



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

“COMPARACIÓN DE LOS PATRONES DE RECONOCIMIENTO DE LOS
ANTÍGENOS DE SECRECIÓN-EXCRECIÓN DE *Toxocara canis*
OBTENIDOS EN MÉXICO Y ESPAÑA POR SUEROS DE PACIENTES
MEXICANOS Y ESPAÑOLES”..

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

TABATA BERENICE GONZÁLEZ GARCÍA

TUTOR:

DR. FERNANDO ALBA HURTADO

COMITÉ TUTORAL:

DR. GERARDO GARCÍA TOVAR

DR. FROYLAN IBARRA VELARDE



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.

DEDICATORIA :

A MI MAMA:

Otra vez gracias mamá por todo lo que me haz apoyado para poder lograr mis objetivos, para poder avanzar como profesionista y como persona; gracias por estar siempre ahí cuando te necesito y sin importar lo que pase me ayudas en todos los sentidos ,sabes que voy a estar siempre contigo, te quiero mucho mami.

A MI HIJO:

Mi niño precioso sabes que te quiero muchísimo y que pase lo que pase siempre voy a estar a tu lado, y que siempre puedes contar conmigo cuando me necesites . Cuando puedas leer esto vas a saber que siempre haz sido lo mas importante y que toda la vida te voy querer.

MAMA ADRIANITA:

Como estas nena linda, tu sabes cuanto te quiero y que gracias a ti eh logrado muchas cosas, gracias por apoyarme cuando más lo eh necesitado y también sabes que siempre voy a estar ahí cuando tu me necesites te quiero mucho nenita.

A MI HERMANO:

Mi querido Willy muy a tu manera siempre haz estado ahí conmigo en las buenas y en las malas, sabes que siempre puedes contar conmigo para todo bueno ya sabes que te quiero eh.

A MI FAMILIA:

Gracias por todo su apoyo cuando los he necesitado gracias tía Mara por apoyarme siempre, tío loncho por estar siempre ahí con mi tía en todos los momentos que han sido radicales en mi vida, a ti mi Tía Silvia que me ayudaste para poder realizar esto que ahora cambia mi vida, por todo les doy las gracias.

A MIS AMIGOS:

Muchas gracias por estar conmigo apoyándome cuando los eh necesitado principalmente a ti Lupita Prado y a Iliana González que son con las que siempre conté incondicionalmente, también gracias a mis amigos Karina, Ángel y Miriam con los que compartí mis primeros semestres de esta maestría.

A MIS PROFESORES:

Les agradezco a mis profesores todos los conocimientos que me pudieron aportar para poder tener ahora la oportunidad de obtener este grado, principalmente a ti Vicky por toda tu ayuda, apoyo y amistad, además del Dr. Francisco Montiel que fue una parte muy importante en desarrollar en varios de nosotros el interés por realizar trabajos no solo en nuestro país si no el abrirnos nuevos horizontes, además de ser un gran amigo; muchas gracias por todo.

A G R A D E C I M I E N T O S :

DR FERNANDO ALBA HURTADO:

Le agradezco toda su ayuda durante toda la realización de mi maestría, el haber estado apoyándome siempre a pesar de la distancia cuando estaba en España siempre estuvo ahí atento a lo que se fuera necesitando a lo largo del proyecto, le agradezco mucho todo y el haberme brindarme su amistad.

DR. MARCO ANTONIO MUÑOZ GUZMAN:

Te agradezco mucho el apoyo que siempre me diste desde que inicié con este proyecto hasta el final del mismo, también te agradezco el que me brindaras tu amistad.

DRA. CARMEN DEL AGUILA DE LA PUENTE Y DRA SOLEDAD FENOY RODRIGUEZ Y A LA UNIVERSIDAD DE SAN PABLO CEU (MADRID):

Les agradezco mucho toda su ayuda para la realización de este proyecto a pesar de lo complicado que es en ocasiones el poder analizar datos a larga distancia; igualmente agradezco a la universidad de San Pablo el haberme dado las facilidades para poder realizar parte de mi fase experimental en la facultad de Farmacia de dicha universidad, también gracias Carmen y Soledad por haberme permitido conocerlas ya que son unas grandes personas y profesionistas; espero que sigamos con estos proyectos y que podamos vernos pronto.

DRA. ALMA VIRGINIA LARA SAGAHON:

Muchas gracias por tu amistad y por el haberme ayudado en la realización de la parte estadística de este trabajo .

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Froylan Ibarra Velarde y al Dr. Gerardo García Tovar por ayudarme con todos sus consejos durante estos dos años en los exámenes tutorales haciéndome ver cosas que mejoraran este trabajo muchas gracias.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO:

Gracias a la UNAM FES Cuautitlán por ser el lugar de mi formación desde la licenciatura y ahora con mi maestría, el haberme dado las facilidades para el desarrollo este proyecto .

CONACYT:

Gracias por el apoyo de la Beca Nacional de CONACYT para la realización de esta maestría y también de la Beca Mixta CONACYT para la estancia realizada a España durante el proyecto.

I. INDICE:

I. INDICE	
II. ABREVIATURAS	
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
Morfología.....	3
Adultos	3
Larvas.....	3
Huevos.....	6
1.1 Ciclo biológico.....	7
Ciclo biológico en cachorros.....	7
Ciclo biológico en perros adultos, gestación y lactancia.....	8
Ciclo biológico en hospederos paraténicos.....	8
1.2 Epidemiología.....	10
2.4 Patogenia en perros.....	14
Cuadro clínico en perros.....	14
Cuadro clínico en humanos.....	15
Síndrome de Larva migrans visceral.....	15
Síndrome de Larva migrans ocular.....	16
Toxocariosis neurológica.....	17
Toxocariosis encubierta.....	17
Forma asintomática.....	17
1.3 Antígenos de Secreción-Excreción de <i>Toxocara canis</i> (AgSET).....	18
1.4 Respuesta inmune en la toxocariosis.....	19
Respuesta humoral.....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	23

5. OBJETIVO GENERAL.....	24
5.1 Objetivos particulares.....	24
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
6.1 Lugar de realización.....	25
6.2 Obtención de huevos de <i>Toxocara canis</i>	26
6.3 Obtención y cultivo de larvas de <i>Toxocara canis</i>	27
6.4 Producción de AgSET.....	28
6.5 Cuantificación de Proteínas (Método de Bradford).....	29
6.5 Obtención y almacenamiento de sueros.....	29
Criterios de selección de los sueros empleados.....	29
6.6 Prueba de ELISA.....	30
6.7 Electroforesis en geles SDS-PAGE.....	31
Tinción de Plata para geles de poliacrilamida.....	32
6.8 Inmunotransferencia y Western Blot.....	32
6.9 Diseño experimental.....	33
7. RESULTADOS.....	35
8. DISCUSIÓN.....	44
9. CONCLUSIONES.....	48
10. BIBLIOGRAFÍA.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases adultas de <i>T. canis</i> , en la parte superior se encuentra una hembra y en la inferior un macho con el tamaño promedio.....	3
Figura 2. Larva eclosionada de <i>Toxocara canis</i>	4
Figura 3. Micrografía de barrido de un huevo de <i>Toxocara canis</i> , es característica la presencia de las fosetas formando depresiones finas.....	6
Figura 4. Ciclo Biológico de <i>Toxocara canis</i>	9
Figura 5. Paciente con fibroma epiretinal tracción de la retina causado por Larva migrans ocular de <i>Toxocara canis</i>	16
Figura 6. . Lugares de realización del proyecto. Universidad Nacional Autónoma de México FES-Cuautitlán, Estado de México; Universidad CEU San Pablo Madrid, España.....	25
Figura 7. Obtención de gusanos de <i>T. canis</i> en México a partir de cánidos de centro de control canino y en España a partir de cachorros Beagle infectados en laboratorio.....	26
Figura 8. Metodología para la obtención de los Ag-SET a partir de gusanos adultos de <i>Toxocara canis</i> obtenidos en México y España.....	28

Figura 9. Metodología para la obtención del patrón antigénico de *Toxocara canis* a partir de AgSET-MX y AgSET-ES utilizando sueros de pacientes mexicanos y españoles mediante pruebas de electroforesis y WB.....34

Figura 10. SDS-PAGE de antígenos de excreción-secreción de *Toxocara canis* obtenidos en México (AgSET-MX) y en España (AgSET-ES).....36

Figura 11. Índice diagnóstico de ELISA de sueros mexicanos y españoles usando antígenos de excreciones y excreciones obtenido en México (AgSET-MX) y en España (AgSET-ES).....37

Figura 12. Patrones de antígenos de excreción-secreción de *Toxocara canis* obtenidos en México (AgSET-MX) y en España (AgSET-ES) reconocidos por sueros de pacientes españoles y pacientes mexicanos mediante Western Blot.38

Figura 13. Frecuencias de reconocimiento de los diferentes antígenos de excreción-secreción de *Toxocara canis* obtenidos en México (AgSET-MX) y en España (AgSET-ES) por pacientes españoles y mexicanos.....41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 . Frecuencia de <i>Toxocara canis</i> en el hospedero definitivo en diferentes países.....	11
Cuadro 2 . Seroprevalencia de anticuerpos hacia <i>Toxocara canis</i> en humanos en diferentes lugares del mundo. PCI: Parálisis cerebral infantil	12
Cuadro 3 . Contaminación con huevos de <i>Toxocara canis</i> en áreas públicas.....	13
Cuadro 4 . Bandas reconocidas por sueros de pacientes mexicanos de los antígenos se excreciones y secreciones de larvas de <i>Toxocara canis</i> obtenidas en México (AgSET-MX) y España (AgSET-ES), mediante Western Blot	39
Cuadro 5 . Bandas reconocidas por sueros de pacientes españoles de los antígenos se excreciones y secreciones de larvas de <i>Toxocara canis</i> obtenidas en México (AgSET-MX) y España (AgSET-ES), mediante Western Blot.....	40
Cuadro 6 . Comparación por la prueba exacta de Fisher del porcentaje de sueros de pacientes mexicanos y españoles que reconocen los antígenos de secreción excreción de <i>Toxocara canis</i> producido por larvas obtenidas en México.....	42
Cuadro 7 . Comparación por la prueba exacta de Fisher del porcentaje de sueros de pacientes mexicanos y españoles que reconocen los de antígenos de secreción excreción de <i>Toxocara canis</i> producidos por larvas obtenidas en España.....	43

I. ABREVIATURAS:

AgSET	Antígenos de secreción-excreción de <i>Toxocara canis</i>
AgSET-MX	Antígenos de secreción-excreción de <i>Toxocara canis</i> obtenidos a partir de gusanos mexicanos
AgSET-ES	Antígenos de secreción-excreción de <i>Toxocara canis</i> obtenidos a partir de gusanos españoles
BSA	Albumina sérica bovina
°C	Grados centígrados
Da	Daltons
DO	Densidad óptica
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
g	Gramos
HLA	Antígeno leucocitario humano
ID	Índice diagnóstico
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina

kDa	Kilodaltones
L2	Larva 2 (Fase infestante)
LB	Linfocito B
LT	Linfocito T
LMO	Larva migrans ocular
LMV	Larva migrans visceral
M	Molar
mA	Mili amperios
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
μ l	Microlitro
nm	Nanómetros
PBS	Solución salina amortiguadora con fosfatos
p.i.	Post-infección
PM	Peso molecular

PVDF	Membranas de Transferencia (Polyvinylidene Fluoride)
RPMI	Medio de cultivo celular
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel de electroforesis de poliacrilamida-Duodecil sulfato de sodio
<i>T. canis</i>	<i>Toxocara canis</i>
V	Voltios
WB	Western blot

1. RESUMEN

Actualmente el diagnóstico de la toxocariosis humana se realiza por la técnica ELISA usando antígenos de excreción-secreción (AgSET). Sin embargo, los criterios de positividad muestran una elevada variabilidad debido a la ausencia de controles estandarizados. Con objeto de mejorar el diagnóstico, en el presente trabajo se realizó un estudio comparativo entre dos AgSET: uno obtenido en México (AgSET-MX) y otro en España (AgSET-ES). Se seleccionaron 25 sueros de pacientes humanos mexicanos y 14 sueros de pacientes españoles en base a su positividad en ELISA frente al AgSET según las condiciones de cada laboratorio. Posteriormente, todos los sueros se procesaron en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad San Pablo-CEU (España). Se determinó su Índice Diagnóstico (ID) por ELISA y los antígenos reconocidos por WB. El AgSET-MEX mostró en SDS-PAGE la presencia de 14 bandas proteicas (260, 120, 91, 70, 61, 50, 47, 43, 38, 35, 32, 29 y 27 kDa) y el AgSET-ES de 8 bandas proteicas (97, 70, 47, 43, 35, 32, 29 y 27). Ninguno de los sueros estudiados mostró ID negativos independientemente del antígeno utilizado. Los sueros mexicanos y españoles reconocieron hasta 11 antígenos utilizando el AgES-MX (217, 120, 73, 51, 43, 41, 38, 36, 31 y 29 kDa). Los sueros mexicanos reconocieron hasta 10 antígenos utilizando el AgSET-ES (217, 120, 73, 51, 43, 41, 38, 36, 31 y 29 kDa) y los sueros españoles utilizando el AgSET-ES reconocieron hasta 6 antígenos (217, 73, 38, 36, 31 y 29 kDa). Los sueros de los pacientes mexicanos reconocieron con mayor frecuencia ($p < 0.05$) los antígenos del AgSET-MX de 73, 66, 43 y 29 kDa que los sueros españoles. Las fracciones antigénicas procedentes del AgSET-ES de 36, 31 y 29 kDa fueron reconocidas con mayor frecuencia ($p < 0.05$) por los sueros de pacientes españoles. En conclusión los AgSET obtenidos en cada país fueron diferentes como lo mostraron los patrones electroforéticos y de reconocimiento antigénico. Sin embargo, aparentemente estas diferencias no afectan la sensibilidad de las pruebas diagnósticas.

2. INTRODUCCIÓN

La toxocariasis es una parasitosis causada por la presencia y acción del ascárido *Toxocara canis*. Este parásito utiliza como principal hospedador definitivo a los perros aunque también se encuentra en otros animales como en mapaches, hurones y lobos (Acha, 2003; Cordero *et al.*, 1999).

Clasificación taxonómica de *Toxocara canis*

Reino: *Animalia*

Phylum: *Nemathelminthes*

Clase: *Secernentea*

Orden: *Ascaridida*

Familia: *Toxocaridae*

Género: *Toxocara*

Especie: *canis*

T. canis se encuentra en su forma adulta en el intestino delgado de perros jóvenes, siendo estos sus hospederos definitivos; mientras que sus formas larvarias se encuentran enquistados en las vísceras y musculatura de perros adultos, pollos, roedores, conejos, cerdos, ovinos, humanos y otros mamíferos; los cuales actúan como los hospederos paraténicos (Cordero *et al.*, 1999 ; Habluetzel, *et al.*, 2003; Minar, *et al.*, 2002).

Las larvas se enquistan en diferentes partes del cuerpo del hospedador paraténico y forma una entidad conocida como síndrome de la *larva migrans visceral* (LMV). Cuando estas larvas se enquistan en el globo ocular se denomina *larva migrans ocular* (LMO), mientras que cuando las larvas se encuentran en el cerebro es denominada como toxocariosis neurológica. (Cordero *et al.*, 1999, Fenoy *et al.*, 2001; Habluetzel, *et al.*, 2003).

MORFOLOGÍA:

Adultos

Los adultos de *Toxocara canis* son helmintos cilíndricos con cuerpo grueso y blanquecino con tonos marrón (Figura 1). Las hembras adultas de *Toxocara canis* miden de 5 a 18 cm, tienen terminal puntiaguda y cuentan con una vulva en el primer tercio de su cuerpo. Los machos miden de 4 a 10 cm y terminan en forma enroscada con aletas caudales y dos espículas que emergen de su cloaca. En la parte anterior tanto machos como hembras cuentan con 3 labios en la boca y 2 aletas cervicales que le dan la forma característica de punta de flecha (Alba, 2006; Cordero *et al*, 1999; Quiroz, 1996).



