

A 11661
5



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DETERMINACION POR WESTERN BLOT DE LOS
ANTIGENOS DE EXCRECION-SECRECION DE
Toxocara canis QUE SON RECONOCIDOS POR
ANTICUERPOS DE LA CLASE IgE EN PACIENTES
ASMATICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN MICROBIOLOGIA

P R E S E N T A :

M.V.Z. MARCO ANTONIO MUÑOZ GUZMAN

ASESOR: DR. FERNANDO ALBA HURTADO

CUAUTITLAN IZCALLI,

JULIO DE 2003



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.

B

DEDICATORIAS

A Dios por ser tan bondadoso
con nosotros.

A mi esposa Margarita por su cariño, paciencia
y amor.

A mi hijo Julián por ser mi más grande
tesoro.

A mis padres por ser mi apoyo incondicional.
y mis mejores amigos.

A mi querida Universidad.

Julio de 2002

e

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. **Fernando Alba Hurtado** le agradezco su apoyo y su confianza en mí para la realización de este trabajo. Además de eso le agradezco infinitamente su amistad.

Al M en C. **Guillermo Valdivia Anda** por su valiosísima ayuda, consejos y orientación técnica a lo largo de la realización del presente trabajo.

Al M en C. **Alejandro Martínez** por su espíritu de cooperación y disponibilidad incondicional.

Al Dr. **Jorge Tórtora Pérez** agradezco sus buenas críticas y sus consejos a lo largo de mi formación académica.

A las **Doctora Blanca del Río Navarro** jefa del Dpto. de Alergia e inmunología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" por su colaboración para la obtención de los pacientes incluidos en este trabajo; así como a la **Doctora Rosa María Bernal** jefa de análisis clínicos de la misma institución por su cooperación para los sueros de referencia utilizados en este estudio.

A todas las personas que de forma directa o indirecta participaron en este trabajo especialmente a **Rocío Rincón, Adrián Romero, Alejandra Ayanegui y Diana B. García** por que además de su ayuda me llevo su amistad sincera.

A **todos los niños** que hicieron posible la realización de este estudio, el cual, espero sea en beneficio de ellos mismos.

D

ÍNDICE

RESUMEN	1
1.- INTRODUCCIÓN	2
1.1 Morfología	3
1.2 Ciclo biológico	5
1.3 Epidemiología	8
1.4 Patología	12
1.4.1 <i>Larva Migrans Visceral</i> (LMV)	12
1.4.2 <i>Larva Migrans Ocular</i> (LMO)	16
1.5 Antígenos de excreción-secreción de la larva de <i>T. canis</i> (AgEST)	17
1.6 Inmunopatología	19
1.7 Asma y toxocariosis	21
1.8 Justificación	23
2.- OBJETIVOS	24
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	25
3.1 Lugar de realización	25
3.2 Diseño experimental	25
3.3 Obtención y cultivo de huevos de <i>T. canis</i>	27
3.4 Obtención y mantenimiento de larvas	27
3.5 Obtención de AgEST	28
3.6 Obtención de antígenos somáticos de <i>Ascaris suum</i>	28
3.7 Desarrollo de la técnica de ELISA para determinación de IgG contra AgEST (ELISA-IgG)	29
3.8 Desarrollo de la técnica de ELISA para determinación de IgE contra AgEST (ELISA-IgE)	31
3.9 Electrotransferencias	32
3.10 Desarrollo del Western blot	32
3.11 Análisis estadístico	34
4.- RESULTADOS	35
4.1 Obtención de AgEST	35
4.2 Obtención de sueros de niños asmáticos y sanos	35
4.3 Determinación de IgG contra AgEST utilizando la técnica de ELISA (ELISA-IgG)	37
4.4 Determinación de IgE contra AgEST utilizando la técnica de ELISA-IgE (ELISA-IgE)	40
4.5 Western blot IgG	45
4.6 Western blot IgE	54
5.- DISCUSIÓN	58
6.- CONCLUSIONES	74
7.- REFERENCIAS	75
ABREVIATURAS	81
APÉNDICES	83



ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

FIGURA 1: Microfotografía por microscopía electrónica de un huevo de <i>T. canis</i>	4
FIGURA 2: Ciclo biológico de <i>T. canis</i>	6
CUADRO 1: Frecuencia de huevos de <i>Toxocara</i> spp. en diferentes sitios del sur de la ciudad de México, Distrito Federal.....	10
CUADRO 2: Frecuencia de anticuerpos contra <i>Toxocara canis</i> en personas de diferentes lugares del mundo	11
FIGURA 3: Número de larvas recuperadas por gramo de diferentes tejidos de perros a diferentes días post-inoculación con 5000 huevos larvados de <i>T. canis</i>	15
FIGURA 4: Patrón de AgEST en geles de SDS-PAGE	36
CUADRO 3: Determinación del valor de corte para la ELISA-IgG	38
CUADRO 4: Sueros de referencia positiva para la prueba de ELISA-IgG	39
FIGURA 5: Seroprevalencia a AgEST por ELISA-IgG en niños asmáticos	41
FIGURA 6: Seroprevalencia a AgEST por ELISA-IgG en niños sanos	42
FIGURA 7: Frecuencias de lecturas de EAs en la prueba de ELISA-IgE	43
FIGURA 8: Determinación de los valores de corte para la prueba de ELISA-IgE.....	44
FIGURA 9: Seroprevalencia a AgEST por ELISA-IgE en niños asmáticos.....	46
FIGURA 10: Seroprevalencia a AgEST por ELISA-IgE en niños sanos	47
FIGURA 11: Patrón de reconocimiento de los AgEST por Western blot-IgG	48
FIGURA 12: Determinación por Western blot-IgG de la frecuencia de reconocimiento de los AgEST por sueros positivos a ELISA-IgG	50
FIGURA 13: Porcentaje de reconocimiento de los AgEST por sueros positivos a ELISA-IgG	51
FIGURA 14: AgEST de reacción cruzada con ASAs	52
FIGURA 15: Frecuencia de reconocimiento de los AgEST que presentan reacción cruzada con ASAs.....	53
FIGURA 16: Patrón de reconocimiento de los AgEST por Western blot-IgE	56
FIGURA 17: Determinación por Western blot-IgE de la frecuencia de reconocimiento de los AgEST por sueros positivos a ELISA-IgG	57
FIGURA 18: Distribución de la placa para la prueba de ELISA-IgG y ELISA-IgE	63

RESUMEN

Los adultos de *Toxocara canis* se encuentran en perros jóvenes y sus fases larvares infectan a diversos hospedadores paraténicos incluyendo al hombre. La infección por larvas de *T. canis* en el humano produce la *Larva Migrans Visceral* y la *Larva Migrans Ocular*. Las larvas migrantes de *T. canis* secretan continuamente en los tejidos del hospedador glicoproteínas conocidas como antígenos de excreciones y secreciones de *T. canis* (AgEST). Se ha demostrado que las manifestaciones de asma con cuadros de bronquitis recurrente ocurre en mayor proporción en grupos de niños seropositivos a AgEST, y se ha propuesto la presencia de larvas de *T. canis* en los pulmones como un factor predisponente para las manifestaciones asmáticas. Hasta la fecha no existen reportes de los antígenos específicos responsables de este fenómeno alérgico. El objetivo del presente trabajo fue comparar la seroprevalencia y los patrones de reconocimiento a AgEST entre los niños asmáticos y sanos. Se obtuvieron AgEST por el método de Savigny, éstos se emplearon en pruebas de ELISA y Western blot. A un total de 285 sueros de niños asmáticos y 152 sueros de niños sanos se les realizaron pruebas de ELISA para IgG y para IgE específicas a AgEST, así como Western blot para las mismas inmunoglobulinas en presencia de antígenos somáticos de *Ascaris suum*. En la prueba de ELISA-IgG el 30.8% de los niños sanos fueron positivos y el 19.73% resultaron positivos para el grupo de niños sanos, estos datos mostraron una diferencia estadística significativa. En la ELISA-IgE 7.77% de los pacientes asmáticos resultaron positivos 5.3% fueron sospechosos. De este grupo todos los sueros positivos a ELISA IgE fueron positivos también a ELISA IgG. Del grupo de niños sanos 6.57% resultaron positivas y 5.26% fueron sospechosos. Ninguno de estos datos mostró diferencia significativa. Los sueros positivos a ELISA-IgG de ambos grupos reconocieron por Western blot (WB) para IgG un total de 11 bandas de AgEST, los pesos moleculares fueron de 219, 120, 106, 74, 51, 43, 36, 33, 32, 30 y 26 kD respectivamente. Las bandas más frecuentemente reconocidas fueron las de 51, 43, 30 y 26 kD. El grupo de niños asmáticos presentó significativamente mayor reacción cruzada a ASAs que el grupo de niños sanos y no hubo diferencias en cuanto a los patrones de reconocimientos de ambos grupos. Sesenta y tres sueros de niños asmáticos positivos a ELISA-IgG fueron evaluados por WB para IgE y el 58.73% presentaron un patrón de reconocimiento por IgE. La banda que fue reconocida por todos los sueros fue la de 26 kD. En el grupo de niños sanos positivos a ELISA-IgG el 80% presentaron un reconocimiento de bandas por IgE estando las bandas de 26 y 30 kD presente en todos los casos. Estos resultados indican que no hay diferencias en cuanto al reconocimiento de AgEST entre los grupos de niños asmáticos y sanos, además sugieren que las diferencias reportadas por otros autores en las seroprevalencias determinadas por ELISA-IgG de estos grupos se debe a una mayor frecuencia de reacción cruzada en los niños asmáticos.

1.- INTRODUCCIÓN

T *oxocara canis* es el ascárido más común en los perros, tiene gran importancia en los cachorros, no sólo por las repercusiones de la enfermedad en ellos, sino por el peligro que representa para la salud humana (Beaver, 1969; Georgi y Georgi, 1991; Quiroz, 1988; Soulsby, 1982). Los adultos de *T. canis* se encuentran en el intestino delgado de cachorros, las fases larvarias infestan a diversos hospedadores paratécnicos incluyendo al hombre (Beaver, 1969; Glickman y Shofer, 1987). Se han descrito otros helmintos que de forma esporádica pueden causar infección larvaria en el humano entre las que se encuentran *Toxocara cati*, *Capillaria hepatica* y *Gnastoma spp.* La infección por larvas de *T. canis* en el humano es la más importante y produce dos cuadros clínicos bien definidos: El síndrome de *Larva Migrans Visceral* (LMV) y la *Larva Migrans Ocular* (LMO). El primero se presenta principalmente en niños y se caracteriza por debilidad, dolor abdominal, signos del tracto respiratorio como tos y manifestaciones alérgicas con infiltración pulmonar, signos cutáneos como erupciones y eczema, todo esto siempre acompañado de eosinofilia, hipergammaglobulinemia con aumento principalmente de los niveles de IgE circulante, hepatomegalia y esplenomegalia (Beaver, 1969; Magnaval *et al.*, 1992). Con menor frecuencia se presenta la LMO con problemas de retinitis, uveoretinitis y pseudogliomas. Raramente se presentan las dos patologías en forma simultánea (Glickman y Shofer, 1987).

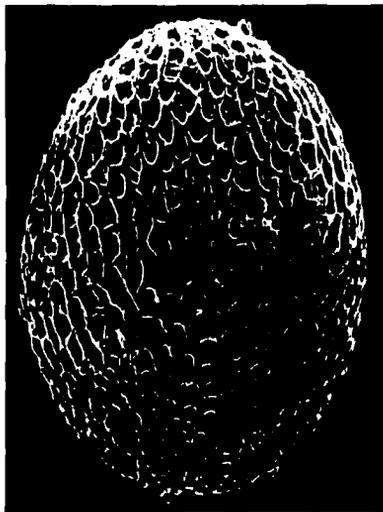
Recientemente se han propuesto otros dos síndromes clínicos relacionados a la infección con *T. canis*: La toxocariosis cerebral que tiene como principal característica la

presentación de manifestaciones nerviosas como convulsiones epileptiformes, retraso en el aprendizaje y lesiones granulomatosas en el tejido encefálico, así como la toxocariosis encubierta con presencia de eosinofilia con manifestaciones subclínicas de toxocariosis pero relacionada a otros padecimientos como eczema o asma (Taylor *et al.*, 1987, Alba-Hurtado *et al.*, 1999; Minvielle *et al.*, 1999).

1.1 MORFOLOGÍA

Los adultos de *T. canis* se encuentran en el intestino delgado de perros, zorros y lobos en todo el mundo, son gusanos cilíndricos pertenecientes a la familia *Ascarididae* (Georgi y Georgi, 1990), el cuerpo es grueso y blanquecino con tonos café, en el extremo anterior presentan tres labios rodeando la boca y aletas cervicales lanceoladas de lo cual se deriva su nombre "toxo" = punta o flecha (Quiroz, 1988), las hembras miden hasta 18 cm y los machos son más pequeños midiendo hasta 10 cm. Los huevos del *T. canis* son eliminados a partir de los 15 días del establecimiento de los gusanos adultos en el intestino delgado del perro, miden de 70 a 90 μm son amarillo blanquecinos y su forma varía de esférica a elipsoidal (fig. 1), poseen un cascarón protéico grueso y foseado el cual le da una particular resistencia a condiciones ambientales adversas, los huevos recién formados son inmaduros y poseen una masa protoplasmática que llena completamente el huevo (Georgi y Georgi, 1991).

FIGURA 1



Microfotografía por microscopía electrónica de un huevo de *T. canis*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2 CICLO BIOLÓGICO

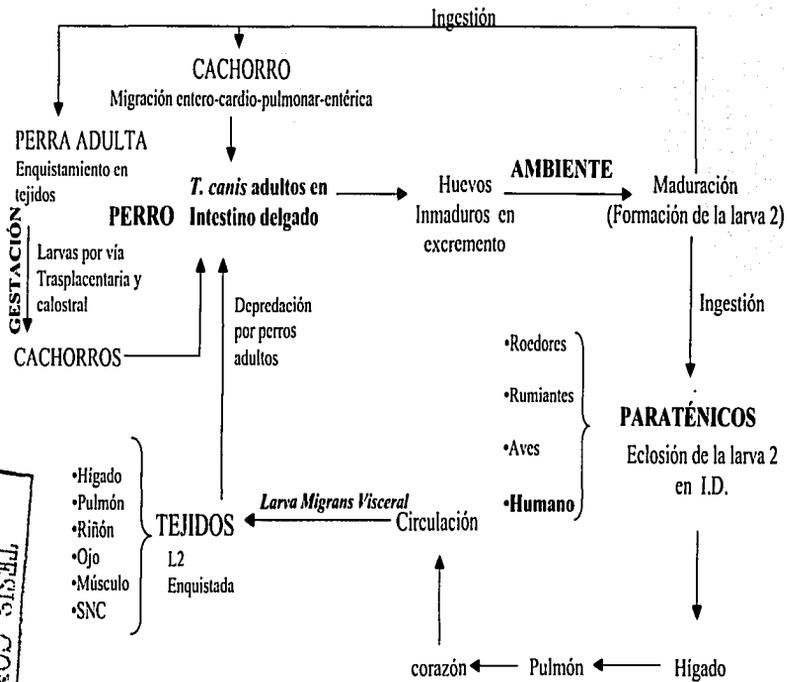
El ciclo de vida de *T. canis* es complejo y varía de acuerdo a la edad a la que el perro adquiere la infección y a las diversas formas en que el parásito puede llegar a éste (Fig. 2), las vías de infección pueden ser: Transplacentaria, calostrala, por ingestión de huevos larvados o por ingestión de un hospedador paraténico con larvas enquistadas (Soulsby, 1987).

Las fases adultas del parásito se desarrollan por la ingestión de huevos larvados por perros menores a los tres meses de edad (Quiroz, 1988), la eclosión de los mismos ocurre en el intestino delgado y las larvas (L2) atraviesan la pared intestinal alcanzando la linfa y la sangre después migran al hígado, corazón y pulmones en donde a través de los bronquios llegan a la faringe y son deglutidas. En el intestino delgado maduran las formas adultas y comienza la producción de huevos de la especie, las hembras de *T. canis* pueden producir alrededor de 200.000 huevos al día (Soulsby, 1987).

Los huevos inmaduros son eliminados con las heces y se dispersan en el ambiente, en condiciones óptimas de temperatura, humedad y oxígeno se desarrolla en un período de dos semanas el segundo estado larvario (L2) dentro del huevo la cual es la fase infectante y puede permanecer viable varios meses en el suelo (Quiroz, 1988).

En los perros adultos tras la ingestión de huevos larvados después de la eclosión en el intestino las larvas migran a través de los tejidos en donde permanecen como L2 enquistadas sin alcanzar el estado adulto.

FIGURA 2



TESIS CON FALTA DE ORIGEN

Ciclo biológico del *Toxocara canis*

Estas larvas enquistadas pueden permanecer varios años en los tejidos o continuar su desarrollo a fases adultas en la perra gestante, estas larvas se reactivan por mecanismos hormonales no muy claros y alcanzan el útero entre el día 40 o 42 de la gestación infectando a los cachorros antes del nacimiento, posteriormente las larvas alcanzan también la glándula mamaria y son eliminadas a través de la leche. De esta manera los cachorros pueden nacer parasitados o adquirir la infección durante la lactancia siendo eliminadores potenciales de huevos a los 20 días de edad (Quiroz, 1988; Soulsby, 1987).

