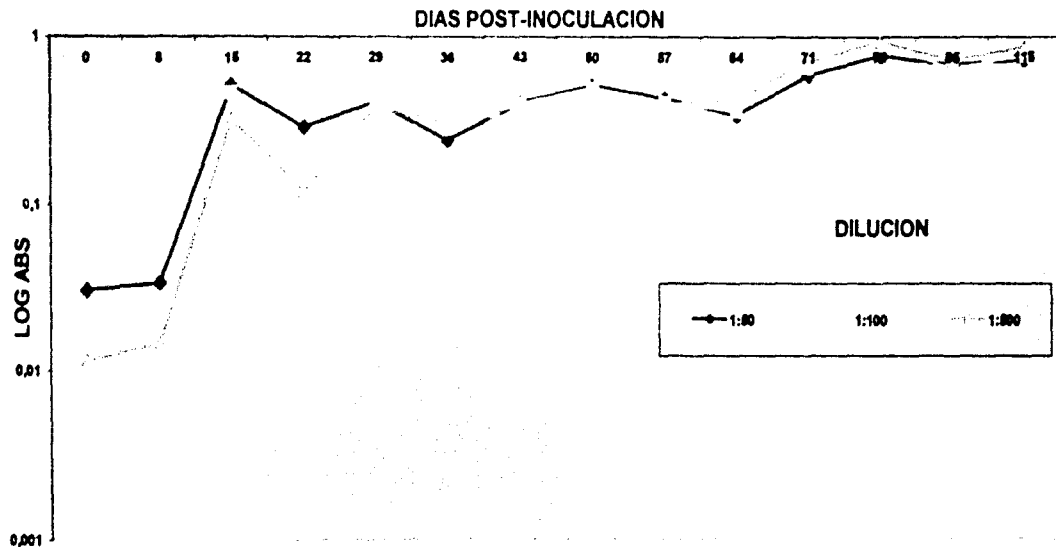


FIGURA 1. Separación de los Ag-EST por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida teñidos por la técnica de Nitrato de Plata, del lado izquierdo se encuentra los marcadores de peso molecular, en el lado derecho el peso molecular de los Ag-EST.<sup>o</sup>

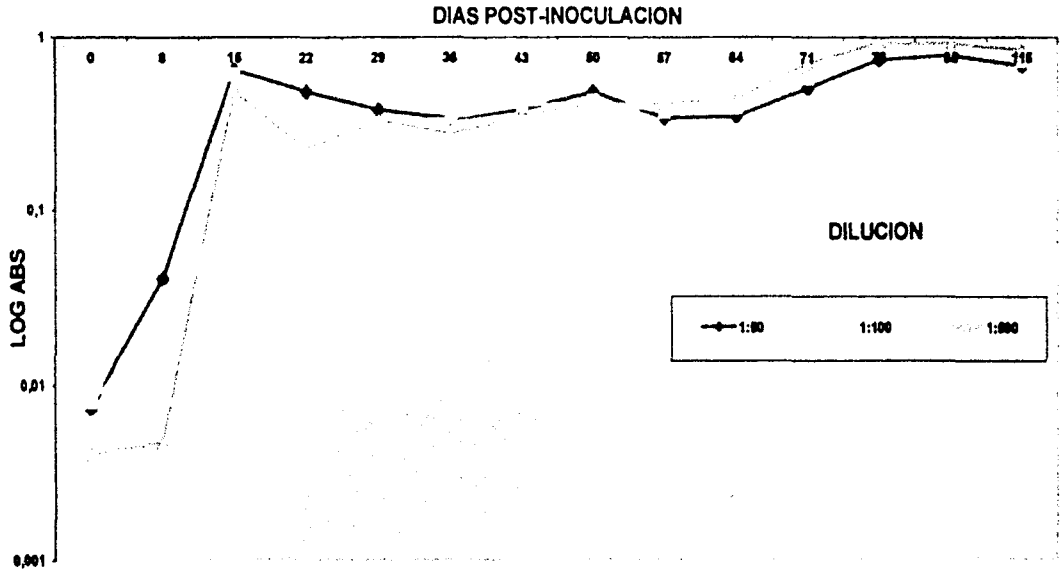
GRAFICA No. 1



ROMERO S. G. A. 2001

GRAFICA No. 1 Cinética de producción de anticuerpos circulantes detectados por ELISA contra antígenos de excreción y secreción de larvas de *T. canis* en 5 conejos inoculados experimentalmente con 5,000 hTc. En las gráficas se presentan los resultados de usar diferentes diluciones de los sueros.

GRAFICA No. 2



ROMERO S. G. A. 2001

GRAFICA No. 2 Cinética de producción de anticuerpos circulantes detectados por ELISA contra antígenos de excreción y secreción de larvas de *T. canis* en 5 conejos inoculados experimentalmente con 10,000 hTc. En las gráficas se presentan los resultados de usar diferentes diluciones de los sueros.