Figura 1. Fases adultas de *T. canis* , en la parte superior se encuentra una hembra y en la inferior un macho con el tamaño promedio y la terminación enroscada del parásito.

Larvas

La larva de segundo estadio (L2), que se forma por muda de la L1 dentro del huevo (Figura 2), es la forma infectante del parásito. Presenta una longitud media de 404 μm (360-434 μm), con un diámetro a nivel del esófago de 18-21 μm (Nichols, 1956).

Por microscopía electrónica de transmisión, Vegni Talluriet *et al.* (1986) observaron que la superficie corporal de la larva se encuentra fuertemente estriada. La cavidad bucal, en posición subterminal y dorsalmente inclinada, está rodeada de tres labios desarrollados, los cuales están presumiblemente implicados en la recolección del alimento y el anclaje de los tejidos durante la migración; ligeramente anterior a los labios se sitúan una cápsula bucal superficial, cuyo margen ventral está formado por una cutícula fina, espinosa y afilada y en el extremo anterior de la larva se encuentran las papilas cefálicas.

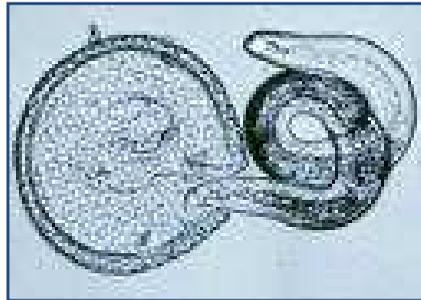


Figura 2. Larva eclosionada de *Toxocara canis*.

Tomada de: www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/s-z/toxocariasis/body_toxocariasis_il2.htm

El aparato bucal continúa en un esófago largo que ocupa un tercio de la longitud total de la larva. A nivel del primer tercio del esófago se sitúa un anillo nervioso muy marcado, mientras que en la posición subterminal se encuentran las células excretoras que desembocan en un poro excretor, situado entre ambas estructuras y desplazado hacia la primera. El esófago se prolonga en un intestino cilíndrico que desemboca en un ano situado en la porción subterminal. El primordio genital se encuentra en el último tercio y adosado a la pared intestinal (Nichols, 1956)

El extremo posterior de la larva es digitiforme, aguzado y ligeramente asimétrico. Posee también dos alas que aparecen como dos líneas retráctiles y que se extienden desde la boca al poro anal (terminan a unos 20 μm del extremo final), así como dos pares de papilas, un par anterior al poro excretor y otro par detrás de la mitad del cuerpo, cerca del ala lateral (Nichols, 1956).

Por microscopía electrónica de transmisión se pueden observar tres proyecciones cuniculares que separan la cavidad bucal de las cavidades del vestíbulo. Esta estructura podría funcionar como una válvula que se abre y cierra, coordinándose con el movimiento de bombeo del sistema de alimentación, para prevenir la regurgitación del contenido del tracto alimentario. Este mecanismo puede estar soportado por unas fibras musculares que constituyen una gruesa capa al principio del esófago. Debido a que la capa cuticular que cubre esta proyecciones es más gruesa y aparentemente más fuerte que la cutícula adyacente de la cavidad vestibular, podría ser utilizada también como trituradora de alimento (Vegni Talluri *et al.*, 1986).

El esófago ocupa, aproximadamente, un tercio de la longitud total de la larva, y se puede dividir en cuatro regiones: procorpus (20 μ m de longitud y 5 μ m de ancho), metacorpus (35 μ m de longitud y 5 μ m de ancho), istmo (equivalente a procorpus y metacorpus juntos) y bulbo terminal (20-25 μ m de longitud y 6-10 μ m de ancho). Rodeando al esófago se encuentra una glándula dorsal bien definida y dos subventrales situadas en la porción posterior del esófago. La abundancia de retículo endoplásmico rugoso y la presencia de aparato de Golgi en el citoplasma de las células de la glándula dorsal indica que estas intervienen en la secreción de proteínas. Las secreciones de estas células, así como las de las glándulas esofágicas posteriores, además de participar en el mecanismo de alimentación, pueden estar implicadas en la secreción de enzimas histolíticas en el hábitat del hospedero, para facilitar la penetración de las larvas a través de los tejidos (Bardón, 1992).

El intestino aparentemente carece de lumen y está constituido por siete células alargadas cuyo citoplasma contiene gránulos opacos de grasa. El intestino está comprimido lateralmente por las columnas excretoras y posteriormente se expande y ocupa todo el cuerpo de la larva. La última célula intestinal termina 20-30 μ m antes del poro anal, con el que se conecta por un fino tubo cuticular. El primordio genital es una pequeña masa situada entre el intestino y la pared corporal ventral, desde la porción anterior al nivel medio del intestino, lo forman cuatro células que no son separables individualmente (Bardón, 1992).

Huevos

Los huevos miden de 70 a 90 μm (Figura 3), son amarillo- blanquecino de forma esférica a elipsoidal con un cascarón grueso con fosetas, el cual le da la resistencia ante las condiciones ambientales de tipo químico, mecánico y térmico (Alba, 2006; Cordero *et al*, 1999; Quiroz, 1996).

La fertilización estimula inmediatamente la formación de esta cubierta, de cuyas cuatro capas, tres las forma el propio huevo y una cuarta es añadida por las secreciones del útero. La primera es la capa vitelina, debajo una capa quitinosa seguida de una tercera de naturaleza lipídica formada bajo la segunda por coalescencia de gránulos refringentes que salen del citoplasma. El material secretado por la pared del útero se adhiere a la superficie externa del huevo para formar la cuarta capa, que mientras el huevo está en el útero, mantiene un aspecto albuminoso e incoloro; sin embargo al entrar en contacto con la bilis en el flujo de contenido intestinal, se endurece y adquiere una coloración pardo-amarillenta.

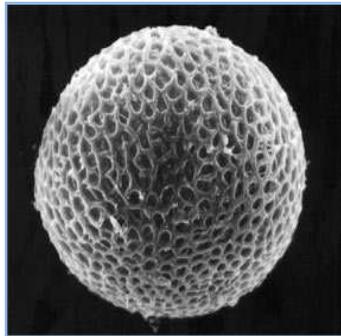


Figura 3. Micrografía de barrido de un huevo de *Toxocara canis*. Es característica la presencia de las fosetas formando depresiones finas. Tomada de <http://www.snof.org/maladies/toxocarose.html>

CICLO BIOLÓGICO:

Los huevos de *T. canis* son eliminados en la materia fecal de los cachorros infectados a partir de los 15 días del establecimiento de los gusanos adultos en el intestino delgado del perro; estos huevos son muy resistentes a las condiciones ambientales y pueden permanecer viables por varios años. Si están protegidos del sol en condiciones favorables de humedad, temperatura (aproximadamente 24°C), aereación y tiempo (aproximadamente 10 días), el huevo forma en su interior a la larva 2 (L2) que es la fase infectante (Alba, 2006; Cordero *et al*, 1999; Quiroz, 2003).

T. canis tiene un ciclo de vida muy complejo. Este varía de acuerdo con la edad a la que el perro adquiere la infección y a las formas en que el parásito llega al mismo. Las vías de infección pueden ser: trasplacentaria, calostrada, ingesta directa de huevos larvados o ingestión de un hospedero paraténico con larvas enquistadas. La infección también puede ser adquirida por un hospedero paraténico a través de la ingesta de huevos con la L2 (Soulsby, 1987).

Ciclo biológico en cachorros

El desarrollo de las fases adultas de *Toxocara canis* en cachorros comienza cuando son ingeridos huevos larvados (L2) por perros menores a 3 meses de edad (Quiroz, 2003). Cuando éstos llegan al intestino delgado, eclosionan y las L2 atraviesan la pared intestinal, penetran a vasos linfáticos o sanguíneos y migran a hígado donde permanecen por varias semanas. Posteriormente, migran por vasos sanguíneos a corazón y pulmones en donde a través de los bronquios llegan a la faringe y son deglutidas; llegan a intestino delgado y maduran a las formas adultas y comienzan la reproducción sexual. Cada hembra puede producir hasta 200,000 huevos por día (Cordero *et al.*, 1999, Soulsby, 1972, Quiroz, 2003)

Ciclo biológico en perros adultos, gestación y lactancia.

Cuando la ingestión de los huevos larvados es realizada por un perro adulto, tras la eclosión de las larvas en el intestino delgado, éstas igualmente atraviesan la pared intestinal y se dirigen por vía sanguínea o linfática a diferentes órganos, principalmente hígado, músculo, pulmones, ojo y cerebro. En estos órganos permanecen como L2 enquistadas sin alcanzar el estado adulto. En perras gestantes las larvas pueden seguir su desarrollo, ya que estas son reactivadas por mecanismos hormonales dados por la prolactina, cortisona y la oxitocina. Algunas larvas llegan al útero entre el día 40 y 42 de la gestación infectando a los cachorros antes del nacimiento; otras larvas se reactivan y migran a la glándula mamaria y son eliminadas a través del calostro y la leche. Debido a esto los cachorros pueden nacer parasitados o adquirir la infección durante la lactancia, y así los cachorros pueden eliminar huevos a partir de los 20 días de nacidos. Algunas de las larvas en las perras gestantes pueden migrar a intestino y alcanzar su estadio adulto; sin embargo, estos gusanos son eliminados en forma espontánea antes de 60 días (Quiroz, 2003; Soulsby, 1972)

Ciclo biológico en Hospederos Paraténicos

Los huevos larvados son ingeridos por hospederos paraténicos, en los cuales no hay desarrollo de las fases adultas del parásito. Cuando las larvas atraviesan la pared intestinal y llegan al hígado, pulmones y el corazón, entran en la circulación y se distribuyen a otros órganos tales como riñón, ojo, tejido muscular y el sistema nervioso central. En estos tejidos la L2 se enquista y puede permanecer viable largos períodos de tiempo.

Cuando un perro adulto consume algún hospedero paraténico, la L2 reactiva su desarrollo en ellos y se convierte en adulto directamente en el intestino sin realizar una migración somática. Eventualmente estos perros pueden eliminar huevos de *T. canis* en un corto periodo ya que generalmente hay eliminación espontánea de los gusanos adultos. Entre los diferentes hospederos paraténicos se encuentran los roedores como los ratones, ratas, conejos; rumiantes como los ovinos, bovinos, caprinos y aves, al igual que el hombre el cual es considerado un hospedero accidental (Soulsby, 1972; Quiroz, 2003).

Figura 4. Ciclo Biológico de *Toxocara canis*

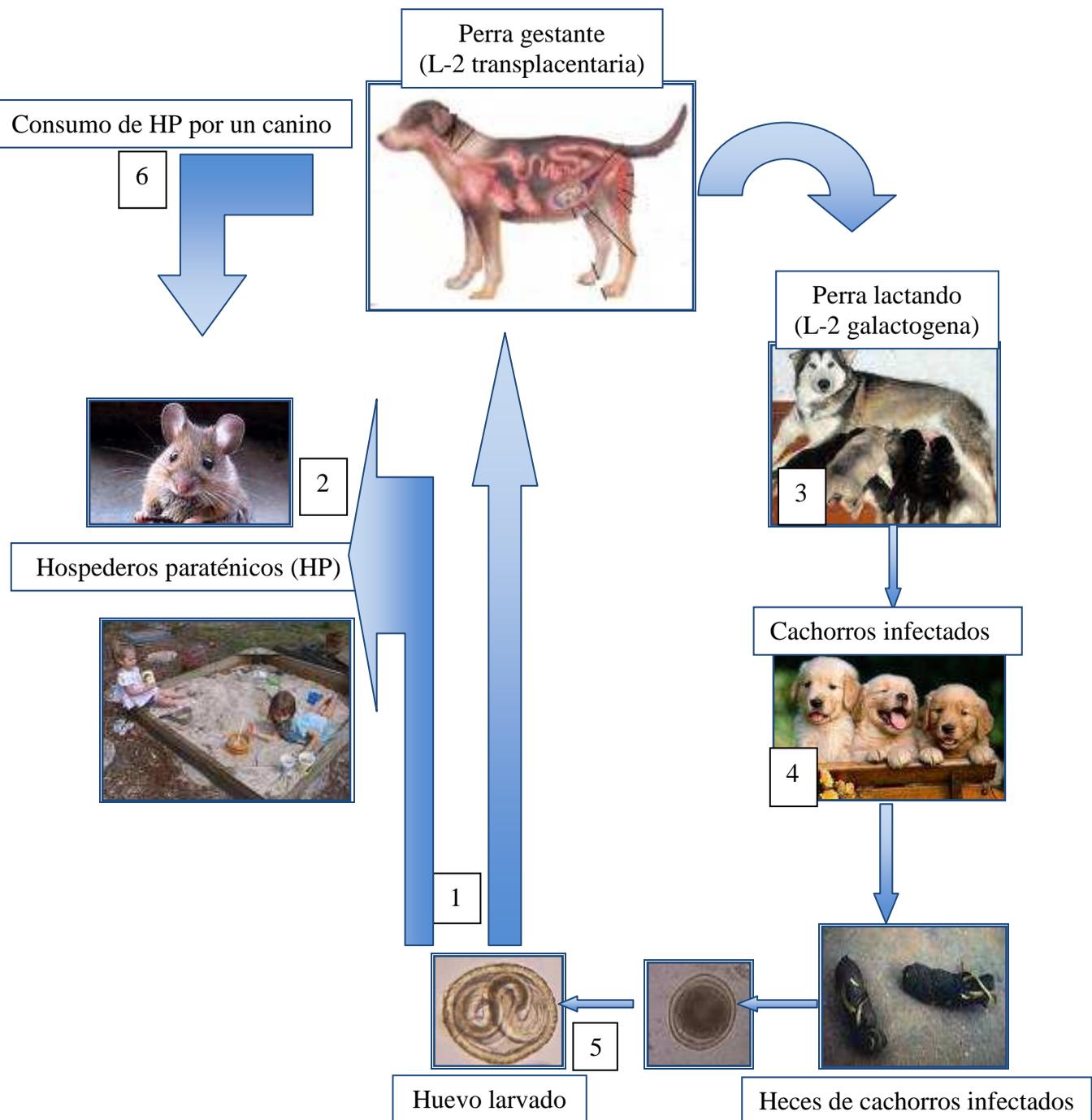


Figura 4. 1. Ingestión de huevos embrionados por el hospedero paraténico (humano, ratones) y definitivo (cachorro) 2. Migración de la larva dirigiéndose a circulación general. 3. Desenquistamiento de las larvas existentes en tejidos de la perra gestante migrando estas a los cachorros o a glándula mamaria y transmisión de larvas de *T.canis* por vía transplacentaria. 4. Cachorros infectados excretan en heces los huevos de *T.canis*. 5. Evolución de los huevos en el medio en condiciones apropiadas. 6. Consumo de hospedero paratenico (HP) por un canino. Tomadas de: www.bayer-cz.cz/.../drontal/skrkavky.jpg, www.mascotia.com/fotos/Ascaris.jpg, www.upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb

EPIDEMIOLOGÍA

La Toxocariosis es una de las enfermedades parasitarias de perros y otros caninos más importantes. Su distribución geográfica es mundial, con alta incidencia y patogenicidad. La costumbre del hombre de vivir rodeado de animales domésticos, particularmente de perros y gatos, ha facilitado que la toxocariosis sea una de las zoonosis helmínticas más ampliamente difundidas en todo el mundo (Despommier, 2003).

La fuente de infestación son los perros y otros carnívoros que contaminan con sus heces el suelo. Los huevos eliminados son resistentes a la mayoría de los desinfectantes de uso común y a las condiciones del medio ambiente, siempre y cuando exista humedad. La evolución del huevo para desarrollar la segunda larva depende además de oxígeno y de una temperatura adecuada (Quiroz, 2003).

La prevalencia de *Toxocara canis* en los perros es muy alta debido, sobre todo, a la eficiencia de la transmisión prenatal, por lo que la mayoría de los perros cachorros recién nacidos están infestados con *Toxocara canis*. Numerosos estudios arrojan positividad desde el 5 % hasta más del 80% en los resultados (Cuadro 1), los cuales dependen de la procedencia de los animales, condiciones higiénico-sanitarias e incluso de las diferencias en los procedimientos de diagnóstico (Cordero *et al.*, 1999 y Quiroz, 2003).