Un modo alternativo en el ciclo biológico ocurre cuando los huevos larvados son ingeridos por hospedadores paraténicos en los cuáles no hay desarrollo de la fase adulta del parásito, la L2 migra a través de la pared intestinal y alcanza el hígado, los pulmones y el corazón en donde entran a la circulación y por el torrente sanguíneo se distribuyen a otros órganos como el riñón, el ojo, el tejido muscular esquelético y el sistema nervioso central, en estos tejidos las L2 se enquistan y pueden permanecer viables largos periodos de tiempo. Al ser depredados estos hospederos paraténicos por perros adultos, la L2 reactiva su desarrollo en ellos y se convierte en adulto directamente en el intestino sin llevar a cabo migración somática. Eventualmente estos perros pueden eliminar huevos de *T. canis* en un corto período ya que generalmente hay eliminación espontánea de los adultos.

Entre los hospedadores paraténicos más importantes están los roedores como conejos, ratones y ratas; los ruminantes como los ovinos caprinos y bovinos; aves de crianza y otros (Soulsby, 1987). Recientemente se ha observado la capacidad de los artrópodos como la cucaracha *Blatella germanica* para mantener larvas enquistadas y se han propuesto como hospedadores paraténicos (Martínez *et al.*, 1999). Se han demostrado mediante estudios en

zonas urbanas y rurales que los mamíferos pequeños son un importante reservorio de *T. canis* entre los más frecuentemente encontrados están el *Mus musculus*, (Dubinsky *et al.*, 1994) muy común en nuestro país. El hombre es considerado como un hospedador accidental en el cual el comportamiento migratorio y patológico de las larvas es igual al que se observa en los paraténicos (Fig. 2).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

Debido a las condiciones de vivienda prevalecientes en las zonas urbanas en México, es común que los cachorros sean llevados rutinariamente a los parques públicos para la defecación, proporcionando una fuente constante de contaminación por huevos de *T. canis*; en estudios hechos en la Ciudad de México se ha observado que los lugares con más carga de huevos larvados de *T. canis* son los camellones, seguido de los jardines comunales (Martínez *et al.*, 1998). Sin embargo, el problema principal tal vez radica en la población canina callejera, sobre todo en épocas de crianza en donde hay un alto porcentaje de cachorros que por vía transplacentaria comúnmente nacen parasitados.

En estudios recientes hechos en México se ha determinado una incidencia del 8% de *T. canis* adultos en perros de más de seis meses por lo que no se pueden descartar como diseminadores potenciales de huevos en el ambiente (Soto-Porrúa *et al.*, 2000). Esto dado por el alto índice de mamíferos pequeños sobre todo roedores así como también artrópodos como *Blatella germanica* que conviven con la población canina callejera, siendo además parte de su dieta.

El humano adquiere la infección de manera más frecuente durante la niñez al ingerir accidentalmente huevos larvados (Beaver, 1969; Quiroz, 1988; Soulsby, 1982). En algunos muestreos del suelo de parques públicos se encontró que en algunos lugares con topografía baja en donde hay acumulación de agua, unos cuantos gramos de tierra puede contener cientos de huevos viables para la infección. En el cuadro 1 se muestran los resultados del estudio sobre la presencia de huevos de *T. canis* en parques, jardines y camellones de la Ciudad hecho por Martínez *et al.*, (1998). Muy comúnmente en estas plazas públicas, jardines y camellones es común que coincidan niños y perros (Buijs *et al.*, 1994).

Los factores de riesgo en los niños más asociados con la adquisición de la toxocarosis son: Apetitos degenerados como geofagia o unicofagia (pica), en conjunto con deficiencias en los hábitos higiénicos, también se ha encontrado relación con la convivencia con cachorros y con una alta población canina en la zona (Buijs *et al.*, 1994; Magnaval *et al.*, 1991; Holland *et al.*, 1994). En algunos estudios se ha determinado una incidencia mayor en niños que en niñas (Holland *et al.*, 1994), aunque en otros estudios esta relación no es significativa (Alonso *et al.*, 1998) y también se ha presentado una incidencia mayor en niños de raza negra sobre los niños de raza blanca (Worley *et al.*, 1984).

Existen varios reportes a nivel mundial sobre la seroprevalencia de AgEST (cuadro 2). En países desarrollados como Francia se encontró una seroprevalencia del 22% en un grupo de pacientes con cosinofilia existiendo una mayor incidencia en los niños del sexo masculino (Gueglia *et al.*, 1994). En Estados Unidos la seroprevalencia encontrada fue del 23.1% asociándose con problemas de pica, convivencia con perros y baja moderada en la inteligencia (Worley *et al.*, 1984). En los países en desarrollo las seroprevalencias tienden a ser

CUADRO 1

PRESENCIA DE HUEVOS DE *Toxocara* spp. EN DIFERENTES SITIOS DEL SUR DE LA CIUDAD DE MÉXICO, DISTRITO FEDERAL

Delegación política	Parque público	Jardín	Camellón
Coyoacán	2/30 (6.7%)	0/7 (0.0%)	4/18 (22.2%)
Iztapalapa	2/26 (7.7%)	0/5 (0.0%)	7/31 (22.6%)
Milpa Alta	0/2 (0.0%)	0/1 (0.0%)	1/9 (11.1%)
Tláhuac	1/6 (16.6%)	0/1 (0.0%)	1/6 (16.6%)
Tlalpan	0/4 (0.0%)	0/3 (0.0%)	2/14 (14.3%)
Xochimilco	2/14 (14.3%)	0/5 (0.0%)	5/5 (100%)
Total:	7/82 (8.5%)	0/22 (0.0%)	20/83 (24.1%)

10

TRAZAS CON
FALLA DE ORIGEN

Tomado de Martínez *et al.*, (1998)

CUADRO 2

FRECUENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Toxocara canis* EN PERSONAS DE DIFERENTES LUGARES DEL MUNDO

LUGAR	AÑO	No. MUESTRAS	EXAMEN	FRECUENCIA (%)
Alemania Occidental	1977	2864	MP	8.6
Inglaterra	1979	922	ELISA	2.6
Pensilvania E.U.A.	1980	47	ELISA	54.1
Zurich Suiza	1986	665	ELISA	5.1
Canberra Australia	1986	660	ELISA	7.0
Suecia	1989	323	ELISA	7.0
Barcelona España	1989	1018	ELISA	3.6
Francia	1994	1836	ELISA	22.0
Bogotá Colombia	1990	207	ELISA	43.6
Rusia	1990	4765	HAI	12.5
Brasil	1991	54	ELISA	40.0
Jordania	1992	699	ELISA	10.9
Malasia	1993	331	ELISA	19.6
Nepal	1996	200	ELISA	81.5

MP = Microprecipitación

ELISA = Inmunoensayo enzimático

HAI = hemaglutinación indirecta

Tomado de Alba, (1999)

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

más altas, por ejemplo en Venezuela se encontró un 30% en niños de siete a nueve años pero en niños de uno a tres años se encontró una incidencia del 10% lo que demuestra la importancia de los factores higiénico-ambientales para la infección (Lynch *et al.*, 1993). En Argentina existe un reporte donde se establece el 37.9% de seroprevalencia en la población pediátrica sin embargo no se encuentra relación con edad o sexo (Alonso *et al.*, 1998). De igual modo existen diferencias en las seroprevalencias de zonas rurales que en las zonas urbanas (Holland *et al.*, 1994) encontrándose por ejemplo en China una prevalencia del 17.1% en zonas rurales contra el 2.1% en zonas urbanas (Luo *et al.*, 1999).

1.4 PATOLOGIA

1.4.1.- *Larva Migrans Visceral (LMV)*

La LMV fue reportada por primera vez en la década de los 50's cuando la larva del segundo estadio de *Toxocara canis* fue encontrada e identificada en los tejidos de varios niños, esto despertó el interés por el estudio de la naturaleza de la infección y el ciclo de vida del parásito (Beaver, 1952). El síndrome con el que se vio asociado en estos niños fue caracterizado por una gran eosinofilia, diversos grados de hepatomegalia, hipergammaglobulinemia, y varios grados de infiltración pulmonar. También se han descrito en modelos experimentales y humanos varios signos y síntomas neurológicos que incluyen convulsiones semejantes a epilepsia, delirio, parálisis y meningitis (Tomimura *et al.*, 1976).

En el hospedador definitivo el *T. canis* adulto lleva a cabo una acción expoliadora quimófaga, irritativa y obstructiva que en algunos casos puede llevar a la muerte del cachorro. Sin embargo lo más común es que sólo se presente distensión abdominal e hirsutismo con retraso del crecimiento. Por efecto de la migración larvaria en el cachorro también se han descrito problemas respiratorios y neurológicos que tienden a desaparecer cuando alcanzan mayor edad (Soulsby, 1982).

En los hospedadores paraténicos la larva invasiva no continua su desarrollo pero sí se mantiene viva por largos períodos (años) principalmente en tejido muscular y en el sistema nervioso central además de ser metabólicamente activa (Meghji y Maizels, 1986; Tomimura *et al.*, 1976; Alba-Hurtado *et al.*, 2000). Beaver *et al.*, (1969) reportaron que las larvas pudieron mantenerse viables por nueve años en tejidos de primates (Citado por Tomimura *et al.*, 1976 y por Page *et al.*, 1992).

La migración larvaria a través de los tejidos del hospedador tiene tres acciones principales: 1) acción enzimática a diversos órganos producido por las proteasas que se secretan para el avance a través de los tejidos; 2) acción expoliadora histófaga y 3) acción antigénica que produce hipersensibilización tisular del hospedador a los antígenos de la larva. En el modelo de ratón tras la inoculación intragástrica de 1000 hite se vió que las larvas atraviesan la pared intestinal y pueden alcanzar el hígado el día 1 p.i., teniendo un pico máximo entre los días 2 y 3 p.i., los pulmones, riñón, músculo esquelético y SNC son alcanzado al día 4 p.i. como máximo (Olson, 1963).

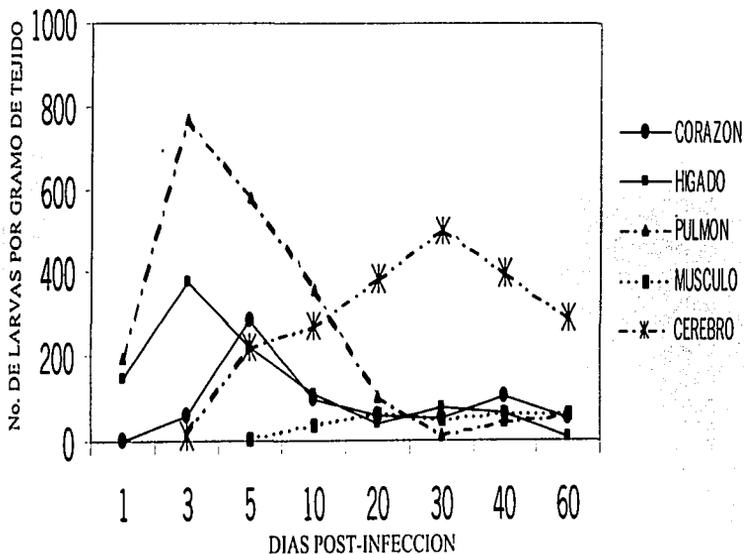
Alba-Hurtado *et al.*, (2000) estudiaron la cinética de migración larvaria en jerbos con varias dosis de hlc por vía intragástrica, el número de larvas recuperadas de diferentes órganos por medio de digestión artificial fue directamente proporcional al número de hlc inoculados, además se pudo apreciar que aunque el tejido muscular acumula la mayor parte de las larvas inoculadas, la mayor acumulación de larvas por gramo de tejido después de la migración se da en el cerebro (Fig. 3).

Las lesiones en los órganos pueden ser de tipo agudo o crónico. Los principales órganos afectados son el hígado, pulmón, riñón y cerebro. Estas lesiones pueden verse con o sin la presencia de la larva y esto sugiere la importancia de los productos antigénicos liberados por la larva en los tejidos. La lesión crónica característica es el granuloma en los cuales puede verse una gran infiltración por células mononucleares, fibroblastos y eosinófilos, así como la presencia de fibrosis alrededor de la lesión con trazas de calcificación en el centro de las lesiones que en algunos casos pueden ser extensas (Parsons *et al.*, 1986; Alba-Hurtado *et al.*, 2000).

La forma aguda se ve en el hígado de los jerbos entre el día 1 y 2 p.i., se caracteriza por una respuesta inflamatoria severa que provoca lesiones multifocales con necrosis y vacuolización con infiltrado de polimorfonucleares, principalmente neutrófilos con presencia de eosinófilos, además, es común encontrar larvas en los tejidos sin ninguna respuesta inflamatoria a su alrededor. Los pulmones son alcanzados durante la fase aguda de la toxocariosis, en este período las larvas atraviesan masivamente los pulmones entre el día 3 y 10 p.i. dejando a su paso lesiones agudas que posteriormente originan granulomas,

FIGURA 3

NÚMERO DE LARVAS RECUPERADAS POR GRAMO
DE DIFERENTES TEJIDOS DE JERBOS A DIFERENTES DÍAS
POST-INOCULACION CON 5000 HUEVOS LARVADOS DE *T. canis*.



15

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tomado de Alba, (1999)

posteriormente se presenta nuevamente una llegada masiva de larvas a través de la circulación sanguínea aproximadamente el día 40 p.i. originando nuevamente lesiones agudas además de las lesiones crónicas ya existentes (Alba-Hurtado *et al.* 2000).

La biometría hemática de los pacientes con *T. canis* se caracteriza por una eosinofilia relativa que rebasa el 70% con valores absolutos por arriba de 800 cel/mm³ (Gueglio *et al.* 1994; Glickman *et al.*, 1987b) siendo el límite superior de 400 cel/mm³ (Vazquez *et al.*, 1998) así como una hipergammaglobulinemia producida principalmente por un aumento en los niveles séricos de IgG, también hay aumento en las isohemaglutininas contra los tipos sanguíneos A y B en los individuos del grupo O esto dado por las reacciones cruzadas encontradas entre algunos antígenos de la larva y los grupos sanguíneos mencionados (Smith *et al.*, 1983).

También se han encontrado otros procesos relacionados con la presencia de la larva en los tejidos como linfadenopatía y anemia hemolítica (Szezepanski *et al.*, 1996), síndrome nefrótico (Shetty *et al.*, 1999) y algunas manifestaciones nerviosas del tipo epileptiforme (Glickman *et al.*, 1979).

1.4.2 - Larva Migrans Ocular (LMO)

Este síndrome ocular fue descrito por primera vez por Wilder en 1950 encontrando larvas en ojos enucleados por procesos de endoftalmitis con aparente proceso tumoral asociado al retinoblastoma (Wilder, 1950; Glickman *et al.*, 1979).

Este proceso se observa en la mayoría de los casos en ausencia de signos de LMV, la razón de esto aparentemente tiene que ver con dos factores: La infección con un bajo número de larvas y la edad del paciente, se ha visto una mayor incidencia de LMO en niños de 12 años o más. Las lesiones detectadas en el ojo son de tipo granulomatoso principalmente en la retina, ubicadas cerca del disco óptico y asociado a procesos de coriorretinitis, panuveítis, papilitis óptica con desprendimiento de la retina y pérdida de la visión (Glickman *et al.*, 1979; Glickman y Shofer, 1987).

Durante mucho tiempo la lesión granulomatosa en la retina era confundida con un proceso tumoral conocido como retinoblastoma, de manera frecuente estos pacientes eran sometidos a enucleación del globo ocular como medida preventiva para la metástasis tumoral, sin embargo en estudios realizados posteriormente se observó en algunos de estos niños la presencia de larvas causando problemas granulomatosos, este proceso aunque puede causar trastornos de la visión irreversibles no es causa de enucleación, que además de ser un proceso traumático severo también es causa de deformidad por desigualdad en el crecimiento de los huesos de la cara (Glickman y Shofer, 1987).

1.5 ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE LARVAS DE *T. canis* (AgEST)

Las larvas migrantes de *T. canis* secretan continuamente glicoproteínas *in situ* a través de sus orificios naturales conocidas como antígenos de excreciones y secreciones de *T. canis* (AgEST) (Maizels *et al.*, 1984; Savigny, 1975). Algunos de estos antígenos permanecen

unidos a la cutícula de la larva para después ser liberadas a los tejidos por lo que se han propuesto como un mecanismo de inmunoevasión (Maizels *et al.*, 1984).

Para el diagnóstico de la toxocarosis la detección de anticuerpos específicos es común y se utiliza con fines de diagnóstico, al no haber posibilidades reales de encontrar en forma directa evidencia parasitaria. La respuesta mediada por células, si bien se ha encontrado positiva para muchas de las infecciones parasitarias, solo ha sido empleada para el diagnóstico de unas pocas como la toxoplasmosis o la leishmanosis en donde la respuesta es de tipo celular (Margni, 1996).

Por lo anterior diversos autores han obtenido *in vitro* los AgEST manteniendo larvas en medios de cultivo para células (Savigny, 1975; Badley *et al.*, 1987; Bowman *et al.*, 1987; Magnaval *et al.*, 1991; Meghji *et al.*, 1986). Badley *et al.*, (1987) separaron 15 bandas de proteínas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida a partir de cultivos de larvas. En otros trabajos realizados se han determinado los AgEST que son reconocidos por anticuerpos de la clase IgG de ratones, primates y humanos infectados (Bowman *et al.*, 1987; Maizels *et al.*, 1984; Tomimura *et al.*, 1976). Recientemente nuestro grupo ha determinado el patrón de reconocimiento antigénico en los perros y en los jerbos (Muñoz, 1997; Alba, 1999).

A través de la inmunoelectrotransferencia o Western Blot (WB) se han podido determinar antígenos de la larva específicos de *T. canis* y antígenos que presentan reacción cruzada con otros helmintos. En los humanos se ha determinado un patrón de cuatro bandas de bajo peso molecular (LMW) que tienen una alta especificidad en el diagnóstico de la toxocarosis así como un patrón de alto peso molecular (HMW) que presenta cruces

antigénicos con otros helmintos como: *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides* sp., *Fasciola hepatica*, *Schistosoma* sp., *Oncocerca* sp., y la larva de *Echinococcus granulosus* productora del quiste hidatídico (Magnaval *et al.*, 1991).