**CUADRO No. 3**

<b>CUADRO DE PROMEDIOS DE ABSORBANCIA</b>			
<b>DÍAS</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>15</b>
0	0.0302	0.0244	0.0114
8	0.0333	0.0142	0.0146
15	0.5040	0.4590	0.3156
22	0.5838	0.2174	0.1196
29	0.4010	0.3980	0.3772
36	0.2362	0.2790	0.2968
43	0.3962	0.3914	0.3476
50	0.5020	0.4875	0.4658
57	0.4177	0.3985	0.3873
64	0.3318	0.3508	0.4098
71	0.5792	0.6432	0.6978
78	0.7656	0.8784	0.9282
85	0.6688	0.6411	0.7056
127	0.7242	0.7558	0.8598

**ROMERO S. G. A. 2001**

**CUADRO No. 3 Promedio de los valores de absorbancia detectados por ELISA empleando Ag-EST y sueros de 5 conejos infestados experimentalmente con 5,000 hITc.**



**CUADRO No. 4**

<b>CUADRO DE PROMEDIOS DE ABSORBANCIAS</b>			
<b>hITc</b>	<b>Ag-EST</b>	<b>Suero 1</b>	<b>Suero 2</b>
0	0.0073	0.0080	0.0040
8	0.0410	0.0250	0.0046
15	0.6387	0.6047	0.4860
22	0.4810	0.3884	0.2202
29	0.3780	0.3156	0.3258
36	0.3390	0.3401	0.2742
43	0.3812	0.4022	0.3477
50	0.4770	0.4230	0.4100
57	0.3406	0.3708	0.4113
64	0.3469	0.3903	0.4323
71	0.5018	0.5717	0.7002
78	0.7363	0.8940	0.9262
85	0.7838	0.8203	0.9201
127	0.6781	0.7205	0.8380

**ROMERO S. G. A. 2001**

**CUADRO No. 4 Promedio de los valores de absorbancia detectados por ELISA empleando Ag-EST y sueros de 5 conejos infestados experimentalmente con 10,000 hITc.**

**CUADRO No. 5**

CUADRO DE IGUALDADES ESTADÍSTICAS SEGUN LA PRUEBA DE TUKEY EN EL TITULO			
0	8	8	8
8	0	0	0
15	22,50,57	29,43,50,64,57	29,36,43,50,57,64
22	15,71	36,64	36
29	43,57,64	15,36,43,50,57,64	15, 36,43,50,57,64
36	43,64	22,29,43,57,64	15,22, 29,43,50,57,64
43	29,36,57,64	15,29,36,50,57,64	15,29,36,50,57,64
50	15,50	15,29,43,57,64	15,29,36,43,57,64
57	15,29,43,64	15,29,36,43,50,64	15,29,36,43,50,64
64	36,43,59,57	15,22,29,36,43,50,57	15,29,36,43,50,57
71	22	85,127	85,127
78	127	127	127
85	71,127	71,127	71,127
127	71,78,85	71,78,85	71,78,85

ROMERO S. G. A. 2001

CUADRO No. 5 Igualdades estadísticas según la prueba de Tukey de las absorbancias detectadas por la prueba de ELISA empleando Ag-EST y sueros de 5 conejos infestados experimentalmente con 5,000 hITC.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

CUADRO No. 6

CUADRO DE IGUALDADES ESTADÍSTICAS SEGÚN LA PRUEBA DE TUKEY EN EL TEST			
DA	DIFERENCIA		
0	8	8	8
8	0	0	0
15	22,50,71,78,85,127	43,50,71,127	29,36,43,50,57,64,71
22	15,29,36,43,50,57,64,71	29,36,43,50,57,64,71	29,36,43,50,57,64
29	22,36,43,50,57,64,71	22,36,43,50,57,64	15,22,36,43,50,57,64
36	22,29,43,50,57,64,71	22,29,43,50,57,64	15,22,29,43,50,57,64
43	22,29,36,50,71	15,22,29,36,50,57,64,71	15,22,29,36,50,57,64
50	15,22,29,36,43,57,64,71	15,22,29,36,43,57,71	15,22,29,36,43,57,64
57	22,29,36,43,50,64,71	22,29,36,43,50,64,71	15,22,29,36,43,50,64
64	22,29,36,43,50,57,71	22,29,36,43,50,57,71	15,22,29,36,43,50,57
71	15,22,29,36,43,50,57,64,127	15,22,43,50,57,64,127	15,78,85,127
78	15,85,127	85,127	71,85,127
85	15,78,127	78,127	78,127
127	15,71,78,85	15,71,78,85	71,78,85

ROMERO S. G. A. 2001  
 CUADRO No. 6 Igualdades estadísticas según la prueba de Tukey de las absorbancias detectadas por la prueba de ELISA empleando Ag-EST y sueros de 5 conejos infestados experimentalmente con 10,000 hITC.