Cuadro 1. Frecuencia de *Toxocara canis* en el hospedero definitivo en diferentes países.

Región	Tipo de muestra	Número de casos	% de Parasitación	Referencia
Egipto	Heces	---	80.6%	Khalil, 1977
Nigeria	Heces	---	18.55%	Fashuyi, 1981
Canadá	Heces	332	34%	Ghadirian <i>et al.</i> , 1976
E.U.A	Heces	182	49.5%	Marron & Schroeder, 1978
Brasil	Heces y necopsia	158	44.3%	Chieffi & Muller, 1976
Japón	Heces	15	86.6%	Matsumura & Endo, 1982
Pakistán	Heces	150	48.6%	Umar <i>et al.</i> , 1986
Armenia	Heces	---	42.8%	Davidyants & Chobanyan, 1981
Bélgica	Necropsia	212	38.9%	Vanparijis <i>et al.</i> , 1991
España	Heces	400	31%	Simon & Conde Simón, 1987
Portugal	Heces	100	36.3%	Arandas-Rego, 1980
Nueva Zelanda	Heces	147	2.8%	Dodge, 1980
México D.F	Heces	470	19.8%	Eguia-Aguilar, 1998
México D.F	Necropsia	100	15%	Martínez <i>et al.</i> , 1998

Ocasionalmente intervienen hospederos paraténicos en los que se encuentran con cierta frecuencia larvas tisulares, lo que presenta otra posibilidad de infestación para el perro. Los huevos de *T. canis* pueden ser ingeridos por una variedad de hospederos paraténicos como gusanos de tierra, ratas, ratones, palomas, pollos, borregos, ovejas, cerdos, tortugas, cucarachas y muy significativamente los humanos. La infestación humana ha sido clásicamente asociada a la geofagia (pica), pero la ingestión de huevos puede ocurrir mediante manos contaminadas con heces y/o por comer vegetales y productos animales crudos contaminados (Cordero *et al.*, 1999).

La tendencia de algunos niños de comer tierra, es el factor principal de riesgo de la infestación. La compulsión de comer tierra por un desorden conductual puede afectar del 2-10% de los niños entre los 1-6 años de edad. La pica está frecuentemente asociada con deficiencias de hierro o zinc. Alrededor del 40% de los pacientes con complicaciones oculares relacionadas con este parásito presentaron una historia clínica de pica (Overgaauw, 1997).

Cuadro 2. Seroprevalencia de anticuerpos hacia *Toxocara canis* en humanos en diferentes lugares del mundo. PCI: Parálisis cerebral infantil

Región	Muestra de la población	Seroprevalencia	Referencia
Francia	Adultos sanos Zonas urbanas	2%	Magnaaval <i>et al.</i> , 2001
Italia	Adultos sanos Zonas urbanas	3.9%	Genchi <i>et al.</i> , 1990
Corea	Adultos sanos Zonas urbanas	5%	Park <i>et al.</i> , 2002
Suecia	Adultos sanos Zonas urbanas	7%	Ljungstrom & Van Knapen, 1989
Escocia	Adultos sanos Zonas rurales	16%	Girdwood <i>et al.</i> , 1978
Polonia	Adultos sanos Zonas rurales	20.7%	Thompson <i>et al.</i> , 1986
Sur de Francia	Adultos sanos Zonas rurales	37%	Magnaaval <i>et al.</i> , 1994
Indias Occidentales	Niños	86%	Josephs <i>et al.</i> , 1981
Isla de la Reunión Colonia Francesa (Cte. Africano ⁹)	Adultos	92.8%	DeSavigny <i>et al.</i> , 1979
Bedford, Ing.	Niños	14.6%	Nicholas <i>et al.</i> , 1986
Londres	Adultos donadores de sangre	2.6%	Lynch <i>et al.</i> , 1988
Australia	Adultos donadores de sangre	7%	Hermann <i>et al.</i> , 1985
Venezuela	Indios Amazónicos	34.9%	Lamina, 1986
E.U.A	Niños	4.6-7.3%	Thompson <i>et al.</i> , 1986
Alemania	Niños	2.5%	Tolan <i>et al.</i> , 2001
Caribe	Niños	83%	<i>Idem</i>
Brasil	Niños	39%	<i>Idem</i>
Rep. Checa	Niños	5.8-36%	<i>Idem</i>
España	Niños	5.2%	<i>Idem</i>
Jordania	Niños	10.9%	<i>Idem</i>
Colombia	Niños	47.5%	<i>Idem</i>
Nepal	Niños	81%	<i>Idem</i>
Rep. Eslovenia	Niños	13%	<i>Idem</i>
Querétaro (Mex)	Niños	7.5%	Martínez <i>et al.</i> , 1997
México D.F	Niños (PCI)	1.9%	Fernández <i>et al.</i> , 1999
Cd. De México	Adolescentes	0.13%	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2000

Las personas que habitan en ambientes contaminados con huevos de *Toxocara spp.* también están expuestos a un gran riesgo de infestación. Los datos sobre la presencia, concentración y estado de embrionamiento de huevos potencialmente infestantes de *Toxocara canis* en el ambiente pueden proveer un ensayo útil en el nivel y significancia de la contaminación en una localidad dada (Cuadro 3) (Holland *et al.*, 1997).

Cuadro 3. Contaminación con huevos de *Toxocara canis* en áreas públicas.

Región	Procedencia	Número de casos	% de contaminación	Referencia
Canadá	Parques públicos	43	32.55%	Ghadirian <i>et al.</i> , 1976
E.U.A	Parques públicos	232	22%	Dada & Lindsquist, 1979
Brasil	Parques públicos	15	60%	Chieffi % Muller, 1978
Corea	Campos de fútbol	---	7.9%	Lee <i>et al.</i> , 1982
India	Parques	527	46.43%	Gunaseelan <i>et al.</i> , 1985
Japón	Parques	227	41.9%	Uga <i>et al.</i> , 1989
Alemania	Parques infantiles	31	87%	Duwell, 1983
España	Zonas de entrenamiento canino	21	47.6%	Angulo <i>et al.</i> , 1985
Inglaterra	Parques	503	66%	Snow <i>et al.</i> , 1987
Portugal	Parques públicos	23	39.13%	Arandas-Rego, 1980
Australia	Cajones de arena para juegos	41	0%	Winkel <i>et al.</i> , 1990

PATOGENIA EN PERROS

La migración larvaria, dentro de los distintos hospederos tiene un efecto traumático sobre los órganos y tejidos por los cuales pasan estas larvas. En los pulmones se observa ruptura de capilares y alvéolos, además de una acción de inoculación de bacterias cuando atraviesan la luz intestinal. También son histófagas durante su migración, en las infestaciones severas durante el paso por pulmón llegan a producir neumonías con edema, exudado pulmonar y hasta muerte por broncodilatación ó gangrena pulmonar. Las L2 en el hígado causan una colangitis y una colestasis biliar por obstrucción, también una inflamación difusa dando una hepatitis crónica y hasta fibrosis hepática (Cordero *et al.*, 1999; Quiroz, 2003).

Las secreciones y excreciones de las larvas pueden tener varios efectos en el hospedador. En primer lugar tienen un efecto enzimático sobre los tejidos, lo que provoca lisis y facilita la migración de las larvas. Además pueden tener efectos anafilácticos, debido a ésto se forman granulomas con infiltrado eosinofílico que además contienen neutrófilos, linfocitos, histiocitos epiteloides y células gigantes (Bardón ., 1992).

Las formas larvarias y adultas en el intestino de cachorros producen una acción expoliatriz quimófaga y de líquidos celulares, irritación en la mucosa intestinal que eventualmente se asocia con cuadros diarreicos o vómitos; además de que en infestaciones masivas puede haber una posible acción mecánica obstructiva en el intestino (Cordero *et al.*, 1999; Quiroz, 2003)

CUADRO CLÍNICO EN PERROS

En los cachorros y los perros jóvenes es donde se presenta principalmente la signología, la migración de larvas por pulmón ocasionalmente pueden desarrollar signos clínicos respiratorios como tos con descarga nasal. La presencia de gusanos adultos en intestino produce perdida de peso, pelo hirsuto, cuadro digestivo con diarrea mucoide, abdomen distendido, dolor abdominal, vómitos y en toxocariasis masiva puede llegar a la

muerte por peritonitis causada por ruptura de la pared intestinal (Bistner *et al*, 2002; Cordero *et al*, 1999).

CUADRO CLÍNICO EN HUMANOS

Esta parasitosis puede producir varios cuadros clínicos, los principales son:

Larva Migrans Visceral (LMV)

Este cuadro fue reportado por primera vez en la década de los 50's cuando una L2 de *T. canis* fue encontrada e identificada en los tejidos de varios niños, lo cual despertó el interés por el estudio de la naturaleza de la infección y el ciclo de vida del parásito (Beaver, 1952). Este síndrome fue caracterizado por eosinofilia, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia e infiltración pulmonar.

Clínicamente, la gravedad de la enfermedad varía según el número de huevos larvados ingeridos, la duración de la infección, la presencia de larvas en lugares críticos y otros factores aun no entendidos (Beaver *et al.*, 1986). La mayoría de las infecciones humanas por *T. canis* cursan asintómicamente o con signos muy leves (Bass *et al.*, 1983) El signo más notorio es eosinofilia crónica. En algunos casos se han descrito cuentas de leucocitos de 30,000 a 100,000 por mm³ y con una elevación de un 50 a 90% del nivel de eosinófilos con respecto al nivel normal (Limaye *et al.*, 1990). En casos más graves se reportan historias de pica, fiebre, hepatomegalia, hiperglobulinemia y dolor abdominal. La mayoría de los pacientes se recuperan y solo algunos llegan a morir (Beaver *et al.*, 1986).

Las lesiones en los órganos pueden ser de tipo agudo o crónico. Los principales órganos afectados son el hígado, pulmón y riñón. 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 *et al.*, 2000).

Larva Migrans Ocular (LMO)

Este síndrome ocular fue descrito por primera vez por Wilder en 1950 encontrando larvas en los 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 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, panuveititis, papilitis óptica con desprendimiento de la retina y pérdida de la visión (Glickman *et al.*, 1987).

Anteriormente la lesión granulomatosa en la retina se confundía con un proceso tumoral conocido como retinoblastoma, por lo que estos pacientes se sometían a enucleación del globo ocular como medida preventiva para evitar la metástasis tumoral. Sin embargo, 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 *et al.*, 1987).

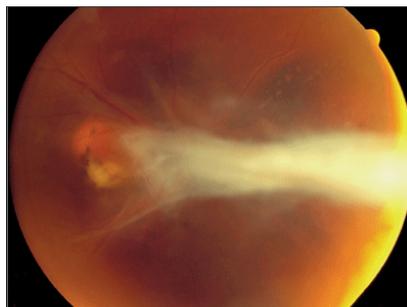


Figura 5. Paciente con fibroma epiretinal tracción de la retina causado por Larva migrans ocular de *Toxocara canis*. Tomado de: www.revophth.com/publish/images/1_898_2.gif

Toxocariosis Neurológica (TN):

En el cerebro las larvas de *Toxocara canis* no se encapsulan; se producen áreas de necrosis por las zonas de migración en este órgano. Se han encontrado algunos signos como déficit neurológico agudo, trastornos de la conducta y meningoencefalitis eosinofílica. (Ardiles A; 2001).

Toxocariosis Encubierta (TE):

La toxocariasis encubierta permanece sin diagnosticar frecuentemente. Por definición, la toxocariosis encubierta es caracterizada por síntomas y signos no específicos y no incluidos dentro de las categorías LMV, LMO o TN. La TE parece depender en menor grado de la reacción local a las larvas de *Toxocara* pero son varios los órganos que pueden estar afectados. Los órganos afectados pueden diferir entre los diferentes individuos y debido a esto la expresión clínica de la TE varía ampliamente. Se puede presentar compromiso pulmonar como asma, bronquitis aguda y neumonía. Es importante señalar que no se ha encontrado asociación significativa entre la infección por *Toxocara* y el padecimiento de asma. No obstante, el asma puede ser un síntoma incluido en la patología de la toxocariosis. Los pacientes que padecen asma y presentan anticuerpos IgE e IgG contra *Toxocara* son considerados como casos de toxocariosis. También pueden presentarse afecciones dérmicas como urticaria y prurito, linfadenopatía, miositis, síndrome pseudoreumático, artritis eosinofílica y linfocítica, dolor abdominal, síndrome de irritación intestinal, vasculitis sistémica y equimosis. En pacientes con síndrome nefrótico se han detectado altos niveles de IgM específicas a *Toxocara*. Esta relación causal es poco conocida (Feldman & Parker, 1992; Pinelli *et al.*, 2001).

Forma asintomática:

La infección parasitaria por *T. canis* en humanos es asintomática usualmente. La toxocariosis asintomática diagnosticada por serología positiva ocurre principalmente en infecciones viejas y puede o no estar acompañada de eosinofilia. Las larvas de *Toxocara*

pueden ser reactivadas en cualquier tiempo después de la infección para luego migrar (Bass, 1987).

Antígenos de Excreción-Secreción de Larvas de *Toxocara canis* (AgSET)

Las larvas de *T. canis* continuamente se encuentran secretando glicoproteínas *in situ* a través de sus orificios naturales, las cuales son conocidas como antígenos de excreción-secreción de *T. canis* (Maizels *et al.*, 1984; Savigny, 1975). Estos son aproximadamente 50 glicoproteínas que son denominadas antígenos de secreción excreción (AgSET) los cuales están compuestos principalmente por dos azúcares: la n-acetilgalactosamina y la galactosa entremezcladas con algunos otros azúcares formando epitopes. Estos epitopes son reconocidos por las células de defensa que montan una respuesta inmune celular y humoral contra dichos antígenos de *T. canis* (Brown, 1986; Levine, 1990; Levine *et al.*, 1993).

Algunos de estos antígenos permanecen unidos a la cutícula de la larva para después ser liberadas a los tejidos lo cual es visto como un mecanismo de inmunoevasión (Maizels *et al.*, 1984). En los hospederos paraténicos, al no tener evidencia directa de la presencia del parásito se utiliza la detección de AgSET por medio de anticuerpos específicos para realizar el diagnóstico (Margini, 1996).

Se han obtenido *in vitro* los AgEST (Bowman *et al.*, 1987) manteniendo larvas en medios de cultivo para células (Savigny, 1975; Badley *et al.*, 1987; Magnaval *et al.*, 1991). Badley *et al.*, (1987) detectaron 15 bandas de proteínas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida a partir de cultivos de larvas.

A través de la inmunoelectrotransferencia o Western Blot (WB) se han podido determinar antígenos específicos de la larva de *T. canis* y antígenos que presentan reacción cruzada con otros helmintos. En los humanos se ha determinado un patrón específico de cuatro bandas de bajo peso molecular y un patrón de alto peso molecular (HMW) que presenta cruces antigénicos con otros helmintos como: *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides*

sp., *Fasciola hepática*, *Schistosoma sp.*, *Onchocerca sp.*, y la larva de *Echinococcus granulosus* productora del quiste hidatídico (Magnaval *et al.*, 1991).

Respuesta inmune en la toxocariosis

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

Los AgSET son capaces de estimular la respuesta inmune por Linfocitos T (LT) CD4+ principalmente el subtipo Th2 con un perfil de citocinas tales como IL-4 e IL-5. 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 & Sugane, 1993).

Se ha observado que la administración de anticuerpos contra CD4+ es capaz de permitir solo 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 & Sugane,1993). 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 IL-5, lo cual afirma la existencia de otros tipos celulares productores de IL-5.

En modelos *in vitro* estas células fueron caracterizadas por anticuerpos monoclonales contra LT que expresan CD3 pero no CD4 ni CD8 conocidos también como células *naive* ó linfocitos doble negativos (Takamoto & Sugane, 1993).