1.6 INMUNOPATOLOGÍA

Los AgEST son considerados como un elemento distractor de la respuesta inmune, algunos mecanismos generales por los cuales estos antígenos interfieren con la respuesta inmune son: 1) neutralización de anticuerpos, 2) bloqueo de células efectoras, 3) inducción de tolerancia por células T ó B y 4) activación de mecanismos supresores de la respuesta (Margni, 1996).

Los AgEST son capaces de estimular una respuesta por Linfocitos T (LT) CD4+ principalmente el subtipo Th2 con un perfil de citocinas tales como IL-4 e IL-5 (Romagnani, 1994) La IL-5 es responsable de la eosinofilia y se ha demostrado que en los ratones infectados con *T. canis* se produce una primera elevación de la cantidad de eosinófilos al día 11 p.i. pudiéndose observar infiltrados eosinofílicos en las lesiones pulmonares. Un segundo pico es observado aproximadamente en el día 28 p.i., los dos picos son inhibidos totalmente cuando a los ratones se les administran anticuerpos contra IL-5 antes y durante la infección (Takamoto y Sugane, 1993).

También se ha visto que la administración de anticuerpos contra CD4+ es capaz de suprimir sólo el segundo pico de eosinofilia por lo que se deduce que el primer pico es producido por células diferentes a LT CD4+ en una respuesta timo-independiente, y que el

segundo pico es producido por LT CD4+ en una respuesta timo-dependiente (Takamoto y Sugane, 1993; Takamoto *et al.*, 1995). En otros trabajos se ha observado que en ratones atímicos solo hay un primer pico de eosinofilia de manera similar al que se ve en los ratones normales y que puede ser bloqueado con anticuerpos contra IL5, lo cual, afirma la existencia de otros tipos celulares productores de IL-5.

Recientemente en modelos *in vitro* estas células fueron caracterizadas por anticuerpos monoclonales como LT que expresan CD3 pero no CD4 ni CD8 conocidos también como células *naive* o linfocitos doble negativos (Takamoto y Sugane, 1993; Takamoto *et al.*, 1995).

En ratones normales y humanos también hay producción de otras citocinas del panel de las células Th2 como IL-4, IL-6, IL-10, e IL-13. La IL-13 bloquea la respuesta por Th1 y el aumento de IL-4 estimula de manera inespecífica varias clonas de linfocitos B (LB) y la producción de altos niveles de IgG e IgE no específica (Sher, 1995), por lo que se ha sugerido que se produce una activación policlonal inespecífica aumentando la susceptibilidad a varios alérgenos (Buijs *et al.*, 1994). También en trabajos recientes se ha demostrado la capacidad mitógena que poseen los antígenos somáticos de los gusanos adultos para los LB, así como su estimulación para la producción de grandes cantidades de IgG. Esta actividad contribuye de manera importante a la activación policlonal que se observa en la infección con *T. canis* (Wang *et al.*, 1995).

La incidencia de individuos seropositivos a *T. canis* en la población pediátrica en el mundo oscila entre el 7 y el 14% (Kerr-Muir citado por Szczepanski *et al.*, 1996), los niveles de

anticuerpos específicos resultantes de una sola estimulación antigénica son altos durante varios años (Fenoy *et al.*, 1992). Las inmunoglobulinas que se encuentran aumentadas principalmente son la IgG subtipo 4 que está asociada a fenómenos de citotoxicidad mediada por células anticuerpo-dependiente y la IgE (Obwaller *et al.*, 1998).

Recientemente se han visto niveles altos de complejos inmunes anti-IgE por autoanticuerpos de la clase IgG (IgG-IgE) en pacientes con toxocariosis, estos niveles son significativamente mayores en los individuos con toxocariosis clínica que los asintomáticos, lo que sugiere una participación importante de estos complejos en la patogenia de la enfermedad probablemente relacionado con fenómenos de hipersensibilidad tipo III (Obwaller *et al.*, 1998). Además, se producen alteraciones de la permeabilidad a nivel pulmonar y se ha demostrado que las manifestaciones de asma con cuadros de bronquitis recurrente ocurre en mayor proporción de manera significativa en grupos de niños seropositivos a AgEST (Buijs *et al.*, 1994) por lo que se discute la posibilidad de que la exposición a los AgEST puede acelerar la manifestación de los problemas asmáticos en niños con predisposición genética al padecimiento.

1.7 ASMA Y TOXOCARIOSIS

El asma es una enfermedad pulmonar que se caracteriza por un incremento en la respuesta de las vías aéreas a una variedad de estímulos externos, lo que produce inflamación y obstrucción de las mismas, estos procesos son reversibles de manera espontánea o con tratamiento (Meneses *et al.*, 1991). Este padecimiento es frecuente en los niños ocupando una de las principales tasas de morbilidad. Existe una clasificación hecha

por la "National Heart Lung and Blood Institute Asthma Education and Prevention Program" de la intensidad del padecimiento asmático dado con base en los signos y síntomas clínicos. Las presentaciones pueden ser: 1) Leve intermitente, 2) Leve persistente, 3) Moderada persistente y 4) Grave persistente. Se ha propuesto la presencia de larvas de *T. canis* en los pulmones como un factor predisponente para las manifestaciones asmáticas, esto asociado a que la principal respuesta que se monta en las infecciones por helmintos es por IgE (Hagan, 1993). En la esquistosomiasis se ha visto que los niveles altos de IgE séricos previenen una reinfección en pacientes que han tenido el padecimiento (Capron *et al.*, 1982), sin embargo, en algunos individuos esta respuesta es muy elevada y contraproducente (Capron *et al.*, 1986). En la toxocariosis la migración a través del pulmón y la presencia de células con capacidad de producir interleucinas puede ser importante para la asociación de toxocariosis y los problemas asmáticos, adicionalmente a esto varios autores han encontrado por ELISA una mayor frecuencia de anticuerpos específicos contra AgEST en niños asmáticos en comparación con niños no asmáticos. Desowitz *et al.*, (1981) observaron que 29 % de niños asmáticos presentaron anticuerpos específicos anti-AgEST contra un 6.4% en niños no asmáticos. Buijs *et al.*, (1994) observaron seroprevalencias de títulos anti-AgEST de 19.2 % para niños con antecedentes de asma contra un 9.9 % para niños no asmáticos. Lokman *et al.*, (1997) reportó en Malasia una diferencia del 57.8% contra el 15.4% en la seroprevalencia de niños asmáticos y sanos respectivamente.

1.8 JUSTIFICACIÓN

Hasta la fecha se ha investigado el comportamiento del proceso alérgico con el conjunto de AgEST a través de pruebas de ELISA para IgE específica contra *T. canis* (Magnaval *et al.*, 1992). No existen reportes de los antígenos específicos responsables de este fenómeno alérgico, se sabe que los patrones de antígenos reconocidos varían de una especie a otra por lo se sugiere que los diferentes antígenos pueden desencadenar fenómenos diferentes de activación en algunas especies o simplemente ser inertes para otras. Por lo anterior, consideramos de gran importancia el determinar los antígenos de *T. canis* que estimulan directamente la producción de IgE en niños asmáticos. Lo anterior nos podría proporcionar conocimientos que puedan servir de base para futuras investigaciones referentes al diagnóstico y tratamiento del asma así como evaluar el papel que juega la infección con *T. canis* en estos pacientes.

2.- OBJETIVOS

GENERAL:

Contribuir al estudio de los efectos de la toxocarosis humana en la respuesta inmune.

PARTICULARES:

- a).- Determinar utilizando la técnica de ELISA los porcentajes de niños asmáticos y sanos de una población mexicana seropositivos a AgEST.
- b).- Determinar utilizando el Western blot las diferencias en los patrones AgEST reconocidos por IgG y por IgE entre los grupos de niños asmáticos y sanos.
- c).- Determinar los AgEST que cruzan antigénicamente con diferentes helmintos.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. - LUGAR DE REALIZACIÓN

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSAs) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. Carretera México-Teoloyucan Km. 3.5 Cuautitlán Izcalli Edo. de México. La toma de muestras sanguíneas fue realizada en el departamento de Alergia e Inmunología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" que está situado en Dr. Márquez y Av. Cuauhtémoc en la Colonia Doctores, México D.F.

3.2.-DISEÑO EXPERIMENTAL

a).- Determinación del tamaño de muestra:

Para determinar el tamaño mínimo de muestra se calculó la n muestral utilizando el software Primer of Biostatic© 4.0, con lo que la n calculada fue de 138.4 pacientes como mínimo para cada grupo ($\alpha = 95\%$, $\beta = 10\%$). Lo anterior tomando como referencia una seroprevalencia del 9.9 % para niños no asmáticos y del 19.6% para niños asmáticos ($p < 0.05$) (Buijs *et al.*, 1994).

b).- Obtención de pacientes y criterios de formación de los grupos:

Los pacientes asmáticos y no asmáticos fueron provenientes del Departamento de Alergia e Inmunología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez". Los criterios de inclusión para los pacientes asmáticos fueron:

- Sexo: indistinto
- edad: entre 4 y 12 años
- con expediente completo en el Hospital Infantil en donde se establece el diagnóstico clínico de asma.

Para el grupo control sano los criterios de inclusión fueron:

- Sexo indistinto
- edad: entre 4 y 12 años
- ausencia de asma en cualquier modalidad
- sin un cuadro patológico de vías respiratorias inferiores o superiores en un periodo de por lo menos seis semanas anteriores a la fecha de la toma de muestra.

Se excluyeron del presente estudio aquellos pacientes sin expediente completo, que no autorizaran toma de productos sanguíneos, que no firmaran hoja de consentimiento y que no llenaran de manera satisfactoria el cuestionario del investigador.

3.3.-OBTENCIÓN Y CULTIVO DE HUEVOS DE *T. canis*

Se recolectaron especímenes de *T. canis* adultos a partir de necropsias realizadas a cachorros de entre uno y tres meses de edad, los cuales fueron proporcionados por el Centro Antirrábico de Cuautitlán. Los gusanos hembra se separaron y por disección del útero se obtuvo el mayor número de huevos posible, después con un colador fino se eliminaron los restos y membranas de los órganos del parásito. Los huevos se centrifugaron (5000 rpm/5min) y el sobrenadante se desecho, la pastilla fue resuspendida en una solución de formol al 2% y colocada en cajas de Petri e incubados en estufa bacteriológica a una temperatura de 25 °C alrededor de 28 días (Savigny, 1975).

3.4.-OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LARVAS

Una vez transcurridos los 28 días de incubación, los huevos se observaron al microscopio para verificar el desarrollo de la embrionación. Se realizaron una serie de lavados por centrifugación y resuspensión en solución salina fisiológica estéril, posteriormente un lavado en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por diez minutos y por último cuatro lavados asepticos en campana de flujo laminar con medio de cultivo estéril RPMI 1640 (In Vitro S.A. ®) amortiguado con HEPES a un pH de 7.2 con 100µg/ml de gentamicina y glucosa al 1% . Las larvas viables fueron liberadas por agitación y se separaron por una técnica de Baermann modificada (Bowman *et al.*, 1987), posteriormente se recolectaron y se resuspendieron en cajas Falcon de 25 cm² (Becton

Dixon®) con medio de cultivo RPMI-1640 a una concentración de 10^4 larvas/ml (Savigny, 1975; Bowman *et al.*, 1987).

3.5.- OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE *T. canis* (AgEST)

Semanalmente el medio de cultivo en el que se encontraban suspendidas las larvas se cambió, filtró y conservó a -20 °C; los antígenos de excreciones y secreciones en el sobrenadante producto del metabolismo de las larvas, fue reunido en un pool de varias semanas y se concentró a través de un equipo de ultrafiltración (Amicon®14111 M52) con membranas de exclusión de 10 kD. La concentración de proteínas fue determinada utilizando la técnica de Bradford (Bowman *et al.*, 1987; Muñoz, 1997; Alba, 1999). Periódicamente los antígenos eran evaluados por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) a una concentración del 12 % previa ebullición en buffer reductor de Laemmli. Una vez hecho el corrimiento las bandas fueron teñidas con azul de Coomassie y nitrato de plata. Para determinar los pesos moleculares, se emplearon marcadores de PM de referencia y los geles fueron analizados en un equipo Syngene con el software Gene-Snap y Gene-Tools (Millennium Products®) (Muñoz, 1997; Alba, 1999).

3.6.- OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS SOMÁTICOS DE *Ascaris suum* (ASAs)

Se obtuvieron adultos de *A. suum* a partir de colectas en la matanza de cerdos en el rancho Municipal de Naucalpan, los gusanos fueron lavados varias veces en PBS y

congelados a -20°C hasta su utilización. Los gusanos fueron seccionados con bisturí en una caja Petri estéril y posteriormente homogenizados en un Tembrook de vidrio, en presencia de NaOH 1M , después de diez minutos la solución fue neutralizada con HCl 1M y centrifugada a 5000 rpm a 4°C por una hora. El sobrenadante fue filtrado a través de Watmann No. 1 y después filtrado por membrana de $0.22\mu\text{m}$, finalmente se le adicionó éter en proporción de 1 a 3 del volumen final y se conservó a -20°C no más de 20 días hasta su utilización (Camargo *et al.*, 1992).

3.7.-DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE ELISA PARA DETERMINACIÓN DE IgG CONTRA AgEST (ELISA-IgG)

Las cantidades óptimas de antígeno, suero y conjugado para la realización de esta prueba fueron establecidas realizando una estandarización mediante la combinación de diluciones seriadas entre ellas, tomando como criterio la máxima lectura en D.O. con el mínimo color inespecífico de fondo. Se utilizaron placas de 96 pozos de poliestireno (Maxisorp Nunc®) las cuáles fueron sensibilizadas de manera alternada con AgEST y con medio solo RPMI-1640 en el cual se empleó para el mantenimiento de las larvas. Se emplearon $50\ \mu\text{l}$ por pozo de una solución de $1.25\ \mu\text{g/ml}$ de AgEST en buffer de bicarbonatos (pH 9.6) y la misma cantidad del medio de cultivo. Posteriormente las placas fueron lavadas con una solución de PBS con Tween 20 al 0.1% (PBS-T0.1) y los sitios libres de la placa se saturaron con una solución de albúmina sérica bovina (SIGMA® A-3294) al 3% en PBS (PBS-ABS 3%). Los sueros problema fueron diluidos v/v 1:32 en PBS-T0.1 e incubados por duplicado en pozos con AgEST y con medio RPMI-1640 solo a

razón de 50 µl por pozo por 2h a 37 °C; después se realizaron lavados con PBS-T0.1 y las placas se incubaron con un policlonal de cabra anti-IgG (Scrotec® AHP0003P) humana conjugado con peroxidasa a una dilución de 1:10,000 por 45 minutos a 37 °C. El desarrollo de color se llevó a cabo agregando a cada pozo 100 µl de la solución reveladora (0.05% OPD, 0.01% H₂O₂ en solución reguladora de citratos) por 15 minutos a temperatura ambiente en obscuridad, la reacción se paró con 50 µl de ácido ortofosfórico al 6%. Las placas se leyeron a una longitud de onda de 492nm. En un lector de ELISA Ascent (Labsystems®). La determinación de la absorbancia específica (EAs) de cada suero se realizó de la siguiente manera:

$$EAs = \frac{(D.O. AgEST a - D.O. RPMI a) + (D.O. AgEST b - D.O. RPMI b)}{2}$$

En donde:

EAs = Absorbancia específica

D.O. AgEST = Densidad óptica del pozo sensibilizado con AgEST + el suero problema

D.O. RPMI = Densidad óptica del pozo sensibilizado solo con RPMI-1640 + el suero problema

a = repetición 1

b = repetición 2

Para detectar cualquier color inespecífico de fondo por efecto de algún reactivo en todas las placas se hicieron cuatro testigos con ausencia de antígeno, suero, conjugado y cromógeno respectivamente, todos ellos en presencia del suero de referencia positivo. Para que la placa se diera como válida todos los testigos debían tener valores marginales de EAs.

Cuando los sueros probados presentaron un valor negativo como resultado de la menor absorbancia del suero con AgEST que el mismo con RPMI-1640 se les asignó cero EAs.

El valor de corte se determinó realizando lecturas por cuadruplicado de nueve sueros negativos a un kit comercial de ELISA (Alexon Trend Inc®) para *T. canis* provenientes de personas asintomáticas proporcionados por el laboratorio de parasitología de Hospital Infantil de México "Federico Gómez" dichos pacientes no presentaban antecedentes clínicos sugestivos de toxocarosis manteniendo valores normales de eosinófilos circulantes. La media aritmética de los negativos más 3 desviaciones estándar fue tomado como valor de corte de la prueba (Lynch *et al.*, 1988). También se logró obtener seis sueros de pacientes con diagnóstico de toxocarosis clínica y positivos al mismo kit comercial de ELISA para *T. canis*.

3.8 .- DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE ELISA PARA DETERMINACIÓN DE IgE CONTRA AgEST (ELISA-IgE)

Se siguieron los mismos procedimientos para la estandarización y el cálculo de la absorbancia específica ya descritos anteriormente con las siguientes modificaciones: Los pozos fueron sensibilizados con 100 µl de una solución de 10 µg/ml de AgEST por 24 h a 4 °C. Después de ser lavadas las placas se bloquearon con PBS-ABS al 3% y se guardaron a -20 °C Los sueros problema fueron utilizados a una dilución de 1:10 en PBS-ABS1% e

incubados dos horas en la placa, posteriormente se realizaron 4 lavados en PBS-T 0.1 y uno con agua destilada. Cien microlitros de un conjugado anti-IgE (Serotec AHP007P®) 1:500 fue colocado en cada pozo e incubado 18 a 24 h a 4 °C. Se realizaron los lavados y el color fue desarrollado con OPD de manera ya descrita anteriormente. El valor de corte de esta prueba se determinó en base a un análisis de frecuencias poblacional del total de muestras analizadas (Margni, 1996).