## CONCLUSIONES

1. Sí se logró obtener y purificar antígenos de excreción y secreción; las bandas detectadas en geles SDS-PAGE correspondieron a los siguientes pesos moleculares 200, 120, 38, 35, 32, 28, 24, 23, 16 y tres bandas de menos de 7.5 kDa.
2. La administración de las diferentes dosis de huevos larvados de *T. canis* en conejos indujo la infestación en todos los animales inoculados.
3. En ambos grupos, entre los días 8 y 15 p.i. se presentó un notable incremento en la producción de anticuerpos.
4. No se observó diferencia entre los títulos de anticuerpos séricos de ambos grupos, detectándose en los días 15, 71 y 85 los títulos más altos con una sola inoculación.
5. Se puede utilizar suero de conejo como referencia positiva en el diagnóstico de la toxocarías.

## APÉNDICE I

Reactivos para la electroforesis.

### **ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA (30:0.8).**

- Pesar 30g de acrilamida.
- Pesar 0.8g de bisacrilamida.
- Disolver en agua desionizada hasta obtener 100ml.
- Filtrar la solución a través de papel filtro Whatman No.1.
- Almacenar a 4° C y proteger de la luz.

### **DUODECIL SULFATO SODICO (SDS) 10%(p/v).**

- Pesar 10g de SDS.
- Disolver en agua desionizada hasta obtener 100ml.
- La solución obtenida debe ser clara e incolora, si no se **disuelve completamente** el SDS, calentar la solución hasta disolverse.
- Almacenar a temperatura ambiente.

### **BUFFER 3.0M TRIS-HCl (pH 8.8).**

- Pesar 36.6g de Tris (Tris(hydroxymethyl) aminometano).
- Disolver en 48ml de HCl 1.0M.
- Ajustar la solución hasta obtener un pH de 8.8 .
- Llevar a un volumen de 100ml, con agua desionizada.
- Filtrar la solución a través del papel filtro Whatman No. 1.
- Almacenar a 4° C.

### **BUFFER 0.5M TRIS-HCl (pH 6.8).**

- Pesar 6.0g de Tris.
- Disolver en 40 ml de agua desionizada.
- Agregar HCl gota a gota hasta alcanzar un pH de 6.8 .
- Ajustar a un volumen de 100ml, con agua desionizada.
- Filtrar la solución a través de papel Whatman No. 1.
- Almacenar a 4° C.

### **BUFFER DE CORRIMIENTO 0.25 M TRIS-HCl, 1.92M GLICINA, 1% SDS (pH 8.3).**

- Pesar 3.03g de Tris, 14.4g de glicina y 1.0g de SDS.
- Disolver en 800ml de agua desionizada.
- Ajustar a un pH 8.3 con HCl, gota a gota.

- Llevar a un volumen de 1000ml con agua desionizada.
- Almacenar a temperatura ambiente.

### **BUFFER DE LAEMMLI**

Las concentraciones finales que debe tener cada reactivo son las siguientes:  
0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8): 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% Glicerol, 0.002% azul de bromofenol. Para facilitar la preparación de este buffer es conveniente utilizar soluciones prehechas con una concentración mayor.

### **PERSULFATO DE AMONIO 15%(p/v)**

- Pesar 15.0 g de persulfato de amonio.
- Disolver en 10ml de agua desionizada.
- Esta sustancia es inestable y debe ser preparada justo antes de ser utilizada.

### **TEMED (N,N,N',N',-TETRAMETILENDIAMINA)**

Se utiliza tal y como se compra (Bio-Rad), es estable siempre y cuando no se diluya, se debe mantener a 4° C y protegido de la luz.

## **PREPARACIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA PARA LA ELECTROFORESIS.**

### **GEL SEPARADOR (12% DE ACRILAMIDA)**

En un vaso precipitado de 50 ml y con pipetas graduadas (todo el equipo debe estar limpio y estéril), colocar:

- 4.5ml de agua desionizada.
- 1.25ml de Tris-HCl 3.0 M pH 8.8.
- 100 $\mu$ l de SDS 10% (p/v).
- 4.0ml de acrilamida (30:0.8).
- 500 $\mu$ l de persulfato de amonio 15%(p/v).
- 5 $\mu$ l de TEMED.

### **GEL CONCENTRADOR (4% DE ACRILAMIDA)**

En un vaso precipitado de 50ml y pipetas graduadas (limpias y estériles) colocar:

- 6.0ml de agua desionizada.
- 2.5ml de Tris-HCl 0.5M pH 6.8 .
- 100 $\mu$ l de SDS 10% (p/v).
- 4.0ml de acrilamida.
- 500 $\mu$ l de persulfato de amonio 15% (p/v).
- 5 $\mu$ l de TEMED.