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 específicas (Sher, 1995). Por lo anterior se ha sugerido que se produce una activación policlonal inespecífica aumentando la susceptibilidad a varios alérgenos (Buijs *et al.*, 1994). En algunos trabajos se ha demostrado la capacidad mitogénica 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 14% (Szczepanski *et al.*, 1996) aunque encontramos rangos mucho más elevados en el cuadro 2. 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 subclase 4 que está asociada a fenómenos de citotoxicidad mediada por células anticuerpo-dependiente y la IgE (Obwaller *et al.*, 1998).

Recientemente se han observado 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 II (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 y de manera significativa en

grupos de niños seropositivos a AgSET (Buijs *et al.*, 1994), por lo que se especula que la exposición a los AgSET puede acelerar la manifestación de los problemas asmáticos en niños con predisposición genética al padecimiento.

Respuesta humoral .

La mayoría de los autores en los últimos años emplean la técnica de ELISA con distintos preparados antigénicos para el diagnóstico de la toxocariosis. Un de los primeros trabajos fue el de Glickman *et al.*,(1979), quienes investigaron mediante ELISA la presencia de anticuerpos (IgG) anti-*T. canis* en empleados de clínicas veterinarias. Utilizaron antígeno preparado a partir de huevos embrionados de *Toxocara* y adsorbieron el suero, previamente al análisis, con extracto de larvas de *Ascaris* para eliminar falsos positivos debidos a reacciones cruzadas entre antígenos presentes a *Toxocara* y anticuerpos anti-*Ascaris*, anticuerpos heterófilos y proteína C-reactiva. Realizaron lectura visual, considerando el punto final como la inversa de la última dilución que produce cambio de color. Guillen *et al.*, (1986) utilizaron también la prueba de ELISA con AgSET para la detección de anticuerpos específicos de pacientes con sospecha clínica de LMV. Emplearon el antígeno a una concentración de 1.5 µg/ml y los sueros a la dilución 1/150. Como criterio de valoración utilizaron el índice diagnóstico (ID) consistente en dividir la Densidad óptica del suero problema entre la del testigo negativo una vez restada su correspondiente fijación inespecífica a la BSA utilizada en el postapizado, Se consideraron negativos aquellos sueros con I.D inferior a dos, dudosos entre dos y tres y positivos los superiores a tres. Cuellar *et al.*, (1990) al revisar este criterio diagnóstico, comparando los resultados obtenidos en ELISA expresados como ID con los obtenidos mediante microprecipitación larvaria, al investigar anticuerpos específicos en el suero de pacientes con sospecha de LMV, concluyeron que el criterio de positividad puede establecerse desde tres en adelante, y los valores hasta ahora considerados como dudosos (2-3) se confirmaron como negativos. No obstante, sugirieron que los pacientes con sospecha clínica de LMV y los sueros con valor diagnóstico de tres, ó cercanos a tres, deben ser revisados.

1. JUSTIFICACIÓN:

Los antígenos de secreción-excreción de las larvas de *T. canis* son por su sensibilidad y especificidad los más utilizados para el diagnóstico inmunológico de la toxocariasis en los hospederos paraténicos a nivel mundial. Se ha observado que los patrones de reconocimiento antigénico de los sueros de pacientes de diversos países es diferente (Maizels *et al.*, 2000). Se ha sugerido que esto se debe a que las condiciones de obtención y las técnicas de detección tienen algunas diferencias en cada laboratorio en distintos países. Por lo anterior en este estudio usando las mismas técnicas y bajo las mismas condiciones metodológicas, se compararon los antígenos de secreción-excreción de las larvas de *T. canis* de gusanos obtenidos en México (AgSET-MX) y los antígenos de secreción-excreción de las larvas de *T. canis* de gusanos obtenidos en España (AgSET-ES) reconocidos por suero de pacientes mexicanos y españoles.

2. HIPÓTESIS

Los antígenos de secreción–excreción de *Toxocara canis* de nematodos obtenidos en México y los de gusanos obtenidos en España tienen diferentes componentes antigénicos, y estos pueden ser reconocidos diferencialmente por sueros de pacientes de ambos países.

3. OBJETIVO GENERAL

Comparar por medio de la prueba de ELISA y la prueba de WB los AgSET-MX y AgSET-ES reconocidos por sueros de pacientes mexicanos y españoles positivos a ELISA según los protocolos empleados en el laboratorio de cada país.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar los patrones electroforeticos de los AgSET-MX y AgSET-ES en geles SDS-PAGE.
- Evaluar el efecto de los AgSET-MX y AgSET-ES sobre la sensibilidad de la prueba de ELISA en sueros de pacientes mexicanos y españoles.
- Comparar los patrones de de reconocimiento antigénico obtenido por WB de los AgSET-MX y AgSET-ES por sueros de pacientes mexicanos y españoles.

6. MATERIAL Y METODO

LUGAR DE REALIZACIÓN

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 1 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM, que se encuentra ubicada en Cuautitlán Izcalli Estado de México y en el laboratorio de Parasitología Clínica de la Universidad de Farmacia de San Pablo CEU (Centro de educación universitaria) campus Montepíncipe en Madrid, España.



Figura 6. Lugares de realización del proyecto. Universidad Nacional Autónoma de México FES-Cuautitlán, Estado de México; Universidad CEU San Pablo Madrid, España.

OBTENCIÓN DE HUEVOS DE *Toxocara canis*:

Se colectaron adultos de *T. canis* a partir de necropsias realizadas de cachorros cánidos de 1 a 4 meses de edad sacrificados de forma humanitaria en el centro de control canino de Cuautitlán Izcalli Estado de México. Los gusanos recuperados fueron lavados con agua corriente para quitarles el exceso de suciedad. En España este proceso se había realizado con anterioridad en el laboratorio utilizando el siguiente método: los gusanos se obtuvieron a partir de una perra Beagle gestante infestada experimentalmente en el laboratorio. Posterior al nacimiento de los cachorros, éstos fueron desparasitados con el producto comercial Canex (pirantel, oxantel y praziquantel) para que liberaran por las heces los gusanos adultos los cuales igualmente fueron lavados con agua para quitar el exceso de suciedad.



Figura 7. Obtención de gusanos de *T. canis* en México a partir de cánidos de centro de control canino y en España a partir de cachorros Beagle infectados en laboratorio.

Los adultos de *T. canis* fueron separados de acuerdo al sexo en hembras y machos. Las hembras fueron disecadas al final del primer tercio de su cuerpo (a nivel de los ovarios) y se obtuvieron los huevos. Estos últimos fueron suspendidos en solución salina fisiológica y se filtraron a través de una coladera de poro fino. Posteriormente se centrifugaron para concentrar los huevos, se desechó el sobrenadante por decantación y la pastilla restante se

resuspendió en una solución de formol al 1.5%. Esta solución se colocó en una caja de Petri y se incubó a 25 °C por aproximadamente 25 días según lo descrito por De Savigny (1975). El conteo de huevos viables de cada cultivo se realizó de la siguiente manera: por triplicado, se pusieron 20 µl del cultivo en un portaobjetos y se contó al microscopio el número de huevos con una larva móvil en su interior, se sumaron, se dividió entre tres y se multiplicó por 50 para calcular el número de huevos viables por ml de cultivo.

OBTENCIÓN Y CULTIVO DE LARVAS

La obtención de las larvas se hizo utilizando el método desarrollado por De Savigny, (1975) y modificado por Bowman *et al.* (1987); la obtención y cultivo de larvas de España ya había sido realizado por personal del laboratorio de la universidad de San Pablo CEU usando el mismo método. En los huevos incubados se verificó el desarrollo de la larva infectante L2, se procedió a realizar tres lavados por centrifugación y reconstitución en SSF estéril; enseguida se hizo un lavado en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos. Posteriormente dentro de una campana de flujo laminar se realizaron cuatro lavados con medio de cultivo para células. En México se utilizó medio RPMI 1640 amortiguado con HEPES a un pH de 7.2 con 100 µl de gentamicina y glucosa al 1% (Maizels *et al.*, 1984) y en España se utilizó en un medio mínimo esencial de Eagle. Posteriormente se sometieron a una agitación utilizando un agitador magnético por 10 minutos para así provocar la eclosión de los huevos. De la suspensión que se obtuvo, se separaron las larvas viables por medio de un método modificado de migración larvaria de Baermann, para lo cual fueron usados microaparatos de Baermann estériles elaborados con pipetas Pasteur, a las cuales se les colocó un algodón dentro, y se colocaron éstas en tubos de ensaye de 30 ml con tapa metálica sin sello hermético. Se colocó la suspensión en la parte superior del algodón, dentro de las pipetas Pasteur, y dentro del tubo se le agregó medio de cultivo estéril RPMI hasta que este hiciera contacto con la parte inferior del algodón. Pasadas 24 hrs de incubación a 37°C en una estufa de CO₂, se colectaron del fondo del tubo de ensaye las larvas viables y se realizó otra colecta a las 48 hrs. Las larvas recolectadas y resuspendidas en medio de cultivo en México con RPMI-1640; mientras que en España con medio mínimo esencial de Eagle, y fueron colocadas en cajas de cultivo tipo

Falcon de 15 ml a una concentración de 1000 larvas/ml. Estas se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂ con 95% de humedad.

PRODUCCIÓN DE Ag-SET

Se colectó el sobrenadante de las cajas de cultivo por aspiración en condiciones estériles dentro de la campana de flujo laminar, para lo cual primero se sedimentaron las larvas en un extremo de la caja por gravedad, después las cajas fueron reconstituidas con medio estéril RPMI (medio del Roswell Park Memorial Institute) en México y en España con medio mínimo esencial de Eagle. Dicho proceso se llevó a cabo cada semana. Después de obtener una cantidad considerable de sobrenadante, éste fue concentrado 100 veces por medio de tubos concentradores con membranas de 10 000 Da. Se determinó la concentración final de proteína mediante la técnica de Bradford (1976). La producción del AgSET en España ya había sido realizada por los miembros del laboratorio de la universidad de San Pablo CEU, bajo la misma metodología utilizada en México.

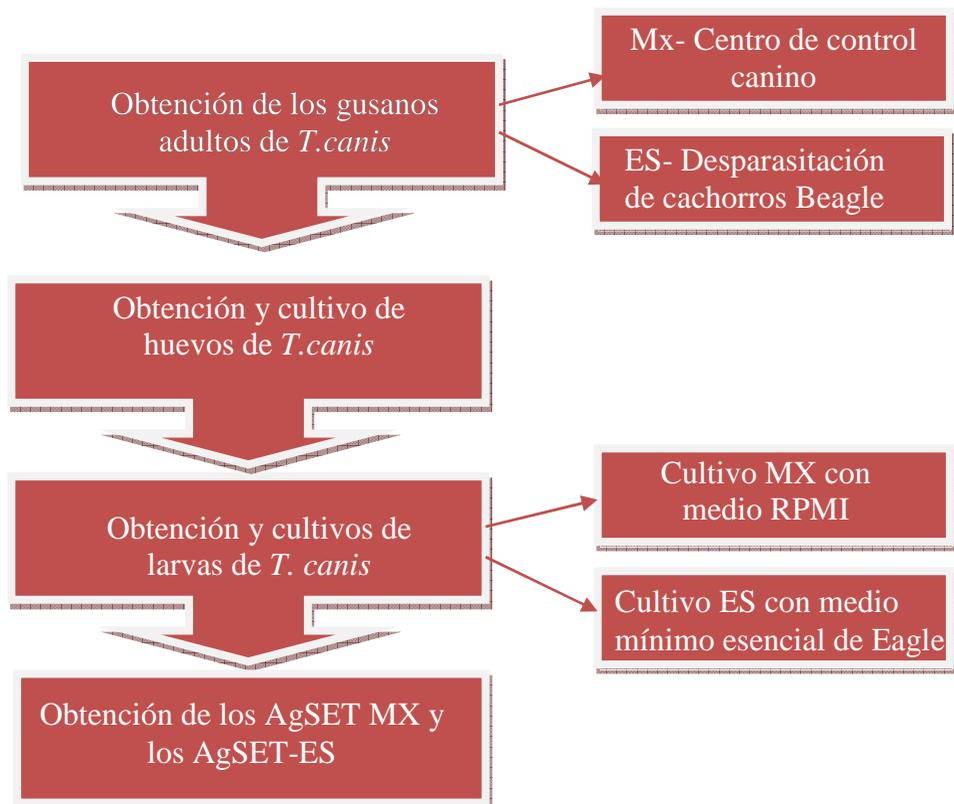


Figura 8. Metodología para la obtención de los Ag-SET a partir de gusanos adultos de *Toxocara canis* obtenidos en México y España.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (Método de Bradford)

La determinación de proteínas tanto del AgSET-MX como del AgSET-ES se realizó mediante el método de Bradford (1976). Para ello, se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de Albúmina Sérica Bovina (BSA de SIGMA A-3294) a partir de un estándar de concentración conocida de 1.40 mg/ml. Las concentraciones preparadas fueron 25, 20, 15, 10, 5 y 1 µg/ml. A continuación se añadió el reactivo colorante comercial (BIO-RAD ®) sobre las diferentes concentraciones y se midieron los valores de Densidades Ópticas (DO) a 595 nm desde el menos al más concentrado, incluyendo además un blanco de PBS. Con los valores así obtenidos se construyó una curva patrón sobre la que se extrapoló la DO obtenida sobre una dilución apropiada de la muestra problema.

OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE SUEROS

Los sueros de pacientes Mexicanos fueron obtenidos del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” y fueron almacenados en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM (México).

Los sueros de pacientes españoles positivos a toxocariosis fueron proporcionados por el Laboratorio de Parasitología Clínica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Pablo CEU (España), los cuales eran procedentes del Hospital la Paz en Madrid España.

CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS SUEROS EMPLEADOS

Los sueros tanto mexicanos como españoles que se utilizaron para la realización de las pruebas de ELISA y WB fueron seleccionados por la positividad de estos ante el AgSET-MX y al AgSET-ES por pruebas de ELISA realizadas bajo las condiciones particulares de cada uno de los laboratorios donadores, tomando como criterio el nivel de Índice Diagnóstico (ID) que debía ser superior a 3.

PRUEBA DE ELISA

La prueba de ELISA se realizó en su totalidad en la Universidad de CEU en Madrid, España. Ésta se hizo para todos los sueros de los pacientes mexicanos y españoles utilizando los AgSET-MX y los AgSET-ES.

La cantidad óptima de antígeno, suero y conjugado para realizar esta prueba fue establecida realizando la estandarización mediante la combinación de diluciones seriadas entre ellas, tomando como criterio la máxima lectura en DO con el mínimo de color inespecífico de fondo. Se usaron placas de 96 pozos de poliestireno, las cuales se sensibilizaron alternadamente con AgSET y con medio que se empleó para el mantenimiento de las larvas. Se emplearon 50 µl por pozo de una solución de 1.25 µg/ml de AgSET en buffer de bicarbonatos (pH 9.6) y la misma cantidad de medio de cultivo. Posteriormente, las placas fueron lavadas con solución de PBS-tween 20 al 0.1% (PBS-T0.1) y los sitios libres de la placa se saturaron con una solución de BSA al 3% en PBS (PBS-BSA 3%). Los sueros problema se diluyeron v/v 1:32 en PBS-T0.1 y se incubaron por duplicado en los pozos con AgSET y con medio de cultivo solo a razón de 50 µl por pozo por 2 h a 37 °C; después se realizaron lavados con PBS-T 0.1 y las placas se incubaron con un policlonal de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (BIOSOURCE) 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 100µl 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 492 nm, en un lector de ELISA (Marca: Labsystems; Modelo: Mutyskan Ascent).

Para detectar color inespecífico de fondo 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 determinar la positividad o negatividad de un suero a la toxocariasis se utilizó el ID, el cual consiste en dividir la media de la DO una vez restada el valor de la BSA del suero problema entre la media de la DO una vez restada su BSA del suero control negativo; el criterio utilizado es de valores iguales o superiores a 3 se consideran positivos, entre 2 y 3 dudosos y negativos los inferiores a 2.

ELECTROFORESIS EN GELES SDS-PAGE

Para separar las proteínas de los AgSET-MX y AgSET-ES, se utilizaron geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), siguiendo con algunas modificaciones el método descrito por Laemmli (1970). El equipo utilizado fue una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN III (Bio-Rad®).