3.9 .-ELECTROTRANSFERENCIAS

Se utilizó un equipo Transblot Semidry (Bio-Rad®) de electrotransferencia semiseca. Los AgEST fueron separados en SDS-PAGE (250 µl por gel) a 100 V, 120 mA por dos horas. Posteriormente el gel y la membrana de nitrocelulosa (NC) fueron equilibrados en buffer de transferencia por 15 minutos y después fueron colocados entre tres capas de papel filtro remojados en la misma solución. Esta preparación se colocó entre los dos platos electrodos y la transferencia fue hecha a 12 V por 45 minutos. La electroforesis y la transferencia fueron monitoreados a través de marcadores de peso molecular preteñidos (Bio-Rad®). Una vez terminado el proceso se colocó la NC en Tris-buffer salino con 3% de ABS toda la noche a 4 C (Muñoz, 1997; Alba, 1999).

3.10 .-DESARROLLO DEL WESTERN BLOT

La NC con los antígenos transferidos fue lavada tres veces en agua destilada y se cortó en tiras de 0.3 mm. Los sueros fueron diluidos en PBS-ABS 1% 1:40 y 1:200 en un

volumen total de 1 ml, se incubaron en presencia de 50 µl. de ASAs durante 30 minutos, posteriormente las tiras con antígeno fueron colocadas y mantenidas en agitación durante dos horas a temperatura ambiente, se hicieron lavados con PBS-T0.1 cinco veces por tres minutos. Después las tiras fueron incubadas con un policlonal de conejo y anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (AHP003P Serotec®) a una dilución de 1:2000 por una hora, nuevamente se lavó con PBS-T0.1 siete veces por dos minutos y las bandas fueron reveladas con una solución 0.05% de 4-cloro-*n*-naftol en MeOH al 16% con 0.001% de H₂O₂. Los sueros que resultaron negativos o con un patrón de bandas sólo de alto peso molecular fueron nuevamente probados a una dilución única de 1:40 en presencia y en ausencia de ASAs.

Para el WB-IgE los volúmenes utilizados fueron de 500 µl, la NC fue bloqueada con la solución de bloqueo del kit Aurora WB (SIGMA®); los sueros fueron incubados previamente con 50 µl. de ASAs como se describió anteriormente a una dilución única de 1:10 en PBS-ABS 1% por dos horas, los lavados fueron realizados con una solución de PBS-T al 0.3% cinco veces por tres minutos y posteriormente se utilizó un policlonal anti-IgE humana conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma® A-3525) a una dilución de 1:500 por una hora previo lavado, el sustrato autoluminiscente (Star-Light Aurora®) se puso en los pozos durante cinco minutos con agitación suave para después hacer un autorevelado en papel fotográfico (Kodabromc II RC Kodak®) por contacto en un chasis radiográfico por 45 minutos. El papel fue revelado por el método convencional con los reactivos del fabricante.

3.11.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados en tablas de contingencia en el programa Excel (Microsoft) utilizando las pruebas de X^2 y t de Student. Para establecer la significancia estadística se tomó en todos los casos un nivel de confianza del 95% (Daniel, 1974).

RESULTADOS

4.1.- OBTENCIÓN DE AgEST

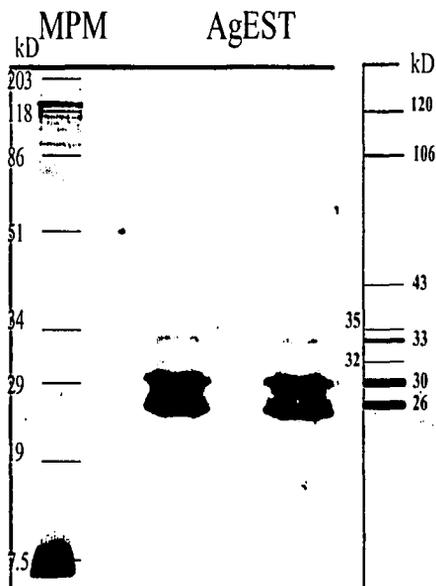
Se prepararon un total de ocho cajas Falcon con 10 ml cada una de una suspensión de 10^4 larvas por ml. Semanalmente el sobrenadante fue recolectado, filtrado y congelado hasta tener un total de 1,500 ml. De este volumen se obtuvo por ultrafiltración un concentrado con 200 $\mu\text{g/ml}$ de proteína determinado por el método de Bradford. Para evaluar la integridad de las proteínas, éstas fueron separadas por electroforesis en gels de poliacrilamida al 12 y 10% determinándose un total de 8 bandas bien definidas de 219, 106, 74, 51, 35, 32 y 30 kD. (Fig 4). Las proteínas más abundantes fueron de 30 y 26 kD. La antigenicidad del concentrado fue evaluada por inmunodifusión utilizando sueros de conejos Nueva Zelanda blancos inoculados con 5,000 huevos larvados de *T. canis*.

4.2.- OBTENCIÓN DE SUEROS DE NIÑOS ASMÁTICOS Y SANOS

En el presente estudio participaron un total de 437 niños de los cuales 285 fueron del grupo asmático y 152 del grupo no asmático (sanos). La edad media de los niños asmáticos fue de 6.9 años, 65% fueron niños y 35% niñas. El grupo de niños sanos presentó un promedio de edad de 7.2 años, 49.2% fueron niños y 50.7% niñas.

FIGURA 4

PATRÓN DE AgEST EN GEL DE SDS-PAGE



Los AgEST fueron separados en gels de SDS-PAGE en condiciones reductoras y teñidos con nitrato de plata, un total de ocho bandas fueron caracterizadas y sus pesos moleculares se determinaron con un patrón de proteínas como marcadores de peso molecular conocido (MPM). Las bandas determinadas fueron de 219, 106, 43, 35, 33, 32, 30 y 26 kD.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

En el grupo asmático 63.3% (189/285) tuvieron diagnóstico de asma leve intermitente, 21.4% (61/285) diagnóstico de asma leve persistente, 11.9% (34/285) diagnóstico de asma moderada persistente y 0.035% (1/285) diagnóstico de asma grave persistente. Los niños sanos fueron obtenidos del servicio de urgencias traumatológicas previo llenado del cuestionario y de forma consecutiva a su llegada al servicio los sueros obtenidos fueron numerados de forma progresiva.

4.3 - DETERMINACIÓN DE IgG CONTRA AgEST UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ELISA (ELISA-IgG)

El valor de corte de la prueba se determinó a partir de nueve sueros negativos a una ELISA comercial referidos por el Hospital Infantil "Federico Gómez". El promedio de las lecturas por cuadruplicado de estos sueros más tres desviaciones estándar fue tomado como valor de corte de la prueba, este valor fue establecido en 0.077 EAs (cuadro 3). Un grupo de sueros positivos a la misma prueba de ELISA comercial fueron probados en la ELISA-IgG estandarizada en este trabajo, resultando en todos los casos con EAs por arriba del valor de corte (cuadro 4).

Un total de 285 sueros de pacientes asmáticos fueron evaluados, de ellos 88 resultaron positivos a la prueba de ELISA (30.8%) y 197 (69.2%) fueron negativos. Para el grupo de pacientes sanos se evaluaron 152 muestras de las cuales 30 (19.73%) resultaron positivos y 122 (80.27%) resultaron negativos.

CUADRO 3

DETERMINACIÓN DEL VALOR DE CORTE PARA LA ELISA-IgG

No. Ref	1°	2°	3°	4°	PROM
7738	0.065	0.059	0.054	0.037	0.053
7730	0.015	0	0	0	0.037
7725	0	0	0	0	0
7753	0.017	0	0	0	0.004
7741	0.014	0.004	0.001	0	0.004
7752	0	0	0	0	0
7732	0	0	0	0	0
7735	0.059	0.055	0.044	0.03	0.047
7771	0.028	0.042	0.021	0	0.018

X = 0.0146

SD = 0.021

X+3SD = **0.077**

El valor de corte de la ELISA-IgG fue determinado con un grupo de sueros obtenidos de personas sanas, sin manifestaciones clínicas de toxocarosis y negativos a una prueba de ELISA comercial, todos ellos referidos por el Laboratorio clínico del Hospital Infantil de México "Federico Gómez". El promedio de las EAs por cuadruplicado más tres desviaciones estándar fue tomado como valor de corte de la prueba fijado en 0.077 EAs. Los valores negativos fueron llevados a cero.

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

CUADRO 4

SUEROS DE REFERENCIA POSITIVA PARA LA PRUEBA DE ELISA-IgG

No. DE REFERENCIA	ELISA COMERCIAL ¹	ELISA-IgG ²
7693	1.658	0.170
7649	1.06	0.281
7370	0.506	0.268
7441	0.305	0.177
R +	0.916	0.229

¹ Valor de corte 0.3 D.O.

² Valor de corte 0.077 EAs

Referencias positivas. Se probaron cinco sueros referenciados por el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" todos con diagnóstico clínico de toxocariosis y positivos a una ELISA comercial para AgEST, todos los sueros mostraron valores de EAs en nuestra ELISA-IgG por arriba del valor de corte.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

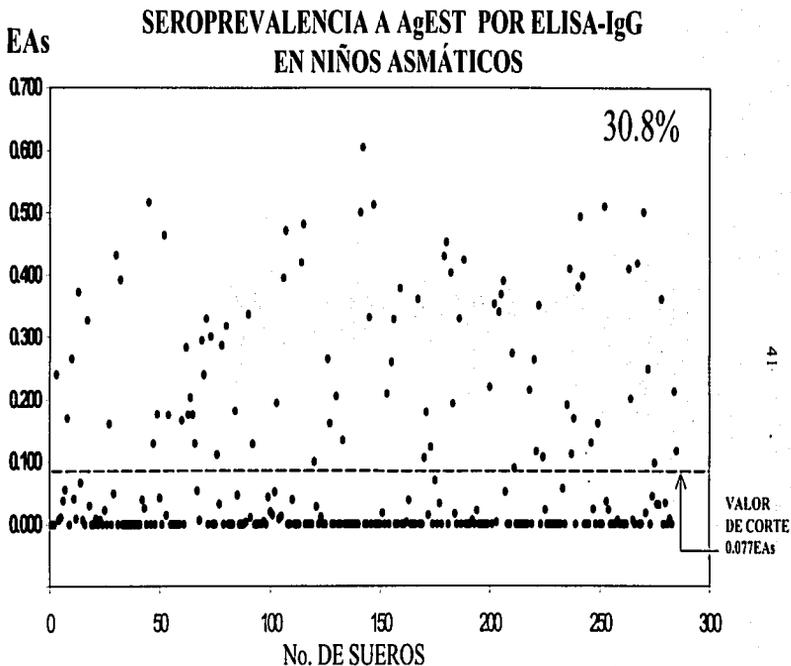
Las gráficas de dispersión de las EAs de los dos grupos se presentan en las figuras 5 y 6. La prueba de χ^2 determinó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las seroprevalencias del grupo asmático y el grupo sano (apéndice 4).

El promedio de lecturas de los sueros positivos en cada grupos fue determinado en 0.280 EAs para el grupo asmático y en 0.294 EAs para el grupo de niños sanos. No hubo diferencia estadística entre los promedios de lecturas de ambos grupos.

4.4 - DETERMINACIÓN DE LA IgE CONTRA AgEST UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ELISA (ELISA-IgE)

Para la obtención del valor de corte de esta prueba se realizó un análisis de frecuencias poblacional, se analizaron 433 muestras de ambos grupos el resultado del análisis de frecuencias mostró una curva bimodal de la cuál se partió para la separación de dos poblaciones: población 1 (negativos) y población 2 (positivos) (Figura 7). De cada una de estas poblaciones se determinó la media aritmética y desviación estándar. Las poblaciones fueron definidas al 99% de confianza utilizando la media más tres desviaciones estándar para el caso de la población 1 y como la media menos tres desviaciones estándar para el caso de la población 2 (Margni, 1996; Tijssen, 1985). La zona de traslape de ambas poblaciones determino un rango cuyos límites definieron los valores de corte (Figura 8). Los límites fueron de la siguiente forma: ≤ 0.171 EAs negativo; ≥ 0.172 EAs pero ≤ 0.423 EAs sospechoso y ≥ 0.424 EAs positivo.

FIGURA 5

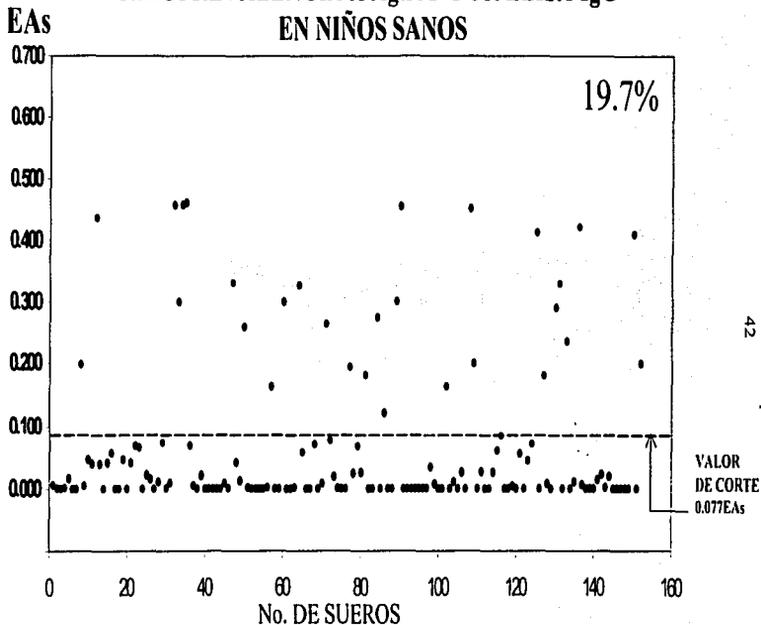


La seroprevalencia a AgEST del grupo de niños asmáticos fue determinada por ELISA-IgG, se evaluaron un total de 285 sueros de niños asmáticos de los cuales 88 (30.8%) presentaron EAs por arriba del valor de corte el cual fue fijado en 0.077 EAs.

TESIS COM
EVALUACIÓN

FIGURA 6

SEROPREVALENCIA A AgEST POR ELISA-IgG
EN NIÑOS SANOS

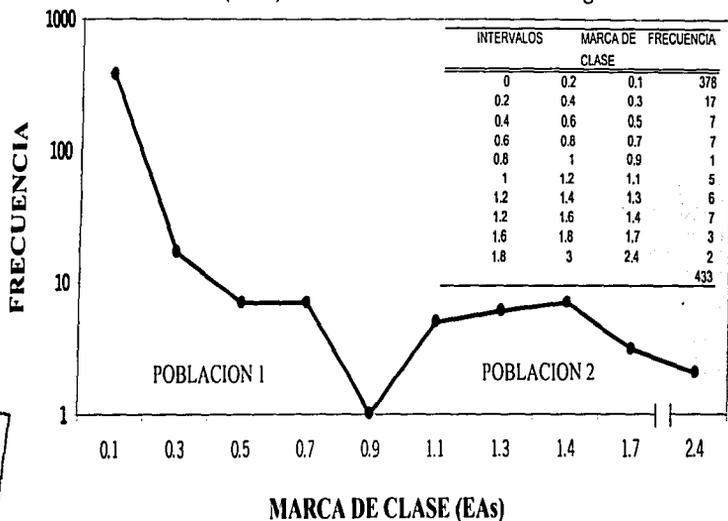


La seroprevalencia a (AgEST) del grupo de niños sanos fue determinada por ELISA-IgG, se evaluaron un total de 152 sueros de niños sanos de los cuales 30 (19.7%) presentaron EAs por arriba del valor de corte el cual fue fijado en 0.077 EAs.

TESIS CON
FALLAS DE ORIGEN

FIGURA 7

FRECUENCIAS DE LECTURAS DE ABSORBANCIA ESPECIFICA
(EAs) EN LA PRUEBA DE ELISA-IgE



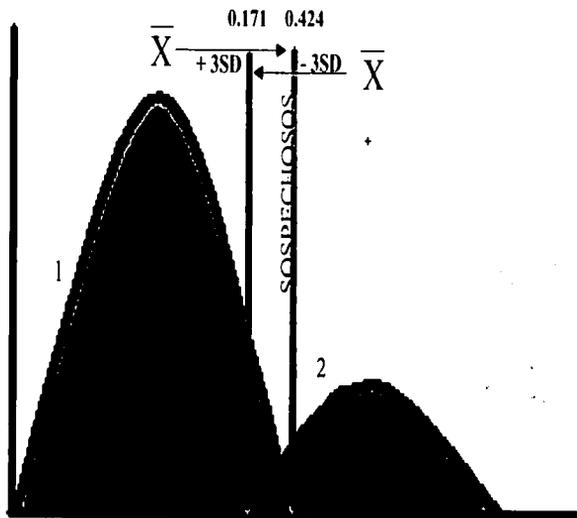
43

TESIS CON
BALA DE ORIGEN

El valor de corte para la prueba de ELISA IgE fue determinado mediante el análisis de frecuencias de una población De 437 sueros de niños asmáticos y sanos, la gráfica muestra una curva de distribución bimodal que separa dos poblaciones: una de bajas lecturas de EAs (población 1) y otra de altas lecturas de EAs (población 2). Los intervalos de clase fueron fijados de 0.2 EAs y el punto de máxima inflexión de la curva se aprecia en el intervalo 5 con 0.9 EAs como marca de clase.