## APÉNDICE II

### TINCIÓN DE PLATA

Para un gel, preparar la siguiente solución:

- De una solución de DL-Dithiothreitol (20mg/ml) tomar 12.5 $\mu$ l y aforar a 100ml con etanol (50% (v/v)).
- Adicionar a un gel.
- Mantener en agitación a 50rpm durante 1-2 horas.
- Lavar con agua destilada 150ml/gel a 50 rpm durante 1 hora.
- Sumergir el gel en la siguiente solución: 200 $\mu$ l de Tiosulfato de sodio Pentahidratado (100mg/ml) en 100 ml de agua destilada durante 1 minuto.
- Lavar con agua destilada por 20 segundos, 3 veces.
- Preparar una solución de plata de la siguiente manera: pesar 0.8g de Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y disolver en 4ml de agua destilada.
- Preparar 20ml de Hidróxido de sodio al 0.4%, mezclar con 1.5 ml de solución de amonía (0.88g  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) y agregar la solución de plata gota a gota con agitación continua, ajustar la solución hasta 100ml.
- Mantener el gel sumergido y en agitación a 70rpm por 30min.
- Lavar con agua destilada 150ml/gel a 70rpm por 5 minutos, 3 veces.
- Preparar la solución reveladora: mezclar 200 $\mu$ l de solución de formaldehído al 40% (p/v) con 2.5 ml de ácido cítrico 1%, agregar 20 $\mu$ l de la solución de tiosulfato de sodio y ajustar a 500ml. Utilizar 150ml/gel por 10 minutos de 1 a 3 veces según aparezcan las proteínas teñidas.

- Para detener la tinción desechar la solución reveladora y agregar 100ml de la siguiente solución: metanol al 50% y ácido acético al 5% para formar 100ml, 100ml/gel durante 10min.
- Conservación del gel: 100ml de Etanol o metanol al 10% a 4° C por gel.

### **APÉNDICE III**

Reactivos para ELISA.

#### **PBS 10X**

- Pesar 80g de cloruro de sodio.
- Pesar 2g de cloruro de potasio.
- Pesar 29g de fosfato dibásico de sodio.
- Pesar 2g de fosfato monobásico de potasio.
- Disolver en 700 ml de agua destilada.
- Ajustar a un volumen de 1000ml con agua destilada.

#### **SOLUCION DE CARBONATO BICARBONATO 0.05M (BCB)**

- Pesar 1.59g de carbonato de sodio.
- Pesar 2.93g de bicarbonato de sodio.
- Disolver y llevar a un volumen de 1000ml con agua destilada.
- Esta solución es estable una semana a 4 °C.

#### **SOLUCION REGULADORA DE CITRATOS**

- Mezclar 24.3ml de ácido cítrico 0.1M con 25.7ml de fosfato dibásico de sodio 0.2M y 50ml de agua destilada.

### **SOLUCION DE LAVADO PBS-TWEEN 20 (0.05%)**

- Mezclar 500ml de PBS 1X con 250 $\mu$ l de Tween 20.

### **SOLUCION DE BLOQUEO: ABS 3%**

- Pesar 0.3g de albúmina sérica bovina y disolver en 10 ml de PBS 1X.
- Esta cantidad es necesaria para una placa de 96 pozos.

### **SOLUCION DESARROLLADORA DE COLOR**

- Pesar 5mg de OPD y disolver en 10ml de solución reguladora de citratos.
- Adicionar 10 $\mu$ l de peróxido de hidrógeno.
- Esta cantidad es necesaria para una placa de 96 pozos.

### **SOLUCION DE PARO**

- Mezclar 0.6ml de ácido ortofosfórico y 10ml agua destilada.
- Esta cantidad es necesaria para una placa de 96 pozos.

## BIBLIOGRAFÍA

Abo-Shehada, M. N.; Al-Zubaldy, B. A. & Hebert, I. V. (1984). The migration of larval *Toxocara canis* in mice I. Migration through the intestine in primary infections. **Vet. Parasitol.**, 17:65-73.

Agnihotri R.K., Bhatia B.B., and Kumar D. (1987). Visceral larva migrans. 1. Migratory behaviour of *Toxocara canis* larvae in golden hamster and chicken. **Ind. J. Ann. Sc.** 57 (8): 853-855.

Alba H. F. : Evaluación de un modelo de toxocaríasis ocular y sistémica empleando jerbos (*Meriones unguiculatus*) . Tesis de Doctorado. **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.**, 1999.

Amir J., Harel L.Eidiltz-Markus T. and Varsano I. (1995), lymphedema as a presenting sign of toxocaríasis. **Infection.** 23(6): 389-390.

Arias-Irigoyen J., Senent Sánchez. (1995), Toxocaríasis: a cause of hyper IgE and Eosinophilia. **J. Invest. Clin. Immunol.** 5; 232-234.