La separación de los geles de poliacrilamida se realizó de la siguiente manera: El gel de resolución fue preparado a una concentración de acrilamida del 12% en trizma 0.375 M y pH 8.8. Se utilizó el gel espaciador preparado con 4% de acrilamida en trizma 0.125 M y un pH de 6.8. Los geles se prepararon en el equipo mini-PROTEAN III. La solución amortiguadora de corrimiento usada contenía trizma base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1% (p/vol), a un pH de 8.3.

Las muestras de AgSET se diluyeron 1:1 en una solución amortiguadora de muestra a un pH de 6.8 (trizma base 62.5 mM, SDS 2 %, glicerol 10%, Azul de bromogenol 0.002% y 2- mercaptoetanol 5 %). Las muestras se calentaron en baño María en ebullición durante 5 minutos. En cada corrimiento se incluyeron marcadores de peso molecular (MPM) preteñidos (Bio-Rad®) y una vez que transcurrió este tiempo las muestras se colocaron en el gel y se corrieron iniciando a 100 V con 250 mA y terminando a 350 mA hasta que el frente del colorante migró al borde inferior del gel. Una vez terminado el corrimiento, las proteínas separadas en los geles se transfirieron a papel PVDF o fueron teñidos con nitrato de plata. El PM de las proteínas obtenidas fue calculado comparado las bandas problema con un patrón de marcadores de un peso conocido en el mismo gel, se utilizó el software GENETOOLS®. Los marcadores de peso molecular (MPM) fueron: 200 kDa (miosina);

116 kDa (beta galactosidasa); 86 kDa (albúmina sérica bovina); 66 kDa (ovoalbúmina); 45 kDa (anhidrasa carbónica); 31 kDa (inhibidor de tripsina); 21.5 kDa (lisozima) y 14.4 kDa (aprotinina). Los marcadores se trataron según las indicaciones del fabricante. En el caso de los geles destinados a transferencia se utilizó un marcador preteñido. Los geles se mantuvieron en metanol al 30% a 4 °C.

TINCIÓN DE PLATA PARA GELES DE POLIACRILAMIDA

Los geles SDS-PAGE se sumergieron en 250 ml de una solución de metanol al 45% y ácido acético al 12% durante 30 minutos. Posteriormente los geles se lavaron 3 veces por 10 minutos, con etanol al 10% y ácido acético al 5%, y se fijaron los geles con glutaraldehído al 10% durante 30 minutos. Para retirar el glutaraldehído, se realizaron seis lavados con agua desionizada. Los tres primeros fueron de 30 segundos y los restantes de 10 minutos.

A continuación los geles se sumergieron en una solución de DTT (DL-dithiothreitol, SIGMA D-0632), a una concentración de 10 µg/ml, durante 30 minutos. Posteriormente se retiró y directamente se trataron con nitrato de plata 0.012 M (Stock 1.2 M) durante 30 minutos. El exceso de nitrato de plata se eliminó, con dos lavados de agua desionizada.

El revelado de las bandas se realizó mediante lavados sucesivos de los geles con Carbonato sódico y formaldehído (0.28 M carbonato sódico/ 0.0147 M HCOH) recién preparado, en agitación continua. Una vez desarrolladas las bandas, se aclaró el fondo del gel con el reductor de Farmer (1 ml de $K_3Fe(CN)_6$ y 4 ml de $Na_2S_2O_3$). Por último, los geles se lavaron con agua y se dejaron a 4 °C en metanol al 30%, para que recuperaran su tamaño original.

INMUNOTRANSFERENCIA Y WESTERN BLOT

Después de realizar el SDS-PAGE de los AgSET, las bandas proteicas se transfirieron a PVDF de 0.22 un de poro en una cámara de electroforesis MINI Trans-Blot (Electrophoretic Transfer Cell BIO-RAD®) con un amortiguador de transferencia que

contenia Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20% v/v a un pH 8.3. La transferencia se realizó a voltaje constante de 100 V durante 2 horas. Las membranas fueron previamente tratadas con metanol y equilibradas en amortiguador de transferencia.

Las membranas de PVDF se colocaron en una solución de BSA en PBS-Tween 20 al 1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos. Las membranas bloqueadas se lavaron en PBS-Tween 20 al 0.3%, se secaron y se cortaron en tiras de aproximadamente 5 mm de ancho. Las tiras de membranas se incubaron durante dos horas con el suero problema a la dilución 1:500 en PBS-Tween 20 al 0.3%. Posteriormente, cada membrana se lavó con PBS-Tween 20 (3 X 10 minutos) y un lavado con PBS y se incubaron con policlonal de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (BIOSOURCE®), a una dilución 1:1000 en PBS-Tween 20 al 0.3%. Para la visualización de las bandas, la nitrocelulosa se lavó de nuevo con PBS-Tween20 al 0.3% y se hizo reaccionar con el sustrato (0.035 g de Diaminobenzidina (DAB) y 7 µl de H₂O₂ en 70 ml de PBS 1X) en oscuridad y sin agitación. La reacción se frenó con lavados en agua desionizada y se dejan secar las membranas en oscuridad sobre un cristal.

DISEÑO EXPERIMENTAL

La secuencia de actividades para la realización del presente trabajo se presentan en el diagrama de la figura 9 . Se obtuvieron los AgSET-MX y los AgSET-ES, además de los sueros de pacientes positivos en cada uno de los países participantes. Se obtuvieron los patrones electroforéticos en geles SDS-PAGE de los AgSET-MX y AgSET-ES. Se midieron por ELISA los títulos de anticuerpos y los ID de los sueros mexicanos y españoles utilizando los AgSET-MX y los AgSET-ES. Se determinaron por WB los patrones de reconocimiento antigénico de los AgSET estudiados por los sueros de los pacientes mexicanos y españoles, además se determinó el porcentaje de sueros que reconocieron los antígenos específicos.

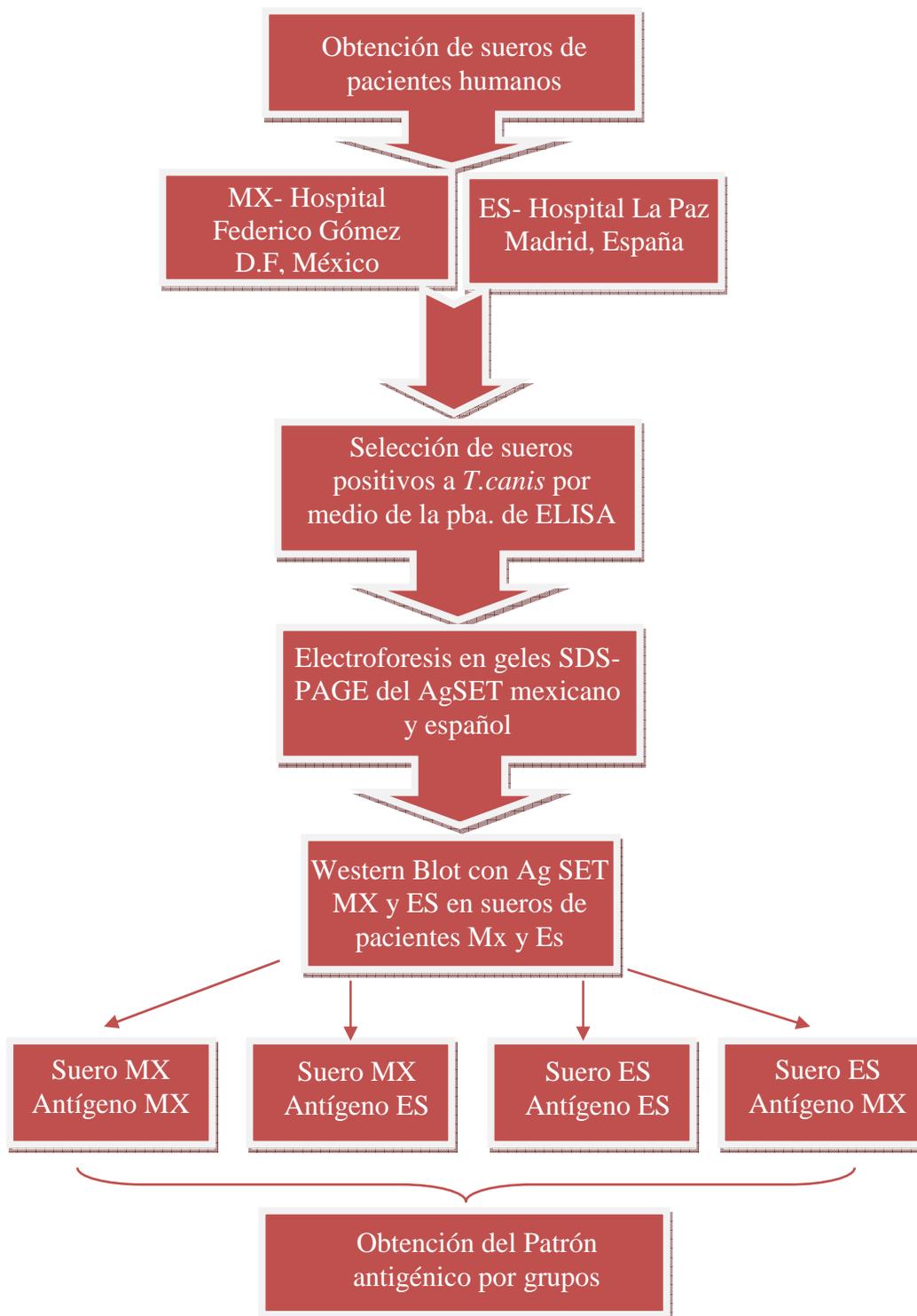


Figura 9. Metodología para la obtención del patrón antigénico de *Toxocara canis* a partir de AgSET-MX y AgSET-ES utilizando sueros de pacientes mexicanos y españoles mediante pruebas de electroforesis y WB.

7. RESULTADOS

En la figura 10 se presentan las bandas proteicas detectadas en geles SDS-PAGE teñidos con nitrato de plata de los AgSET-MX y AgSET-ES. En los AgSET-MX se detectaron 14 bandas con PM de 260, 120, 97, 91, 70, 61, 50, 47, 43, 38, 35, 32, 29 y 27 kDa y en los E/S-SP se detectaron 8 bandas de 97, 70, 47, 43, 35, 32, 29 y 27 kDa.

En la figura 11 se presentan los ID medidos por ELISA de los sueros mexicanos y españoles con los AgSET-MX y AgSET-ES. En ésta se observa que ninguno de los sueros de pacientes mexicanos o españoles mostró ID negativos en la ELISA independientemente del tipo de antígeno utilizado (Figura 11). Tres sueros mexicanos resultaron sospechosos utilizando Ag-TES-ES y 5 usando AgSET-MX. Cuatro sueros españoles fueron sospechosos usando AgSET-MX, mientras que con el AgSET-ES todos resultaron positivos.

La figura 12 muestra los sueros de pacientes mexicanos y españoles que reconocieron un mayor número de bandas antigénicas por medio de WB . Los sueros mexicanos y españoles reconocieron hasta 11 antígenos usando AgSET-MX (217, 120, 73, 66, 51, 43, 41, 38, 36, 31 y 29 kDa). Los sueros mexicanos reconocieron hasta 10 antígenos usando AgSET-ES (217, 120, 73, 51, 43, 41, 38, 36, 31 y 29 kDa) y los sueros españoles usando AgSET-ES reconocieron hasta 6 antígenos (217, 73, 38, 36, 31 y 29 kDa).

El número y tipo de los AgSET-ES y AgSET-MX reconocidos por los sueros españoles (n=14) y mexicanos (n=25) se presentan en el cuadro 4 y 5.

Los pacientes mexicanos reconocieron con mayor frecuencia ($p<0.05$) los AgSET-MX de 73, 66, 43 y 29 kDa que los pacientes españoles (cuadro 6). Los AgSET-ES de 36, 31 y 29 fueron reconocidos con mayor frecuencia ($p<0.05$) por los pacientes españoles que por los pacientes mexicanos (Cuadro7 y Figura 13). Los AgSET-ES de 120, 51, 43 y 41 kDa solo fueron reconocidos por sueros mexicanos. Ningún suero reconoció la presencia de antígenos de 66 kDa en el AgSET-ES.

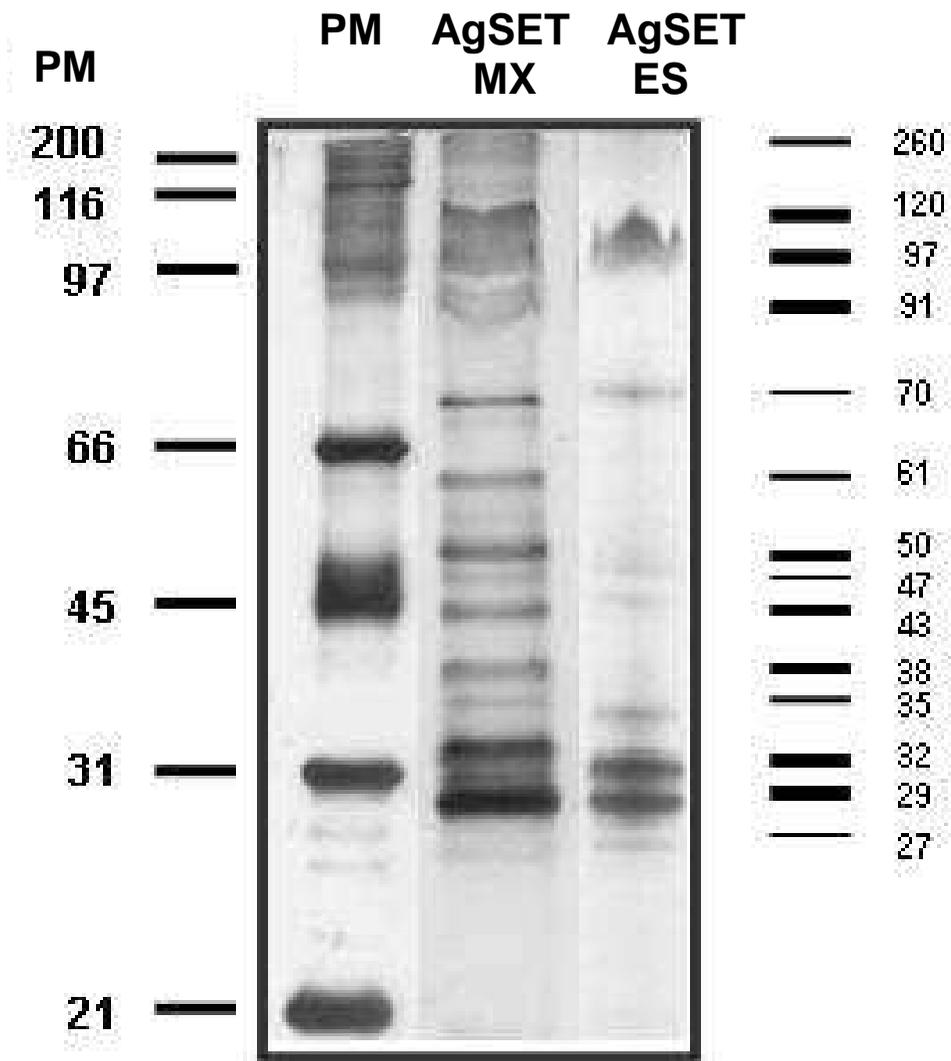


Figura 10. SDS-PAGE de antígenos de excreción-secreción de *Toxocara canis* obtenidos en México (AgSET-MX) y obtenidos en España (AgSET-ES). PM, marcadores de peso molecular