FIGURA 8

DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE CORTE PARA LA PRUEBA DE ELISA-IgE



Los valores de corte para la ELISA-IgE fueron determinados a partir de las dos poblaciones determinadas en el análisis de frecuencias. Los valores se calcularon como la media aritmética más tres desviaciones estándar para la población 1 y como la media menos tres desviaciones estándar para la población 2. Las zonas sin traslape en cada una de las curvas representa las poblaciones negativas (población 1) y positivas (población 2). La zona de traslape de las dos curvas Representa una zona de incertidumbre por lo que los sueros que quedaron en este rango de lecturas se catalogaron como sospechosos.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

En esta prueba se evaluaron 283 de los 285 sueros de pacientes asmáticos de los cuales 22 (7.77%) resultaron positivos, 15 (5.3%) fueron sospechosos y 241 (87.0%) resultaron negativos (figura 9). De este grupo todos los sueros positivos a ELISA-IgE fueron positivos también a ELISA IgG. De los 15 pacientes sospechosos 13 fueron positivos a ELISA IgG y dos resultaron negativos. Siete sueros no pudieron ser evaluados.

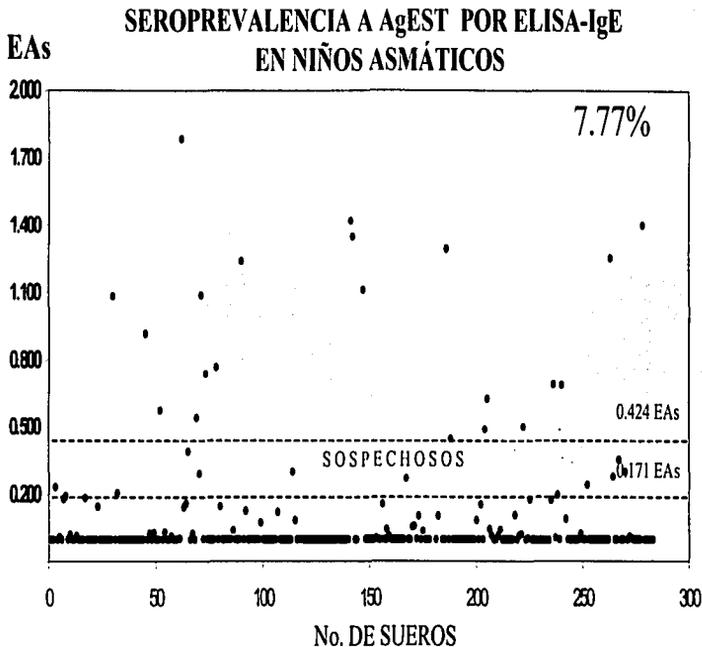
Del grupo de pacientes sanos se evaluaron 152 muestras de las cuales 10 (6.57%) resultaron positivas, ocho (5.26%) fueron sospechosos y 134 (88.15%) resultaron negativos. De este grupo sano, sólo un suero negativo a ELISA-IgG resultó positivo para ELISA-IgE pero no pudo ser posible su detección por WB (figura 10). De los ocho sueros sospechosos seis resultaron positivos a ELISA-IgG y dos fueron negativos.

El promedio de lecturas de los sueros positivos fue calculado en 1.03 EAs para el grupo asmático y 1.15 EAs para el grupo sano. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre las seroprevalencias ni entre el promedio de lecturas de los dos grupos.

4.5 .- WESTERN BLOT IgG

Los sueros positivos a ELISA-IgG de ambos grupos reconocieron un total de 11 bandas de AgEST, los pesos moleculares se determinaron en 219, 120, 106, 74, 51, 43, 36, 33, 32, 30 y 26 kD respectivamente (figura 11).

FIGURA 9



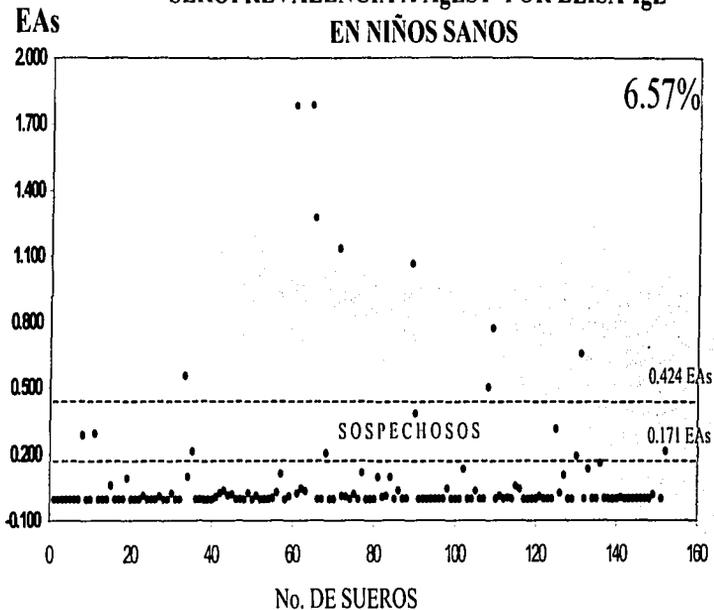
46

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La seroprevalencia del grupo de niños asmáticos fue determinada por ELISA-IgE, se evaluaron un total de 283 sueros de los cuales 22 (7.77%) presentaron EAs por arriba del valor de corte y 15 (5.39%) quedaron en el rango de sospechosos. Los valores de corte fueron: positivo: >0.424 EAs; sospechoso: entre 0.171 y 0.424 EAs y negativo <0.171 EAs.

FIGURA 10

SEROPREVALENCIA A AgEST POR ELISA-IgE EN NIÑOS SANOS



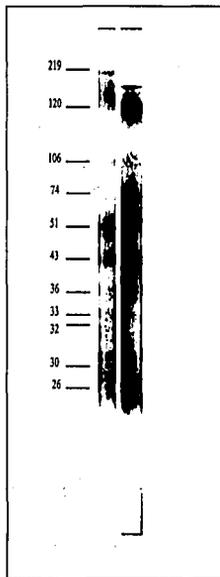
47

La seroprevalencia del grupo de niños sanos fue determinada por ELISA-IgE, se evaluaron un total de 152 sueros de los cuales nueve (6.57%) presentaron EAs por arriba del valor de corte y ocho (5.26%) quedaron en el rango de sospechosos. Los valores de corte fueron: >0.424 EAs; sospechoso: entre 0.171 y 0.424 EAs y negativo < 0.171 EAs.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 11

PATRÓN DE RECONOCIMIENTO DE LOS AgEST POR WESTERN BLOT-IgG



Un total de 11 bandas de AgEST fueron reconocidas por los sueros de niños asmáticos y sanos positivos a ELISA-IgG a través de la técnica de Western blot para determinación de IgG. Los pesos moleculares de las mismas van desde los 26 hasta los 219 kD.

TESTES CONT
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD NACIONAL

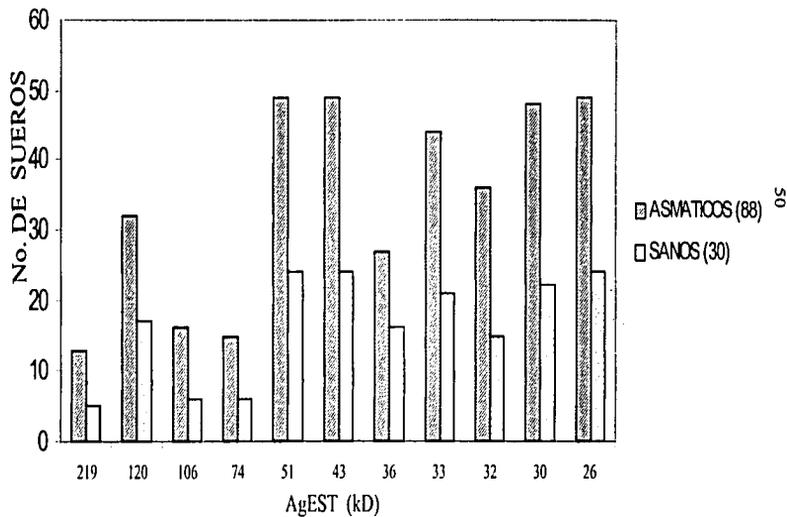
Las bandas más frecuentemente reconocidas fueron las de 51, 43, 30 y 26 kD siendo reconocidas por más del 73% de los pacientes sanos y por más del 54% de los pacientes asmáticos, las bandas de 120, 36, 33 y 32 kD fueron reconocidas por más del 50% de los pacientes sanos y por más del 30% de los pacientes asmáticos, las de menor frecuencia fueron las de 219, 106 y 74 kD reconocidas por menos del 20% de los sueros de ambos grupos (Figura 12 y 13). El promedio de bandas reconocidas fue de 7.71 en el grupo de niños asmáticos y de 7.2 en el grupo de niños sanos.

El criterio de positividad para los sueros probados fue determinado por el reconocimiento de por lo menos tres de las cuatro bandas más frecuentes (51, 43, 30 y 26 kD). En los sueros de ambos grupos que presentaron reacción cruzada, las bandas que fueron eliminadas por la absorción con ASAs fueron las de 74 y 43 kD (Figura 14). En el grupo de niños asmáticos dos sueros también presentaron reacción cruzada con la banda de 51 kD (Figura 15).

De los 88 sueros de pacientes asmáticos positivos a la ELISA-IgG 49 (55.68%) presentaron un patrón positivo a AgEST, algunos de ellos (8/88; 9.09%) además de las bandas más frecuentes, también presentaron bandas de reacción cruzada; 15 (17.04%) fueron negativos y 15 (17.04%) de ellos presentaron únicamente bandas de reacción cruzada con antígenos somáticos de *Ascaris suum*; los restantes 9 (10.22%) no fueron probados por no contar con cantidades suficientes de suero.

FIGURA 12

DETERMINACIÓN POR WB-IgG DE LA FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO DE LOS AgEST POR SUEROS POSITIVOS A ELISA-IgG

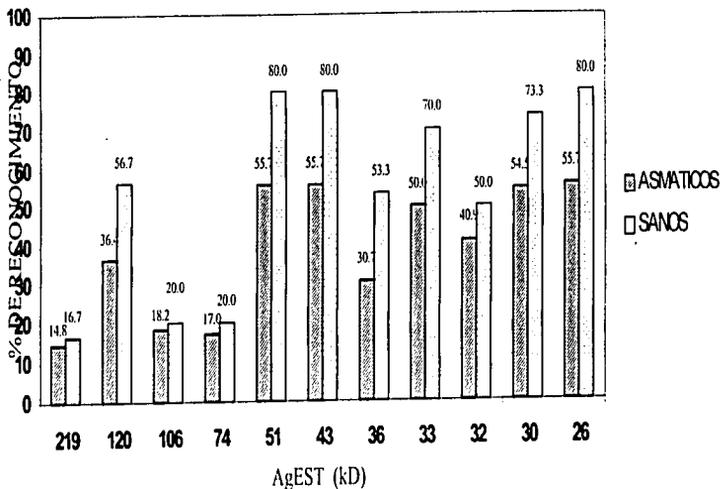


Frecuencia de reconocimiento para los AgEST determinada por la técnica de WB-IgG en 88 sueros de niños sanos y 30 de niños asmáticos, todos ellos positivos a la ELISA-IgG. Los AgEST más frecuentes en ambos grupos son los de 51, 43, 30 y 26 kD.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FIGURA 13

PORCENTAJE DE RECONOCIMIENTO DE LOS AgEST
POR SUEROS POSITIVOS A ELISA-IgG

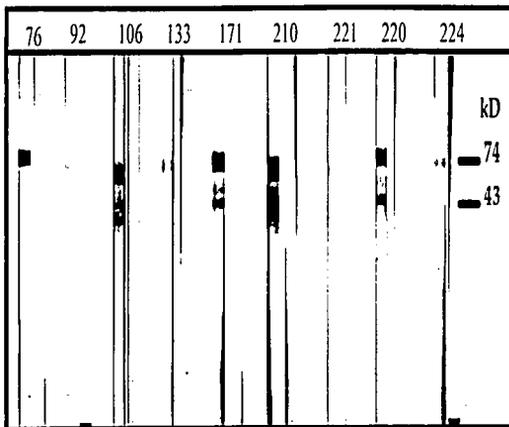


Porcentaje de reconocimiento para los AgEST de los sueros positivos a IgG determinado por Westemblot, en el grupo asmático las bandas más frecuentes (51, 43, 30 y 26 kD) fueron reconocidas por más del 50% de los sueros positivos al ELISA IgG y en el grupo sano estas mismas bandas fueron reconocidas por el 80% de los sueros positivos a ELISA-IgG a excepción de el AgEST de 30 kD reconocido por el 73.3%.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 14

AgEST DE REACCIÓN CRUZADA CON ASAs

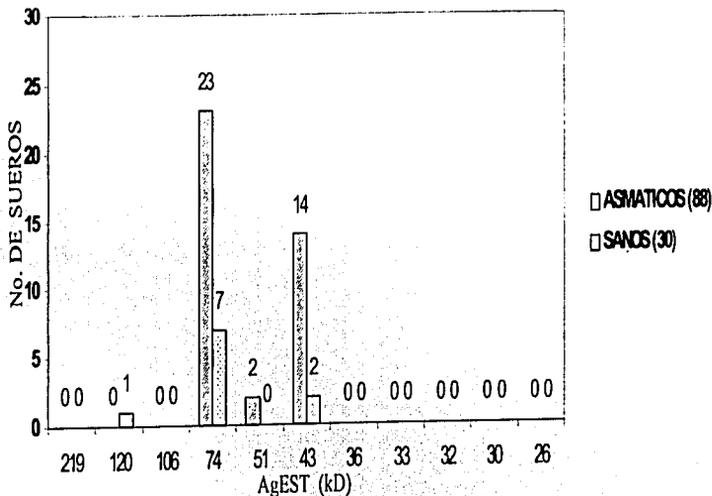


Sueros con reacción cruzada a ASAs. Todos los sueros que no mostraron reacción en el WB-IgG fueron probados nuevamente a una dilución 1:40 en presencia y en ausencia de ASAs. Las tiras de la izquierda fueron realizadas con suero sin ASAs y los de la derecha en presencia de 50 μ l de ASAs. Nótese la desaparición de las bandas de 74 y 43 kD.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

FIGURA 15

FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO DE LOS AgEST
QUE PRESENTAN REACCIÓN CRUZADA CON ASAs



Los AgEST que son fueron eliminados en los sueros por absorción con ASAs fueron en orden de frecuencia los de 74, 43, 51 y 120 kD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De los 30 sueros de pacientes sanos positivos a ELISA IgG 25 (83.33%) mostraron un patrón positivo, algunos de ellos (7/30; 23.33%) además presentaron bandas de reacción cruzada; tres (10.0%) fueron negativos y uno de ellos (3.33%) presentó únicamente bandas de reacción cruzada con antígenos de *A. suum*. Uno (3.33%) no fue probado por no contar con suero suficiente. Un grupo de nueve sueros tomados al azar de pacientes negativos a ELISA IgG fue probado por WB ninguno de ellos mostró bandas.

4.6.- WESTERN BLOT IgE

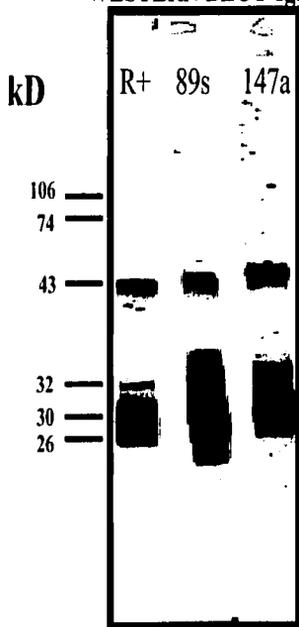
De las 11 bandas identificadas en el WB-IgG solo siete fueron reconocidas en el WB-IgE, los pesos moleculares correspondieron a los 120, 106, 74, 43, 32, 30 y 26 kD (figura 16). De los 88 sueros de pacientes asmáticos positivos a ELISA-IgG 25 no pudieron ser evaluados por WB-IgE por no contar con suero suficiente para la prueba. Los restantes 63 fueron evaluados y el 58.73% (37/63) presentaron un patrón de reconocimiento por IgE. La banda que fue reconocida por todos los sueros fue la de 26 kD (37 sueros) seguida por las de 30 y 43 (33 sueros) y la de 32 kD (24 sueros), siendo las menos frecuentes las de 74, 106 y 120 kD (2, 4 y 1 sueros respectivamente) (Figura 17). De los 22 sueros positivos a ELISA IgE 16 presentaron bandas en esta prueba, 4 no las presentaron y dos no fueron determinados. Siete sueros que mostraron bandas por IgE no mostraron patrón positivo en el WB-IgG.

Los treinta sueros positivos a ELISA-IgG del grupo de pacientes sanos fueron probados, el 80% (24/30) presentaron un reconocimiento de bandas por IgE estando las bandas de 26 y 30 kD presente en todos los casos, después las bandas más frecuentes

fueron: la de 43 kD (22 sueros), 32 kD (18 sueros) y las menos frecuentes las de 74, 106 y 120 kD (5,3 y 2 sueros respectivamente) (Figura 17). De el grupo sano todos los sueros positivos a ELISA-IgE presentaron bandas en el WB-IgE y cinco sueros que mostraron bandas no presentaron patrón positivo en el WB-IgG.