Bach Jean-Francois.: Inmunología. **Limusa México**, 1984.

Badley J. E., Grieve R. B., Bowman D. D., Glickman L.T., Rockey J.H. (1987), Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: Physicochemical characterization and antibody recognition. **J. Parasitol.** 73(3): 593-600.

Baéz y Aleman P. (1960), Larva migrans visceral . Primer caso comprobado en México. **Rev.Inst. Salubr. Enf. Trop.** 20:168-171.

Bardon R. Guillen J.L., and Aguila C. (1994), Idiotypic replica of a *Toxocara canis* excretory/secretory antigen epitope., **Intern. J. for parasitol.**, 25(1) 105-111.

Bass J.L, Mehta K. A., Glickman L.T., Blocker R. Eppes B.M. (1987), Asymptomatic Toxocariasis in children. A prospective Study ant Treatment trial. **Clinical Pediatrics**, 26(9): 441-446.

Beaver P.C., Snyder C.H., Carrera G.M., Dent J.H. and Lafferty J.W. (1951), Chronic eosinophilla due to visceral larva migrans. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, 7-18.

Beaver P.C. (1969), The natural of visceral larva migrans, **The J. of parasitol.** 55(1); 3-12.

Beaver P.C., Juns, R.C. and Cupp, E.W. (1986), Parasitología clínica 2ª. Ed. **Salvat**. Barcelona, España.

Borg O.A. and Woodruff A.W. (1973) , Prevalence of infective ova of *Toxocara* species in public places. **Br. Med. J.** 4: 470-472.

Bowman D. D., Mika-Grieve M., and Grieve Robert B. (1987), Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice Infected with *Toxocara canis* .**Am. J. Trop. Med. Hyg.** 36(1):75-82

Bujis J., Lokhorst W. H., Robinson J. and Nijkamp F.P. (1994), *Toxocara canis*-induced murine pulmonary inflammation: analysis of cells and proteins in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. **Parasite Immunology**; 16: 1-9.

Choo L.N. (1990), contamination of children's playgrounds with toxocara hookworm larvae in singapore. **Sing. Vet. J.** 14:66-69.

Coffman R.L., Seymour B.W.P., hudak S. Jackson J. And Rennick D. (1989), Antibody to interleukin-5 inhibits helminth induced eosinophilia in mice. **Science**. 245:308-309.

Cuéllar C., Fenoy S. and Guillén J.L. (1995). Cross-reactions of sera from *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* infected mice with *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina* and *ascaris suum* antigens. **Int.J. Parasitol.** 25 (6): 731-739.

Cypess H.R. (1982). Visceral Larva Migrans in Parasitic Zoonoses. Ed. **Steel H.J.** 205-212.

Cypess R.H., Karol M. H., Zidian J.L., Glickman L.T., Gitlin D. (1977), Larva-specific antibodies in patients with visceral larva migrans. **The J. of infectious diseases**, 135(4): 633-642.

Dada B. J. O. (1979), A new technique for the recovery of *Toxocara* eggs from soil, **J. of helminthology**. 53: 141-144.

DeSavigny D.H. (1975). In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnosis tests for visceral larva migrans. **J. Parasitol.** 61: 781-782.

DeSavigny D.H. and Tizard I.R. (1977). Toxocaral larva migrans: the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 71 (6): 501-507.

DeSavigny D.H., Voller A. and Woodruff A. W. (1979). Toxocarasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. **J. Clin. Pathol.** 32 (3): 284-288.

Dosowitz R.S., Rudoy R. and Barnwell J.W. (1981), Antibodies to canine helminth parasites in asthmatic and nonasthmatic children. **Int.Arch. All. Appl. Immunol.** 65: 361-366.

Douglas J.R. and Beker, N.R. (1959), The cronology of experimental Intrauterine infection with *Toxocara canis* (Werner. 1782) in the dog. **J. Parasitol.** 45: 43-44.

Dunn A.M. (1983), Helminología veterinaria . 2ª Edición. **El Manual Moderno.** México.

Dunsmore J.D., Thompson R.C.A. and Bates I.A. (1983), The accumulation of *Toxocara canis* in the brains of mice. **Int. J. Parasitol.** 13 (5): 517-521.

Dunsmore J.D., Thompson R.C.A. and Bates I.A. (1984), Prevalence and survival of *Toxocara canis* eggs in the urban environment of Perth, australla. **Vet. Parasitol.** 16(3): 303-311.

Duwel D. (1984), The prevalence of *Toxocara* eggs in the sand in children's playgrounds in Frankfurt. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 78(6): 633-636.

Emehelu C.O. and Fakae B.B. (1986), Prevalence of *Toxocara canis* ova on playgrounds of nursery schools in Nsukka, Nigeria. **Int. J. Zoonoses.** 13 (3): 158-161.