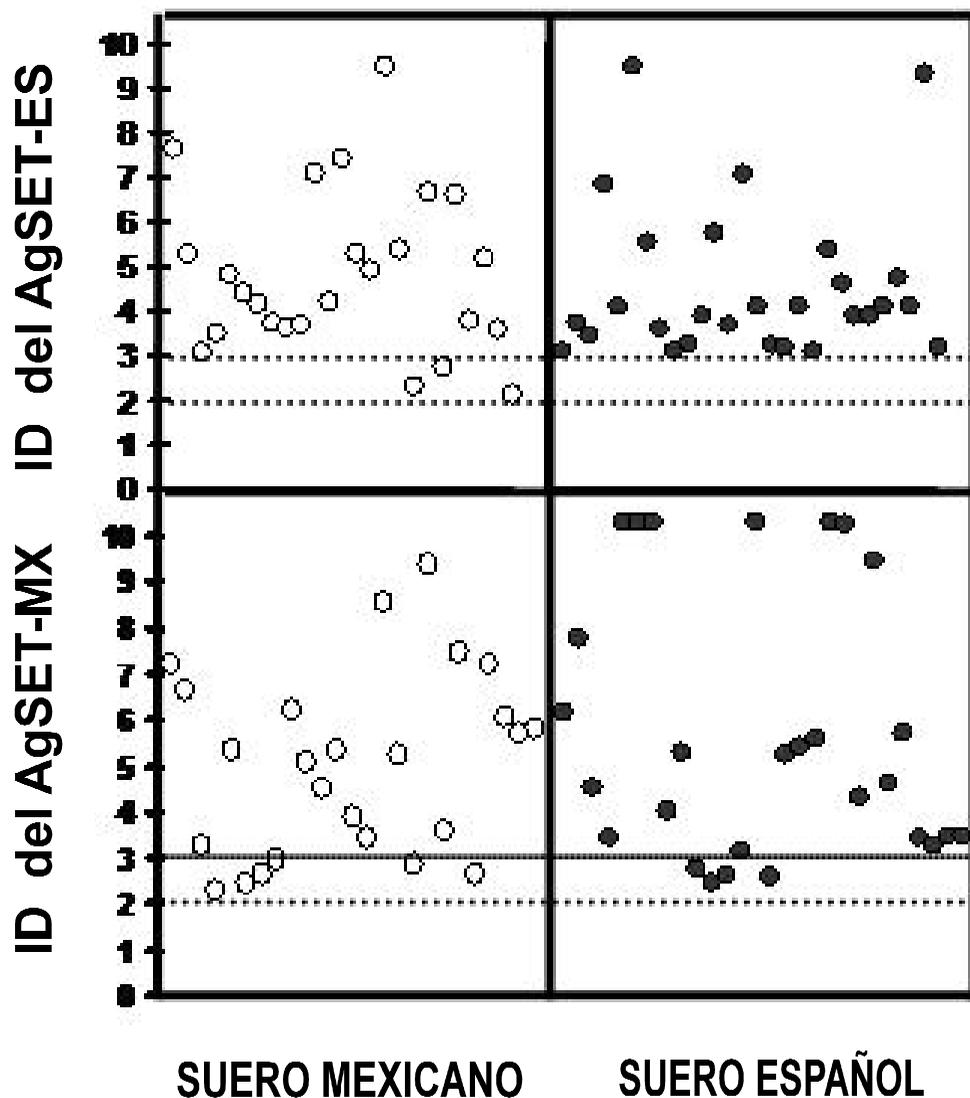


Figura 11. Índice diagnóstico de ELISA de sueros mexicanos y españoles usando antígenos de excreciones y excreciones obtenido en México (AgSET-MX) y en España (AgSET-ES). La línea continua muestra el valor de corte para muestras positivas, líneas discontinuas muestran valores de corte para sospechosos.

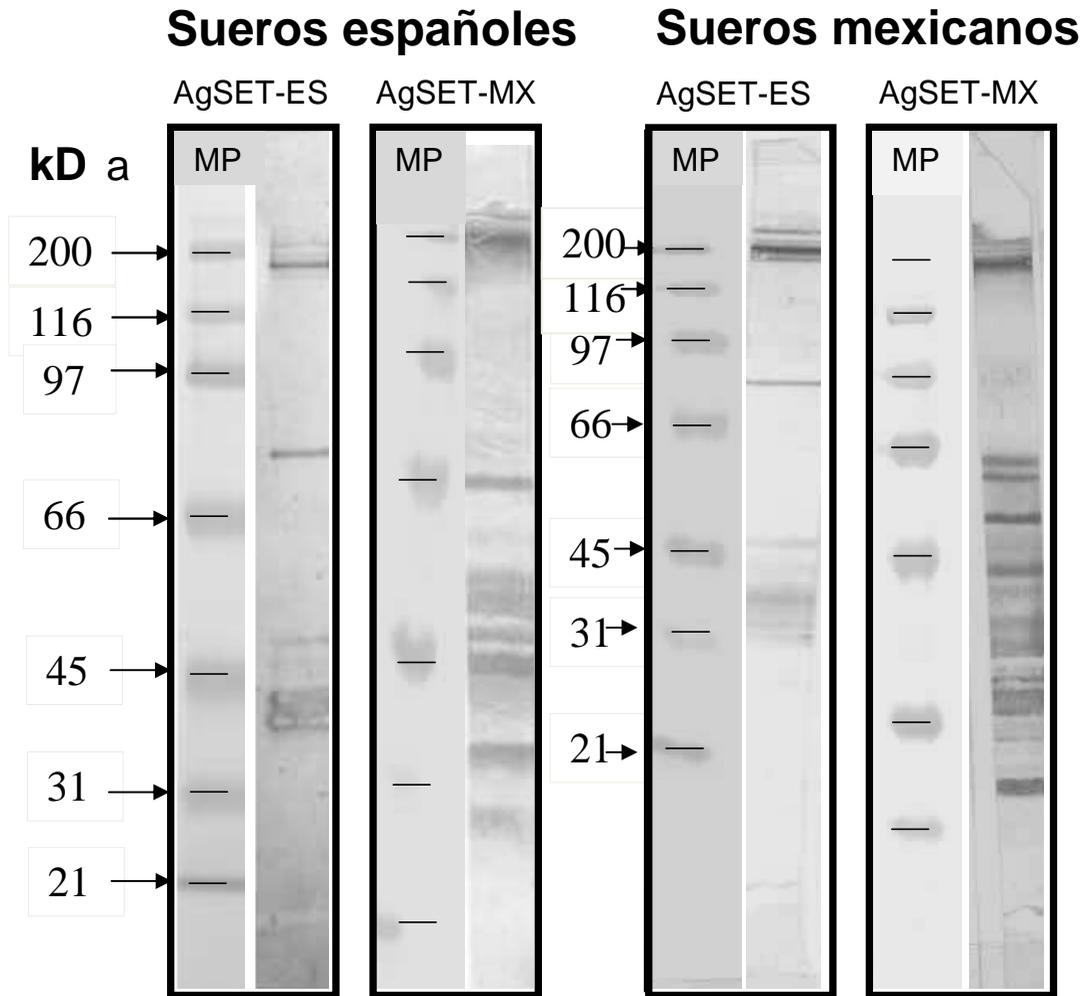


Figura 12. Patrones de antígenos de excreción-secreción de *Toxocara canis* obtenidos en México (AgSET-MX) y obtenidos en España (AgSET-ES) reconocidos por sueros de pacientes españoles y pacientes mexicanos mediante Western Blot. Las líneas muestran los marcadores de peso molecular (MP) correspondientes a cada corrimiento.

Cuadro 4. Bandas reconocidas por sueros de pacientes mexicanos de los antígenos se excreciones y secreciones de larvas de *Toxocara canis* obtenidas en México (AgSET-MX) y España (AgSET-ES), mediante Western Blot.

PACIENTES MEXICANOS	Ag SET-MX	No. Bandas	AgSET-ES	No. Bandas
1	217,120,73,66,51,43,41,38,36,31,29	11	217,120,41,38	4
2	217,120,73,66,51,43,41,38,36,31,29	11	217,120,73,51,38	5
3	217,73,66,51,43,41,38,36,31,29	9	217,120,73,38,36	5
4	217,73,66,51,43,41,38,36,31,29	9	120,73,38	3
5	217,73,66,51,43,41,38,36,31,29	9	217,120,73,51,43,38,31,29	8
6	217,73,66,51,43,38,31,29	8	217,120,73	3
7	217,73,66,51,43,31,29	7	217,120,73,38,29	5
8	217,73,66,51,43,38,36,31,29	9	217,120,73,51,38,36,31,29	8
9	217,73,66,51,43,41,38,31,29	9	73,51,38,29	4
10	217,73,66,43,38,36,31	7	120,73,38,29	4
11	120,73,66,51,43,29	6	217,120,73,38,29	5
12	217,120,73,66,51,43,29	7	217,120,73,38,29	5
13	217,120,73,66,51,43,36,29	8	217,120,73,51,43,38,29	7
14	217,120,73,66,51,43,41,38,36,29	10	217,120,73,43,41,38	6
15	217,120,73,66,51,43,29	7	217,120,73,66,38,29	6
16	217,120,73,66,51,43,41,38,36,31,29	11	217,120,73,51,43,38,31,29	8
17	217,120,73,66,51,43,41,38,36,31,29	11	217,120,73,51,38,29	6
18	217,120,73,66,51,43,31,29	8	38,36,31,29	4
19	217,120,73,66,51,43,41,38,36,31,29	11	217,120,73,51,43,41,38,36,31,29	10
20	217,120,43,29	4	120	1
21	217,120,73,66,51,43,36,31,29	9	217,120,73,51,43,41,38,36,31,29	10
22	217,120,73,66,51,43,36,31,29	9	217,120,73,51,43,41,38,36,31,29	10
23	217,120,73,66,51,43,36,31,29	9	217,120,73,41,38,36,31,29	8
24	217,120,73,66,51,43,31,29	8	120,73,41,38,36,31,29	7
25	217,120,73,66,51,43,41,38,36	9	217,120,73,51,43,41,38,36,31,29	10

Cuadro 5. Bandas reconocidas por sueros de pacientes españoles de los antígenos se excreciones y secreciones de larvas de *Toxocara canis* obtenidas en México (AgSET-MX) y España (AgSET-ES), mediante Western Blot.

PACIENES ESPAÑOLES	AgSET-MX	No. Bandas	AgSET-ES	No. Bandas
17	217,120,51,41,38,36,31	7	217,73,38,36,31,29	6
24	217,120,66,51,41,36,31	7	217,73,38,36,31,29	6
40	217,120,51,43,41,38,36,29	8	217,31,29	3
76	217,120,66,51,38,36	6	217,73,38,36,31,29	6
78	217,120	2	217,73,38,36,31,29	6
80	217,120,73,66,51,41,38,36,31	9	217,73,38,36,31,29	6
102	217,120,66,51,43,41,38,36,31,29	10	217,73,38,36,31,29	6
103	120	1	217,73,38,36,31,29	6
111	217,120	2	217,73,38,36,31,29	6
152	217,120	2	217,73,38,36,31,29	6
159	217,120,51,41,38,36	6	217,73,38,36,31,29	6
169	217,66,51,41,38,36,31	7	217,73,38,36,31,29	6
175	120	1	217,73,38,36,31,29	6
189	217,120,51,41,38,36,31	7	217,73,38,36,31,29	6

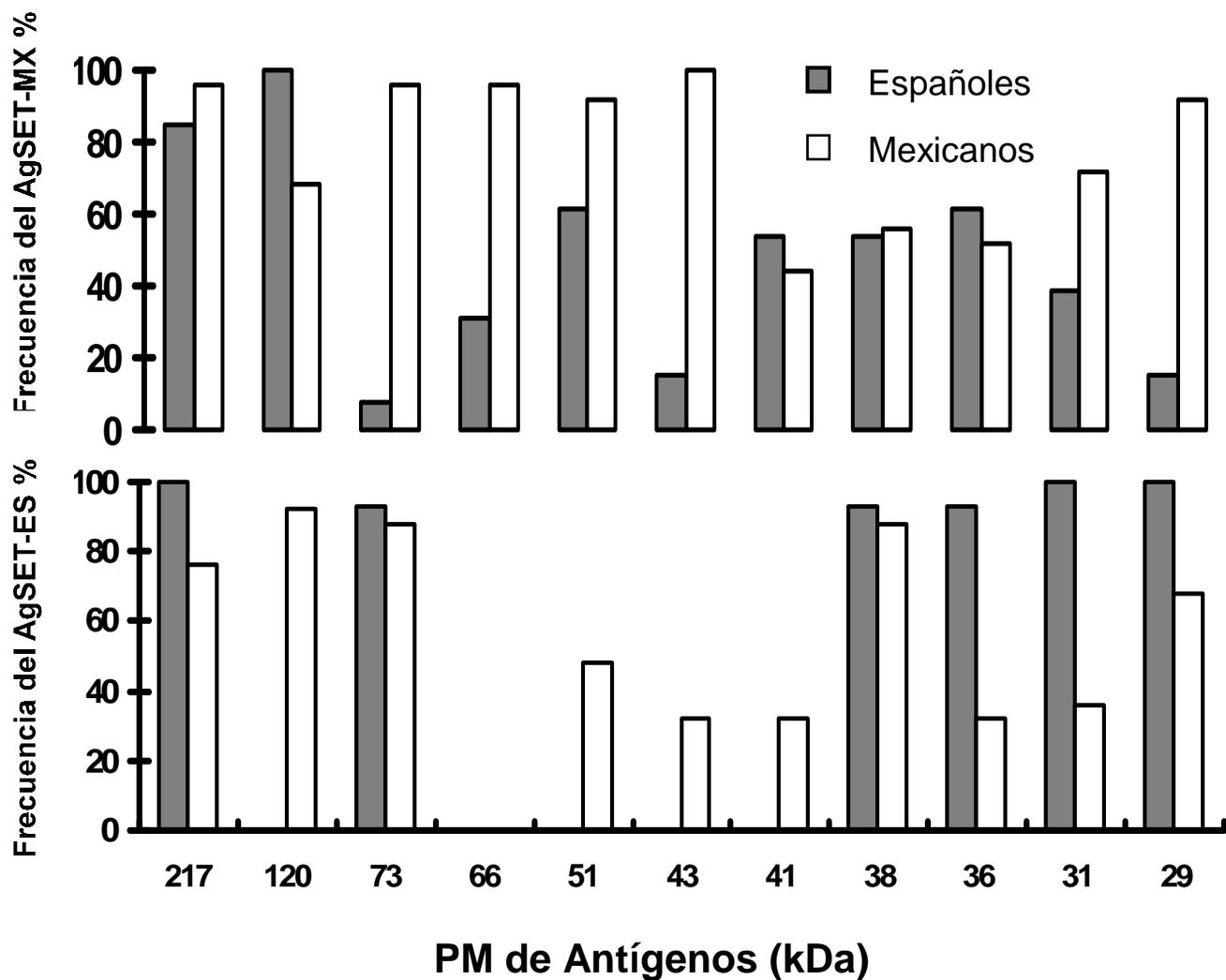


Figura 13. Frecuencias de reconocimiento de los diferentes antígenos de excreción-secreción de *Toxocara canis* obtenidos en México (AgSET-MX) y obtenidos en España (AgSET-ES) por pacientes españoles y mexicanos. kDa: kilodalton.

Cuadro 6. Comparación por la prueba exacta de Fisher del porcentaje de sueros de pacientes mexicanos y españoles que reconocen los de antígenos de secreción excreción de larvas de *Toxocara canis* obtenido a partir de gusanos mexicanos.

PESO MOLECULAR DEL ANTÍGENO kDa	SUERO MEXICANO	SUERO ESPAÑOL	P
217	0.96	0.8571	0.288
120	0.68	0.9286	0.1189
73	0.96	0.0714	0.00001
66	0.96	0.3571	0.00001
51	0.92	0.6429	0.0754
43	1	0.1429	0.00001
41	0.44	0.5714	0.5145
38	0.56	0.5714	1
36	0.52	0.6429	0.5178
31	0.72	0.4286	0.0953
29	0.92	0.1429	0.00001

Cuadro 7. Comparación por la prueba exacta de Fisher del porcentaje de sueros de pacientes mexicanos y españoles que reconocen los de antígenos de secreción excreción de larvas de *Toxocara canis* obtenido a partir de gusanos obtenidos en España.