FIGURA 16

PATRÓN DE RECONOCIMIENTO DE LOS AgEST POR
WESTERN BLOT-IgE

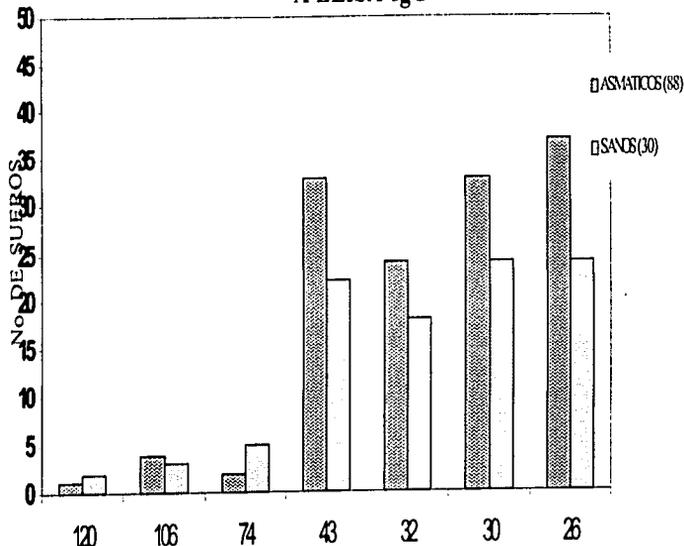


Un total de siete bandas de AgEST fueron reconocidas por los sueros de niños asmáticos y sanos positivos a ELISA-IgG a través de la técnica de Western blot para determinación de IgE. Los pesos moleculares de las mismas van desde los 26 hasta los 219 kD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 17

DETERMINACIÓN POR WB-IgE DE LA FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO DE LOS AgEST POR SUEROS POSITIVOS A ELISA-IgG
A ELISA-IgG



Frecuencia de reconocimiento para los AgEST determinada por la técnica de WB-IgE en 63 sueros de niños asmáticos y 30 sueros de niños sanos, todos ellos positivos a la ELISA-IgG. Los AgEST más frecuentes en ambos grupos son los de 43, 30 y 26 kD.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

La toxocariosis humana es considerada como una parasitosis accidental y tiene una amplia distribución mundial con mayor incidencia en zonas marginales y en climas cálidos, también se han reportado diferencias en cuanto a la importancia y distribución geográfica de la enfermedad en países industrializados de primer mundo en comparación con países en desarrollo en donde las seroprevalencias sobre todo en niños es más alta (Holland *et al.*, 1994; Lynch *et al.*, 1993). En los últimos años se ha prestado más importancia a esta enfermedad por tres razones principales: 1) La descripción de diversos síndromes relacionados con la infección con larvas de *T. canis*, entre las que están la *LMV* (Beaver *et al.*, 1952), la *LMO* (Glickman *et al.*, 1987) y más recientemente la toxocariosis cerebral y la toxocariosis encubierta (Bass *et al.*, 1987); 2) El desarrollo de herramientas de diagnóstico serológico basadas en la caracterización de antígenos específicos de la larva de *T. canis*, lo cual dicho sea de paso, ha demostrado la importancia epidemiológica de la enfermedad; y 3) La relación encontrada entre seropositividad a AgEST y problemas alérgicos en los niños destacándose los problemas asmáticos (Buijs *et al.*, 1994; Lokman *et al.*, 1997); esta última razón es la que nos llevo a la realización del presente trabajo.

En México se han reportado seroprevalencias del 18% en niños hospitalizados con cosinofilia (Cabrera *et al.*, 1980) y en estudios epidemiológicos en población abierta utilizando hemaglutinación pasiva se determinó un 7.5% (Martínez *et al.*, 1997) aunque estos estudios no fueron hechos con antígenos de excreción-secreción de la larva por lo que el grado de reacción cruzada con otros helmintos es muy alta (Lynch *et al.*, 1988; Cuellar *et al.*, 1995;

MagnaVal *et al.*, 1991). Se ha demostrado que cuando se utilizan AgEST se reduce la reacción cruzada por lo que el presente trabajo constituye el primer reporte serológico en el país empleando AgEST y las técnicas de ELISA y WB. Por otro lado se ha reportado la presencia de huevos de *T. canis* en parques públicos de la Ciudad de México con una frecuencia del 8.3% al 16.8% (Martínez *et al.*, 1998), la población canina callejera es muy alta en diversos estados del país en donde han sido reportadas frecuencias altas de infección por *T. canis* en los perros (Alba, 1999; Barrera y Frago, 1989; Cruz *et al.*, 1986; Quiroz, 1982; Martínez *et al.*, 1998). Esto en conjunto con las condiciones higiénico-ambientales predominantes en el país favorecen la infección en los niños.

El diagnóstico de la toxocarosis ha tenido complicaciones por la persistencia de reacciones cruzadas con otras helmintiasis principalmente con ascariasis. Este problema se ha resuelto en parte con la determinación de anticuerpos séricos dirigidos contra AgEST (Savigny, 1975) en vez de los extractos totales que presentan una alta cantidad de proteínas no antigénicas y también con la utilización del Western blot para determinar los patrones de reconocimiento específicos.

Savigny (1975) reportó que las larvas de *T. canis* se podían mantener viables y activas hasta por 18 meses, nosotros mantuvimos por periodos de seis meses cultivos con una buena viabilidad aunque después de este tiempo comenzó a ser notoria la mortalidad o la baja actividad de las larvas por lo que vimos conveniente una segunda migración larvaria en un aparato de Baermann y la reconcentración y conteo de las larvas, así en el experimento se trabajó con dos lotes de antígeno. Lote 1 y lote 2 los cuales presentaron exactamente el mismo patrón de proteínas por electroforesis así como se reconocieron las

mismas bandas de antígeno por los sueros de referencias positivos. Maizels *et al.*, (1984) reportaron un incremento en la cantidad de algunas proteínas como la de 400 kD a través del tiempo de cultivo, esta proteína en el mismo trabajo se reportó estar presente en la superficie de la larva, en este estudio no se detectó este incremento, así que se supone que lo anteriormente reportado se debió a los antígenos liberados al medio por las larvas muertas.

En el presente trabajo se encontró por electroforesis y tinción de plata un total de siete bandas de 219, 106, 74, 51, 35, 32, 30 kD este mismo patrón fue observado por nuestro grupo en un trabajo previo (Muñoz, 1997). Algunas de las bandas que encontramos por separado coinciden con bandas reportadas con otros autores pero en su conjunto no encontramos un patrón homólogo con ninguno. Varios son los autores que han determinado por electroforesis en SDS-PAGE diversas proteínas a partir de larvas en cultivo, (Akao *et al.*, 1983; Speiser y Gottsein, 1984; Maizels *et al.*, 1983; Badley *et al.*, 1987; Magnaval *et al.*, 1991). En los trabajos más completos Badley *et al.*, (1987) determinaron 15 bandas de 94, 88, 82, 80, 78, 76, 71, 66, 57, 53, 45, 42, 34, 32 y 29 kD estos últimos combinando técnicas de tinción de Plata, Azul de Coomassie, PAS y Western blot. Magnaval *et al.*, (1991) reportó siete bandas de 200, 147, 132, 35, 30, 28 y 24 kD, y no registra bandas de peso molecular intermedio en el rango de 94 a 42 kD, Maizels *et al.*, (1983) examinaron las propiedades bioquímicas de los AgEST y describieron un total de cinco bandas glicoprotéicas de 400, 120, 70, 55 y 32 kD siendo la banda de 32 kD la más abundante.

Así mismo en este trabajo la cantidad obtenida de AgEST en el concentrado varía con respecto a otros autores, aun habiendo trabajado con la misma carga larvaria en los

cultivos (10^4 larvas/ml) se obtuvieron 200 $\mu\text{g/ml}$ de proteína determinado por Bradford mientras que Badley *et al.* (1987) obtuvo de 2 a 10 mg/ml , estas diferencias pueden ser el resultado de los diferentes métodos empleadas por cada grupo, como son las técnicas de concentración empleadas y los componentes de los medios de cultivo empleados, sin embargo, la variación en los patrones protéicos observados en otros reportes y el nuestro plantean la posibilidad de que también existan diferencias sustanciales en la secreción de las larvas utilizadas en los diferentes trabajos debidos a posibles biotipos o cepas predominantes en una determinada región geográfica, esto puede significar alguna diferencia en la expresión de los antígenos. En Malasia recientemente se ha caracterizado por técnicas de biología molecular una variante de *T. canis* que morfológicamente corresponde a la especie pero que es encontrada frecuentemente en los gatos y que genéticamente esta más relacionada con *T. cati* por lo que se plantea como una nueva especie (Zhu *et al.*, 1998). Nosotros hemos observado en los gusanos obtenidos que aunque presentan todas las características morfológicas de *Toxocara canis* algunos especímenes son sensiblemente más pequeños o con coloraciones más oscuras que el resto de los gusanos, sin embargo los huevos no presentan ninguna variación morfológica. No existen estudios comparativos acerca de los antígenos de gusanos obtenidos en diferentes partes del mundo y esto puede ser importante ya que de haber diferencias determinaría entre otras cosas que las pruebas serológicas sean realizadas con antígenos nativos de la zona geográfica.

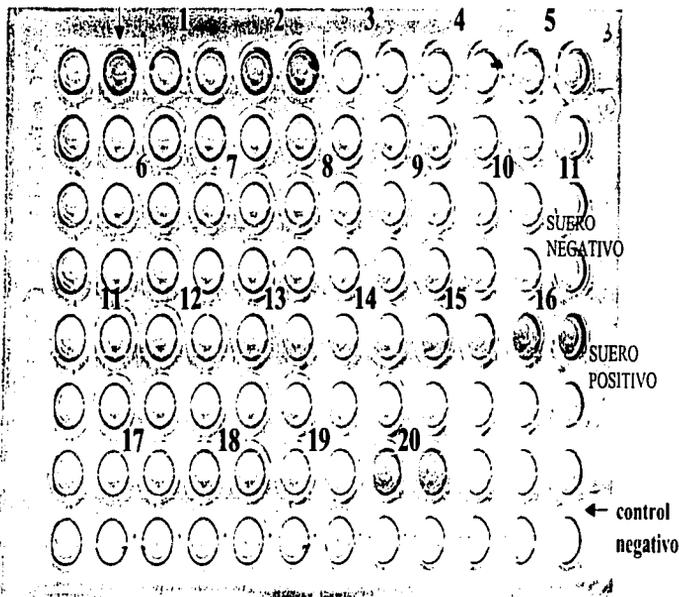
Actualmente la técnica de ELISA por su alta sensibilidad es la herramienta más útil para el diagnóstico de la toxocarosis (Lynch *et al.*, 1988; Magnaval *et al.*, 1992; Nunes *et al.*, 1999).

En la ELISA-IgG los problemas de reacción cruzada que se presentan se han resuelto mediante el empleo de la absorción de los sueros con antígenos de *Ascaris suum* o *Ascaris lumbricoides* (Lynch *et al.*, 1988; Camargo *et al.*, 1992; Nunes *et al.*, 1999). Las técnicas de ELISA empleadas para este trabajo no se estandarizaron como pruebas diagnósticas sino como herramientas que detectarían cualquier tipo de reconocimiento a los AgEST sea específico o inespecífico, por ese motivo no se realizó la absorción de los sueros con antígenos de *Ascaris* en esta etapa de la detección y sobretodo la ELISA IgG fue estandarizada con la mayor sensibilidad posible. Tal como otros autores lo han referido para establecer el valor de corte empleamos sueros de personas clínicamente sanas y negativos a un kit comercial de ELISA para el diagnóstico de *T. canis*. El promedio de las EAs de las referencias negativas más tres veces la desviación estándar fue tomado como valor de corte (Obwaller *et al.*, 1998; Lynch *et al.*, 1988; Nunes *et al.*, 1999). No es posible determinar la especificidad y sensibilidad de estas pruebas debido a que para ello se deben realizar necropsias o infecciones experimentales en humanos lo cual resulta muy difícil y éticamente no viable, sin embargo fue posible la obtención de por lo menos cinco sueros de pacientes con toxocariosis clínica que resultaron positivos al mismo kit comercial de ELISA. éstos mostraron sin excepción valores de EAs por arriba del valor de corte establecido en nuestra prueba de ELISA (ver cuadro 4), así mismo las lecturas de todos los sueros fueron hechas por duplicado, los resultados mostraron diferencias menores al 20% entre ellas. También se realizó el ensayo de cada suero sin AgEST en la misma placa de ELISA para eliminar matemáticamente la reacción inespecífica con lo cual se obtuvo una prueba de ELISA-IgG muy confiable (figura 18).

FIGURA 18

DISTRIBUCIÓN DE LA PLACA PARA LAS PRUEBAS DE ELISA-IgG Y ELISA-IgE

Control positivo



Las placas de 96 pozos fueron sensibilizadas de manera alternada con AgEST (líneas punteadas) y con RPMI (sin línea) respectivamente. Los sueros se probaron por duplicado con una serie de testigos de placa (lado izquierdo). Al inicio de la placa en todas las placas se probó un suero control positivo y al final de la misma un suero control negativo.

Aunque en nuestro muestreo los grupos no fueron obtenidos a partir de una población abierta, nosotros comparamos la seroprevalencia por ELISA-IgG del total de sueros evaluados en ambos grupos resultando del 27% (118/437) esto no difiere con lo obtenido en otros países, hay reportes en Francia del 22% (Gueglio *et al.*, 1994), y en Estados Unidos del 21% (Savigny, 1979) así mismo en países como Colombia o Brasil tienen reportes por arriba del 40%, y en Nepal por arriba del 80% (Alba, 1999) esto indica que en México este problema está presente y al igual que en otros países debe dársele la importancia suficiente para evitar que este problema de salud pública vaya en aumento.

Los estudios realizados a través de ELISA-IgG mostraron una seroprevalencia del 30.8% (88/285) para el grupo de pacientes asmáticos y del 19.2% (30/152) para el grupo de pacientes sanos, estos datos mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Estas diferencias en las seroprevalencias de ambos grupos han sido reportadas por otros autores. Buijs *et al.*, (1994) en Estados Unidos evaluaron por ELISA la frecuencia de reconocimiento a AgEST por IgG en una población abierta de 640 niños dividiendo dos grupos: positivos y negativos, se vio que entre los seropositivos había significativamente más casos de asma y problemas bronquiales recurrentes que en el grupo de niños seronegativos, además, los seropositivos también presentaron títulos de IgE más elevados para alérgenos ambientales pero no evaluaron IgE específica para AgEST. Por otra parte Lokman *et al.*, (1997) en Malasia compararon la seroprevalencia a AgEST por ELISA IgG a un grupo de niños asmáticos contra un grupo de niños sanos y encontraron una diferencia del 57.8% contra el 15.4% respectivamente, sin embargo, ellos utilizaron solo 18 sueros de niños asmáticos y 27 sueros de niños sanos por lo que esta diferencia podría no ser representativa de la población, pero un dato interesante en este trabajo es la diferencia

encontrada entre el promedio de absorbancias por IgG para AgEST de ambos grupos siendo más alta para el grupo asmático; tampoco ellos realizaron estudios con IgE específica a AgEST.

En este estudio no se partió de una población abierta sino de un grupo de niños asmáticos y otro de niños sanos similar a lo hecho por Lokman *et al.* (1997) pero con una muestra estadísticamente representativa, ésta estuvo formada por dos grupos de pacientes: El primero de 285 niños asmáticos y el segundo de 152 niños sanos. El promedio de absorbancias también fue determinado, pero en este caso no encontramos diferencias significativas entre los dos grupos ($p>0.05$) siendo inclusive ligeramente más alto el promedio de sanos (0.294EAs) con respecto a los asmáticos (0.280 EAs) esto debido posiblemente a las diferencias en los números muestrales ya anteriormente mencionado o a diferencias en la realización de la técnica de ELISA. En los trabajos anteriormente mencionados y en el presente trabajo, la ELISA fue realizada sin absorción con antígenos de reacción cruzada, en nuestro caso de manera prevista.

A diferencia de los otros autores en este trabajo se realizó el WB-IgG de los sueros positivos a ELISA-IgG. La técnica se hizo con absorción con ASAs para poder determinar los pesos moleculares de los AgEST específicos, de estos, los que no mostraron patrón de reconocimiento alguno fueron probados nuevamente a una dilución más baja (1:10), con y sin absorción para determinar los AgEST que dan reacción cruzada, así como sus frecuencias en ambos grupos. En los resultados obtenidos del WB (ver discusión más adelante) pudimos apreciar que de los 88 sueros de niños asmáticos positivos a ELISA IgG 49 presentaron un patrón de por lo menos cuatro bandas (51, 43, 32 y 26 kD) más

frecuentemente reconocidas por todos los sueros, las cuales no fueron afectadas por la absorción (bandas específicas). De los 30 niños sanos positivos a ELISA-IgG 25 también presentaron estas bandas. Si determináramos la seroprevalencia solo por los casos confirmados por WB-IgG éstas serían de 17.19% (49/285) para asmáticos y del 16.44% (25/152) para los niños sanos, en estos datos no hay diferencia significativa, sin embargo, en el porcentaje de reacción cruzada hay una diferencia significativa ($p > 0.05$); un 17.05% (15/88) de los niños asmáticos mostraron solo bandas inespecíficas de 74 y 43 kD y sólo un 3.33% (1/30) de los niños sanos las presentaron. Estos datos muestran que los niños asmáticos tienen una mayor frecuencia de reacciones cruzadas por lo que sugiere que las diferencias encontradas en la ELISA-IgG a favor de los niños asmáticos posiblemente se debe a una mayor incidencia de reacciones cruzadas en este grupo. Incluso sugiere que el asma podría ser facilitado por una combinación de infecciones parasitarias donde pueden estar involucrados otros helmintos y no solamente *T. canis*.

Magnaval *et al.*, (1992) desarrollaron en Francia a nivel experimental una técnica de ELISA para la detección de anticuerpos de la clase IgE contra AgEST probando mediante reacciones cruzadas con sueros de pacientes con diversas helmintiasis que la IgE no presenta reacción cruzada y por tanto es más específica para el diagnóstico de la toxocarosis, este mismo autor determinó un grupo de cuatro bandas reconocidas por IgG que igualmente son específicas de *T. canis*.