Enayat, M.S. and Pezeshki, M. (1977), The comparison of counterimmunoelectrophoresis with indirect haemagglutination test for detection of antibodies in experimentally infected guinea pigs with *Toxocara canis*. **J. Helminthol.**, 51 (2): 143-148.

Fenoy S., Cuellar C., Aguila., and Guillen J. L. (1992), Persistence of immune response in human toxocarasis as measured by ELISA, **Intern. J. for Parasitol.**, 22 (7); 1037-1038.



Finkelman F.D., Gause W. C., and Urban J.F. (1995), Cytokine control of protective immunity against nematode infections. **Molecular Approaches to parasitol.** 467-476.

Flores-Alatorre, H.L. (1993). Estudio histopatológico de las lesiones causada por larvas de *Toxocara canis* en ojos de gerbos (*Meriones unguiculatus*) . Tesis de licenciatura , FES-Cuautitlán UNAM.

Gass J.D. and Braunstein R.A. (1983), Further observations concerning the diffuse unilateral subacute neuroretinitis syndrome. **Arch. Ophthalmol.** 101(11): 1689-1697.

Gavin, I.J. (1964). Experimental *Toxocara canis* infection in chicken and pigeons. **J. Parasitol.** 50:124-127.

Gems D., and Malzels R.M. (1996), An abundantly expressed mucin-like protein form *Toxocara canis* infective larvae: The precursor of the larval surface coat glycoproteins, **Medical Sciences**,; 93; 1665-1670.

Georgi J.R. and Georgi M.E. (1991), Parasitology for veterinarians. **W.B. Saunders Company USA** , 1990.

Glickman L., Cypess R., Hiles D. and Gessner T. (1979), *Toxocara canis* antibody in the serum and aqueous humor of a patient with presumed ocular and visceral toxocarasis. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, 28(1): 29-33.

Glickman L. T., and Shofer F. S. (1987), Zoonotic visceral and ocular Larva migrans. **Vet. Clin. Nth. Am. Small. Ann. Pract.** 17 (1): 39-53.

Gluelio B.,de-Gentile L., Nguyen J.M., Achard J., Chabasse D. And Marjolet M. (1994), Epidemiologic approach to human toxocarasis in wester France. **Parasitol. Res.** 80 (6): 531-536.

Hakim L. S., Thadasavanth M., Shamila R., and Yogeswari S. (1997), Prevalence of *Toxocara canis* antibody among children with bronchial asthma in Klang Hospital, Malaysia. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.** 91; 528-529.

Havaslová-Reiterová K., Tomasovicová o., Dubinsky P. (1995), Effects of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution larvae in mice. **Parasitol Res.** 81;13-17.

Heiwich A.B., Lind P. and Nansen P. (1999), Visceral larva migrans migratory pattern of *Toxocara canis* in pigs. **Int. J. Parasitol.** 29; 559-565.

Holland C.V., O'Lorcain P. Taylor M.R.H. and Kelly A. (1994), Sero-epidemiology of toxocariasis in school children. **Parasite Immunology**, 535-543.

Horn K., Schenieder T. and Stoye M. (1990), Contamination of public children's playgrounds with helminth eggs in Hannover. **Deut. Thier. Wonchen.** 97 (3): 124-125.

Inuo Gen, Akao N., Kohsaka H., Saito I., Miyasaka N. (1995), *Toxocara canis* adult worm antigen induces proliferative response of healthy human peripheral blood mononuclear cells. **Parasite Immunology**, 17: 77-84.

Jones R. E., Finkelman F.D., Hester R.B. and Kayes S.G. (1994), *Toxocara canis*: failure to find IgE receptors (FcεR) on eosinophils from infected mice suggests that murine eosinophils do not kill helminth larvae by an IgE-dependent mechanism. **Experim. Parasitol.**, 78:64-75.

Kirk R.W. (1984). *Práctica canina en pequeñas especies.* 4ª. Edición. **Editorial Interamericana.** Mexico, D.F.

Kornblatt A.N., Schantz P. M.(1989), Veterinary and public health considerations in canine roundworm control: A survey of practicing veterinarians. **JAVMA**, 177 (12): 1212-1215.

Kusama Y., Takamoto M., Kasahara T., Takatsu K., Nariuchis H. and Sugane K. (1995), Mechanisms of eosinophilia in BALB/c-un/\* and congenitally athyic BALB/c-un/un mice infected with *Toxocara canis*. **Immunology**. 84: 461-468.

Lapage G. (1976), Parasitología veterinaria . **CECSA**. 2ª Edición México.

Llotet S., Bloch M.E., Petithory J.C., Betellier L. and Chaumeil C. (1992), Biological modifications of the intraocular parasitosis: Preliminar study. **Int. Ophthalmol.** 61(29): 75-80.

Lokman-Hakim S., Vegni-Talluri M., Raden-shamilah R.H. and Yogeswari S. (1997), Prevalence of *Toxocara canis* antibody among children with bronchial asthma in Klang Hospital Malaysia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 91: 528-529.

Magnaval J. F., Fabre R., Maurières P., Charlet J.P., and Larrard B.(1991), Application of the Western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. **Parasitol. Res.** 77: 697-702.

Magnaval J.F., Fabre R., Maurières P., Charlet J.P., and 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. Microbiology**, 30 (9); 2269-2274.

Maizels R. M., Kennedy M.W., Meghji M., Robertson B.D. and Smith H.V. (1987) Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigen of the parasitic nematode *Toxocara canis*. **J. Immunol.** 139:207-214.

Maizels R. M., Savigny D., and Ogilvie B. M. (1984), Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. **Parasitol. Immunol.** 6: 23-34.

Margo C.E., Sedwick L.A. and Rubin M.L. (1986). Neuroretinitis in presumed visceral larva migrans. **Retina.** 6(2): 95-98.

Markell E.M., Voge M. and John T.D. (1986), Medical Parasitology . W.B. Saunders Company. U.S.A.

Martínez A.A. (1989), Toxocariasis canina. **Av. Med. Vet.** 6 (6) 272-276.

Maruyama S., Nino T., Yamamoto K., and Katsube Y. (1944a). Parasitism of *Toxocara canis* larvae in chickens inoculated with the ascarid eggs. **J. Vet. Med. Sci.** 56(1) : 139-141.

Maruyama S., Yamamoto K., and Katsube Y. (1944b). Parasitism of *Toxocara canis* larvae from Japanese quail in mice. **J.Vet. med. Sci.** 56(2): 399-401.

Meghji M., Maizels R.M. (1986), Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. **Mol. And Bioch. Parasitol.**, 18: 155-170.

Nakamura S., Sotoyama T., Hayasaka S., Kameyana Y., Maruyama S. and Katsube Y. (1991). Parasitism of *Toxocara canis* larvae in Japanese quail by inoculation of the ascarid eggs. **J.Vet. med. Sci.** 53(5): 865-872.

Nelson S., Greene T. and Ernhart C.B. (1996), *Toxocara canis* infection in preschool age children: risk factors and the cognitive development of preschool children. **Neurotoxicol. Teratol.** 18(2): 167-174.

Niedfeld G., Pezzani B., Minvielle M. and Basualdo-Farjat J.A. (1993). Presence of lipids in the secretory/excretory product from *Toxocara canis*. **Vet. Parasitol.** 51(1): 155-158.

Ohima T. (1961). Standardization of techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observations on normal migration routes of the larva. **J. Parasitol.** 47: 652-656 (1961).

Olsen O.W. (1974) Animal parasites. **Universal Park Press**, Baltimore, Maryland, U.S.A.

Olsen O.W. (1979) Animal parasites, their cycles and ecology. 3<sup>a</sup> ed. **Universal Park Press**, U.S.A.

Olson L.J. and Rose J.E. (1966), Effect of *Toxocara canis* infection on the ability of white rats to solve maze problems. **Exp. Parasitol.** 19:77-84.

Page A. P., Hamilton A. J., and Maizels R. M. (1992), Monoclonal Antibodies to Carbohydrate epitopes of secreted (TES) Antigens Localize to Different Secretion-Related Structures In Infective Larvae. **Experimental Parasitology.** 75: 56-71.

Page A. P., Rudini W., and Maizels R.M. (1992), Lectin binding to secretory structures , the cuticle and the surface coat of *Toxocara canis* infective larvae. **Parasitology.** 105: 285-296.

Parsons J.C., Coffman R.L., and Grieve R.B. (1993), Antibody to interleukin 5 prevents blood and tissue eosinophilia but not trapping in murine larval toxocarasis . **Parasite Immunology.** 15: 501-508.

Quiroz R.H. (1988), Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos . **LIMUSA.** México.

- Ramp T., Ecker J., and Golstein B. (1987), Cryopreservation and long-term in vitro maintenance of second-stage of *Toxocara canis* . **Parasitol. Res.** 73: 165-170.
- Read A. F., and Skorping A. (1995), The evolution of tissue migration by parasitic nematode larvae. **Parasitology.** 111: 359-371.
- Rincón M.R. (2001) . Reconocimiento de los antígenos de excreción y secreción de la larva (L2) de *Toxocara canis* por medio del Western blot en sueros de conejos infectados experimentalmente. Tesis de licenciatura, FES-Cuautitlán UNAM.
- Schacher J. F. (1957), A contribution to the life history and larval morphology of *Toxocara canis*. **Trop. Med. And Public Health.**, 599-610.
- Schantz Peter M., Meyer David., and Glickman Lawrence T. (1979), Clinical, serologic, and epidemiologic characteristics of ocular Toxocarasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 28(1) : 24-28.
- Sher A. (1995), Regulation of cell-mediated immunity by parasites: the ups and downs of an important host adaptation., 431-442.
- Shields E.S. (1984), Ocular toxocarasis. A review. **Sury. Ophthalmol.** 28: 362-379.
- Shrand H., Cape Town M. B. (1964), Visceral larva migrans. *Toxocara canis* infection. **The Lancet.**, 1357-1359.
- Small K.W., McCuen B.W., De Juan E. and Machermer R. (1989), surgical management of retinal traction caused by toxocarasis. **Am. J. Ophthalmol.** 108: 10-14.