PESO MOLECULAR DEL ANTÍGENO kDa	SUERO MEXICANO	SUERO ESPAÑOL	P
217	0.76	1	0.07
120	0.92	0	1E-05
73	0.88	0.928	1
66	0	0	1
51	0.48	0	0.003
43	0.32	0	0.034
41	0.32	0	0.034
38	0.88	0.928	1
36	0.32	0.928	0.0003
31	0.36	1	0.0001
29	0.52	1	0.003

8. DISCUSION:

La toxocariasis es una parasitosis muy común en los canideos y en los humanos es considerada como una parasitosis accidental. Tiene una distribución mundial con mayor incidencia en zonas marginales y en lugares con clima cálido. Sin embargo, al igual se han encontrado diferencias en cuanto a la distribución geográfica de esta enfermedad, observando una mayor incidencia en países en vías de desarrollo que en países del primer mundo (Holland *et al.*, 1995; Lynch *et al.*, 1993). En los humanos se han reportado varias presentaciones, entre ellas: los síndromes de LMV y LMO, además de la toxocariosis neurológica y la encubierta (Bass *et al.*, 1987). Se han desarrollado distintas herramientas para el diagnóstico de esta enfermedad, entre las que se encuentra el diagnóstico serológico el cual se basa en la caracterización de los AgSET. Aunque se han observado diferencias en cuanto al reconocimiento antigénico de los AgSET en diferentes países no se ha demostrado si éstas se deben en parte a la forma como se desarrollan las técnicas o a características propias de los parásitos en diferentes países. Lo anterior nos llevó a buscar diferencias entre los antígenos obtenidos por parásitos de dos diferentes países y cuáles antígenos fueron reconocidos por los sueros de pacientes procedentes de estos países.

Los patrones de bandas producidas por los dos AgSET analizados en geles SDS-PAGE teñidos con nitrato de plata fueron diferentes. Se detectaron 15 bandas en los AgSET-MX (260,120,97,91,88,70,61,50,47,43,38,35,32,29,27 kDa), mientras que en el AgSET-ES se detectaron 8 bandas (97,70,47,43,35,32,29,27). Debido a que la metodología electroforética se realizó bajo las mismas condiciones, se puede concluir que los componentes de los AgSET fueron diferentes entre sí. La razón de esta diferencia no es clara, pero probablemente sea debida a dos posibles factores: a) a la presencia de diferencias genotípicas entre los gusanos mexicanos y españoles dados por la diferencia del origen y b) a que las larvas se cultivaron en medios de cultivo diferentes, esto es las L2 en el laboratorio mexicano se incubaron en RPMI suplementado con glucosa y las L2 obtenidas en el laboratorio español en medio mínimo esencial de Eagle.

Las diferencias en el número de bandas no solo ocurrió entre los AgSET utilizados en este trabajo, ya que estas han sido también observadas por otros autores; Badley *et al.*,

(1987) encontró un total de 15 bandas (94, 88, 82, 80, 78, 76, 71, 66, 57, 53, 45, 42, 34, 32 y 29); por su parte Muñoz (2002) encontró 7 bandas (219,106,74,51,35,32,30), Magnaval *et al.*, (1991) encontraron siete bandas (200,147,132,35,30,28,24) y Maizels *et al.*, (1987) encontraron 5 bandas glicoproteicas (400,120,70,55,32). Como se menciona, algunas de estas diferencias podrían deberse a diferencias intrínsecas de las larvas de las cuales se obtuvieron los AgSET. Otras posiblemente son el resultado de las metodologías utilizadas para su detección. Por ejemplo, varios autores han reportado una banda de 400 kDa (en este trabajo no se detectó) que es una banda formada por una pequeña cadena peptídica y una gran cantidad de carbohidratos (Maizels *et al.*, 1984). Esta banda no se tiñe con nitrato de plata, la forma en la que se ha detectado la abundancia de esta banda es marcando con Iodo¹²⁵ las proteínas de superficie de larvas en cultivo y después buscando estas proteínas en los AgSET (Maizels *et al.*, 1984) o tiñendo los geles con una tinción de ácido periódico de Schiiff (PAS) que es específica para carbohidratos (Meghji & Maizels, 1986).

Para el diagnóstico de la toxocariosis tanto en modelos experimentales como en humanos se ha utilizado varias técnicas inmunológicas como doble difusión radial (Cypes *et al.*, 1977), intradermoreacciones (Collins & Ivey, 1975), precipitación en tubo capilar (Dafalla, 1975), inmunofluorescencia (Smith *et al.*, 1982), contrainmunolectroforesis (Enayat & Pezeshki, 1977) y hemaglutinación (Krupp, 1975). En la actualidad las dos técnicas inmunológicas que se han demostrado que tienen una mayor sensibilidad y especificidad son ELISA y WB (DeSavigny *et al.*, 1979; Magnaval *et al.*, 1991; Fenoy *et al.*, 1992). Por lo anterior, estas son las técnicas que se utilizaron en este trabajo. Para dar la positividad o negatividad en pruebas de ELISA se utilizó el I.D en vez de la absorbancia específica ya que este índice es mucho más específico por que nos da una relación entre la D.O del suero problema y la del suero control negativo. Este I.D ha sido utilizado exitosamente por otros autores tales como Fenoy *et al* (1992).

Las pruebas de ELISA para detectar anticuerpos específicos anti *Toxocara canis* en los sueros de pacientes mexicanos y españoles se realizó en el mismo lugar y bajo las mismas variables metodológicas. Los sueros anteriormente se habían analizado por ELISA en cada país y todos eran positivos con la técnica que en cada país se realiza. Ninguno de los sueros mexicanos o españoles tuvieron ID negativo a ninguno de los antígenos utilizados en este trabajo. Sin embargo, 3 sueros mexicanos resultaron sospechosos

utilizando AgSET-ES y 5 utilizando el AgSET-MX, cuatro sueros españoles fueron sospechosos usando el AgSET-MX y ninguno con el AgSET-ES. Lo anterior lleva a considerar que aunque los antígenos obtenidos en México y en España tiene diferentes patrones electroforéticos, estos tuvieron un efecto adverso limitado para el diagnóstico por pruebas de ELISA.

Los patrones de reconocimiento antigénico de los AgSET por los sueros utilizados vario de acuerdo al origen del suero y al tipo de antígeno. Los sueros mexicanos y españoles reconocieron un mayor número de antígenos en los AgSET-MX que en los AgSET-ES. Con esto se demuestra que los AgSET-MX son una mezcla mucho más compleja de proteínas que los AgSET-ES lo cual ya se había observado previamente en los geles SDS-PAGE teñidos con nitrato de plata. Las razones probablemente son las mismas, ya que el medio RPMI-1640 utilizado para cultivo de las larvas mexicanas es más rico en nutrientes que el medio mínimo esencial de Eagle usado en el cultivo de larvas en España. Así mismo las L2 mexicanas provenían de gusanos obtenidos de diversos cachorros con infección natural, lo cual puede originar una gran diversidad genética en las larvas obtenidas. En contraste, las larvas de origen español provinieron de una cepa de *Toxocara canis* mantenida por varios años en condiciones de laboratorio donde se infectaba una sola perra Beagle, lo cual provoca que la diversidad genética de las larvas sea muy reducida, y por lo tanto, los antígenos producidos sean menos variantes y/o abundantes. Otra factor que puede participar en el número de antígenos reconocidos es el tiempo transcurrido de la infección inicial. En este sentido no existen reportes de la secuencia de reconocimiento antigénico en humanos en estudios longitudinales de infección por *T.canis*, pero en modelos experimentales como gerbos se ha demostrado que el número de antígenos reconocidos por WB varia de acuerdo al tiempo de infección. Así, los sueros de los gerbos 20 días después de la infección reconocen un solo antígeno de 32 kDa a los 130 días p.i. reconocen otros 8 antígenos diferentes (Alba-Hurtado *et al.*, 2009).

El porcentaje de reconocimiento de algunos antígenos no presentó diferencias entre sueros de pacientes mexicanos y españoles. Entre éstos se encuentran los AgSET-MX de 217, 120, 51 41, 38, 36 y 31 kDa de peso molecular, además de los AgSET-ES de 217, 73 y 38 kDa. Lo anterior muestran un grado de similitud que hay entre los dos AgSET y que fue la razón por la que se podían usar indistintamente para las pruebas de ELISA. Sin embargo,

el reconocimiento de otros antígenos fue diferente según el tipo de suero. Patrones de reconocimiento antigénico similares a los observados en este trabajo han sido reportados en México (Muñoz, 2002) y España (Fenoy *et al.*, 2001). Lo anterior parece confirmar que hay patrones característicos de reconocimiento relacionados a los pacientes de cada país.

El antígeno de 66 kDa de los AgSET-MX fue reconocido por el 96% de los sueros mexicanos y por el 35% de los sueros españoles, pero ninguno reconoció un antígeno de este peso molecular en los AgSET-ES. Lo anterior muestra que dicho antígeno no está presente en los AgSET-ES, pero que algunos pacientes españoles ya han entrado en contacto con éste, ya sea por reacción cruzada con otro parásito o porque las cepas de campo en España si secretan dicho antígeno cuando están dentro de un hospedador. Otros autores como Muñoz (1997) han detectado un antígeno del mismo peso molecular utilizando sueros y AgSET mexicanos.

El antígeno de 120 kDa de los AgSET-MX fue reconocido por el 100% de los sueros españoles y 68% de los sueros mexicanos, sin embargo solamente los sueros mexicanos (92%) reconocieron un antígeno de 120 kDa en los AgSET-ES. Un efecto parecido se presentó en los antígenos de 51, 43 y 41 kDa, que no fueron reconocidos por los sueros españoles en los AgSET-ES pero sí por algunos sueros mexicanos. Una explicación posible a este hecho sería la presencia de reacciones cruzadas con otros parásitos (Chia-kwungfan *et al.*, 2004).

Este trabajo demostró que los AgSET de México y España presentan diferencias en sus componentes. Futuros trabajos donde las larvas sean cultivadas en los mismos medios de cultivo y estudios de secuenciación del DNA de los gusanos mexicanos y españoles, permitirán determinar si las diferencias encontradas son producto de diferencia del genoma de los parásitos o simplemente el resultado de haber sido cultivadas en diferentes medios y con ello de una alimentación diferente. En este contexto hay que considerar que las L2 obtenidas en el laboratorio español provenían de una cepa mantenida en el laboratorio por varios años sin intercambio genético con otros individuos y pudiera ser que los AgSET producidos no fuesen así representativos de la diversidad fenotípica de las larvas de *T. canis* presentes en canidos de España.

10. CONCLUSIONES

- El patrón electroforético en geles SDS-PAGE fue diferente para los AgSET estudiados. Los AgSET-MX mostraron 15 bandas (260, 120, 97, 91, 88, 70, 61, 50, 47, 43, 38, 35, 32, 29 y 27 kDa) y en los AgSET-ES 8 bandas (97, 70, 47, 43, 35, 32, 29 y 27 kDa).
- Todos los sueros de pacientes mexicanos y españoles fueron positivos a la prueba de ELISA independientemente del antígeno utilizado, con la excepción de 3 sueros mexicanos que fueron sospechosos usando el AgSET-ES y 5 usando el AgSET-MX, además de 4 sueros españoles usando AgSET-MX.
- Los sueros mexicanos reconocieron por WB hasta 11 antígenos en el AgSET-MX (217, 120, 73, 66, 51, 41, 43, 38, 36, 31 y 29 kDa) y en AgSET-ES hasta 10 antígenos (217, 120, 73, 66, 51, 41, 43, 38, 36, 31 y 29 kDa).
- Los sueros españoles reconocieron por WB hasta 11 antígenos en el AgSET-MX (217, 120, 73, 66, 51, 41, 43, 38, 36, 31 y 29 kDa) y en AgSET-ES hasta 6 antígenos (217, 73, 38, 36, 31 y 29 kDa).
- Los sueros de los pacientes mexicanos reconocieron con mayor frecuencia los AgSET-MX de 73, 66, 43 y 29 kDa que los pacientes españoles.
- Los sueros de los pacientes españoles reconocieron con mayor frecuencia los AgSET-ES de 36, 31 y 29 kDa que los pacientes mexicanos.
- Únicamente sueros de pacientes mexicanos reconocieron AgSET-ES de 120, 51, 43 y 41 kDa., pero el antígeno de 66 kDa solo está presente en AgSET-MX y no en el AgSET-ES.

Las diferencias en los patrones en electroforéticos y de WB entre los Ag-SET estudiados no afectaron la sensibilidad de la prueba diagnóstica de ELISA y el propio WB.

11. BIBLIOGRAFÍA:

1. Acha P. (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización panamericana de la salud. 3ª. Ed. Chile.
2. Alba H.F., Tortora P.J., Tsutsumi V. & Ortega-Pierres M.G. (2000). Histopathological investigation of experimental ocular Toxocariasis in gerbils. *Int. J. for Parasitol.*, 30:143-147.
3. Alba H.F. (2006) Manual de Laboratorio de Parasitología Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.
4. Alba H.F., Muñoz G., Valdivia A., Tórtora J.L., & Ortega P.M.(2009). *Toxocara canis*: Larval migration dynamics, detection of antibody reactivity to larval excretory-secretory antigens and clinical findings during experimental infection of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp. Parasitol.* 122:1-5
5. Angulo R., Aguila C. & Guillen J.L. (1985). Contaminación de suelos de parques públicos por *Toxocara canis*. *Rev. Iber. Parasitol.* Vol. Extraordinario. 165-171
6. Arandas R.A. (1980). Contamination of the soil in parks and gardens of Lisboa by eggs of *Toxocara canis* and other helminthes. *Ann. Esc. Sup. Med. Vet.* 22:152-162
7. Ardiles A, Chanqueo L, Reyes V, Araya L. (2001). Toxocariasis in an adult manifested as hypereosinophilic síndrome with predominant neurological involvement. Clinical case. *Rev Med Chile.*, 129: 780-5
8. Badley J. L., Grieve R.B., Bowman D.D., Glickman L.T & Rockey J.H. (1987). Análisis of *Toxocara canis* Larval excretory-secretory antigens: Phisicochemical characterization and antibody recognition. *J. Parasitol.*, 73: 593-600.