Ante la inexistencia de kits comerciales de referencia para IgE específica a *T. canis* no es posible obtener referencias positivas confiables para esta prueba así que el valor de corte fue determinado mediante el análisis de frecuencias de EAs del total de sueros

evaluados; esto nos dió la posibilidad de obtener sospechosos los cuales no son determinados por Magnaval *et al.* (1995), aunque lo estricto que necesariamente tuvo que ser la separación de las poblaciones en la determinación de los valores de corte restó sensibilidad a esta prueba con respecto a la ELISA-IgG.

En este trabajo encontramos que todos los sueros en ambos grupos que fueron positivos a ELISA-IgE presentaron en el WB-IgG por lo menos 3 de las cuatro bandas específicas de bajo peso molecular (51, 43, 32 y 26 kD) más frecuentemente reconocidas por los sueros positivos (ver figura 13) y un sólo suero del grupo asmático sospechoso a ELISA IgE presentó bandas de reacción cruzada; los demás sueros que presentaron solo bandas de reacción cruzada (15 en total) fueron discriminados por esta prueba, así mismo, se observó en ambos grupos que todos los positivos a ELISA-IgE fueron también positivos a ELISA-IgG. Esto confirma lo descrito anteriormente por Magnaval *et al.* (1992) respecto a la mayor especificidad de la IgE y también la mayor especificidad de nuestra prueba de ELISA-IgE con respecto a la ELISA-IgG.

Por ELISA-IgE no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la seropositividad a AgEST de niños asmáticos y niños sanos, estos fueron de 7.7% (22/285) y 6.57% (9/152) respectivamente. En el trabajo que anteriormente se comentó realizado por Buijs *et al.* (1994) se determinó un aumento significativo de la IgE sérica a alérgenos ambientales en los seropositivos aunque no se determinó la IgE específica a AgEST. Por los resultados obtenidos en el presente estudio suponemos que este aumento no es debido a la IgE específica a AgEST sino a IgE inespecífica.

De los 15 niños asmáticos sospechosos a ELISA-IgE 13 fueron positivos a ELISA IgG y de estos 10 presentaron bandas específicas en el WB y tres no las presentaron, así mismo de los ocho niños sanos sospechosos seis fueron positivos a ELISA IgG y todos presentaron bandas específicas en el WB, de esta manera se pudo observar que la ELISA IgE al igual que el WB-IgG no muestran diferencias en la seroprevalencia entre ambos grupos.

En Francia existen estudios que demuestran la reacción cruzada con otras helmintiasis menos comunes en nuestro entorno utilizando sueros de pacientes con hidatidosis, esquistosomiasis o teniasis, (Magnaval *et al.*, 1991). En esos estudios se ha determinado que las bandas de AgAST que cruzan con otros helmintos son de alto peso molecular (200, 147 y 132 kD) y que la aparición de un patrón de por lo menos tres de las cuatro bandas de bajo peso (35, 32, 30 y 28 kD) es sumamente específico para toxocariosis. Tomando estos criterios y debido a la dificultad de encontrar casos clínicos con estos otros tipos de helmintiasis, se tomó como modelo de cruce antigénico al *Ascaris suum* el cual ha sido utilizado también por otros autores por ser morfológica, antigénica y genéticamente similar al *A. lumbricoides*, (Zhu *et al.*, 1998a; Zhu *et al.*, 1999), pero de mucho más fácil acceso. Además otros autores han demostrado que la ascariasis es la parasitosis más frecuentemente relacionada con la toxocariosis, en gran parte por que las condiciones epidemiológicas necesarias para la infección en estas dos son casi las mismas (Lynch *et al.*, 1993).

En el WB-IgG las bandas de AgEST que reconocieron ambos grupos fueron las de 219, 120, 106, 74, 51, 43, 36, 33, 32, 30 y 26 kD siendo las más frecuentemente reconocidas las de 51, 43, 30 y 26 kD (ver fig*****). Los pesos moleculares de las dos

últimas son similares a los pesos de las bandas específicas descritas por Magnaval *et al.*, (1991), por lo que es posible que se traten de las mismas bandas, la bandas de 32 y 35 kD descritas por Magnaval también fueron determinadas en el presente trabajo pero no fueron reconocidas con la misma frecuencia de las anteriores por los sueros muestreados.

En este estudio encontramos dos bandas de peso molecular intermedio (43 y 74 kD) que presentaron reacción cruzada con ASAs como ya se mencionó anteriormente, los sueros de pacientes asmáticos presentaron significativamente una mayor frecuencia en el reconocimiento de estas bandas, ninguna de ellas corresponde con las descritas por Magnaval *et al.*, (1991) como inespecíficas (200, 147 y 132 kD), de modo que los pesos moleculares de las bandas mencionadas no han sido reportadas hasta el momento como bandas de cruce antigénico. Estas bandas fueron también detectadas en ambos grupos en sueros con reconocimiento de un patrón positivo, en ellos solo fueron absorbidas estas dos bandas permaneciendo el patrón de bandas específicas, esto indica la posibilidad de infecciones mixtas en donde están de manera concomitante toxocarosis y otras helmintiasis.

No existen reportes en cuanto a las diferencias que posiblemente existan en la frecuencia del reconocimiento para cada AgEST en los grupos de niños asmáticos y sanos. Este planteamiento cobró interés ante la posibilidad de que las diferencias en la seroprevalencias de estos grupos reportadas por otros autores se debieran a diferencias en la inmunodominancia de los AgEST para cada uno de los grupos y por consecuencia diferencias en el reconocimiento por la IgG o por la IgE. Los resultados obtenidos en el WB-IgG mostraron que las frecuencias de reconocimiento del conjunto de AgEST no

presentan diferencias en los dos grupos siendo además por el contrario claramente homogéneas (ver figuras 12 y 13). Estos resultados indican que para los niños asmáticos y sanos no hay diferencias en la inmunodominancia de los AgEST inductores de la IgG.

Sin embargo, otra interrogante surge en cuanto a las diferencias del reconocimiento a los antígenos específicos que estimulan la respuesta por IgE, es decir, los que son alérgicos. En trabajos realizados por Takamoto *et al.*, (1995) se observó en cultivos celulares de pulmón de ratones *nu/nu* infectados con *T. canis* que la respuesta policlonal inespecífica por IgE se debe a la secreción de IL-4 e IL-5 por células en el pulmón caracterizadas posteriormente como linfocitos T CD4⁺-CD8⁻ (doble negativos). En estudios más recientes se ha podido reproducir en ratones un modelo de toxocarosis y asma alérgica, y se ha visto que los ratones BALBc son más propensos a las manifestaciones asmáticas que los C57BL/6 cuando son infectados con *T. canis* y son sensibilizados por vía respiratoria con ovalbumina (Pinelli *et al.*, 2001) lo cual indica que existe una parte genética en la susceptibilidad al proceso asmático desencadenada por la infección con *T. canis*. Estos trabajos han sido realizados con el total de AgEST y con infección experimental respectivamente. En el presente trabajo se evaluó por WB la respuesta por IgE en niños asmáticos y sanos que resultaron positivos a ELISA-IgG con el propósito de establecer comparaciones en ambos grupos y determinar si la mayor cantidad de niños asmáticos seropositivos en relación a los sanos se debe a diferencias en el reconocimiento antigénico.

En esta prueba para poder determinar la IgE se utilizaron diluciones únicas de 1:10 en presencia de 50 μ l de ASAs y la inmunodetección fue realizada por medio de un kit

comercial de autoluminiscencia (Aurora Kit Labs. ICN), varios sueros no pudieron ser evaluados en esta prueba por no haber suero suficiente para su determinación.

Hasta el momento existe un solo reporte en humanos de los AgEST que son reconocidos por la IgE (Obwaller *et al.*, 1998), en dicho trabajo fue realizado el WB sin absorción para antígenos de reacción cruzada en pacientes con LMV, LMO y asintomáticos en los cuales se determinó en los tres grupos la presencia de cinco bandas de 26, 30, 35, 90 y 200 kD, ellos reportaron que la banda más frecuente fue la de 26 kD.

En este trabajo se encontró por WB-IgE con absorción bandas de 120, 106, 74, 43, 32, 30 y 26 kD. La banda que estuvo presente en todos los sueros positivos fue la de 26 kD lo cual indica de acuerdo con el trabajo anterior que esta proteína es el alérgeno más común de todo el grupo de AgEST pero en este estudio podemos decir además que se trata de una proteína específica para *T. canis*. Así mismo las bandas de 30 y 43 kD también fueron reconocidas de manera frecuente pero no por todos los sueros probados, estas proteínas tienen semejanza en sus pesos moleculares con las descritas anteriormente de 30 y 35 kD, sin embargo, hay que recordar que la banda de 43 kD también es una de las bandas de reacción cruzada más frecuentemente encontrada en ambos grupos en el presente estudio, de tal forma que esta proteína no representa una alternativa confiable en futuras investigaciones en las cuales se pretenda establecer un modelo de alergia utilizando solo proteínas purificadas.

Las bandas de 74, 106 y 120 kD son bandas de alto peso molecular al igual que las anteriormente reportadas de 90 y 200 kD, y como anteriormente se ha mencionado en este

reporte estas bandas sobre todo la de 74 kD son susceptibles a la absorción con ASAs. En este estudio estas bandas fueron solo reconocidas por un grupo marginal de sueros mientras que en el estudio de Obwaller *et al.*, (1998) las bandas de alto peso molecular permanecieron más constantes, esto puede ser debido a que en el reporte mencionado utilizaron radiomarcaje la cual es una técnica más sensible que la autoluminiscencia utilizada en el presente estudio, aunque también puede ser debido a que ellos no utilizaron la absorción con ningún tipo de antígeno de reacción cruzada, de tal forma que pudieron tener una mayor cantidad de bandas de reacción cruzada, de ser así, esto confirmaría nuevamente la mayor especificidad de las bandas de bajo peso molecular (26 y 30 kD) encontradas en los dos trabajos.

Por otra parte los resultados obtenidos en el WB-IgE no mostraron ninguna diferencia en cuanto al patrón de reconocimiento de los AgEST en los niños asmáticos y sanos, de manera similar al WB-IgG los niños sanos presentaron un mayor porcentaje de reconocimiento que los niños asmáticos y las frecuencias para cada uno de los AgEST fueron muy homogéneas (ver figura 17). De esta forma el WB-IgE no muestra dominancias diferentes en los antígenos que son reconocidos por niños sanos y niños asmáticos, esto sugiere que las diferencias encontradas en las seroprevalencias y en la cantidad de IgE sérica a favor de los niños asmáticos no es debido a la presencia de más alérgenos reconocidos en el grupo asmático, las diferencias encontradas en la ELISA-IgG del presente estudio y la mayor frecuencia de reacción cruzada detectada para este mismo grupo en el WB-IgG nos indican que si existen factores que provoca una mayor seroprevalencia en los niños asmáticos y entre las posibilidades pueden estar factores genéticos o la

combinación de infecciones con helmintos. Lo cierto es que hasta el momento estos factores permanecen desconocidos.

Sería interesante como complemento a estos resultados el obtener los valores de la Ige sérica total en los grupos para determinar si existen diferencias en estos niveles así mismo la utilización de fracciones purificadas de algunos antígenos como el de 26 kD para evaluar por medio de pruebas de intradermoreacción las reacciones en los grupos evaluados, esto con el fin de conocer la intensidad de la respuesta de hipersensibilidad retardada en cada uno de los grupos.

En otros países como Francia (Magnaval *et al.*, 1991), Estados Unidos (Beaver *et al.*, 1952; Glickman *et al.*, 1979; Worley *et al.*, 1984; Buijs *et al.*, 1994), Japón (Tomimura *et al.*, 1976; Takamoto *et al.*, 1993), China (Zhu *et al.*, 1998) y España (Fenoy *et al.*, 1992; Cuellar *et al.*, 1995), existen grupos de investigadores que se han preocupado por la toxocariosis desde hace varios años. En Estados Unidos se ha utilizado diversos mecanismos incluyendo medios masivos como la televisión para difundir la información necesaria para la prevención de la toxocariosis (Worley *et al.*, 1984). Lo encontrado en este trabajo puede ser tomado como una base para el estudio de la toxocariosis en México en la población pediátrica abierta, a fin de establecer los reportes necesarios para dar a conocer más ampliamente entre la población y el personal de la salud este problema y ubicarlo en nuestro país en su justa dimensión.

CONCLUSIONES

- ✓ En la prueba de ELISA-IgG el grupo de niños asmáticos mostró una seroprevalencia mayor estadísticamente significativa al la mostrada por el grupo de niños sanos. En la prueba de ELISA-IgE no se encontró diferencia estadística en las seroprevalencias de los niños asmáticos y sanos.
- ✓ Los niños asmáticos presentaron en el WB-IgG significativamente un mayor porcentaje de reconocimiento de bandas de reacción cruzada de que los niños sanos.
- ✓ Los patrones de reconocimiento en el WB-IgG en los grupos de niños asmáticos y sanos fueron homogéneos
- ✓ Los patrones de reconocimiento en el WB-IgE en los grupos de niños asmáticos y sanos fueron homogéneos.

REFERENCIAS

- Alba H.F.: Evaluación de un modelo de toxocariasis ocular y sistémica empleando Jerbos (*Meriones unguiculatus*) (Tesis Doctoral). Cuautitlán (México) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1999.
- Alba-Hurtado F., Romero S., Tórtora P., y Ortega-P.: Toxocariasis cerebral en jerbos (*Meriones unguiculatus*): Un estudio histopatológico de las lesiones cerebrales. Memorias del XIV congreso latinoamericano de parasitología; 1999 octubre 11-16; Acapulco (Guerrero) México Federación Latinoamericana de Parasitología 1999: 53.
- Alba-Hurtado F., Tórtora P.J., Tsutsumi V. and Ortega-Pierres M.G.: Histopathological investigation of experimental ocular toxocariasis in gerbils. *Int. J. for Parasitol.* 2000; 30: 143-147.
- Badley J.L., Grieve R.B., Bowman D.D. and Glickman L.T. and Rockey J.H.: Análisis of *Toxocara canis* Larval Excretory-Secretory Antigens: Physicochemical characterization and Antibody recognition. *J. Parasitol.* 1987; 73: 593-600.
- Bass J., Mehta K., Glickman T., Blocker R. And Eppes B.: Asymptomatic Toxocariasis in children. *Clin. Ped.* 1987; 26-9:441-447.
- Beaver P.C. Snyder H., Carrera M., Dent H. And Lafferty W.: Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. *Pediatrics* 1952; 9: 7-18.
- Beaver P.C.: The Nature of Visceral Larva Migrans. *J. Parasitol.* 1969; 55: 3-12.
- Bowman D.D., Grieve M.M. and Grieve R.B.: Circulating Excretory- Secretory Antigen levels and specific Antibody responses in Mice infected with *Toxocara canis*. *Am. J. Trop. Med. Hvg.* 1987; 36: 75-82.
- Buijs J., Borsboom G., van Gemund J., Hazebroek A., van Dongen P., van Knapen F., and Neijens H.: *Toxocara* seroprevalence in 5-year-old elementary Schoolchildren: Relation with Allergic Asthma. *Am. J. Epidemiol.* 1994; 140: 839-847.
- Buijs J., Lokhorst W., Robinson J., and Nijkamp F.: *Toxocara canis*-induced murine pulmonary inflammation: analysis of cell and proteins in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. *Parasit. Immunol.* 1994; 16:1-9.

- Cabrera M.A. and Suazo A.T.: Titers of antibodies for visceral larva migrans in hospitalized patients. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 1980; 37:2 195-201.
- Camargo E., Nakamura P., Vaz A., Silva M., Chieffi P. And Melo E.: Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1992; 34-1: 55-60.
- Capron A., Dessaint J-P., Joseph M. And Torpier G.: Effector mechanism of immunity to schistosomiasis and their regulation. Immunol. Rev; 1982; 61:41-66.
- Capron A., Dessaint J-P., Capron M., Joseph M., Ameisen J.C. and Tonnel A.: From parasites to allergy: a second receptor for IgE. Immunol. Today 1986; 7: 15-18.
- Cuéllar C., Fenoy S., and Guillen J. L.: Cross. Reaction of Sera from *Toxocara canis* infected mice with *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* antigens. Int. J. for Parasitol. 1995; 22: 301-307.
- Fenoy S., Cuéllar C., Agula C. And Guillén L.: Persistence of immune response in human toxocariasis as measured by ELISA. Int. J. for Parasitol. 1992; 22:1037-1038.
- Georgi J.R. and Georgi M.E.: Canine Clinical Parasitology, ed. Lea and Febiger, 1991.
- Georgi J.R. and Georgi M.E.: Parasitology for Veterinarians, ed. W.B. Saunders Company, 1990.
- Glickman L.T., and Shofer F.S.: Zoonotic Visceral and Ocular Larva Migrans. Vet. Clin. of N. Am. S. Anim. Pract. 1987; 17: 39-53.
- Glickman L.T., Magnaval F., Domanski L., shofer F., Lauria S., Gottstein B. And Brochier B.: Visceral larva migrans in french adults: A new disease syndrome?. Am. J. of Epidemiol. 1987b; 125: 1019-1034.
- Glickman L.T., Cypess R.H., Crumrine P.K. And Gitlin D.A.: *Toxocara* infection and epilepsy in children. J. Pediatr. 1979; 94: 75-78.
- Guglielmo B., Gentile L., Nguyen J., Achard D. And Marjolet M.: Epidemiological approach to human toxocariasis in western France. Parasitol. res. 1994; 80: 531-536.
- Hagan P.: IgE and protective immunity to helminth infections. Parasite immunol. 1993; 15: 1-4 .
- Iglesias R., Leiro J., Ubeira F., Santamarina M., Navarrete I. And Sanmartin M.: Antigenic cross-reactivity in the mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and others nematodes. Parasitol. Res. 1996; 82: 378-381.