Smith P.H. and Greer C.H. (1971) Unusual presentation of ocular *Toxocara* infestation . **Brit. J. Ophthalm.** 55:317-320.

Smith H. V., Kusel J. R., Girdwood W. A. (1983), The production of human A and B blood group like substances by in vitro maintained second stage *Toxocara canis* larvae: their presence on outer larval surfaces and in their excretions secretions. **Exp. Immunology** 54: 625-633.

Smith H.V., Quinn R., Bruce R.G., and Girdwood R.W. (1982), Development of the serological response in rabbits infected with *Toxocara canis* and *Toxocara leonina*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 67 (1): 89-94.

Soulsby E.J.L. (1982), Helminths, Arthropods and protozoa of Domesticated Animals. **Lea & Febiger**, U.S.A.

Sprenst J.P. (1958), Observations on the development of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. **Parasitol.** 48:184-209.

Sorr E.M. (1984). Meandering ocular toxocariasis. **Retina.** 4: 90-96.

Stevenson P., and Jacobs D. E. (1977). *Toxocara* infection in pigs. The use of indirect fluorescent antibody tests and an in vitro larval precipitate test for detecting specific antibodies. **J. Parasitol.** 51(2): 149-154.

Sugane K, and Oshima T. (1982), Eosinophilia, granuloma formation and migratory behaviour of larvae in the congenitally athymic mouse infected with *Toxocara canis*. **Parasiti. Immunol.**, 4: 307-318.

Sugane K, and Oshima T. (1983), Purification and characterization of excretory-secretory antigen of the *Toxocara canis* larvae. **Immunol.**, 50: 113-118.

Takamoto M., Kusuma Y., Takutsu K., Nariuchi H., and Sugane K. (1995), Occurrence of interleukin-5 production by CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> (double-negative) T cells in lungs of both normal and congenitally athymic nude mice infected with *Toxocara canis*. **Immunology**. 85:258-291.

Takamoto M., and Sugane K. (1993), Mechanisms of eosinophilia in *Toxocara canis* infected mice: *In vitro* production of interleukin 5 by lung cells of both normal and congenitally athymic nude mice. **Parasite Immunology**. 15:493-500.

Tonimura T., Toyota M. and Takiguchi M. (1976), Experimental visceral larva migrans in monkey 1. Clinical, hematological, biochemical and gross pathological observations on monkeys inoculated with embryonated eggs of the dog ascarid, *Toxocara canis*. **Jpn. J. Vet. Sci.** 38:533-544.

Umeche N. (1989), Helminth ova in soil from children's playgrounds in Calabar Nigeria. **Int. J. Zoonoses**. 13 (2): 128-131.

Wang Mei Qi., Jiang Hong Jie., Inoue Hiroko., Myozaki Mitsuru., and Yamashita Uki (1995), B cell mitogenic activity of *Toxocara canis* adult worm antigen. **Parasite Immunology**. 17: 609-615.

Warren K.S. and Mahmoud A.A.F. (1977), Algorithms in the diagnosis and management to exotic diseases. **J.Infect. Dis.** 55:99-109.

Wilder H.C. (1950), Nematode endophthalmitis. **Trans. Am. Acad. Ophthalmol.** 55: 99-109.

Woodruff A.W., Bisseru B. and Bowe J.C. (1996). Infection with animal helminths as a factor in causing poliomyelitis and epilepsy. **Br. Med. J.** 1: 1576-1579.



Worley G., Green J.A. Frothingham T. E., Sturner R.A., Walls K.W., Pakalnis V. A., and Ellis G.S. (1984), *Toxocara canis* infection: Clinical and epidemiological associations with seropositivity in Kidergarten children. **The J. of Infectious diseases**, 149(4), 591-598.

Yahiro S., Cain G., and Butler J.E. (1998), Identification, characterization of *Toxocara canis* nematode polyprotein allergen TBA-1. **Parasite Immunology**, 20: 351-357.

Yamaguchi Y., Matsui T., and Kasara T. (1990), In vivo changes of hemopoietic progenitors and the expression of the interleukin-5 gene in eosinophilic mice infected with *Toxocara canis*. **Exp. Hematol.** 118.1152-1157.

Yang J., Keystone J. S., McIntyre L., and Spenci H. (1982), *Toxocara* antibodies in veterinary personnel. **Can-vet. J.** 23: 126-128.