9. Bardón I. M. (1992). Contribución a la biología e inmunología de *Toxocara canis*. Tesis de doctorado. Madrid, España: Universidad complutense. Facultad de Farmacia. Departamento de parasitología.
10. Bass J L, Mehta KA, Glickman LT & Eppes BM. (1983). Clinically inapparent *Toxocara* infection in children. N. Engl. J. Med; 308:723-4.
11. Bass JL, Mehta KA, Glickman LT, Blocker R & Eppes BM. (1987). Asymptomatic toxocariasis in children. Aprospective study and treatment trial. Clin. Pediatric Philadelphia;26-9:441-447.
12. Beaver P.C., Jung, R.C & Cupp, E.W. (1986). Parasitología clínica. 2ª Ed. Salvat.
13. Beaver P.C. Snyder H., Carrera M., Dent H. & Lafferty W. (1952). Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. Pediatrics; 9: 7-18
14. Bistner S, Ford R y Raffe M. (2002). Manual de terapéutica y procedimientos de urgencia en pequeñas especies. 7ª. Ed. Mc Graw- Hill Interamericana. México.
15. Bradford, M.M.A. (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem.72. 248-254
16. Bio-Rad:MiniPROTEAN III Electrophoretic Transfer Cell Instruction Manual
17. Bio-Rad Trans Blot SD Electrophoretic Transfer Cell (1996).Instruction Manual Cat. 170-3940
18. Bowman D.D., Grieve M.M., & Grieve R.B. (1987). Circulating Excretory-Secretory Antigen levels and especific Antibody Responces in Mice infected with *Toxocara canis*. Am. J. Trop.Med. Hyg., 36: 75-82
19. Brown H. (1986). Parasitología clínica. Interamericana. México
20. Buijs J.,Lokhorst W., Robinson J., & Nijkamp F. (1994). *Toxocara canis*-induced murine pulmonary inflammation: analysis of cell and protein in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. Parasit. Immunol. 16:1-19
21. Chieffi P. & Muller E. (1976). Prevalencia de parasitismo por *Toxocara canis* em case e presence de ovos de *Toxocara spp.* no solo de localidades públicas de zonas

- urbanas do municipio de Londrina, Estado de Paraná, Brasil. Rev. Saúde. Publ. S. Paolo. 10:367:372
22. Chieffi P. & Muller E. (1978). Estudio da variacao mensal na contaminacao do solo por ovos de *Toxocara sp.* (Nematodo, Ascaroidea), na zona urbana do municipio de Londrina, Estado de Paraná, Brasil. Rev. Iber. Adolfo Lutz. 38(1): 13-16
 23. Collins, R.F. & Ivey M.H. (1975). Specific and sensitivity of skin test reactions to extracts of *Toxocara canis* and *Ascaris suum*. Skin test done of infected guinea pigs. Am. J. Trop. Med. Hyg., 24(3):455-459
 24. Cordero del C.M, Rojo F; Martínez A, Sánchez C, Hernández S, Navarrete I, Diez P, Quiroz H y Carballo M. (1999). Parasitología Veterinaria. Mc Graw- Hill Interamericana. España.
 25. Cuellar C., Fenoy S., Aguila C. & Guillen J.L. (1990). Evaluation of chemotherapy in experimental toxocariosis by determination of specific immune complexes. J. Helminthol. 64(4): 279-89
 26. Cuellar C., Fenoy S., & Guillen J.L. (1995). Cross reaction of sera from *Toxocara canis* infected mice with *Toxascaris leonine* and *Ascaris suum* antigens. Int. J. for Parasitol. 22: 301-307.
 27. Cypess R.H., Karol M.H., Zidian J.L., Glickman L.T. & Gitlin D. (1977). Larva specific antibodies in patients with visceral larva migrans. J. Infect. Dis., 135 (4): 633-640.
 28. Dada B. J. & Lindsquist W. (1979). Studies on flotation techniques for the recovery of helmintho eggs from soil and the prevalence of eggs of *Toxocara spp.* In some Kansas public places. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 174(11): 1208-1210
 29. Dafalla A. A. (1975). The serodiagnosis of human toxocariasis by the capillary tube precipitin test. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg., 69 (1): 146-147
 30. Davidyants V. & Chobanyan A. (1981). Some aspects of the epizootiology and epidemiology of toxocariosis. Med. Parasitol. Trop. Med.: 83-84
 31. DeSavigny D.H. (1975) In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic test for visceral larva migrans. J. Parasitol. 61: 781-782.

32. De Savigny D.H., Voller A. & Woodruff, A.W. (1979). Toxocariasis serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J. Clin. Pathol.* 32(3): 284-288.
33. Despommier D. (2003). Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. *Clin. Microbiol Rev.* 16(2): 265-272
34. Dodge J.S. (1980). *Toxocara canis*: The risk of infection. *New Zealand Med. J.* 651:24-26
35. Duwell, D. (1983). Toxocariosis in humans and veterinary medicine and how to prevent it. *Helminthologia.* 20:277-286
36. Eguia-Aguilar. (1998). Análisis ecológico de comunidades de helmintos intestinales de perros obtenidos en centros de control canino del DF., México. Memorias del XIII Congreso Nacional de Parasitología. Zacatecas, Zac.
37. Enayat M.S. & Pezeshki M. (1977). The comparison of counterimmuno-electrophoresis with indirect haemagglutination test for detection of antibodies in experimentally infected guinea pigs with *Toxocara canis*. *J. Helminthol.*, 51 (2): 143-148.
38. Fashuyi S.A. (1981)., Diagnostic of gastro-intestinal helminths of dogs in Lagos area using the Kato-Katz technique. *Bull. Ann. Health. Prod. Afr.* 29(4):333-335
39. Feldman G.J. & Parker H.W. (1992). Visceral larva migrans associated with the hypereosinophilic syndrome and the onset of severe asthma. *Ann Intern Med*; 116:838-40.
40. Fenoy, S., Cuellar C., Aguila C & Guillén L. (1992). Persistence of immune response in human toxocariasis as measured by ELISA. *Int. J. For Parasitol.*; 22:1037-1038.
41. Fenoy, S., Ollero M., Guillén J., & Aguila C. (2001) Animal models in ocular toxocariasis. *Helminthol.* 75: 119-124.
42. Fernández P., Martínez B., Gutiérrez Q. & Vázquez T.O. Serología para detección de helmintos extra intestinales en niños con alteraciones neurológicas. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 46(4): 217-221
43. Genchi C., Di Sacco B., Gatti S., Sangalli G & Scaglia M. (1990). Epidemiology of human toxocariasis in northern Italy. *Parasitologia.* 32: 313-319

44. Ghadirian, E., Viens P., Stroykowski H. & Dubrevil F. (1976). Epidemiología de la toxocariosis en el área de Montreal. Prevalencia de *Toxocara* y otros helmintos en perros y tierra. Can. J. Publi. Healt. 67(6):495-498
45. Girdwood R., Smith H.V., Bruce R. & Quinn R. (1978). Human *Toxocara* infection in west of Scotland. Lancet. 17:1318
46. Glickman L.T., Magnaval F., Domanski L., Shofer F., Lauria S., Gottstein B. & Brochier B. (1987). Visceral larva migrans in french adults: A new disease syndrome. Am. J. Epidemiol.; 125:1019-1034.
47. Glickman L. T., Cypess R. H., Crumrine P. K. & Gitlin D. D. (1979). *Toxocara* infection and epilepsy in children. J.Pediatr.; 94: 75-78.
48. Guillen J., Cuellar C. y Aguila C. (1986). Fotodependencia del desarrollo embrionario de *Toxocara canis*. Rev. Iber. Parasito. 46:67-74
49. Gunaseelan L., Ramadass P. & Raghavan R. (1986). Serological diagnosis of *Toxocara canis* infection in children. Indian. Vet. J. 63:828-832
50. Gutiérrez Q.M., Martínez B.I., Alonso G.T. & Fernández P.A.(2000). Reactividad serológica a cinco antígenos de parásitos en adolescentes escolares. Rev. Mex. Patol. Clin. 47(1): 32-37
51. Habluetzel A, Traldi G., Ruggier S., Attili A., Scuppa P., Marchetti R. & Esposito F. (2003). An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs enviromental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. Vet. Parasitol. Vol. 77: 190-206.
52. Hermann N., Glickman L.T. & Schantz P.M. (1985). Seroprevalence of zoonotic toxocariasis in the United States. Am. J. Epidemiol. 122:890-896.
53. Holland C., O'Lorcain P, Taylor M. & Nelly A. (1995). Sero-epidemiology of Toxocariasis in scholl children. Parasitol. Res.; 110: 535-545.
54. Josephs D.S., Bhinder P & Thompson A.R. (1981). The prevalence of *Toxocara* infection a child population. Public Health. 95: 273-275
55. Khalil H.N. (1977). Toxocariasis in Egypt. J. Egypt. Pub. Health. Ass. 52(5):330-343
56. Krupp I.M. (1956). Amebic invasión of the liver of guinea pigs infected with the larvae of a nematode *Toxocara canis*. Exp. Parasitol. 5(5):421-6

57. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685
58. Lamina J. (1986). Toxocariasis: an important zoonosis in Germany. *Tierarztl Umschau*. 41:872-878
59. Lee J.I., Lee C.G. & Kim O.N. (1982). Demonstration of helminthes eggs and larvae in the soil of public place in the Kwangju area, Korea. *Korean J. Vet. Res.* 22(2):253-258
60. Levine D. (1990). *Tratado de Parasitología Veterinaria*. Acribia. España..
61. Levine D, Hagel I & Vargas V. (1993). Comparable seropositivity for ascariasis ant toxocariasis in tropical slum children . *Parasitol. Res.* 40: 547-550.
62. Ljungstrom I. & Van Knapen F. (1989). An epidemiological and serological study of *Toxocara canis* infection in Sweden. *Scan. J. Infect. Dis.* 21(1): 87-93
63. Lynch N. R., Eddy K., Hodgen A.N., López R.I. & Turner K.J. (1988). Seroprevalence of *Toxocara canis* infection in tropical Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med, Hyg.* 82:275-281
64. Lynch N. R., Hagel I., Vargas V., Rotundo A., Varela M. and Di Prisco M. (1993). Comparable seropositivity for ascariasis and toxocariasis in tropical slum children. *Parasitol. Res.* 10:547-550
65. Magnaval J., Glickman L., Dorchie P. & Morassin B. (2001). Highlights of human toxocariasis. *Kor. J. Parasitol.* 39(1):1-11
66. Magnaval J., Fabre R., Maurieres P., Charlet J., & Larrad B. (1991). Application of the Western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol. Res.* 77: 697-702.
67. Magnaval J., Michault A., Calon N. & Charlet J. (1994). Epidemiology of human toxocariasis in La Reunión. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88: 531-533
68. Maizels R.M., Kennedy M.W., Meghji M. Robertson B.D.& Smith H.V. (1987). Shared carbohydrate epitopes on distinct Surface and secreted antigens of the Parasitic Nematode *Toxocara canis*. *J. Inmunol.*139:207-214
69. Maizels R.M., Savigny D. & Ogilvie B.M. (1984). Characterization of Surface and Excretory-Secretory Antigens of *Toxocara canis* Infective Larvae. *Parasitol. Inmunol.*6:23-34

70. Maizels R.M., Tetteh K. & Loukas A. (2000). *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *Parasitol.* 30: 495-508.
71. Margini M.(1996). *Inmunología e inmunoquímica fundamentos*. Ed. Panamericana.
72. Martínez B.I., Fernández P., Vázquez T.O. & Gutierrez C. M. (1998). Frecuencia de helmintos en perros del Distrito Federal. *Memorias del XIII Congreso Nacional de Parasitología, Zacatecas*.
73. Martínez B.I., Gutiérrez Q.M., Fernández P.A., Pérez L.M., Vázquez, T.O. & García Y.(1997). Reactividad serológica a un antígeno de *Toxocara canis* en una población escolar. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 44(2): 85-89
74. Marron J. & Schroeder R. (1987). Survey of *Toxocara canis* infection rate in impounded dog in Los Angeles country. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 172(6):713
75. Matsumura K. & Endo R. Investigation of antibodies against *Toxocara canis* in naturally infected puppies. *Bak, Hyg. I. Abt. Orig.* 253: 139-143
76. Meghi M. & Maizels R. (1986). Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18: 155-170.
77. Meghji M.,Niedfeld G., Ciarmela M., Falco A., Ghiani H. & Basualdo J.(1999) Asthma and cover toxocariasis. *J. Med.* 59:243-248.
78. Minar W., Krecek R. & Fourie L. (2002). Helminths in dogs from a peri urban resource limited community in free state province. South Africa. *J. Parasitic.* 107: 305-314.
79. Muñoz G.M. (1997) Determinación por Western Blot de los Antígenos de Secreción-Excreción de la Larva 2 de *Toxocara canis* que son reconocidos por sueros de cachorros infectados naturalmente. Tesis licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México.
80. Muñoz G.M. (2002) Determinación por Western Blot de los Antígenos de Secreción-Excreción de *Toxocara canis* que son reconocidos por anticuerpos de la clase IgE en pacientes asmáticos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

81. Nicholas W.L., Stewart A.C. & Walker J.C. (1986). Toxocariasis: a serological survey of blood donors in the Australian Capital territory. *Trans. R. Soc Trop. Med. Hyg.* 80:217-221
82. Nichols R.L. (1956). The etiology of visceral larva migrans. I- Diagnostic morphology of infective second-stage *Toxocara canis* larvae. *J. Parasitol.* 42(4):349-362
83. Obwaller A., Jensen-Jarolim E., Auer H., Huber A., Kraft D. & Aspöck H. (1998). *Toxocara* infestation in humans: symptomatic course of toxocarosis correlates significantly with levels of IgE/anti-IgE immune complex. *Parasite Immunol.* 20:311-317
84. Overgaauw P.A. (1997). Aspects of *Toxocara* epidemiology: Toxocariasis in dogs and cats. *Crit. Rev. Microbiol.* 23(3):233-251
85. Page, A.P., Rudin W., Fluri E., Blaxter M. & Maizels R.M. (1992). *Toxocara canis*. A labile antigenic surface coat overlying the cuticle of infective larvae. *Exp. Parasitol.* 75:72-86
86. Park H.Y., Lee S., Huh S., Kong Y. & Magnaval J.F. (2002). A seroepidemiological survey for toxocariasis in apparently healthy residents in Gangwon-do, Korea. *Korean J. Parasitol.* 40(3): 113-117
87. Parsons J.C., Dwigth D., Bowman D & Grieve R. (1986). Tissue localization of Excretory-Secretory antigens of larval *Toxocara canis* in Acute and Chronic Murine Toxocariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35:974-981.
88. Pinelli E, Dormans J, Fonville M. & Vander Giessen J. (2001). A comparative study of toxocariasis and allergic asthma in murine models. *J. Helminthol.* 75:137-40.
89. Quiroz R. (2003). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Ed. Limusa. México
90. Savigny D.H. (1975). In vitro Maintenance of *Toxocara canis* Larvae and a Simple Method for the production of *Toxocara canis* ES Antigens for Use in Serodiagnostic Test for Visceral Larva Migrans *J. Parasitol.* 61: 781-782
91. Sher A. (1995). Regulation of Cell-Mediated immunity by parasites: The ups and downs of an important host adaptation. *Mol. App. Parasitol.* 431-442

92. Simon M.F. y Conde G.L. (1987). Datos epidemiológicos sobre la toxocariosis y larva visceral emigrante en la provincia de Salamanca. V Cong. Nac. Parasitol. Salamanca. 237-238
93. Smith, H.V., Quinn R., Bruce R. G. & Girdwood R.W. (1987) Development of the serological response in rabbits infected with *Toxocara canis* and *Toxascaris leonine*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 67(1): 89-94.
94. Snow K.R., Ball S. & Benick J. (1987). Prevalence of *Toxocara* species eggs in the soil of five east London parks. Vet. Rec. 120(3): 66-67
95. Soulsby E.J. (1972). Immunity to Animal Parasites. Ed. Academic Press Inc., 1972.
96. Szczepansky T., Sonta-Jakimczyk D., Janik-Moszant A., Olejnik I. (1996). Generalized lymphadenopathy as initial presentation of toxocariasis in a seven-years-old boy. The pediatric infect. Dis. J. 15:717-718
97. Takamoto M & Sugane K. (1993). Mechanism 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 inmunol. 15: 493-500.
98. Thompson D., Bundy D., Cooper E. & Schantz P. (1986). Epidemiological characteristic of *Toxocara canis* zoonotic infection of children in a Caribbean community. Bull. WHO. 64(2): 283-290
99. Tolan R.W., Konop R., Barton L.L., Raunch D. & Steele R. (2001). Toxocariasis. Med. J. 3:2-5
100. Uga S., Matsumura T., Aoki W & Kataoka N. (1989). Prevalence of *Toxocara* species eggs in the sand pits of public parks in Hyogo Prefecture, Japan. Jpn. J. Parasitol. 38(5): 280-284
101. Umar S., Rabbani A., Mian M., Afzal M. & Saeed K. (1986). Efficacy of levamisole, mebendazole and pyrantel pamoate against natural infection of *Toxocara canis* in dogs. Pakistan. Vet. J. 6(3): 127-128
102. Vanparijs O., Hermans L. & Flaes L. (1991). Helminth and protozoan parasites in dogs and cats in Belgium. Vet. Parasitol. 38(1): 67-73
103. Vegni Talluri M., Paggi L., Orecchia P. & Dallia R. (1986), Fine structure of bucal cavity and esophagus in *Toxocara canis* (Nematode, Ascaridae) infective larvae. JI Ult. Mol. Stuct. Res. 97:144-157

104. Wang M., Jiang H., Imoue H., Myozaki M. and Yamashita U. (1995). B cell mitogenic activity of *Toxocara canis* adult worm antigen. Parasite Immunol. 17:609-615
105. Wilder H.R. (1950). Nematode endophtalmitis. Trans An Acad Ophthalmol Otolaryngol. 55:99-109
106. Winkel K.D., Saw T.H. & Prociv P. (1990). Risk of parasitic infections from sandpits. Med. J. Aust. 153:503