- ◆ Kusama Y., Takamoto M., Kasahara T., Takatsu K., Nariuchi H. And Sugane K.: Mechanisms of eosinophilia in BALB/c-un/+ and congenitally athymicBALB/c-nu/nu mice infected with *Toxocara canis*. Immunol. 1995; 84:461-468.
- ◆ Lapage G.: Parasitologia Veterinaria 2nd. ed. CECSA , 1976.
- ◆ Luo Z.J., Wang G.X., Yahg C.I., Luo C.H., Cheng S.W. and Liao L.: Detection of Circulating antigens and antibodies in *Toxocara canis* infection among children in Chengdu, China. J. Parasitol. 1999; 85:252-256.
- ◆ Lynch N.R., Hagel I., Vargas V., Rotundo A., Varela M.C. and Di Prisco M.: Comparable seropositivity for ascariasis and toxocarasis in tropical slum children. Parasitol. Res. 1993; 547-550.
- ◆ Lynch N.R., Wilkes I.k., Hodgen A.N. and Turner K.J.: Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. Parasite Immunol. 1998; 10:323-337.
- ◆ Magnaval J., Fabre R., Maurières P., Charlet J., and Larrard B.: Application of the Western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocarasis. Parasitol. Res. 1991; 77: 697-702.
- ◆ Magnaval J-F., Fabre R., Maurieres P., Charlet J-P.: Evaluation of an Immunoenzymatic Assay Detecting Specific Anti-*Toxocara* Immunoglobulin E for Diagnosis and Posttreatment Follow-Up of Human Toxocarasis. J. of Clin. Microbiol. 1992; 30: 2269-2274.
- ◆ Maizels R.M., Savigny D. and Ogilvie B.M.: Characterization of surface and Excretory-Secretory Antigens of *Toxocara canis* infective Larvae. Parasite Immunol. 1984; 6: 23-37.
- ◆ Maizels R., Kennedy M., Meghi M., Robertson B. And Smith H.: Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigens of the parasitic nematode *Toxocara canis*. The J. of Immunol. 1987; 139-1: 207-214.
- ◆ Margni: Inmunología e Inmunológica fundamentos. ed. Panamericana, 1996.
- ◆ Martínez B., Fernandez P., Vazquez O. Y Ruiz H.: frecuencia de *Toxocara canis* en perros y áreas verdes del sur de la ciudad de México, Distrito Federal. Vet. Méx. 1998; 29-3: 239-244.
- ◆ Martínez L. P., González R., Omaña O. Y Mincro B.: Persistencia de larvas de *Toxocara canis* en el cuerpo de cucarachas *Blatella germanica* infestadas

- artificialmente. Memorias XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología; 1999 octubre 11-16; Acapulco (Guerrero) México Federación Latinoamericana de Parasitología, 1999; 125.
- Meghji M. and Maizels R.M.: Biochemical properties of Larval Excretory-Secretory Glycoproteins of the parasitic Nematode *Toxocara canis*. Mol. and Biochem. Parasit. 1986; 18: 155-170.
 - Minvielle M., Niedfeld G., Ciarmela M., Falco A., Ghiani H. And Basualdo J.: Asthma and cover toxocaríasis. Medicina. 1999; 59:243-248.
 - Muñoz G. M.A.: Determinación por Western blot de los Antígenos de Excreción-Secreción de la larva dos de *Toxocara canis* que son reconocidos por sueros de Cachorros Infectados Naturalmente (Tesis de Licenciatura). Cuautitlán (México) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1997.
 - Norman D.L.: Tratado de Parasitología Veterinaria. ed. Acriba, 1978.
 - Nunes C. Tundisi R. Heineman M., Ogassawara S. and Richtzenhain.: Toxocaríasis: serological diagnosis by indirect antibody competition ELISA. Rev. Ins. Med. S. Paulo 1999; 41-2: 95-100.
 - Obwaller A., Jensen-Jarolim E., Auer H., Huber A., Kraft D., Aspöck H.: *Toxocara* infestation in humans: symptomatic course of toxocarosis correlates significantly with levels of IgE/anti-IgE immune complex. Parasite Immunol. 1998; 20:311-317.
 - Olson L.J.: Organ distribution of *Toxocara canis* larvae in normal mice and in mice previously infected with *Toxocara*, *Ascaris* or *Trichinella*. J. Parasitol. 1963; 19: 77-84.
 - Page A.P., Hamilton A.J. and Maizels R.M.: *Toxocara canis* Monoclonal Antibodies to Carbohydrate Epitopes of secreted (TES) Antigens localize to different Secretion-Related Structures in infective Larvae. Exp. Parasitol. 1992; 75: 56-71.
 - Pinelli E., Dormans J., Fonville M. and van del Giessen J.: A comparative study of toxocaríasis and allergic asthma in murine models. J. Helminthol. 2001; 75: 137-140.
 - Quiroz R.H.: Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. ed. LIMUSA México, 1988.
 - Savigny D.H.: In vitro maintenance of *Toxocara canis* and a simple Method for the Production of *Toxocara* ES Antigen for use in Serodiagnostic Test for Visceral Larva Migrans. J. Parasitol. 1975; 61: 781-782.

- Schantz P., meyer D., Glickman T.: Clinical, serological and epidemiological characteristics of ocular toxocariasis. Am. J. Of Trop. Med. Hyg. 1979; 28-1: 24-28.
- Sher A.: Regulation of Cell-Mediated Immunity by Parasites: The Ups and Downs of an Important Host Adaptation. Mol. App. To Parasitol. 1995; 431-442.
- Shetty A. And Aviles D.: Nephrotic syndrome associated with *Toxocara canis* infection. Ann Trop. Pediatr. 1999; Sep 19: 297-300.
- Soto-Porrúa PE.,Martínez Gordillo MN.,De la Mora de la Mora JI., Peralta-Abarca G. Y Ponce macotela M.: Prevalencia de *Toxocara canis* en perros adultos y su implicación en la salud pública en la ciudad de México. XIV Congreso Nacional de Parasitología Memorias publicadas en la Revista Latinoamericana de Microbiología Vol. 2 (suplemento II): 124 (2000).
- Soulsby E.J.: Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals 7ed. ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1982.
- Soulsby E.J.: Immunity to Animal Parasites. ed. Academic Press Inc., 1972.
- Smith J., Kusel J. And Girdwood R.: The production of human A and B blood group like substances by in vitro maintained second stage *Toxocara canis* larvae: their presence on the outhar larval surfaces and in their excretions/secretions. Clin. Exp. Immunol. 1983; 54:625-633.
- Szczepansky T., Sonta-Jakimeczyk D., Janik-Moszant A., Olejnik I.: Generalized lymphadenopathy as initial presentation of toxocariasis in a seven-year-old boy. The pediatric infec. Dis. J. 1996; 15:717-718.
- Takamoto M. And Sugane K.: mechanisms of eosinophilia in *Toxocara canis* infected mice: in vitro production of interleukin 5 by lung cells of both normal and congenitally athimic nude mice. Parasite immunol. 1993; 15:493-500.
- Takamoto M., Kusama Y., Takatsu K., Nariuchi H. And Sugane K.: Ocurrence of interleukin-5 production by CD4- CD8- (double negative) T cells in lungs of both normal and congetitally athymic nude mice infected with *Toxocara canis*. Immunol. 1995; 85: 285-291.
- Tijssan P.: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology Vol. 15 "Practice and theory of enzyme immunoassays", ed. Elsevier, 1985

- Tomimura T., Yokota M and Takiguchi H.: Experimental Visceral Larva Migrans in Monkeys I.- Clinical, Hematological, Biochemical and Gross Pathological observations on Monkeys inoculated with embrionated Eggs of the Dog Ascarid, *Toxocara canis*. Jap. J. Vet. Sci. 1976; 38: 533-548.
- Taylor M.R., Keane C.T., O'Connor P., et al.: Clinical features of covert toxocarosis. Scand. J. of Infect. Dis. 1987; 19:693-696.
- Vazquez N.F., Casados R., Salazar H.: Eosinófilos en sangre periférica y moco nasal, en sujetos asmáticos y sanos. Rev. Alerg. Méx. 1998; XLV-1: 4-8.
- Wang M., Jiang H., Inoue H., Myozaki M. And Yamashita U.: B cell mitogenic activity of *Toxocara canis* adult worm antigen. Parasite Immunol. 1995; 17: 609-615.
- Worley G., Green J., Frothingham T., Sturner R., Walls K., Pakainis V. And Ellis G.Jr.; *Toxocara canis* infection: Clinical and Epidemiological associations with seropositivity in Kindergarten Children. The J. of Infec. Dis. 1984; 149: 591-597.
- Zhu X.Q., Jacobs D.F., Chillon N.L., Sauti R.A. Cheng N.A., and Gasser R.R.: Molecular characterization of a *Toxocara* variant from cats in Kuala Lumpur Malaysia. Parasitol. 1998; 155-164.
- Zhu X., Gasser B. And Chilton N.:Diferences in the 5.8S rDNA sequences among ascarid nematodes. Int. J. for Parasitol. 1998b; 28: 617-622.
- Zhu X., Chilton B., Jacobs E., Boes J. And Gasser R.: Characterization of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. Int. J. for parasitol. 1999; 29: 469-478.

ABREVIATURAS

IM	Solución uno molar
AgEST	Antígenos de excreción-secreción de <i>Toxocara canis</i>
ASAs	Antígenos somáticos de <i>Ascaris suum</i>
CD3+	Cluster de diferenciación 3 positivo
CD4+	Cluster de diferenciación 4 positivo
CD8+	Cluster de diferenciación 8 positivo
cel/mm ³	Células por milímetro cúbico
cm	Centímetro
D.O.	Densidad óptica
EAs	Absorbancia específica
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
ELISA-IgE	Determinación de la IgE por ELISA
ELISA-IgG	Determinación de la IgG por ELISA
HCl	Acido clorhídrico
HEPES	Solución amortiguadora
HMW	High molecular weight
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgG-IgE	Complejos inmunes entre IgG e IgE
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
kD	Kilodaltones
L2	Larva dos de <i>Toxocara canis</i>
LB	Linfocito B
LMO	<i>Larva migrans ocular</i>
LMV	<i>Larva migrans visceral</i>
LMW	Low molecular weight
LT	Linfocito T
mA	Miliampers
MeOH	Metanol
NaOH	Hidróxido de sodio
NC	Nitrocelulosa
nm	Nanómetros
OPD	Ortofenilendiamina
p.i.	Post-infección
PAS	Acido peryodico de Shift
PBS	Fosfato buffer salino

PBS-ABS	PBS con albúmina sérica bovina
PBS-T	PBS con Tween 20
PM	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI-1640	Medio de cultivo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel de electroforesis de poliacrilamida con SDS
Th1	Linfocito T subtipo 1
Th2	Linfocito T subtipo 2
UIMSA	Unidad de investigación multidisciplinaria en salud animal
V	Volts
WB	Western blot
X ²	Prueba de ji cuadrada

APÉNDICE I

A).-REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS

1.-Acrilamida-bisacrilamida (30:0.8): Se prepara disolviendo 30 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida en un volumen total de 100 ml de agua desionizada. Se filtra la solución a través de papel filtro Whatman No. 1 y se almacena a 4 °C en una botella ámbar.

NOTA: La bisacrilamida es NEUROTOXICA y debe ser manejada con cuidado sin tener contacto con ella ni inhalar los vapores que emite.

2.- Dodecil sulfato sódico (SDS) 10 % w/v : Se prepara disolviendo 10 g de SDS en 100 ml de agua desionizada. La solución debe ser clara e incolora. Si la temperatura del agua es muy baja, no todo el SDS se disolver y ser necesario calentar la solución.

3.- Buffer del gel separador 3.0 M Tris-HCl (pH 8.8) : Disolver 36.6 g de Tris (Tris[hydroxymethyl] aminometano) en 80 ml de agua desionizada, agregar gota a gota una solución de 1.0 M de HCl hasta alcanzar el pH deseado y ajustar a un volumen final de 100 ml. Una vez disuelta la solución se filtra a través de papel filtro Whatman No. 1 y se almacena a 4 °C.

4.- Buffer del gel concentrador 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8): Disolver 6.0 g de Tris en 40 ml de agua desionizada, se agrega 1.0 M de HCl gota a gota (hasta alcanzar un pH de 6.8) se

ajusta a un volumen final de 100 ml. Una vez disuelta la solución se filtra a través de papel filtro Whatman No. 1 y se almacena a 4 °C.

5.- Buffer de corrida 0.25 M Tris HCl 1.92 M Glicina, 1 % SDS (pH 8.3): Disolver 30.3 g Tris, 144.0 g glicina y 10.0 g de SDS en un litro de agua destilada. Esta solución es diez veces concentrada (solución 10X) y se almacena a temperatura ambiente. Para preparar 500 ml de buffer de corrida se toman 50 ml de la solución 10X y se ajusta a 500 ml.

6.- Buffer de muestra o buffer Laemmli: El reactivo debe tener una concentración final de 0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8): 2 % SDS, 5 % 2-mercaptoetanol, 10 % Glicerol, 0.002 % azul de bromofenol.

7.- Persulfato de amonio: 10 % w/v ; se disuelven 1.5 g de persulfato de amonio en 10 ml de agua desionizada. Esta sustancia es inestable y debe ser preparada justo antes de ser usada.

8.- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine): Se usa tal como se compra, es estable cuando no se diluye, se debe almacenar a 4 °C y en botella ámbar.

Preparación del gel de Poliacrilamida:

a).- Gel Separador:

Agua desionizada	4.5 ml
Tris-HCl pH 8.8 3.0 M	1.25 ml

10 % SDS stok	100 μ l
Acrilamida (30:0.8)	4.0 ml
Persulfato de amonio 10%	50 μ l
TEMED	5 μ l

b).- Gel Concentrador:

Agua desionizada	6.0 ml
Tris-HCl pH 6.8 0.5 M	2.5 ml
10 % SDS stok	100 μ l
Acrilamida	1.3 ml
Persulfato de amonio 10%	50 μ l
TEMED	5 μ l

B).- TINCIÓN DE PROTEÍNAS

1).- Tinción de Azul de Coomassie

	Sol. Teñidora	Sol. Desteñidora
Azul de Coomassie G 250	50 mg	-- --
Etanol absoluto	25 ml	25 ml
Ac. ortofosfórico	50 ml	50 ml
Agua deionizada	c.b.p. 500 ml	c.b.p. 500 ml.

- 1.- Sumergir el gel en sol. colorante por 30 min. en agitación.
- 2.- Sumergir en sol. desteñidora y cambiar cada 15 min. hasta que solo queden visibles las bandas de proteína.
- 3.- Conservar en ácido acético al 1 %.

2).- Tinción de plata (técnica corta)

- 1.- Fijación del gel en etanol 10% ac. Acético al 0.5% por media hora.
- 2.- Sumergir el gel en una solución de nitrato de plata al 0.01M en agitación y oscuridad
- 3.- Realizar tres lavados de un minuto con agua desionizada.
- 4.- Sumergir en solución reveladora y agitar fuertemente al principio hasta deshacer el precipitado sobre el gel.
- 5.- esperar hasta la aparición clara de las bandas, cuando el gel comienza a oscurecerse sacar de la solución de revelado y fijar en metanol 10% ac. Acético 0.5%.

APÉNDICE 2**REACTIVOS PARA LA ELECTROTRANSFERENCIA****1.- Buffer de transferencia pH 8.3**

Tris	25 mM
glicina	192 mM
SDS	0.05 % (P/V)
metanol	20 %

2.- Tris buffer salino (TBS)

30 ml de una Sol. de NaCl 5 M

20 ml de una Sol. Tris-HCl 1 M pH 7.5

llevar a un litro con agua destilada.

APÉNDICE 3**REACTIVOS PARA ELISA****PBS 10x**

Cloruro de sodio	80 g
Cloruro de potasio	2 g
Fosfato dibásico de sodio	29 g
Fosfato monobásico de potasio	2 g
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml

SOLUCIÓN DE CARBONATO BICARBONATO 0.05M (BCB)

Carbonato de sodio	1.59 g
Bicarbonato de sodio	2.93 g
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml

SOLUCIÓN REGULADORA DE CITRATOS

Ácido cítrico 0.1M	24.3 ml
Fosfato dibásico de sodio 0.2M	25.7 ml
Agua destilada	50.0 ml

SOLUCIÓN DESARROLLADORA DE COLOR

Solución reguladora de citratos	10 ml
OPD	5 mg
Peróxido de hidrógeno	10 μ l

SOLUCIÓN DE PARO

Ácido ortofosfórico	0.6 ml
Agua destilada	10 ml

APÉNDICE 4

PRUEBA DE χ^2 PARA DETERMINAR LA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LAS SEROPREVALENCIAS DE LOS GRUPOS ASMÁTICOS Y SANOS EN LA PRUEBA DE ELISA-IgG

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

Donde:

O frecuencia observada
E frecuencia esperada

Ho = No existe diferencia significativa
Hi = Existe diferencia significativa

	Frecuencia		(O - E)	(O - E) ²	(O - E) ² /E
	observada (O)	esperada (E)			
asmáticos					
positivos	88	76.95	10.54	111.16	1.44
negativos	197	208.04	-11.54	133.25	0.64
sanos					
positivos	30	41.04	-11.54	133.25	3.24
negativos	122	110.95	10.54	111.16	1.001
				$\Sigma =$	6.321
				$Z_{(0.05/1g.I.)} =$	3.84

El valor resultante de χ^2 es 6.32

El valor de Z con 95% de confianza y 1 grado de libertad es de 3.84

6.32 > 3.84 = Acepta Hi

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN