



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

***Toxocara canis*: detección de antígeno y anticuerpos en pacientes pediátricos con asma**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

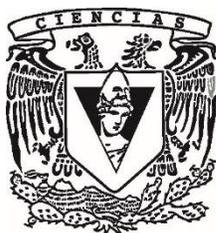
P R E S E N T A:

KARINA CLAVIJO SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARTHA PONCE MACOTELA

Ciudad Universitaria, Cd. M.x. 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se llevó acabo en el Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, que recibió apoyo de CONACYT (262237) y del INP (070/15).

Se obtuvo una beca del Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI) de la Dirección General de políticas de Investigación en Salud, Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha Ponce Macotela, por ser una gran mujer, por todo el conocimiento que me ha brindado, porque a pesar de que fue un largo camino, siempre estuvo en la disposición de apoyarme.

A Mario N. Martínez Gordillo, por siempre cuestionarme, brindarme un consejo y darme ánimos para continuar.

A Aarón Rodríguez Caballero, por ser un gran maestro, por darme todo su apoyo, paciencia y, sobre todo, amistad.

A Gustavo E. Peralta Abarca, por ser un gran amigo, un cómplice, una gran persona, que en cada momento estuvo ahí para ayudarme.

A Silvia Caballero Salazar, porque siempre me ayudó a resolver muchas dudas y siempre con la mejor disposición.

A Yadira, por todo el apoyo brindado durante el largo camino.

A Alma L. Chávez Zea, porque gracias a todo su trabajo y conocimiento, pude obtener mis muestras y resultados confiables.

A Clau, por plasmar un poco de su estilo en mis dibujos.

DEDICATORIAS

A mis padres, quienes me brindaron una educación y gracias a sus enseñanzas he logrado esta meta.

A ti mamá, por ser mi amiga, mi apoyo, mi consejera, la persona que está a mi lado no importando las circunstancias, te adoro, siempre estaremos juntas.

A ti papá, porque siempre me has dado todo tu apoyo, tu confianza, has sido parte fundamental de este logro, te quiero mucho.

A ti hermano, porque a pesar de todo, me gustaría ser un ejemplo para ti.

A ti Miguel, por ser mi compañero desde hace muchos años, por brindarme tu apoyo incondicional, comprenderme, darme ánimos y siempre quererme tal como soy.

Porque tú siempre me complementas, te amo.

ABREVIATURAS

ELISA	Inmuno Ensayo Enzimático(Enzime-Linked Immunosorbent Assay)
Ag E/S	Antígenos de excreción y secreción
L₂	Larva 2, Larva de segundo estadio
Ag	Antígeno
Ac	Anticuerpo
AcPo	Anticuerpo Policlonal
AcMo	Anticuerpo Monoclonal
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
TES	Antígeno de secreción y excreción de L2 de <i>Toxocara canis</i>
LMV	Larva Migrans Visceral
LMO	Larva Migrans Ocular
TC	Toxocariosis encubierta
WB	Western blot
ACQ	Cuestionario de Control de Asma
GINA	Global Initiative for Asthma
MP	Moderada Persistente
LP	Leve Persistente
LI	Leve Intermitente
MPC	Moderada Parcialmente Controlada
LC	Leve Controlada
LPC	Leve Parcialmente Controlada
MMC	Moderada Mal Controlada
LMC	Leve Mal Controlada
N	Normal
HB	Hiperreactividad Bronquial
BH	Biometría hemática
CPS	Coproparasitoscópico

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
ABREVIATURAS	v
CONTENIDO	vi
1 RESUMEN.....	1
2 INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 Posición taxonómica	4
2.2 Morfología	5
2.2.1 Huevo	5
2.2.2 Huevo larvado.....	6
2.2.3 Larvas de segundo estadio.....	7
2.2.4 Fase adulta.....	8
2.3 Hospederos definitivos	9
2.4 Hospederos paraténicos.....	9
2.5 Ciclo biológico	9
2.5.1 Ciclo en el hospedero paraténico	11
2.6 Manifestaciones clínicas	14
2.6.1 En el humano.....	14
2.6.2 En cánidos	16
2.7 Epidemiología.....	17
2.7.1 Seroprevalencia en humanos	17
2.7.2 Prevalencia de toxocariosis en perros.....	20
2.7.3 Prevalencia de huevos de <i>Toxocara</i> en muestras de suelo.	22
2.7.4 Prevalencia de huevos de <i>Toxocara</i> en el pelo de los perros.....	25
2.8 Diagnóstico	26

2.8.1 En cánidos	26
2.8.2 En el humano.....	26
2.9 Tratamiento.....	31
2.9.1 En cánidos	31
2.9.2 En humanos.....	31
2.10 Prevención.....	32
2.11 Asma	33
3 JUSTIFICACIÓN	36
4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	36
5 OBJETIVO PRINCIPAL	36
6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
7 MATERIALES Y MÉTODOS	37
7.1 Estrategia.....	37
7.2 Diseño del estudio	38
7.3 Población objetivo.....	38
7.4 Criterios de selección.....	38
7.5 Obtención del material biológico.....	39
7.5.1 Obtención de adultos de <i>Toxocara canis</i>	39
7.5.2 Obtención de huevos larvados	39
7.5.3 Eclosión de larvas de segundo estadio	39
7.5.4 Recuperación de antígeno de E/S de larvas de <i>T. canis</i>	40
7.5.5 Obtención de sueros	40
7.6 ELISA indirecta	41
7.6.1 Titulación de α IgG-Humano(HRP)	41
7.6.2 Titulación para la obtención de la dilución de suero humano y concentración de antígeno de excreciones–secreciones de larvas de segundo estadio de <i>Toxocara canis</i> (Ag E/SL ₂ <i>T. canis</i>).	42

7.6.3 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos (IgG) en pacientes pediátricos con asma.....	42
7.6.4 ELISA con Kit comercial	43
7.7 ELISA directo para la detección de Ag E/S L ₂ T. <i>canis</i> con un anticuerpo monoclonal (G4C12MoAc).....	43
7.7.1 ELISA para la obtención de la curva de titulación del conjugado.....	43
7.7.2 ELISA para obtener la curva de titulación del AgE/SL ₂ T. <i>canis</i>	44
7.7.3 ELISA directo para la detección de Ag E/S L ₂ T. <i>canis</i>	45
7.8 ELISA competitivo, adsorción de los sueros de los pacientes con antígeno de <i>Ascaris suum</i> (reacción cruzada).....	45
7.9 ELISA para determinar el índice de avidéz	46
8 RESULTADOS	48
8.1 Obtención de la fase adulta, huevos larvados y larvas de <i>T. canis</i>	48
8.2 ELISA para la detección de anticuerpos anti- <i>T. canis</i>	50
8.2.1 ELISA indirecta	50
8.2.2 ELISA INP y ELISA Kit para la detección de anticuerpos anti- <i>T. canis</i> en pacientes pediátricos con asma.	52
8.3 ELISA directo para la detección de Ag E/SL ₂ T. <i>canis</i>	54
8.3.1 ELISA para la obtención de la curva de titulación del conjugado.....	54
8.3.2 ELISA para obtener la curva de titulación del AgE/SL ₂ T. <i>canis</i>	55
8.3.3 ELISA directo para la detección de Ag E/SL ₂ T. <i>canis</i>	56
8.4 ELISA competitivo, adsorción de sueros con Ag de <i>Ascaris suum</i> (reacción cruzada)	58
8.5 ELISA para determinar el índice de avidéz	60
8.6 Variables de los pacientes pediátricos con asma.....	61
8.7 Resultados de la espirometría, biometría hemática, ACQ (cuestionario de control del asma) y GINA (iniciativa global para el asma).	62
8.8 Resumen de la seropositividad a <i>Toxocara canis</i> y gravedad del asma	65
9 DISCUSIÓN	70

10 CONCLUSIONES 74
11 PERSPECTIVAS 74
12 REFERENCIAS 75
13 ANEXOS 98

1 RESUMEN

Introducción: *Toxocara canis* es un geohelminto zoonótico que en humanos causa larva migrans visceral. Los niños son susceptibles a la infección por sus hábitos de juego o por geofagia. El inmunodiagnóstico es con kits comerciales que detectan anticuerpos anti-*T. canis*, pero dan reacciones cruzadas, no detectan el estatus de la infección y son costosos. Nuestro grupo de trabajo produjo herramientas para la captura de antígeno de secreciones y excreciones de larvas de *T. canis* (Ag S/E L₂ T. canis) y para la detección de anticuerpos anti-*T. canis*. Con éstas, se puede diagnosticar infección reciente, crónica o larva *migrans* activa. Objetivo: Demostrar si hay asociación entre la seroreactividad a *Toxocara canis* con la gravedad del asma. Material y métodos: Estudio prospectivo, transversal y observacional. A 86 niños de 6 -18 años de edad, con diagnóstico de asma se les realizó la espirometría y cuestionarios ACQ y GINA; ELISA para la detección de Ag S/E L₂ *T. canis* y anticuerpos anti-*T. canis*. Se descartaron reacciones cruzadas y se determinó el índice de avidez. Resultados: Un paciente (1.0%) fue positivo al Ag S/E L₂ *T. canis* y fue negativo a anticuerpos. Por lo tanto, se infirió que cursaba con infección reciente; el GINA arrojó datos de asma moderada persistente y con ACQ fue moderada parcialmente controlada. El 26% de los pacientes fue positivo a anticuerpos anti-*T. canis*; probablemente cursaban con infección crónica o con memoria inmunológica. La mayoría tuvieron espirometría normal y el GINA mostró asma leve parcialmente controlada y con ACQ asma leve controlada. Mediante el índice de avidez se detectó que el 96% presentó infección crónica y este resultado concuerda porque estos pacientes no tuvieron Ag S/E L₂ *T. canis*. Conclusiones: Este es el primer reporte en donde se correlaciona el estado de gravedad de asma con larva migrans de infección reciente o crónica.

2 INTRODUCCIÓN

Aproximadamente el 100% de los perros cachorros se infecta con *Toxocara canis* por vía transplacentaria y comienzan a eliminar huevos de este parásito a los 16 días después de nacer (Overgaauw et al., 2013). En perros adultos la prevalencia es menor al 20% (Ponce-Macotela et al., 2005), pero, si las hembras se infectan cuando están gestando, las larvas llegan a los fetos por vía transplacentaria (Lee et al., 2010). Se estima que en la ciudad de México hay aproximadamente 3 millones de perros callejeros y 2 millones de perros con dueño, ambos grupos producen aproximadamente 625 toneladas de heces diarias; estos desechos pueden llegar con facilidad hasta los seres humanos por geofagia, por contaminación de los depósitos de agua o de los alimentos (Acevedo & Peralta. 2010).

Los huevos larvados de segundo estadio de *Toxocara canis* (*T. canis*) y en menor medida *Toxocara cati* (*T. cati*) son infectivos para el humano. Este parásito zoonótico en su estado adulto vive en el intestino delgado del perro y el gato, respectivamente. Los huevos de *Toxocara* depositados en el ambiente, desarrollan en su interior una larva infectante y para ello se requieren determinadas condiciones de temperatura, humedad y aireación.

Los huevos al ser ingeridos accidentalmente por el ser humano (hospedero paraténico), llegan al intestino delgado, la larva eclosiona y migra por diferentes órganos, en donde puede vivir por varios meses e inclusive años, ocasionando reacciones inflamatorias locales o sistémicas según el órgano afectado. (Bolívar, et al., 2013, Glickman & Schantz, 1981, Roldán, et al., 2010).

Los niños tienen el mayor riesgo de infección, ya que tienen una mayor oportunidad de exposición al suelo contaminado y areneros mientras juegan al aire libre. Además, los seres humanos también pueden infectarse por la ingestión de vísceras infectadas (Öge et al., 2013). Un modo alternativo de transmisión propuesto recientemente es el contacto con huevos larvados sobre el pelo de perro (Devoy & Holland, 2010, Öge et al., 2013, El-Tras et al., 2011).

El cuadro clínico predominante asociado a la toxocariosis se clasifica de acuerdo a los órganos y tejidos que afecta, produciéndose tres condiciones principales, Larva *migrans* visceral (LMV), caracterizado por comprometer órganos tales como el hígado, los pulmones, la piel, el sistema nervioso, el músculo esquelético, el corazón y los riñones. Larva *migrans* ocular (LMO), en el cual los ojos y los nervios ópticos son las principales estructuras afectadas y finalmente la toxocariosis encubierta (TC), que comprende un espectro clínico que va desde una infección asintomática hasta la migración de larvas a órganos blanco específicos. No obstante, las manifestaciones clínicas y el pronóstico de la enfermedad no solo dependen del órgano en el cual se localice la larva migrante, sino que, además, su evolución estará determinada por la cantidad del inóculo, la frecuencia de reinfecciones y la respuesta inmunológica del individuo, entre otros factores. (Delgado & Rodríguez, 2009, Bolívar, et al., 2013, Ponce-Macotela, et al., 2011).

La toxocariosis es una zoonosis de amplia distribución, sin embargo, es más común en áreas tropicales y subtropicales y es considerada de alto riesgo en poblaciones con poca higiene y en donde las personas no desparasitan a sus mascotas (Roldán, et al., 2010).

2.1 Posición taxonómica

Los organismos del phylum Nematoda son gusanos de color nacarado, con simetría bilateral, radial sólo en la región cefálica; con cuerpo elongado y cilíndrico, usualmente con los extremos ahusados; cutícula compleja con ornamentaciones o con apariencia segmentada. Epidermis con cuatro cordones longitudinales internos a lo largo del cuerpo y sólo con musculatura longitudinal que inerva a los cordones nerviosos; tubo digestivo completo.

Dominio: ***Eukaryota***

Reino: ***Animalia***

Subreino: ***Bilateria***

Phylum: ***Nematoda***

Clase: ***Secernentea***

Subclase: ***Rhabditia***

Orden: ***Ascaridida*** (Skrjabin et Schulz, 1938)

Superfamilia: ***Ascaridoidea*** (Nadler, 1992)

Familia: ***Toxocaridae*** (Werner, 1782)

Subfamilia: ***Toxocarinae*** (Hartwich, 1954)

Género: ***Toxocara*** (Stiles & Hassall, 1905)

Especie: ***Toxocara canis*** (Werner, 1782)

(Delgado et al., 2009, Maizels et al., 2000, Dantas-Torres et al., 2014, Nadler et al., 1998)

2.2 Morfología

2.2.1 Huevo

La hembra fecundada pone cerca de 68, 000 huevos por día (Rodríguez-Caballero et al., 2015). Los huevos que salen con las heces son semiesféricos, adherentes y presentan un blastómero; miden aproximadamente 85-95 μ m por 75-90 μ m (Fig.1). Están formados por tres capas, dos las forma el propio huevo y la tercera es añadida por las secreciones del útero. La capa más interna es la vitelina, seguida de la capa quitinosa, y la tercera de naturaleza proteínica, ornamentada y con pequeñas hendiduras denominadas mamelas (Webster, 1958, Ponce-Macotella et al., 2011, Magnaval et al., 2001).



Figura 1. Huevo de *T. canis*. Se observa la pared del huevo y un blastomero en el centro. 40x.

2.2.2 Huevo larvado

El desarrollo de los huevos se lleva a cabo fuera del hospedero definitivo. Bajo condiciones óptimas de temperatura (25 y 30 °C) y humedad (85-95%) el desarrollo de la larva dentro del huevo requiere de 9 a 15 días. Sin embargo, dependiendo del tipo de suelo y de las condiciones climáticas; el desarrollo puede variar desde 3 a 6 semanas, hasta varios meses, y puede permanecer viable durante al menos un año (Schnieder et al., 2011, Morrondo et al., 2006, Degregorio et al., 1997).

Los huevos son muy resistentes a bajas temperaturas y la embrionación puede ser retrasada temporalmente o suspendida. Las larvas mueren a temperaturas inferiores a los -15°C. La humedad es esencial para el desarrollo, pero, la exposición a la luz solar o a la desecación causan la desintegración (Webster, 1958, Gillespie, 1988).



Figura 2. Fase infectante de *T. canis*. Se observa un huevo larvado de segundo estadio. La larva dentro del huevo. 40x

2.2.3 Larvas de segundo estadio

Las larvas que salen de los huevos (L₂) miden entre 360 y 434 μm de longitud y 18-21 μm de diámetro (Fig. 3). Tienen cutícula estriada, cavidad bucal en posición subterminal y dorsalmente inclinada, está rodeada de tres labios desarrollados, cuya función es la recolección de alimento y el anclaje a los tejidos durante la migración. En la región anterior a los labios se sitúa 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 (Nichols, 1956).

El aparato bucal continúa en un esófago largo, que ocupa un tercio de la longitud total de la larva y se prolonga en un intestino cilíndrico que desemboca en un ano, situado en posición subterminal. A nivel del primer tercio del esófago se sitúa un anillo nervioso, mientras que en la posición subterminal se encuentra la célula excretora que desemboca en un poro excretor (Nichols, 1956).



Figura 3. Larva de segundo estadio. Se observan larvas y un huevo dañado. 40x.

2.2.4 Fase adulta

Toxocara es un gusano cilíndrico, nacarado y no segmentado, con estriás transversales irregulares y alas cervicales estrechas y lanceoladas, que se extienden desde la extremidad anterior, a lo largo de los márgenes laterales. Tienen los tres labios, presentan un bulbo formado por dos lóbulos laterales diferentes, separados por un canalículo, entre los cuales existe un lóbulo intermedio simple.

El macho mide entre 4 y 6 cm de longitud por 2.5 mm de diámetro con un extremo caudal que termina en curva, sin alas caudales, con dos series de 20 - 30 papilas preanales, cinco papilas postanales a cada lado de la cloaca y una papila subventral a cada lado del ano. Presenta unas espículas ligeramente desiguales y curvadas, de 750 - 1.5 μm de longitud.

La hembra es más grande que el macho, mide de 6.5 a 15 cm de longitud por 2.5-3mm de diámetro y su extremo posterior es romo. La vulva se sitúa en el cuarto anterior del cuerpo.

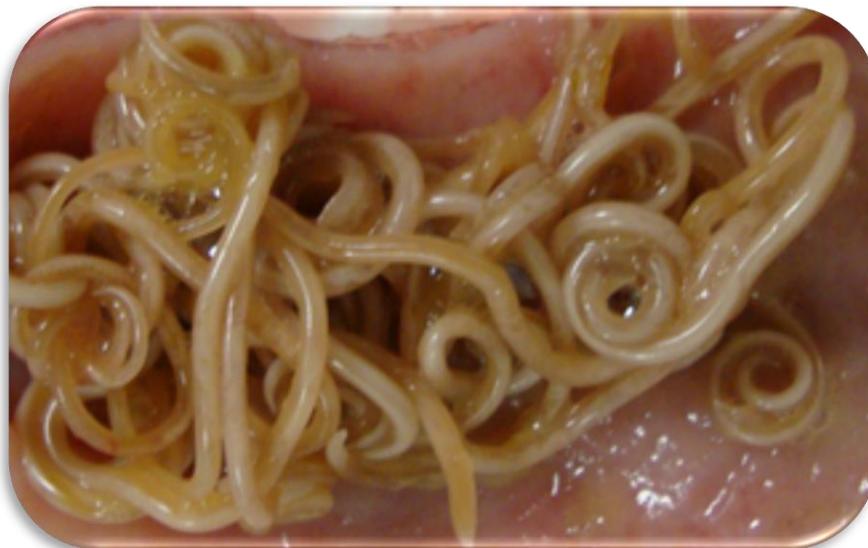


Figura 4. Adultos de *T. canis*. Obtenidos del intestino delgado de un cánido.

2.3 Hospederos definitivos

El hospedero definitivo es el organismo en el cual el parásito alcanza su maduración sexual o las formas más desarrolladas. Los hospederos definitivos de *T. canis* son los cánidos (perro, el zorro gris californiano, zorro de la india, zorro rojo, zorro amarillo, coyotes, lobos, chacales y hienas) (Durant et al. 2012).

2.4 Hospederos paraténicos

Los hospederos paraténicos son aquellos en donde el parásito persiste sin desarrollar cambios (Bowman et al., 2010). Entre éstos están: otros mamíferos (seres humanos, ratones, ratas, cueros, ovinos, caprinos, bovinos y conejos entre otros) y aves (pollos, patos, gallinas y palomas). Los hospederos paraténicos se infectan al ingerir huevos larvados que se encuentran en la tierra o por la ingestión de larvas encapsuladas en el tejido de otros hospederos paraténicos (Bolívar-Mejía et al 2013, Choiet al., 2012, Schnieder et al. 2010).

2.5 Ciclo biológico

El desarrollo completo del ciclo biológico de *Toxocara canis* requiere de un solo hospedero (Canidos). Fig.5

Los cánidos (hospederos definitivos) se infectan al ingerir los huevos larvados de segundo estadio (fase infectante) que se encuentran en la tierra. Los huevos pasan por esófago, estómago y llegan al intestino delgado. Aquí, las larvas eclosionan y por venas linfáticas y sistema porta llegan al hígado, por vena cava caudal al corazón derecho y por arterias pulmonares a los pulmones. En este punto las larvas tienen dos caminos:

i) Infección patente (hepatotraqueal). Las larvas rompen la pared alveolo capilar (Larva estadio 3, L₃), ascienden por árbol bronquial (bronquiolos, bronquios, tráquea, larnige y faringe) y son deglutidas, pasan por esófago, estómago (Larva estadio 4, L₄) y llegan a su hábitat que es el intestino delgado. Los parásitos alcanzan la fase adulta, el macho fecunda a la hembra y ésta pone hasta 200,000 huevos (no infectantes) por día (Magnaval et al., 2001), y salen con la materia fecal.

El ciclo desde la ingestión de los huevos (infectantes) hasta la eliminación de los huevos (no infectantes) dura aproximadamente dos meses. Esta ruta es más frecuente en cánidos cachorros y son los principales excretores de huevos de *T. canis* (Nijse, et al. 2016, Breña et al., 2011, De la Fe et al., 2006, Strube et al., 2013). La maduración de los huevos hasta la fase infectante se lleva a cabo en el medio ambiente y dura aproximadamente de 3-4 semanas, motivo por el cual a *T. canis* se le conoce como geohelminto (Becerril M, 2008).

ii) Migración somática. En ésta, las larvas viajan por venas pulmonares para llegar a corazón izquierdo y por vías sistémica se distribuyen a cualquier parte de la economía, quedándose como larvas “hipobióticas”. Esta ruta es más frecuente en cánidos mayores de seis meses. En las perras gestantes, se ha probado que el estímulo hormonal (prolactina) despierta y activa a las larvas “hipobióticas”, éstas son transportadas por vasos sanguíneos y llegan al útero e infectan a los fetos. Las larvas llegan al hígado fetal y se transforman en L₃. Cuando los cachorros nacen ya están infectados (Nijse et al., 2016), las larvas se encuentran en los pulmones y permanecen ahí durante la primera semana de vida y la salida de huevos (no infectantes) en heces se inicia a partir de los 15 días de edad de los cachorros (Breña, et al., 2011).

Los cachorros recién nacidos cuando son amamantados pueden infectarse por transmisión lactogénica, debido a que las larvas migran a las glándulas mamarias en las últimas etapas de la gestación o en la lactancia temprana. En los cachorros estas larvas se desarrollan directamente al estadio adulto en el intestino (Gillespie, 1988).

Despommier (2003), menciona que los hospederos definitivos también pueden infectarse por la ingestión de huevos embrionados transportados por reservorios paraténicos, tales como lombrices de tierra, hormigas y otros invertebrados que habitan en el suelo.

2.5.1 Ciclo en el hospedero paraténico

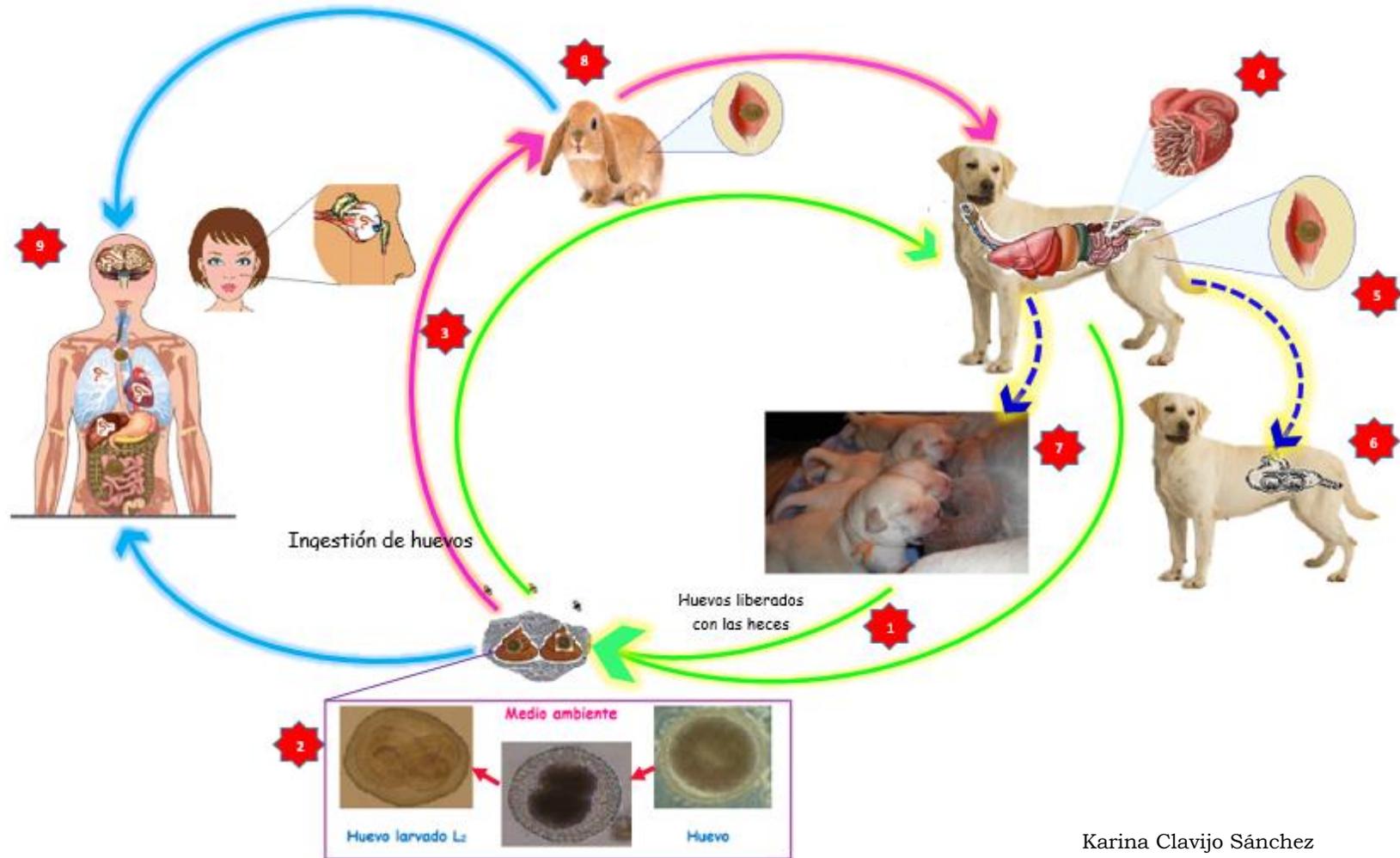
Los hospederos paraténicos pueden infectarse por la ingestión de huevos larvados (L₂) que se encuentran en el ambiente o por depredación y canibalismo.

El humano se infecta por comer tierra (geofagia o pica), alimentos, vegetales crudos y agua contaminados con huevos larvados de segundo estadio, también por el consumo de carne o vísceras crudas o mal cocidas de bovinos, ovinos o aves infectados (Overgaauw et al., 2013)

Después de la ingestión de los huevos larvados, éstos llegan al esófago, estómago e intestino delgado, aquí las larvas eclosionan y por venas mesentéricas y sistema porta llegan al hígado. Por vena cava inferior llegan a corazón derecho y por arterias pulmonares a los pulmones, rompen la membrana alveolo-capilar y por venas pulmonares llegan a corazón izquierdo y por vía sistémica pueden llegar a ojos, sistema nervioso central y a otros organos (Strube, et al. 2013).

Una vez detenidas en tejidos u órganos donde las células inmunológicas y/o fagocíticas son abundantes, pueden quedar atrapadas dentro de los granulomas eosinofílicos donde se degenerarán. Las larvas liberan de forma continua aproximadamente 2ng/larva/día de antígenos glicoproteínicos solubles denominados "excreción-secreción" (Ag E/S). Una parte del Ag E/S tiene un origen interno y es secretado por la glándula esofágica y poro excretor de la larva. La otra parte se compone de glicoproteínas que se liberan de la capa epicuticular externa larvaria, que se renueva de forma continua y rápida. Es probable que la liberación de Ag E/S esté implicada en la supervivencia de las larvas dentro del huésped paraténico, que preferentemente monta una respuesta inmunológica contra el Ag soluble, en lugar de contra el Ag somático que se expone solamente durante la destrucción de las larvas. El Antígeno E/S contiene una potente fracción alérgica que más tarde se identificó como TBA-1. Este hallazgo explicaría la frecuencia de síntomas alérgicos en pacientes con toxocariosis, especialmente en sujetos atópicos. La alta inmunogenicidad y alergenidad del Ag E/S sugieren que la mayoría de los

casos de toxocariosis serían causados por inóculos larvales pequeños (Fillaux et al., 2013).



Karina Clavijo Sánchez

Figura 5. Ciclo biológico de *T. canis*. Huevos expulsados con las heces del hospedero definitivo ①. Huevos fecundados, en división y larvados en el medio ambiente ②. Infección de hospederos paraténicos y definitivos (cánidos) con huevos larvados L₂ ③. Adultos en el intestino delgado de cánidos ④. Larvas en tejidos de perros adultos ⑤. “Larvas durmientes” se reactivan en las perras gestantes e infectan a los fetos por vía transplacentaria ⑥ y a los cachorros por vía lactogénica ⑦. Ingestión de hospedero paraténico ⑧ por el cánido y por el humano. En el humano, los huevos eclosionan y las larvas penetran pared intestinal y son transportadas a hígado, corazón, pulmones, cerebro y ojos ⑨.

2.6 Manifestaciones clínicas

2.6.1 En el humano

El espectro de manifestaciones clínicas incluye: casos asintomáticos e infecciones generalizadas. El grado de daño al hospedero y el curso de la enfermedad dependen de la cantidad del inóculo, la frecuencia de reinfecciones, localización de la larva migrante en el órgano afectado y la respuesta del hospedero (Roldán, 2010, Despommier, 2003).

Se han propuesto tres etapas: aguda (que suele ser inespecífica), latente y crónica.

La fase aguda de la infección ocurre inmediatamente después de la ingestión de los huevos infectantes. Las larvas eclosionadas atraviesan el epitelio intestinal y migran por vasos sanguíneos al hígado, aparato respiratorio y órganos inmunológicamente privilegiados como el globo ocular y el cerebro. La migración larval puede manifestarse con síntomas inespecíficos como mialgias, fiebre, malestar general y puede ocasionar episodios de broncoespasmos o hiperreactividad bronquial (Roldán, 2010, Breña et al., 2011).

En la fase latente el parásito puede quedarse confinado a un tejido en particular y dependiendo de su capacidad de evasión de la respuesta inmune puede sobrevivir y mantenerse en forma latente sin causar signos o síntomas relevantes para poder sospechar de su presencia en el organismo.

La fase crónica se produce por la respuesta inflamatoria ocasionada por la presencia del parásito en los tejidos. LMV y LMO fueron descritas desde el primer reporte en los años 50 (Beaver et al., 1952,). Posteriormente, se describieron la Larva Migrans Cerebral (LMC) (Dent et al., 1956) y la toxocariasis encubierta (TE) (Bass et al., 1987, Taylor et al., 1987).

La LMV fue descrita por Beaver et al. en 1952, (adoptaron el término para denotar una migración interna prolongada de un parásito larvario en un huésped que no es definitivo, ni intermediario), se observa principalmente en niños de 1-3 años de

edad, la razón de ésto puede ser que los niños suelen jugar en patios y areneros, tienen un contacto más cercano con el suelo potencialmente contaminado. LMV es una forma grave y sistémica que se caracteriza por hipergammaglobulinemia, eosinofilia (más del 50% de los glóbulos blancos en la sangre periférica), anemia, pérdida de peso, fatiga y fiebre. Signos y síntomas gastrointestinales tales como: vómito, diarrea, dolor abdominal, anorexia y hepatomegalia. En aparato respiratorio con tos, sibilancias y broncoespasmos y un cuadro semejante al asma (Gillepie 1988, Smith et al., 2009, Lee et al., 2010, Janecek et al., 2014, Aydenizöz-Özkayhan et al., 2008, Despommier 2003, Perteguer et al., 2003, Lima et al., 2005, Magnaval et al., 2001).

La LMO usualmente se presenta en niños de 5-10 años de edad. Las manifestaciones clínicas son unilaterales: con pérdida de la agudeza visual, estrabismo, dolor ocular, uveítis, endoftalmitis, papilitis y lesión granulomatosa de la retina. La LMO usualmente no se acompaña de eosinofilia (Despommier, 2003, Magnaval, 2001, Breña et al., 2011, Good et al., 2004).

En la LMC produce trastornos de conducta, convulsiones focales o generalizadas, meningoencefalitis eosinofílica, ataxia, alteraciones sensoriales, infartos cerebrales y mielitis transversa. En el cerebro las larvas no se encuentran encapsuladas, y su migración deja pequeños focos de necrosis e infiltrado inflamatorio a su paso (Fillaux& Magnaval 2013, Janecek et al., 2014, Roldán et al., 2010).

La toxocariosis encubierta (TE) fue descrita originalmente por Bass et al. (1987), es la presentación más común, es caracterizada por síntomas y signos no específicos y tampoco incluidos en la LMV y LMO. La TE parece depender en menor grado de la reacción local a las larvas de *Toxocara*, pero son varios los órganos incluidos en la respuesta inmunológica del hospedador. Los órganos predispuestos pueden diferir en los diferentes individuos y debido a esto la expresión clínica de la TE varía ampliamente (El-Tras et al., 2011, De la Fe et al., 2006).

2.6.2 En cánidos

Cuando la infección es prenatal, en los cachorros hay nematodos en el estómago e intestino, alterando la digestión y provocando vómito acompañado de gusanos; también puede haber diarrea con moco, deshidratación, abdomen distendido y doloroso a la palpación. Los cachorros pueden presentar neumonía por aspiración de vómito que puede ser mortal (De la Fe et al., 2006). En algunos perros, la penetración de la larva por la pared intestinal le puede causar enteritis y mucosa sanguinolenta (Schnieder, 2011).

En la fase crónica los cachorros y adultos pueden tener diarrea intermitente, desnutrición y convulsiones.

2.7 Epidemiología

2.7.1 Seroprevalencia en humanos

La toxocariasis en humanos tiene una distribución cosmopolita en el mundo (Fig. 6). Con amplias variaciones de acuerdo a las características sanitarias de cada país o región, considerándosele endémica en la mayor parte de los países en América, África y Asia. También se le relaciona a otros factores: como el estatus socioeconómico, hábitos higiénicos y alimenticios (Alonso et al., 2004; Lee et al., 2010).

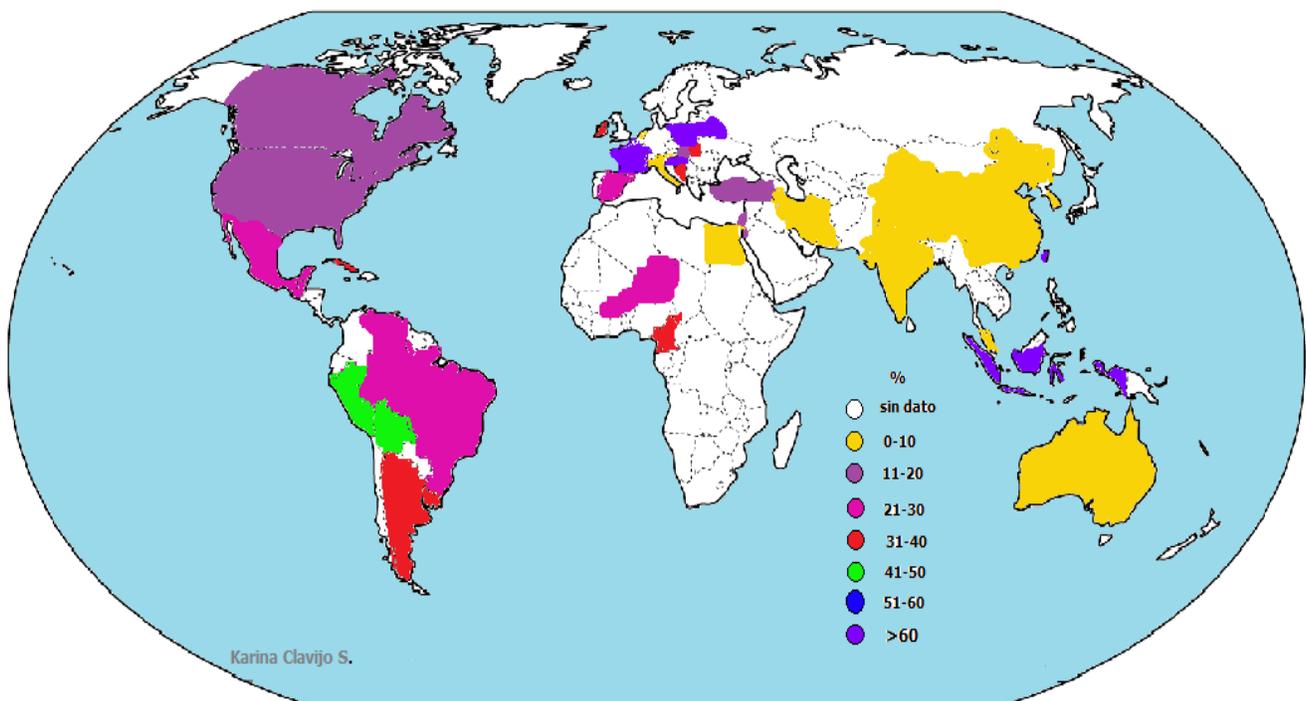


Figura 6. Seroprevalencia de toxocariosis en humanos a nivel mundial (1986-2014).
(Datos de la tabla 1)

El porcentaje de seroprevalencia en humanos es variable. Tabla 1. La fuente más importante de infección en humanos es por geofagia, por beber agua o ingerir alimentos contaminados con huevos larvados de segundo estadio. Los niños tienen el mayor riesgo de adquirir la infección, debido a la tendencia de llevarse las manos y los objetos sucios a la boca y por comer tierra, asociada a un contacto íntimo con las mascotas (Öge, et al., 2013).

Tabla 1. Seroprevalencia de toxocariosis en humanos a nivel mundial.

País	Seroprevalencia %	Edad	Técnica	Referencia
Perú, Lima	32.1	1>60	ELISA	Espinoza et al., 2016
República de las Islas Marshall, Majuro	86.75	7-12	WB	Fu et al., 2014
Argentina, La Plata	38.33	10m-3a	ELISA Kit	Archelli et al., 2014
Brasil, Fernandópolis	15.5	1-12	ELISA	Cassenote et al., 2014
México, Durango	26.2	M	ELISA IgG	Alvarado-Esquivel, 2014
Canadá, Saskatchewan	13	>4	ELISA IgG	Schurer et al., 2013
México, Durango	4.7	M	ELISA Kit	Alvarado-Esquivel, 2013
México, Edo. De México	22.22	2-16	ELISA Kit	Romero et al., 2013
Venezuela, Barquisimeto	34.4	1-6	ELISA Kit	De Abreu et al., 2011
Bolivia, Cochabamba	6.5	2-13	ELISA Kit	Lozano et al., 2011
Swaziland	44.6	3-12	WB	Liao et al., 2010
Malasia, Orangasli	4.8	M	ELISA Kit	Romano et al., 2010
Dinamarca	2.4	M	ELISA Kit	Stensvold et al., 2009
Perú, Cajamarca	53.1	17-58	dot-ELISA	Roldán et al., 2009
Croacia	31	3-18	ELISA IgG	Sviben et al., 2009
Egipto	6.2	1-12	ELISA IgG	Antonios et al., 2008
E.U.A.	13.9	≥6	ELISA IgG	Won et al., 2008
Sri Lankan, Colombo	19.8	5-12	ELISA IgG	Deepika et al., 2008
Polonia	72.59	N	ELISA IgG	Zarnowska et al., 2008
Hungría	32	2-17	ELISA IgG	Bede et al., 2008
Brasil, Maringá	28.8	7m-12a	ELISA IgG	Paludo et al., 2007
Irán, Hamadan	8.8	1-9	ELISA Kit	Fallah et al., 2007
Turquía	12.95	N	ELISA IgG	Doğan et al., 2007

Libano, Beirut	19	M	ELISA IgG	Kanafani et al., 2006
Argentina	58.2	1-14	ELISA IgG	López et al., 2006
Perú, Perené	27.9	M	ELISA	Espinoza et al., 2006
España, Madrid	28.6	A	ELISA IgE	Gonzalez et al., 2006
Indonesia, Manado	84.6	N	ELISA	Hayashi et al., 2005
Argentina, Resistencia	38.9	18-68	ELISA IgG	Alonso et al., 2004
Taiwan	76.6	7-12	ELISA IgG	Fan et al., 2004
Eslovenia	28	3-80	ELISA IgG	Logar et al., 2004
Italia, Marche	1.6		ELISA	Habluetzel et al., 2003
Argentina, Nte. de Salta	22.1	M	ELISA	Taranto et al., 2003
Perú, Lima	23.3	M	ELISA IgG	Espinoza et al., 2003
India, Chandigarh	6.4	1-30	ELISA Kit	Malla et al., 2002
Brasil, Campinas	23.9	3m-80a	ELISA	Anaruma et al., 2002
Corea, Wachon-Gun	5	M	ELISA IgG-IgE	Park et al., 2002
Turquía, Isparta	29.1	M	ELISA	Demirci et al., 2002
Bogotá, Cd. Bolívar	7.3	4-14	ELISA IgG	Acero et al., 2001
Nigeria, Jos	29.8	2-24	ELISA IgG	Ajayi et al., 2000
Italia, Ancona	4.29	M	ELISA IgG	Giacometti et al., 2000
China, Chengdu	4.11	3-6	ELISA	Luo et al., 1999
México, D.F.	1.9	20m-17a	HI	Fernandez et al., 1999
Bolivia, Mora	27	2-85	ELISA Kit	Cancrini et al., 1998
Bolivia, Zanja Honda	42	2-85	ELISA Kit	Cancrini et al., 1998
Chile, Valdivia	5.3	18-52	ELISA IgG	Navarrete et al., 1998
México, D.F.	7.5	6-13	HI	Martínez-Barbosa et al., 1997
Nepal, Kathmandu	81	>14	ELISA IgG	Rai et al., 1996
España, Gipuzkoa	17.4	N	IgG	Cilla et al., 1996
Irlanda, Dublín	31	4-19		Holland et al., 1995
Francia, Isla La Réunion	92.8	>15	WB	Magnaval et al., 1994
Francia	22	M	ELISA	Gueglio et al., 1994
Eslovaquia	13.65	M	ELISA IgG	Havasiová et al., 1993
Jordania, Irbid	10.9	5-24	ELISA IgG	Abo-Shehada et al., 1992
Australia, Camberra	7	M	ELISA	Nicholas et al., 1986

N=niños; M=población mixta; m=meses; a=años

La toxocariosis asmátiforme, fue descubierta gracias a las pruebas inmunológicas. Desde los años setenta se reportó una asociación entre parásitos intestinales y asma, cuando Tullis (1970) informó que pacientes con asma se encontraban parasitados por *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis* y *Necator americanus*. Este estudio, como otros, abrieron la posibilidad de investigar la asociación del asma con la presencia de otros parásitos. De tal forma que Desowitz 1981, reporto una probable asociación entre la presencia de asma y toxocariosis, con una seroprevalencia del 28% en 80 niños con asma, en comparación con un 6.8% en aquellos sin asma. Años más tarde Buij y col 1994, en un estudio de casos y controles, realizado en dos ciudades de Alemania, con niños de 4-6 años, también encontró una mayor seroprevalencia a *T. canis* en niños asmáticos. Adicionalmente, buscó factores de riesgo, tales como: género, nivel socioeconómico, edad, tipo de cuadro de asma bronquial y presencia de mascotas y en ningún caso encontró una asociación significativa con estos factores. En otro estudio de casos (38 con asma) y controles (44 sin asma), Minvielle y col 1999, reportan el 68.42% de seropositividad a *Toxocara* en pacientes con asma y 13.63% en el grupo control.

2.7.2 Prevalencia de toxocariosis en perros

El registro de perros en el medio es muy importante, ya que son los portadores y diseminadores de la toxocariosis. Se estima que a nivel mundial hay 1 perro por cada 10 personas, y en muchos países alrededor del 50% son callejeros (Ponce-Macotela et al., 2011). La cantidad de nematodos y la prevalencia es más alta en cachorros y perros jóvenes menores de 6 meses de edad (Overgaauw et al., 2013); pero, los perros adultos también contribuyen en la diseminación de esta parasitosis (Ponce-Macotela et al., 2011). La frecuencia de *T. canis* en perros, en diferentes países, así como el método utilizado para el diagnóstico se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Prevalencia de Toxocariosis en perros a nivel mundial.

País	Frecuencia (%)	Edad	Método	Referencia
India, Uttar Pradesh	24.3	M	CPS	Sahu et al., 2014
Portugal, Gran Oporto	5.1	M	CPS	Neves et al., 2014
Japón, Osaka	34.9	C	CPS	Kimura et al., 2013
Canadá, Saskatchewan	11.8	M	CPS	Schurer et al., 2012
Alemania	4	M	CPS	Becker, et al 2012
Albania, Tirana	0.9	M	CPS/N	Xhaxhiu et al., 2011
Israel, Palestina	36.4	M	CPS	Othman, 2011
Zambia	7.6	M	CPS	Nonaka et al., 2011
México, Edo. de México	64.6	C	N	Muñoz-Guzmán et al., 2010
México, D.F.	66.7	M	N	Martínez-Barbosa et al., 2008
México, Chiapas	19	M	CPS	Martínez et al., 2008
Etiopia, Debre Zeit	21	M	CPS	Yacob et al., 2007
Argentina, Sur de Buenos Aires	11	M	CPS	Fontanarrosa <i>et al.</i> , 2006
Chile, Santiago de Chile	11	M	CPS	López et al., 2006
México, D.F.	12-18	M	CPS/N	Ponce et al., 2005
México, D.F.	13.3	M	N	Eguía-Aguilar et al., 2005
Venezuela, Maracaibo	11.4	M	CPS	Ramírez-Barrios et al., 2004

E.U.A., Colorado	3.1	M	CPS	Hackett et al., 2003
Italia, Marche	33.6	M	CPS	Habluetzel et al., 2003
Argentina, Buenos Aires	9-19	M	CPS	Rubel et al., 2003
Brasil, Sao Paulo	5.5	M	CPS	Oliveira-Sequeira et al., 2002
México, Querétaro	13.93	M	N	Fernández et al., 2002
México, D.F.	18.6	M	CPS	Martínez-Barbosa et al., 1998
Chile, Valdivia	19	M	CPS	Torres et al., 1995
Cuba, Habana	17.9	M	CPS	Duménigo et al., 1994

C= cachorros; M= población mixta; CPS=coproparasitoscópicos; N=necropsia

2.7.3 Prevalencia de huevos de *Toxocara* en muestras de suelo.

Desde el punto de vista epidemiológico, el potencial biótico de *T. canis* es enorme debido a que una hembra es capaz de poner aproximadamente 68,000 huevos fecundados/día (Rodríguez-Caballero et al., 2015).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha estimado que un gramo de materia fecal de un perro cachorro puede contener hasta 15 mil huevos de *Toxocara*, que al ser evacuados contaminan la vía pública y son disgregados por la acción del pisoteo, la lluvia, el viento o por vectores. Las diferentes capas que cubren a los huevos los hacen resistentes al frío y a los cambios ambientales, por lo que pueden sobrevivir varios años (Martínez-Barbosa, 2008).

La contaminación de los suelos con materia fecal de perros es un problema de magnitud considerable en cualquier parte del mundo; incluso en países desarrollados, como lo muestran las tasas de contaminación del suelo con huevos de *T. canis* registradas en Inglaterra 6.3%, Italia 26.2%, Japón, 87.5%, estados

unidos de América 14.4%, Irlanda 32%, Eslovaquia 18.7% (Martínez-Barbosa, 2008).

La alta fecundidad de *Toxocara* aunada a la alta prevalencia, y el creciente número de animales de compañía explican el elevado nivel de contaminación del suelo con huevos de este parásito (Gawor et al., 2008).

Se ha reportado desde el 2 al 56% de contaminación del suelo (campos de juegos y parques) con huevos de *Toxocara*, tanto en zonas rurales como urbanas de países desarrollados y países en vías de desarrollo Tabla 3. Por tal motivo, se debe considerar al suelo como la principal fuente de infección para humanos y en especial en los niños, por sus hábitos de juego o por las malas costumbres higiénicas. (Castillo et al., 2001).

Tabla 3. Prevalencia de huevos de *Toxocara* en muestras de suelo de diferentes países

País	Región	Frecuencia (%)	Referencia
Brasil	Campinas	12.3-14	Delgado et al., 2009
Argentina	Patagonia	35.1	Fillaux et al., 2007
Venezuela		63.16	Cazorla et al., 2007
Brasil	Sao Paulo	29.7	Muradian et al., 2005
Italia	Marche	28	Habluetzel et al., 2003
Paraguay	Asunción	53	Canese et al., 2003
Perú	Lurigancho	70.6	Castillo et al., 2001
Polonia		38-53	Mizgajska, 2001
Argentina	La Plata	13.2	Fonrouge et al., 2000
Argentina	Chubut	17.4	Zunino et al., 2000
Cuba	Habana	68.3	Laird et al., 2000
Chile	Santiago de Chile	33.3	Castillo et al., 2000
India	Chandigarh	4.16	Grover et al., 2000
México	D.F.	14.6	Martínez Barbosa, 1998
Egipto	El Cairo	30.3	Oteifa & Moustafa, 1997
México	D.F.	12.5	Vásquez-Tsuji et al., 1996
Cuba	Habana	42.2	Dumenigo & Galvez 1995
Alemania		87	Glickman, 1993
Reino Unido	Londres	66	Snow et al., 1987
Australia	Perth	0	Dunsmore et al., 1984

2.7.4 Prevalencia de huevos de *Toxocara* en el pelo de los perros

Recientemente se han encontrado huevos infectivos en el pelo de perros, lo que sugiere que el contacto directo con el pelaje de un perro contaminado podría ser una ruta adicional de transmisión (Devoy et al., 2010). Son pocos los reportes, pero, incluyen a varios países. Tabla 4.

Tabla 4. Prevalencia de huevos de *Toxocara* en el pelo de los perros

País	Región	Prevalencia (%)	Referencia
<i>Turquía</i>	Ankara	49	Ogë et al., 2013
<i>Irán</i>	Urmia	36.2	Tavassoli et al., 2012
<i>Egipto</i>	Kafrelsheikh	26.6	El-Tras et al., 2011
<i>Brasil</i>	Río Grande Do Sul	24	da Cunha et al., 2010
<i>Reino Unido</i>	Dublín	8.8	Devoy et al., 2010
<i>Irlanda</i>	Cork	67	Roddie et al., 2008
<i>Turquía</i>		21.56	Aydenizöz-Özkayhan et al., 2008
<i>Reino Unido</i>	Irlanda	25	Wolfe et al., 2003

2.8 Diagnóstico

2.8.1 En cánidos

El diagnóstico clínico en los perros jóvenes se puede establecer, en algunos casos, por el aspecto que presentan los animales (delgados y con abdomen protuberante). El diagnóstico etiológico se realiza mediante coproparasitoscópicos de concentración para la búsqueda de huevos. También es frecuente la expulsión espontánea de la fase adulta con las heces (Overgaauw et al., 2013).

2.8.2 En el humano

Debido a que el parásito queda restringido a su forma larvaria en el humano, no es posible utilizar métodos coproparasitológicos para detectar huevos en las heces (Roldán et al., 2010, Savigny et al., 2013).

La hepatoesplenomegalia asociada a signos y síntomas multisistémicos, así como antecedentes de geofagia, incrementan la posibilidad de LMV. Se sospecha de LMO cuando se presenta pérdida unilateral de la visión y estrabismo. En la fase aguda, el diagnóstico es extremadamente raro ya que es muy difícil que exista la sospecha de la infección, solo se puede encontrar eosinofilia, por lo que se puede catalogar como un asma bronquial. El diagnóstico clínico debe confirmarse con métodos serológicos, como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) o la inmunotransferencia, también conocida como Western blot (WB), los cuales se realizan con antígenos secretados por la larva de segundo estadio de *Toxocara canis* (TES) para determinar la presencia de anticuerpos IgG, IgG4 o IgE (Despommier, 2003, Breña et al., 2011).

Inmunológico:

En la Tabla 5 se muestran las diferentes técnicas utilizadas para el inmunodiagnóstico, la sensibilidad y especificidad, y si el antígeno que los diferentes autores utilizan reconoce antígenos de otros parásitos.

IgG TES-ELISA. En la actualidad es la prueba utilizada con mayor frecuencia para la detección de anticuerpos contra la larva. Sin embargo, un inconveniente es que puede dar reacción cruzada con otras helmintiasis como *ascariosis*, *triquinelosis*, *fasciolosis*, *estrongiloidosis* y *uncinariosis* (Iddawela et al., 2007, Ponce-Macotela et al., 2011, Roldán et al., 2010).

IgE TES-ELISA. Debido a que los pacientes con larva *migrans* presentan síntomas de alergia y un incremento en la concentración total de IgE sérica, se han desarrollado métodos inmunoenzimáticos para la detección de IgE específica contra TES. En general, el título de IgE es menor que el de IgG, pero al parecer la IgE es más específica que la IgG por no detectar muestras falso positivas. Es importante mencionar que la detección de IgG es más sensible y permanece detectable al menos por cuatro años, mientras que la IgE decrece durante el primer año de tratamiento (Ponce-Macotela et al., 2011).

ELISA-Avidez-IgG. Una prueba que aparece como promisoría en la determinación del estado infectivo del paciente es la de la prueba de Avidez-IgG, emplea urea como agente disociante de los complejos antígeno-anticuerpos. Se sabe que la avidéz de los anticuerpos aumenta con el tiempo después de la exposición al antígeno. Los anticuerpos de baja avidéz se relacionan con infecciones recientes, mientras que los de alta avidéz con infecciones pasadas o crónicas (Archelli et al., 2008, Dziemian et al., 2008).

Wester blot. Debido a las reacciones cruzadas con otros parásitos, varios autores recomiendan confirmar el resultado del ELISA con el Wester Blot (WB). Se ha documentado que los componentes de alto peso molecular de los antígenos TES contienen epítopes antigénicos de reacción cruzada con otros helmintos. Aunque

hay controversia, algunos autores dicen que los componentes de bajo peso molecular resultan ser más específicos (Roldán et al., 2010). Otros han mostrado que los componentes de alto peso molecular sólo reconocen antígenos de larvas de *T. canis*. (Rodríguez-Caballero et al., 2015).

ELISA para la detección de antígeno

Actualmente, larva *migrans* se diagnostica por métodos inmunológicos, que detectan anticuerpos contra antígenos de excreción-secreción. Sin embargo, este método tiene limitaciones, es decir, hay reactividad cruzada con antígenos de otros parásitos. Existen pocos informes que demuestren la captura de AgE /S L₂T. *canis*, como estrategia diagnóstica alternativa, pero con resultados variables. La captura de los antígenos circulantes favorece la detección de infección reciente y larva *migrans* activa. Tabla 6. (Rodríguez-Caballero et al., 2015; Rodríguez-Caballero et al., 2017).

Estudios de gabinete. Con el ultrasonido y la tomografía axial computarizada se pueden detectar lesiones granulomatosas y pueden ayudar a localizar el o las áreas afectadas. Por ejemplo, con el ultrasonido abdominal se observaron múltiples áreas hipoeoicas en el hígado de 14 niños con hepatomegalia, además de eosinofilia y serología positiva a *Toxocara* (Magnaval et al., 2001).

Otros estudios de laboratorio. En la biometría hemática hay leucocitosis con eosinofilia moderada o marcada (>500IU/ml). La eosinofilia y la hiperglobulinemia se ha asociado con LMV. En pacientes con LMO son ausentes; probablemente debido a la baja carga larvaria. Cuando el compromiso ocular es debido a una migración larval durante una infección generalizada, la eosinofilia en sangre está presente. En algunos pacientes con toxocariasis encubierta, la eosinofilia puede estar ausente (Fillaux et al., 2013).

Histopatología

El estudio histopatológico se realiza fundamentalmente en muestras de ojos enucleados. En ocasiones, en la forma ocular, la larva se puede observar debajo de la retina. Es difícil encontrar larvas en biopsias de hígado u otros órganos, además

la histopatología es una técnica invasiva; por lo tanto, los métodos inmunológicos son el pilar para el diagnóstico (Magnaval, et al., 2001, Breña et al. 2011).

Tabla 5. Técnicas para el inmunodiagnóstico de *larva migrans* y reacciones cruzadas

Referencia	Técnica S-E (%)	Reacción cruzada	Tipo de Ag
Zahabiun et al., 2015	WB S-57.4 E-94.4	No reportado	rTES-120
Yan et al., 2013	ELISA S-92.2 E-86.6	Anisakiasis, gnathostomiasis, clonorchiasis, spargonosis, cysticercosis	E/S
Mohamad et al., 2009	ELISA S- 93.3 E-96.2	Ascariasis, trichuriasis, anquilostomiasis, estrongiloidiosis, gnatostomiasis, entamoebosis, toxoplasmosis	rTES-26, rTES-30USM, rTES-120
Noordin et al., 2005	ELISA IgG S-97.1 E-36 ELISA IgG4 S-45.7 E-78.6	No reportado	E/S
Yokoi et al., 2002	Sandwich ELISA	No hay reacción cruzada	mAB
Yamasaki et al 2000	ELISA S-93 E-87	Filariasis, gnatostomosis, esquistosomiasis, paragonimiasis, fasciolosis, spargonosis	Recombinante 38 kDa
Nunes et al., 1999	ELISA S-60.2 E-98	No reportado	E/S
Yamasaki et al., 1998	WB	Anisakiasis, filariasis y <i>Toxocara cati</i>	38 kDa

Akao et al., 1997	<i>Toxocara</i> CHEK	Gnatosomosis, dilofilariasis, no probada para ascáridos	E/S
Gillespie et al., 1993	ELISA OD-405	Filariasis, esquistosomiasis, triquinosis fascioliasis	AcMo (Tcn-2)
Camargo et al., 1992	ELISA S-100 E-90.5 Dot-ELISA S-95.4 E-95.3	Esquistosomiasis, tripanosomiasis	E/S
Magnaival et al., 1992	ELISA S-81.3 E-53.8	Anisakiasis, hidatidosis, fasciolosis, filariasis, esquistosomiasis, estrongiloidiosis	E/S
Jacquier et al., 1991	ELISA S-91 E-86	Entamoebosis, fasciolosis, cisticercosis, estrongiloidiosis, triquinelosis, filariasis	E/S
Magnaival et al., 1991	WB	No reportado	E/S
Speiser et al., 1984	ELISA S-80 E-93	No reportado	E/S
Glickman et al., 1978	ELISA S-92 E-78.3	Ascariasis, hidatidosis, filariasis	E/S

2.9 Tratamiento

2.9.1 En cánidos

El tratamiento antiparasitario a los cachorros y la eliminación adecuada de la materia fecal de los caninos son esenciales para evitar la transmisión de la toxocariosis. La desparasitación de perros debe realizarse desde las 3 semanas de edad, repitiéndose tres veces con intervalos de 2 semanas y cada 6 meses.

Los fármacos utilizados son: las sales de piperizina, con dosis de 200mg/kg, y una efectividad del 100% contra los estadios adultos, pero no tienen acción en los estadios larvarios que se encuentran en los tejidos de las perras gestantes. El tetramisol en dosis de 10mg/kg por vía oral o subcutánea es efectivo en un 99%. (De la Fe et al., 2006). La aplicación de ivermectina durante la gestación, reduce la carga parasitaria de los cachorros en un 90% y el número de huevos expulsados al ambiente en un 99.8% (De la Fe et al., 2006).

2.9.2 En humanos

Se ha documentado que el albendazol (10mg/kg/día/5 días) fue efectivo en el 47% de los pacientes; el 60 por ciento de éstos se quejó de efectos secundarios menores (MagnaVal et al., 2001). Se sugiere la administración del fármaco después de la ingestión de los alimentos con alto contenido de lípidos para su mejor absorción (Bolívar-Mejía et al., 2013).

Con respecto al mebendazol el mejor esquema terapéutico fue de 20-25 mg/kg al día durante 3 semanas, lo que resultó en un 70 % de reducción en manifestaciones clínicas. Los efectos secundarios que consisten en debilidad, mareos, náuseas, dolor abdominal y gástrico fueron leves y se produjeron en el 17% de los individuos tratados (Bolívar-Mejía et al., 2013).

En pacientes con LMO, además del antiparasitario, se recomienda un antiinflamatorio esteroideo (Breña et al., 2011).

2.10 Prevención

Para evitar que los seres humanos se infecten con huevos o larvas de *T. canis* se deben establecer estrategias de prevención, dirigidas a eliminar las fuentes de infección. Sin embargo, la prevención se dificulta si los hospederos definitivos (cánidos) tienen acceso a lugares, en donde es factible el desarrollo de los huevos de *T. canis*, así como jardines y pisos de tierra con cierto grado de humedad y contaminación fecal, a la gran cantidad de perros callejeros, a que los dueños de mascotas que comúnmente los llevan a pasear a camellones, parques o jardines, no levanten o desechen adecuadamente la materia fecal.

Se proponen varias medidas de prevención:

- a) Desparasitación temprana de cachorros.
- b) Servicio médico veterinario.
- c) Recoger y eliminar apropiadamente las heces de los animales.
- d) Erradicar a los perros callejeros.
- e) Evitar la geofagia en niños.
- f) Lavar las verduras y frutas que se ingieren sin cocción.
- g) Cocción adecuada de la carne de bovinos y aves.
- h) Promover medidas higiénicas entre los adultos y los niños (por ejemplo, lavarse las manos antes de ingerir alimentos).
- e) No permitir que los niños jueguen en áreas donde los animales han defecado.

También es importante la educación a la comunidad acerca de esta zoonosis, sus riesgos y medidas preventivas, ya que existe un escaso conocimiento acerca de la toxocariosis, por lo cual desarrollamos un folleto como material educativo (Anexo 5).

2.11 Asma

Por definición del Global Initiative for Asthma (GINA), el asma es una enfermedad heterogénea, usualmente caracterizada por una inflamación crónica de las vías aéreas.

El asma es una enfermedad respiratoria crónica común, que afecta 1-18% de la población en diferentes países. Se caracteriza por síntomas variables de sibilancias, falta de aliento, opresión torácica, tos y limitación variable del flujo de aire espiratorio. Dichos síntomas y la limitación del flujo de aire varían según el tiempo y la intensidad. Estas variaciones a menudo se activan por factores como el ejercicio, exposición alérgica o irritante, cambio de clima o infecciones respiratorias virales. Los síntomas y la limitación del flujo de aire pueden resolverse espontáneamente o en respuesta a la medicación y algunas veces pueden estar ausentes durante semanas o meses. Por otro lado, los pacientes pueden experimentar episodios de asma que pueden ser mortales.

El asma generalmente se asocia con la hiperreactividad de las vías respiratorias, a los estímulos directos e indirectos y con la inflamación crónica de las vías respiratorias; estas características generalmente persisten, incluso cuando los síntomas están ausentes o la función pulmonar es normal, pero puede normalizarse con el tratamiento.

Esta enfermedad tiene un gran impacto económico en los gobiernos, sector salud, familia y pacientes que la padecen (Tan et al., 2009). En 1989 se inició el programa “Global Initiative for Asthma” (GINA) para alertar a gobiernos, personal de salud y público en general del incremento del asma y recomienda un manejo con solidez científica para el cuidado médico efectivo del asma (Masoli et al., 2004).

Mediante el análisis de literatura primaria publicada a través del International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) y the European Community Respiratory Health Survey (ECHRS) se encontró: que la prevalencia en México fue del 3.3% (datos obtenidos de los cuestionarios realizados a niños de 13 a 14 años de edad, quienes presentaron sibilancias en un periodo de 12 meses). El acceso a

tratamiento fue del 50 al 80% y la mortalidad por asma fue del 14.5% por cada 100,000 asmáticos (Masoli et al, 2004).

López et al (2009) reportaron una frecuencia del 14.9% de asma al analizar 4742 pacientes (población abierta), de todas las edades, de las diferentes delegaciones del distrito federal y con enfermedad alérgica.

El diagnóstico de asma se basa en la historia clínica, biometría hemática y examen físico para probar si hay obstrucción de vías aéreas; la espirometría se utiliza para saber si es reversible y considerar otros factores que producen obstrucción (Pérez, 2009) Tabla 6.

En el asma hay una respuesta de hipersensibilidad inmediata (tipo I), la unión del alérgeno-IgE-célula cebada produce la liberación de aminas activas: histamina, prostaglandinas, leucotrienos y factor activador de plaquetas que producen broncoespasmo. La migración de las larvas de *T. canis* por aparato respiratorio produce una respuesta de hipersensibilidad inmediata. En pacientes con larva *migrans* la detección de IgE específica puede ser de valor para apoyar el diagnóstico (Platts-Mills, 2001).

Tabla 6. Características para definir a las diferentes gravedades del asma y la larva *migrans* aguda, activa o crónica

Variable	Definición operacional
PEF (FEM) Flujo espiratorio máximo	Obtenido por espirometría
FEV (VEF) Volumen espiratorio forzado	Obtenido por espirometría
Gravedad de asma	<p>Asma leve se considera cuando: Síntomas al día 2-6/semana. Síntomas nocturnos 3-4/mes. Función pulmonar. PEF o FEV \geq 80%. Variabilidad PEF 20-30%</p> <p>Asma moderada se considera cuando: Síntomas diarios. Síntomas nocturnos \geq5/mes. Función pulmonar. PEF o FEV >60%- <80%. Variabilidad PEF >30%</p> <p>Asma severa se considera cuando: Síntomas continuos en el día Síntomas nocturnos frecuentes. Función pulmonar. PEF o FEV \leq 60%. Variabilidad PEF >30%</p>
Larva migrans	<p>Aguda: Larva migrando por tejidos y detección de antígenos por métodos inmunológicos.</p> <p>Activa: Larva migrando por tejidos y detección de antígenos y anticuerpos anti-larvas por métodos inmunológicos</p> <p>Crónica: Larva se encuentra o se encontraba en tejidos y se detectan anticuerpos anti-larvas por métodos inmunológicos</p>

3 JUSTIFICACIÓN

Toxocara canis es un geohelminto zoonótico, que al ser humano le causa *larva migrans* visceral, y cuando la larva migra por vías respiratorias le produce un cuadro clínico semejante al asma. La infección es más frecuente en la población infantil, por sus hábitos de juego o por geofagia. La inmunodetección de *larva migrans* se realiza con kits comerciales que detectan anticuerpos anti-*T. canis*, pero dan reacciones cruzadas con otras helmintiasis, no detectan el estatus de la infección y además son costosos. El grupo de trabajo del Laboratorio de Parasitología Experimental obtuvo un anticuerpo monoclonal que se puede emplear para la captura de antígeno. Es necesario implementar estas herramientas para el inmunodiagnóstico de *larva migrans* en pacientes con diferente gravedad de asma.

4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre la detección de anticuerpos anti-*T. canis* y concentración de antígenos con la gravedad del asma en pacientes pediátricos?

5 OBJETIVO PRINCIPAL

Demostrar si hay asociación entre la seroreactividad a *Toxocara canis* con la gravedad del asma.

6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar el ELISA para la captura de antígeno de larvas de *T. canis*.
- Estandarizar el ELISA para la captura de anticuerpos anti-*T. canis*.
- Realizar los ELISA para la detección de antígenos y anticuerpos en pacientes pediátricos con asma.
- Descartar reacciones cruzadas con *Ascaris suum*.
- Determinar el índice de avidez.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Estrategia.

El flujograma para la obtención de los antígenos, detección de asma y pruebas inmunológicas se muestran en la Fig. 7.

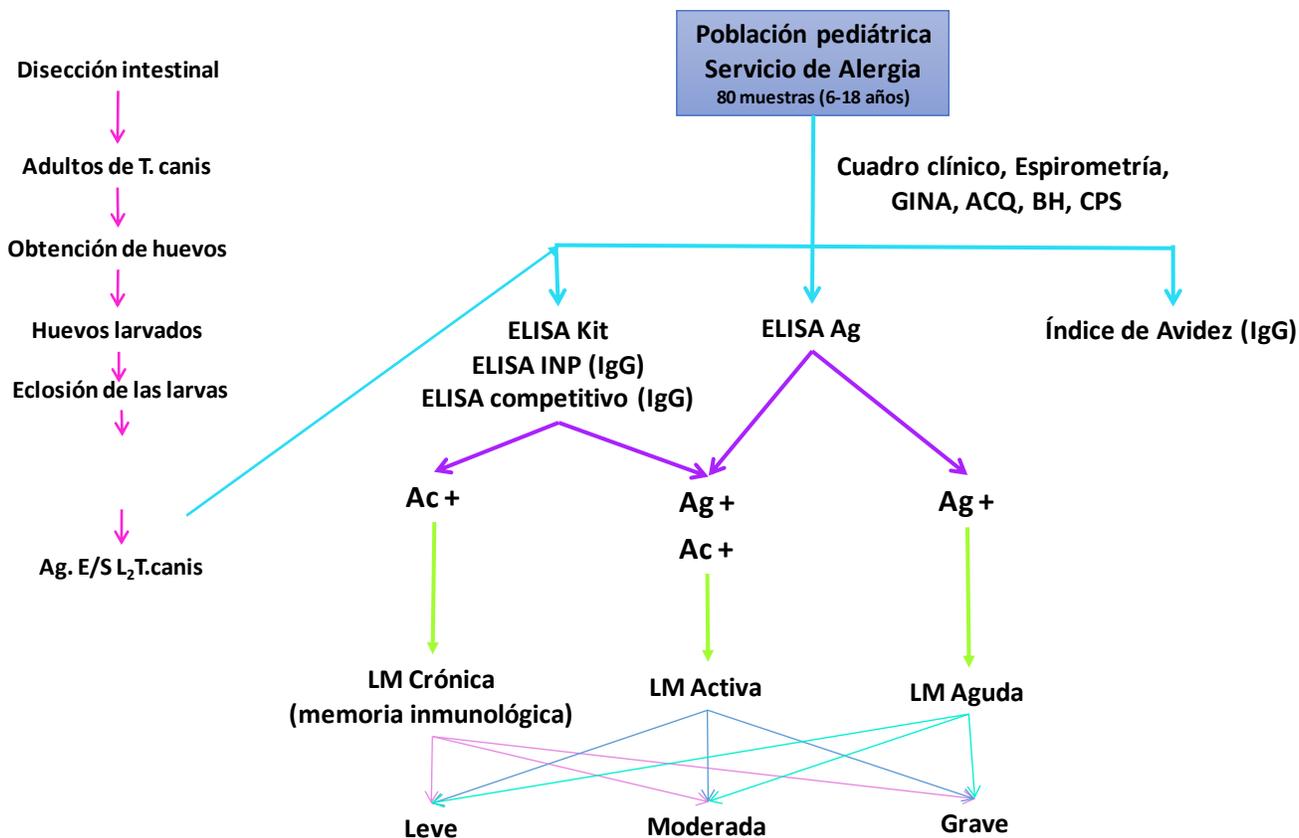


Figura 7. Diagrama que muestra la estrategia que se llevó a cabo para cumplir con el objetivo

7.2 Diseño del estudio

El presente estudio fue prospectivo, transversal, descriptivo y observacional.

7.3 Población objetivo

Niños entre 6 y 18 años de edad con diagnóstico de asma, atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría.

7.4 Criterios de selección

Criterios de inclusión:

- Niños mayores de 6 a 18 años de edad
- Cualquier sexo
- Con diagnóstico de asma (por criterios clínicos y por la prueba de espirometría)

Criterios de exclusión:

- Pacientes con retraso mental o cualquier trastorno de conducta que impida llevar a cabo la espirometría
- Pacientes con padecimientos oncológicos, inmunodeficiencias, infecciones de vías aéreas de al menos una semana de evolución

Criterios de eliminación:

- Pacientes en los que no se obtengan todos los estudios requeridos para este protocolo (biometría hemática, espirometría, ELISA para captura de antígeno, de anticuerpos)

7.5 Obtención del material biológico

7.5.1 Obtención de adultos de *Toxocara canis*

Del centro de control canino de Ecatepec se obtuvo el intestino delgado de perros cachorros (0-4 meses de edad), que fueron objeto de eutanasia. El intestino de cada perro se colocó en un recipiente con solución amortiguada de fosfatos (PBS) (Anexo 4) y se transportaron al Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría. Se realizó una disección longitudinal del intestino, los nematodos adultos se colectaron y se depositaron en un vaso deprecipitado con solución salina isotónica (SSI, NaCl 0.9%). Bajo un ambiente estéril (campana de flujo laminar) los nematodos se lavaron con formol al 0.1% en PBS estéril.

7.5.2 Obtención de huevos larvados

Las hembras adultas de *T. canis*, se mantuvieron en medio de cultivo SGPH (PBS con plasma humano al 10%, sacarosa al 2% y antibióticos) durante varios días, pasado el tiempo se colectó el medio y se obtuvo la fase infectante (huevos con larva de segundo estadio). Los huevos que se recolectaron se incubaron a temperatura ambiente durante tres semanas (Rodríguez-Caballero et al., 2007).

7.5.3 Eclosión de larvas de segundo estadio

Los huevos larvados se concentraron por centrifugación y se decortizaron con hipoclorito de sodio (NaClO al 2%) durante 10 minutos en agitación. Se lavaron con PBS estéril, se centrifugaron y colocaron en solución salina balanceada de Hanks (SSBH) pH 2.0 a 37 °C/30 min. (Anexo 4). El sobrenadante se decantó y la muestra

se amortiguó con SSBH pH 7.4, se le agregó el medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, 21870076) y se incubó a 37°C toda la noche.

Para separar a las larvas vivas del detritus y larvas muertas, se utilizó un gradiente de densidad (Lymphoprep). En un tubo se agregaron 3.0 ml de Lymphoprep y 4.0 ml del medio con larvas, se centrifugó a 1400 rpm durante 30 min. y bajo la campana de flujo laminar, se decantó, dejando solo el concentrado de larvas, a éstas se le agregó el medio RPMI-1640 (GIBCO®, 21870076) y se incubó a 37°C (Ponce-Macotela et al., 2011).

7.5.4 Recuperación de antígeno de E/S de larvas de *T. canis*.

Las larvas se mantuvieron en medio de cultivo RPMI en condiciones estériles, a 37°C en ambiente de CO₂. El medio se recolectó semanalmente, se le adicionaron inhibidores de proteasas (Proteinase Inhibitor Cocktail P2714 Sigma-Aldric®) y se almacenó a -70°C hasta su uso. Posteriormente para concentrar el antígeno, se utilizaron columnas (AMICON®), con diámetro de poro que deja pasar proteínas de menos de 30 kilodaltones. El medio de cultivo con el antígeno se colocó en las columnas y se centrifugó a 4500 rpm por 10 min. a 4°C, el procedimiento se repitió hasta terminar todo el sobrenadante. Para precipitar el antígeno, se agregó acetona a -20°C y se centrifugó a 12,000rpm/4°C durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y se agregó PBS estéril e inhibidores de proteasas, se almacenó en alícuotas a -70°C hasta su uso.

7.5.5 Obtención de sueros

Las cartas de consentimiento informado y de asentimiento (Anexo 1.), la historia clínica, las espirometrias (Anexo 3), la toma de dos muestras de sangre (3.0 ml) para la biometría hemática y para los ELISA, y las muestras de heces para los coproparasitoscópicos (CPS) fueron obtenidas por la Pasante de Medicina Alma L.

Chávez Zea (Servicio Social), la Dra. Sandra G. Bautista y el Dr. Alvaro Pedroza del Servicio de Alergia.

7.6 ELISA indirecta

Para realizar el ELISA indirecto se realizó la estandarización de: dilución óptima de α IgG-Humano; concentración de Ag E/S de *T. canis* y dilución de suero humano.

7.6.1 Titulación de α IgG-Humano(HRP)

Los pozos de la placa de poliestireno (3370 Corning ®) se sensibilizaron con 100 μ l de suero humano (negativo a Ag E/S *L₂T. canis*), diluido (1:500) en solución amortiguadora de carbonatos, pH 9.6. La placa se mantuvo a 4°C durante toda la noche. Se lavó tres veces (SL I) durante 5 minutos en cada lavada, posteriormente se agregaron 200 μ l de solución de bloqueo I, y la placa se incubó a 37°C durante 30 min. Después de lavarla, a cada pozo se le agregaron 100 μ l de diferentes diluciones (1:162.5, 1:325, 1:750, 1:1500, 1:3000, 1:6000, 1:12000) de α IgG-Humano HRP (EDM Millipore Corp., USA®) y se incubó una hora a 37°C. Se lavó (SLI), a cada pozo se le agregaron 100 μ l de solución de cromógeno y se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente en la obscuridad.

La reacción se detuvo con 100 μ l/pozo de ácido sulfúrico 2N. La placa se leyó en un espectrofotómetro a 490nm (ModulusMicroplateMultimode Reader 9300-010 Turner Biosystems). Se realizó la curva de titulación y se obtuvo la dilución a emplear. Se realizaron 3 ensayos por duplicado.

7.6.2 Titulación para la obtención de la dilución de suero humano y concentración de antígeno de excreciones–secreciones de larvas de segundo estadio de *Toxocara canis* (Ag E/SL₂T. *canis*).

Los pozos de la placa de poliestireno (3370 Corning®) se sensibilizaron con 0.5µg/ml, 1.0µg/ml ó 1.5µg/ml de Ag E/S L₂T. *canis*, diluido en amortiguador de carbonatos pH 9.6. La placa se incubó a 4°C durante una noche. Se lavó (SL I), los sitios inespecíficos se bloquearon agregando a cada pozo 200µl de solución de bloqueo I, y se incubó 30 min. a 37°C. Se lavó, a cada pozo se le agregaron 100µl de (1:16, 1:32, 1:64) de suero humano positivo y negativo, y se incubó durante una hora a 37°C. Se lavó (SL I), se agregaron 100µl de α IgG-HumanoHRP (EDM Millipore Corp., USA ®) diluida en PBS Tween 20 (1:750) y se incubó una hora a 37°C. Se lavó (SL I), se agregaron 100µl/pozo de solución de cromógeno y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. en oscuridad. La reacción se paró con 100µl/pozo de ácido sulfúrico 2N. La placa se leyó en un espectrofotómetro (Modulus Microplate Multimode Reader 9300-010 Turner Biosystems) a 490nm.

Se realizó la curva de titulación y se obtuvo la concentración de Ag E/S de *T. canis* y la dilución de suero a emplear. Se realizaron 2 ensayos por duplicado. El valor de corte se obtuvo con el promedio de las absorbancias del suero negativo de 3 ensayos por duplicado más 3 veces su desviación estándar.

7.6.3 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos (IgG) en pacientes pediátricos con asma

Los pozos de la placa de poliestireno (3370 Corning®) se sensibilizaron con 0.5µg/ml del AgE/S L₂T. *canis*, diluido en amortiguador de carbonatos pH 9.6, la placa se incubó a 4°C durante una noche. Se lavó tres veces (SL I) durante 5 min. en cada lavada, a cada pozo se le agregaron 200µl de solución de bloqueo I y se incubó a

37°C por 30 min. Se lavó (SL I), se agregaron 100µl/pozo de cada uno de los 80 sueros de los pacientes pediátricos con asma, diluidos 1:64 en PBS estéril y se incubaron durante una hora a 37°C. Se lavó (SL I), se adicionaron 100µl del conjugado α IgG-Humano HRP (EDM Millipore Corp., USA ®) diluido 1:750 en PBS Tween 20, se incubó una hora a 37°C. Se lavó (SL I), se agregaron 100µl/pozo de solución de cromógeno y se incubó a temperatura ambiente y oscuridad durante 15 min. La reacción se detuvo con 100µl/pozo de ácido sulfúrico 2N. La placa se leyó en un espectrofotómetro (ModulusMicroplateMultimode Reader 9300010 Turner Biosystems) a 490nm. El ensayo se realizó por duplicado y se incluyeron los controles negativo y positivo.

7.6.4 ELISA con Kit comercial

Adicional al ELISA indirecto que se describió anteriormente, los sueros de los 80 pacientes pediátricos con asma también se probaron con el ELISA del Kit comercial (*Toxocara* IgG DIAGMEX® S.A. de C.V.), que detecta IgG contra antígenos de larvas de *T. canis*. Se siguió el procedimiento descrito por el Kit, que tiene una especificidad y sensibilidad del 100%. Su valor de corte es de 0.3.

7.7 ELISA directo para la detección de Ag E/S *L2T. canis* con un anticuerpo monoclonal (G4C12MoAc)

7.7.1 ELISA para la obtención de la curva de titulación del conjugado

Para obtener la curva de titulación de la α IgG-Ratón HRP (ZYMED ® Laboratories), los pozos de la placa de poliestireno (3370 Corning®) se sensibilizaron con 100µl/pozo (10µg/ml) del G4C12MoAc en amortiguador de carbonatos, la placa se incubó una hora a 37°C. Se lavó (SL II). Los sitios inespecíficos se bloquearon con 200µl de solución de bloqueo II y se incubó durante 30 min./37°C. Se lavó (SL II), se

agregaron 100µl/pozo del conjugado (1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000 ó 1:16000) en amortiguador de dilución y se incubó durante 2 h/37°C. Se lavó (SL II), se añadieron 100µl/pozo de cromógeno y se incubó 15 min./37°C, la reacción se paró con 100µl/pozo de ácido sulfúrico 2N. La placa se leyó en un espectrofotómetro (Modulus Microplate Multimode Reader 9300010 Turner Biosystems) a 490nm. El ensayo se realizó por duplicado.

7.7.2 ELISA para obtener la curva de titulación del AgE/SL₂T. *canis*

Se utilizaron las concentraciones de anticuerpo policlonal (AcPo) y anticuerpo monoclonal (G4C12AcMo) reportadas por Rodríguez-Caballero et al., 2015.

Los pozos de la placa de poliestireno (3370 Corning®) se sensibilizaron con 100µl/pozo (5µg/ml) del AcPo de conejo, diluido en buffer de boratos pH 8 y se incubó a 4°C durante toda la noche. Se lavó 3 veces (SL II), cada lavado de 5 min. Los sitios inespecíficos se bloquearon con 200µl de solución de bloqueo II y se incubó durante 30 min./37°C. Se lavó (SL II), se añadieron 100µl/pozo (10 µg/ml, 1.0 µg/ml, 0.1µg/ml, 0.01µg/ml ó 0.001µg/ml) del AgE/S L₂T. *canis* y se incubó 2 horas a 37°C. Se lavó (SL II), se agregaron 100µl/pozo (10 µg/ml) del G4C12AcMo (Rodríguez-Caballero et al., 2015) en amortiguador de dilución, se incubó 2 h/37°C. Se lavó (SL II), se agregaron 100µl/pozo del conjugado (α IgG-ratón HRP) a una dilución de 1:500 en amortiguador de dilución, se incubó 2 h/37°C. Se lavó (SL II), se añadieron 100µl/pozo del cromógeno, se incubó 15 min./37°C, la reacción se detuvo con 100µl/pozo de ácido sulfúrico 2N. La placa se leyó en un espectrofotómetro (Modulus Microplate Multimode Reader 9300010 Turner Biosystems) a 490nm. El ensayo se realizó por duplicado.

7.7.3 ELISA directo para la detección de Ag E/S *L2T. canis*

Los pozos de la placa de poliestireno (3370 Corning®) se sensibilizaron con 100µl/pozo (5.0 µg/ml) de AcPo diluido en amortiguador de boratos pH 8 y la placa se incubó toda la noche a 4°C. Se lavó 3 veces (SL II), cada lavado de 5 min., los sitios inespecíficos se bloquearon con 200µl de solución de bloqueo II incubando durante 30 min./37°C, posteriormente se lavó (SL II).

Para romper los complejos inmunes, los sueros de los pacientes se trataron con EDTA 0.1M pH 7.5 (1:1), y se incubaron en baño maría durante 10 min., posteriormente se centrifugaron durante 10 min./13000 rpm. En cada pozo se añadieron 100µl del sobrenadante de cada suero tratado y la placa se incubó 2h/37°C. Se lavó (SL II), se agregaron 100µl/pozo (10µg/ml) de G4C12AcMo en amortiguador de dilución y se incubó durante 2 h/37°C. Se lavó (SL II), se agregaron 100µl/pozo del conjugado (α IgG-ratón HRP) a una dilución de 1:500 en amortiguador de dilución, se incubó 2h/37°C. Se lavó (SL II), se añadieron 100µl/pozo del cromógeno y se incubó durante 15min./37°C. La reacción se detuvo con 100µl/pozo de ácido sulfúrico 2N. La placa se leyó en un espectrofotómetro (Modulus Microplate Multimode Reader 9300010 Turner Biosystems) a 490nm. El ensayo se realizó por duplicado.

7.8 ELISA competitivo, adsorción de los sueros de los pacientes con antígeno de *Ascaris suum* (reacción cruzada)

Los pozos de la placa de poliestireno (3370 Corning®) se sensibilizaron con 0.5µg/ml del Ag E/SL₂T. *canis* diluido en buffer de carbonatos 0.1M pH 9.6, se incubaron a 4°C toda la noche. Se lavaron tres veces (SL I), cada lavado de 5 min. Los sitios inespecíficos se bloquearon con 200µl de solución de bloqueo I, se incubaron 30min./37°C y se lavaron (SL I).

Con la finalidad de que los anticuerpos afines al antígeno de *Ascaris suum* se unieran y dejaran disponibles a los anticuerpos específicos al Ag E/S *L2T. canis*, los sueros (diluidos 1:64) de los pacientes se adsorbieron con 1µg/ml antígeno somático de *A. suum* en PBS estéril y se incubaron durante 2 h/37°C.

A cada pozo se le agregaron 100µl de cada suero tratado, se incubaron durante 1h/37°C y se lavaron (SL I). Se adicionaron 100µl/pozo del conjugado (α IgG-Humano) 1:750 en PBS Tween 20, se incubaron durante 1h/37°C y se lavaron (SL I). Se agregaron 100µl/pozo del cromógeno, se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente en obscuridad. La reacción se detuvo con 100 µl/pozo de ácido sulfúrico 2N. La placa se leyó en un espectrofotómetro (Modulus Microplate Multimode Reader 9300010 Turner Biosystems) a 490nm. Se realizaron 3 ensayos por duplicado. Se incluyó el control positivo y negativo.

7.9 ELISA para determinar el índice de avidéz

A los sueros de los pacientes, que tuvieron IgG positiva, se les determinó el índice de avidéz.

Los pozos de poliestireno de dos placas (3370 Corning®) se sensibilizaron con 100µl/pozo (0.5 µg/ml) de Ag E/S *L2T. canis* en amortiguador de carbonatos pH 9.6 y se incubaron toda la noche a 4°C. Se lavaron tres veces (SL I), cada lavado de 5 min. Los sitios inespecíficos se bloquearon con 200µl/pozo de solución de bloqueo I, se incubaron 30min./37°C y se lavaron (SL I). Se agregaron 100µl/pozo de los sueros positivos, diluidos 1:64 en PBS Tween 20 y se incubaron durante 1 h/37°C.

A una placa se le realizaron tres lavados con SL III y uno más con SL I, cada lavado de 5 min. La otra placa se lavó cuatro veces (SL I). A los pozos de las dos placas se les agregó 100µl/pozo del conjugado α IgG-Humano (EDM Millipore Corp., USA ®) a una dilución de 1:750 en PBS Tween 20, se incubaron durante 1 h/37°C, se lavaron (SL I). Se les agregaron 100µl/pozo de cromógeno y se incubaron durante 15 min. en obscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se les agregó 100µl/pozo de

ácido sulfúrico 2N para detener la reacción. La placa se leyó en un espectrofotómetro (Modulus Microplate Multimode Reader 9300010 Turner Biosystems) a 490nm. Se realizaron 2 ensayos por duplicado.

Para determinar el índice de avidéz se dividió la absorbancia media de los pozos tratados con la solución de urea entre la absorbancia media de los pozos sin tratamiento con urea, multiplicado por 100. Los índices de hasta 50% se consideraron como indicadores de la presencia de IgG de baja avidéz (infección reciente) y por arriba del 50%, IgG de alta avidéz por lo tanto infección antigua.

8 RESULTADOS

8.1 Obtención de la fase adulta, huevos larvados y larvas de *T. canis*

Del centro de control canino de Ecatepec se obtuvieron 8 intestinos de perros cachorros eutanatizados, de donde se extrajeron los adultos de *T. canis* (Fig. 8). Después de tres semanas de la oviposición se observaron huevos larvados (Fig. 9).

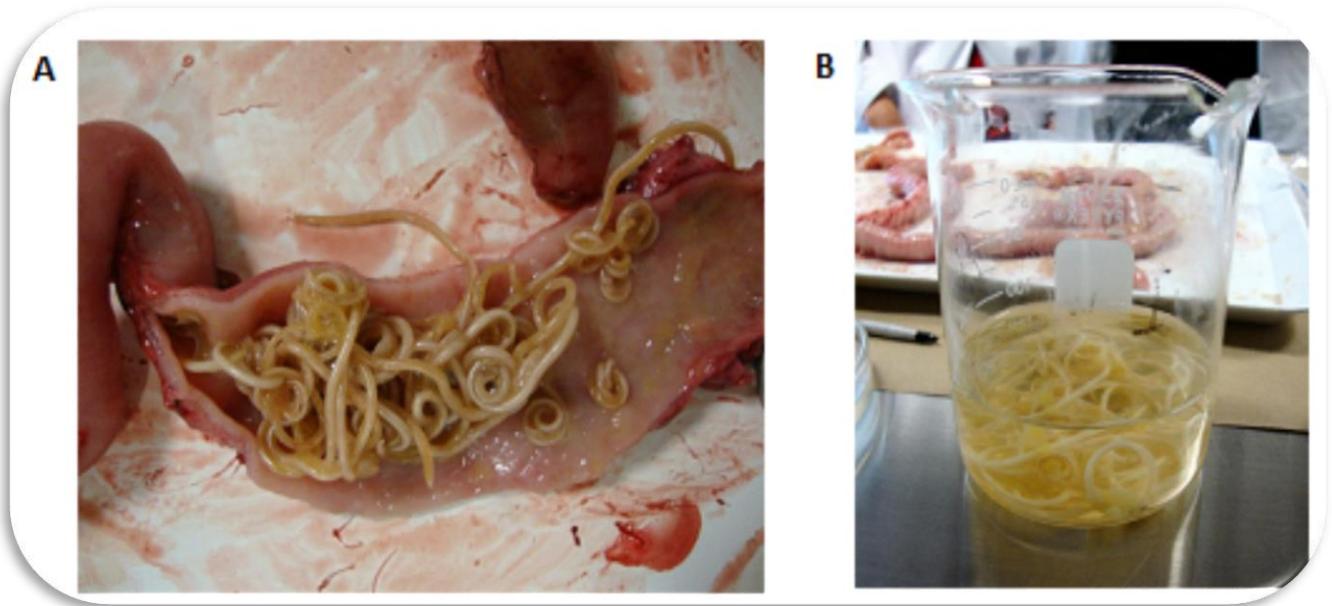


Figura 8. Adultos de *T. canis*. A) Disección longitudinal del intestino, se observan varios adultos de *T. canis*. B) Adultos de *T. canis* en Solución Salina Isotónica (SSI, NaCl 0.9%)

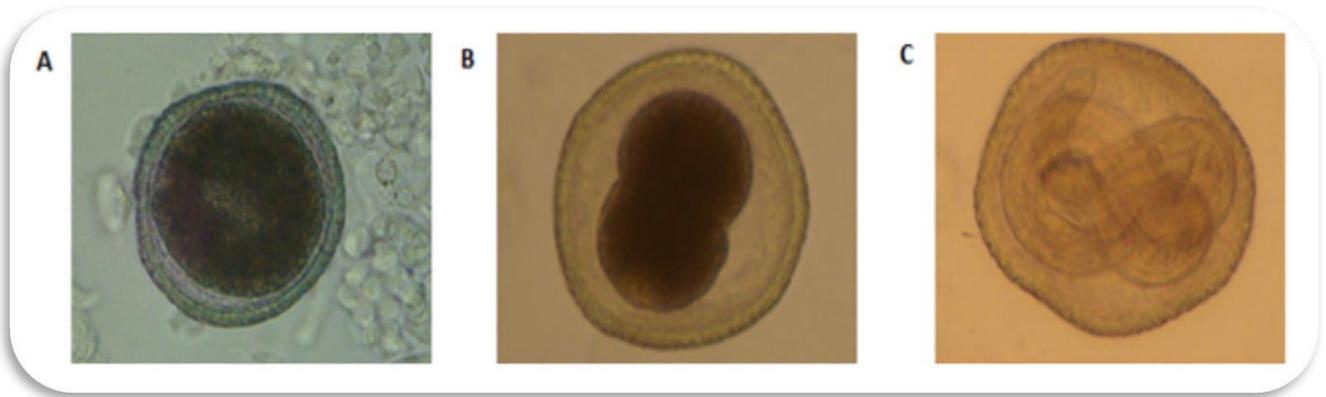


Figura 9. Huevos de *T. canis*. A) Huevo obtenido de una muestra del intestino delgado de un cachorro B) Huevo con dos blastomeros y C) Huevo larvado

Para la eclosión de las larvas de *T. canis* se siguió el protocolo descrito por Ponce-Macotela et al. (2011). Las larvas en medio RPMI-1640 (GIBCO®, 21870076) se utilizaron para la obtención de antígenos de excreción-secreción (Fig. 10).

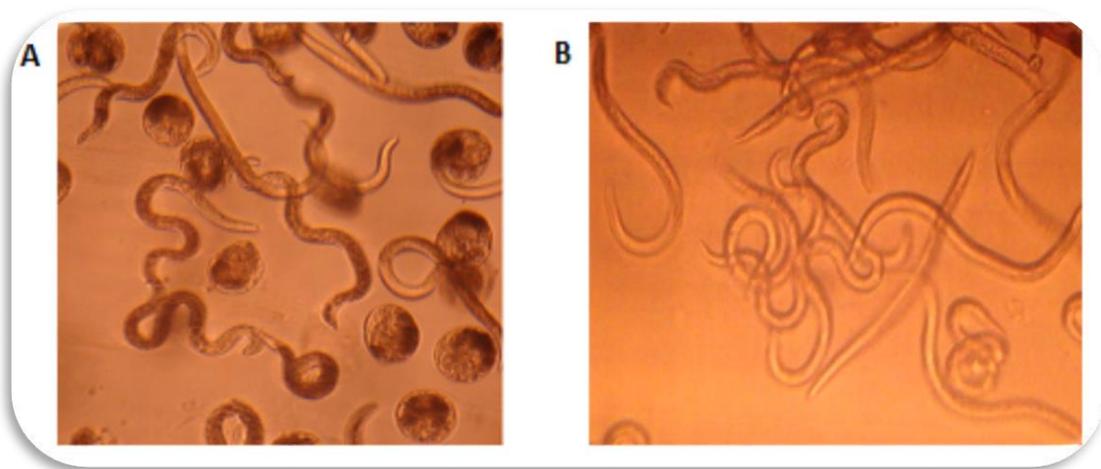


Figura 10. Huevos larvados activados para la eclosión. A) Huevos larvados, larvas recién eclosionados, larvas vivas y muertas. B) Larvas vivas en medio RPMI-1640 (GIBCO®, 21870076) axénico.

8.2 ELISA para la detección de anticuerpos anti-*T. canis*.

8.2.1 ELISA indirecta

8.2.1.1 Titulación de α IgG-Humano (HRP)

Se realizó el ELISA indirecto para determinar la dilución óptima del conjugado. El punto en donde la pendiente inició el descenso fue con la dilución 1:750. Ésta se utilizó para continuar con la estandarización (Fig. 11).

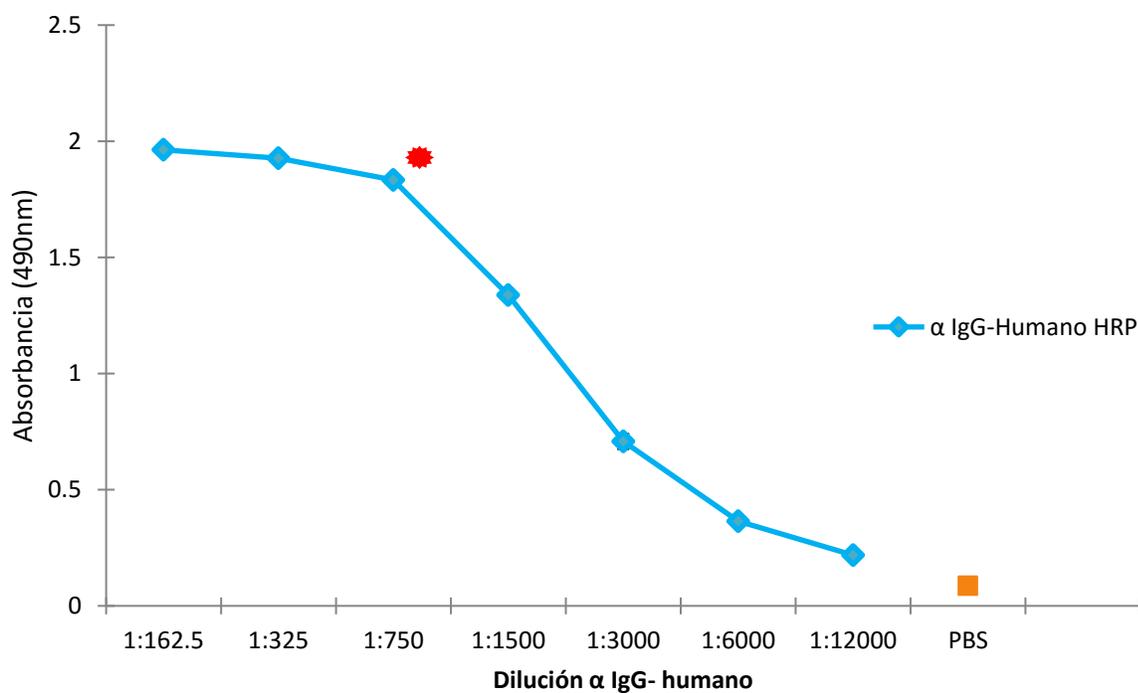


Figura 11. Titulación de α IgG-Humano (HRP). PBS control negativo. ● Dilución elegida.

8.2.1.2 Titulación para la obtención de la dilución del suero humano y la concentración del AgE/SL₂T. canis.

Con 0.5µg/ml, 1µg/ml y 1.5µg/ml del antígeno; las diluciones 1:16, 1:32, 1:64 de los sueros (control positivo y negativo) y una dilución 1:750 del conjugado (α IgG-Humano HRP, EDM Millipore Corp., USA ®), se obtuvo la concentración de antígeno y dilución de suero a emplear (Fig. 12). El valor de corte se obtuvo con el promedio de las absorbancias del suero negativo de los 3 ensayos por duplicado más 3 veces su desviación estándar.

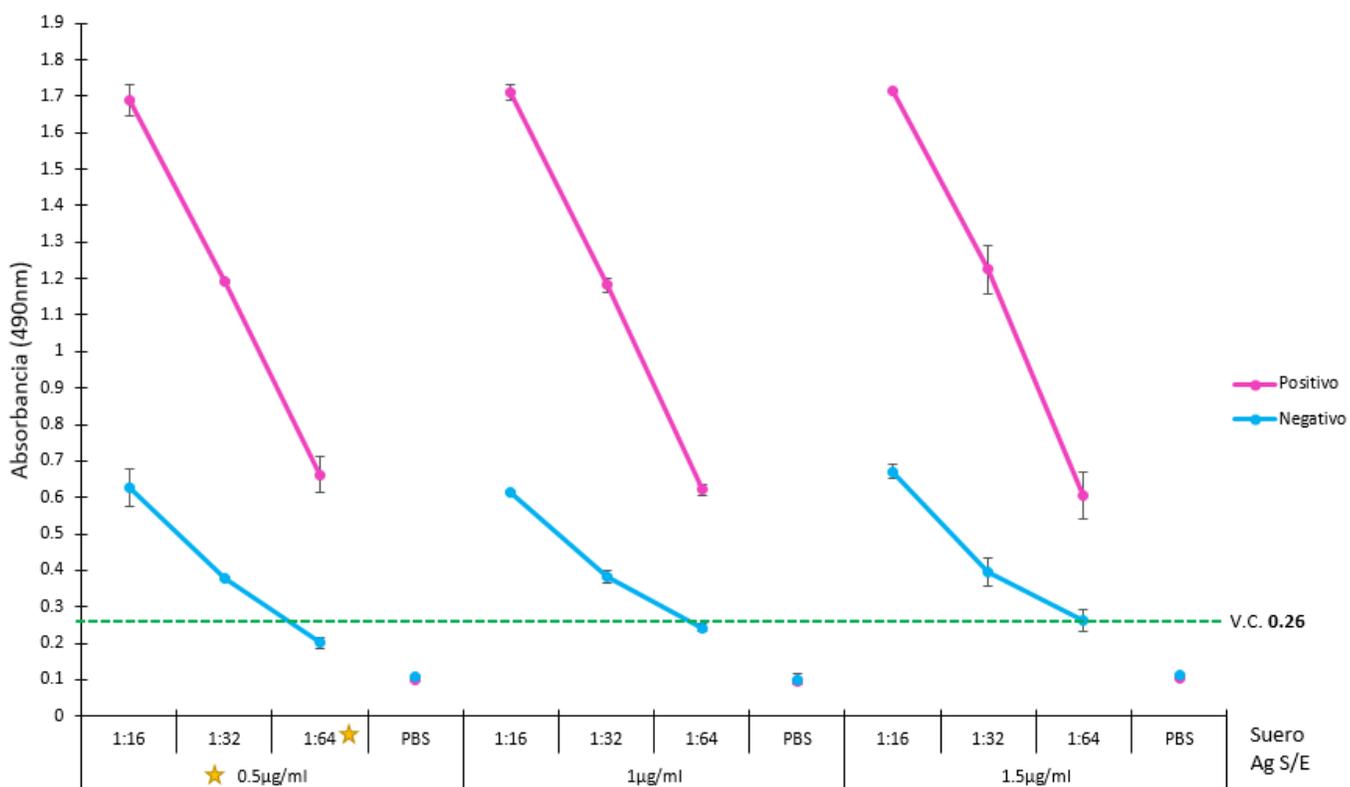


Figura 12. Titulación de la concentración de Ag E/S L₂T. canis y dilución del suero.

★ Dilución de suero y concentración de antígeno elegidos. PBS control negativo.

8.2.2 ELISA INP y ELISA Kit para la detección de anticuerpos anti-*T. canis* en pacientes pediátricos con asma.

Con una concentración de 0.5µg/ml de AgE/SL₂*T. canis* y una dilución de 1:64 de los sueros, se realizó el ELISA INP para la detección de anticuerpos anti-*T. canis*. Se probaron 80 sueros por duplicado y se incluyó el control positivo y negativo. El valor de corte fue de 0.26. En el ELISA del KIT comercial el valor de corte fue de 0.3.

De los 80 sueros, para el ELISA INP se detectaron anticuerpos anti-*T. canis* en 20 sueros, determinándose una frecuencia del 25%, mientras que con el ELISA del KIT comercial se detectaron en solo 2 sueros, que representa una frecuencia del 2.32% (Fig. 13).

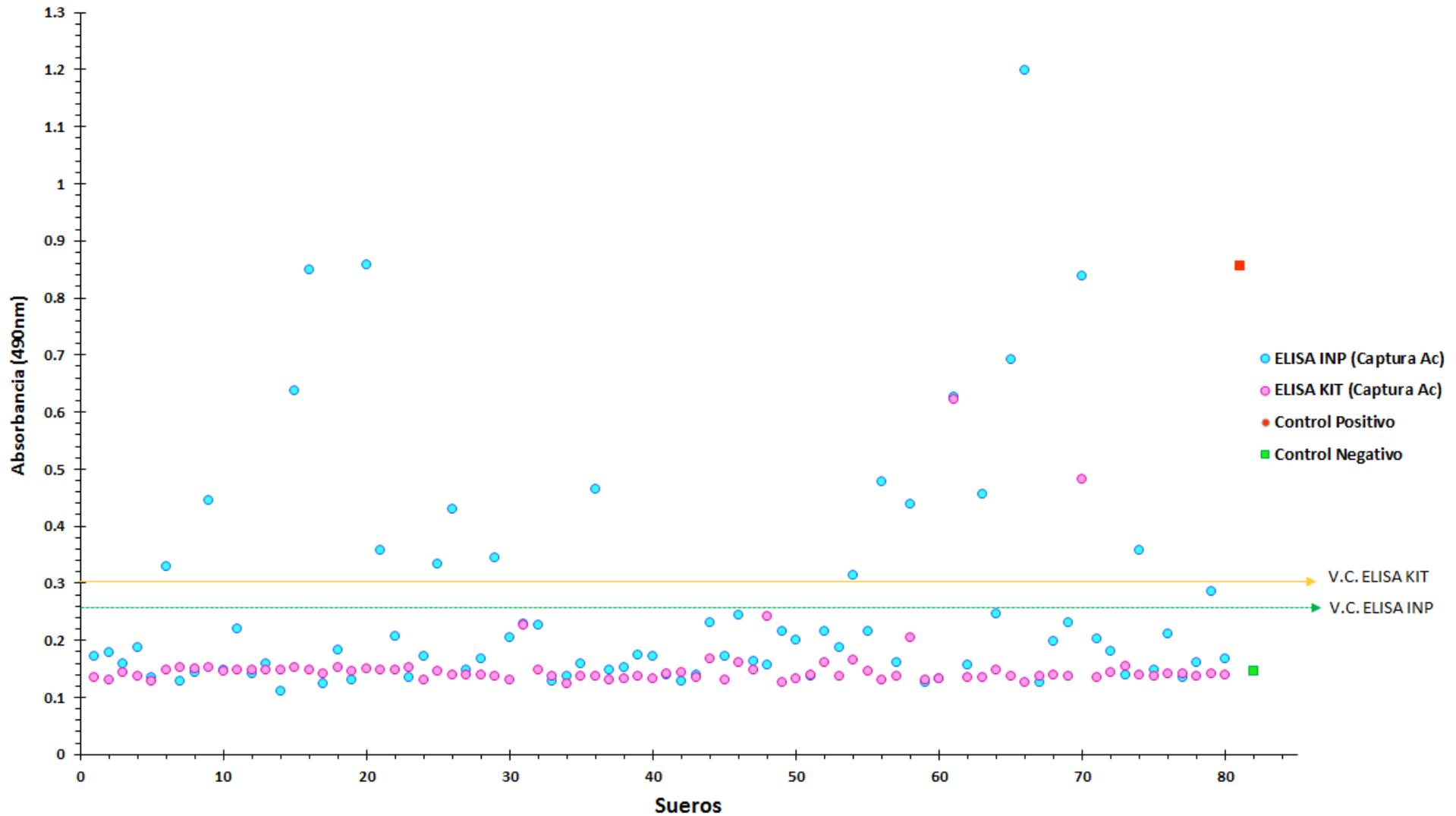


Figura 13. Distribución de las absorbancias promedio de los sueros de pacientes pediátricos con asma. En azul; absorbancias promedio con ELISA INP, en donde se utilizaron $0.5\mu\text{g/ml}$ del Ag E/S *L2T. canis*, 1:750 de dilución de α IgG-Humano HRP y 1:64 de dilución de suero. Control positivo rojo, control negativo verde. En rosa se muestran las absorbancias con ELISA KIT. Valor de corte ELISA INP 0.26 (línea verde), valor de corte ELISA KIT 0.3 (línea amarilla).

8.3 ELISA directo para la detección de Ag E/SL₂T. canis

8.3.1 ELISA para la obtención de la curva de titulación del conjugado

Se realizó el ELISA directo para estimar la dilución óptima a emplear del conjugado (α IgG-Ratón HRP, ZYMED ® Laboratories). El punto en donde la pendiente inició el descenso fue con la dilución 1:500, ésta se utilizó para continuar con la estandarización (Fig. 14).

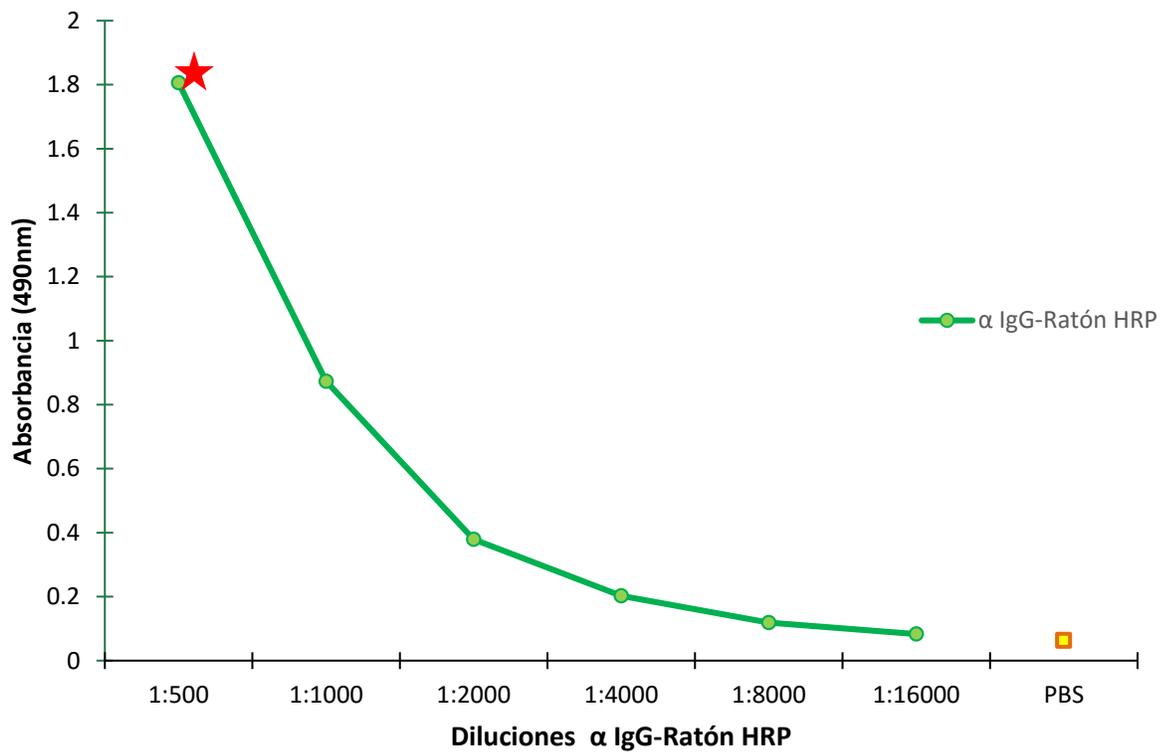


Figura 14. Titulación de la α IgG-Ratón (HRP). PBS control negativo. ★ Dilución elegida.

8.3.2 ELISA para obtener la curva de titulación del AgE/SL₂T. *canis*

En el ELISA para obtener la curva de titulación del Ag E/SL₂T. *canis*, se utilizaron 5µg/ml del AcPo de conejo, 10µg/ml del G4C12AcMo, la dilución 1:500 del conjugado (α IgG-Ratón HRP, ZYMED ® Laboratories) y 10µg/ml, 1µg/ml, 0.1µg/ml, 0.01µg/ml, 0.001µg/ml del Ag E/SL₂T. *canis*. Se utilizó el PBS como control negativo (Fig. 15).

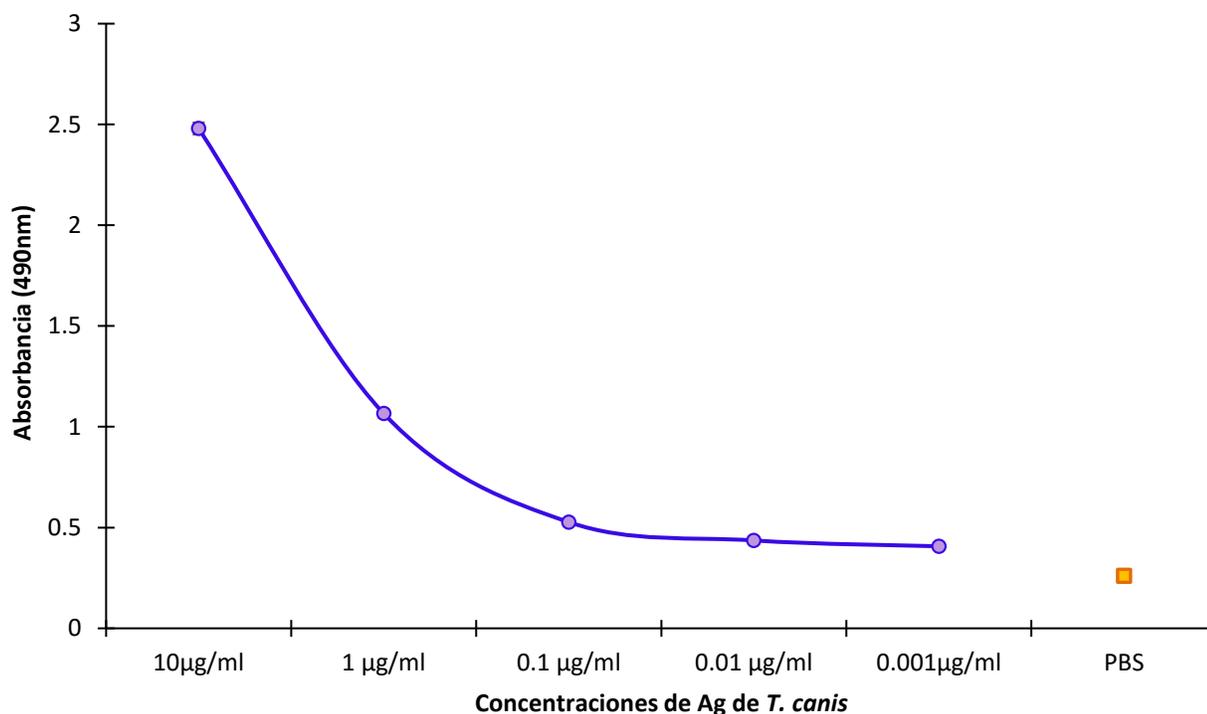


Figura 15. Curva de titulación del AgE/SL₂T. *canis*. PBS control negativo

8.3.3 ELISA directo para la detección de Ag E/SL₂T. canis

En este caso se utilizaron 5µg/ml del AcPo de conejo, dilución 1:1 de los sueros tratados con EDTA, 10µg/ml del G4C12AcMo, dilución 1:500 del conjugado (α IgG-Ratón HRP, ZYMED ® Laboratories). Con los respectivos controles positivo y negativo. La muestra número 54 fue positiva para antígeno (1.0%). La concentración de Ag E/SL₂T. canis fue de aproximadamente 0.1µg/ml (Fig. 16). Ésta muestra fue negativa para anticuerpos anti-T. canis con el ELISA indirecto.

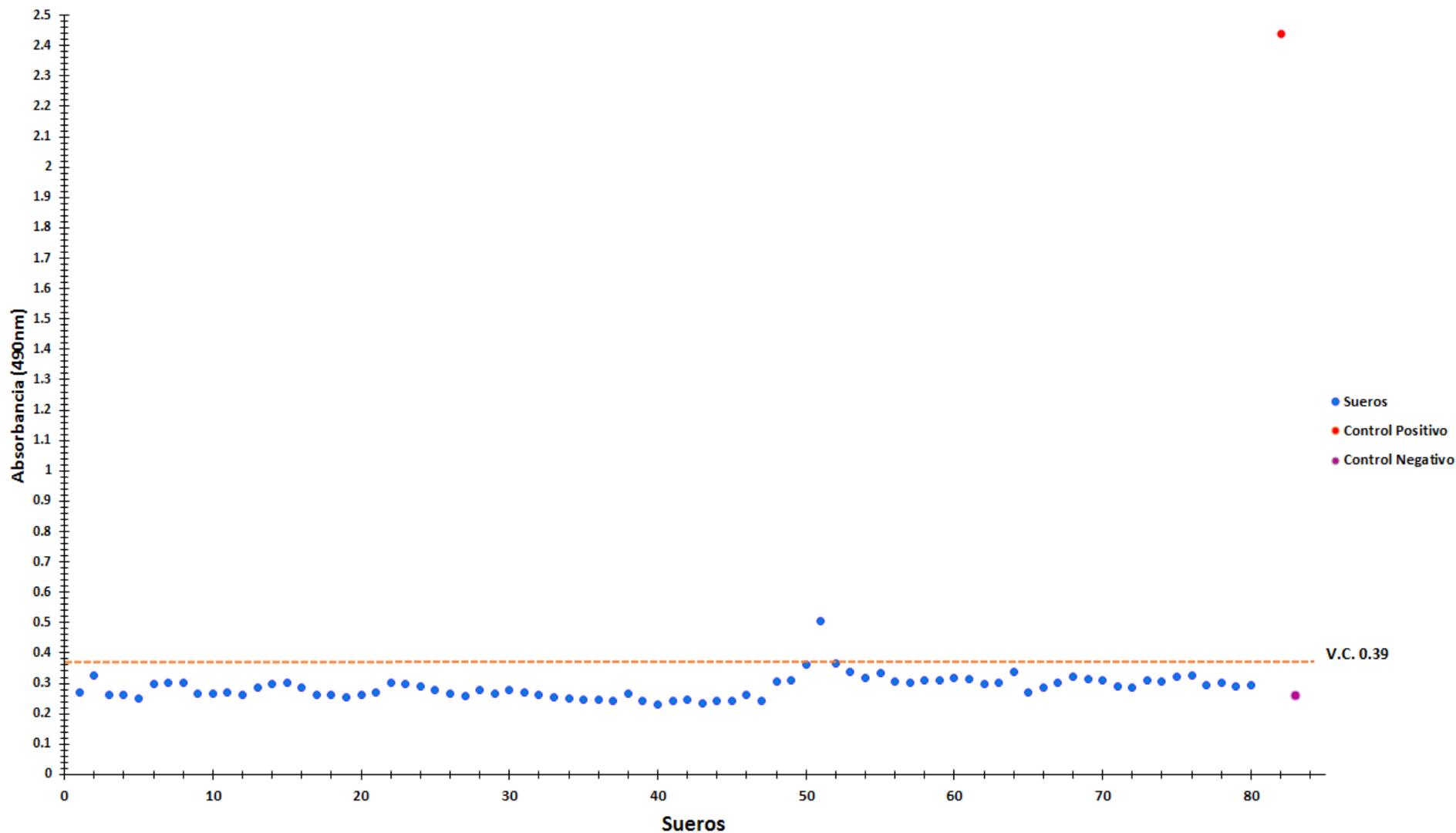


Figura 16. ELISA directo. Distribución de las absorbancias promedio de los sueros de pacientes pediátricos con asma (azul). Control positivo (rojo) y control negativo (rosa). El valor de corte (0.39), se señala con una línea punteada amarilla y representa el valor promedio de 10 sueros negativos más tres veces su desviación estándar

8.4 ELISA competitivo, adsorción de sueros con Ag de *Ascaris suum* (reacción cruzada)

Para el ELISA competitivo, se utilizó Ag E/S *L2T. canis* a una concentración de 0.5µg/ml, los 80 sueros más el control positivo y negativo se adsorbieron con Ag somático de *Ascaris suum*, el conjugado se utilizó a una dilución 1:750 (Fig. 17).

Antes de la adsorción se encontraron 20 (25%) sueros positivos; después de la adsorción de los sueros con el Ag de *A suum*, 18/20 fueron positivos. Además, hubo otros tres sueros que dieron positivos y que sin adsorción habían sido negativos. Con un total de 21 positivos (26.25%).

Si consideramos estos 21 sueros más el suero que dio positivo al antígeno, entonces tenemos una seroreactividad total del 28%.

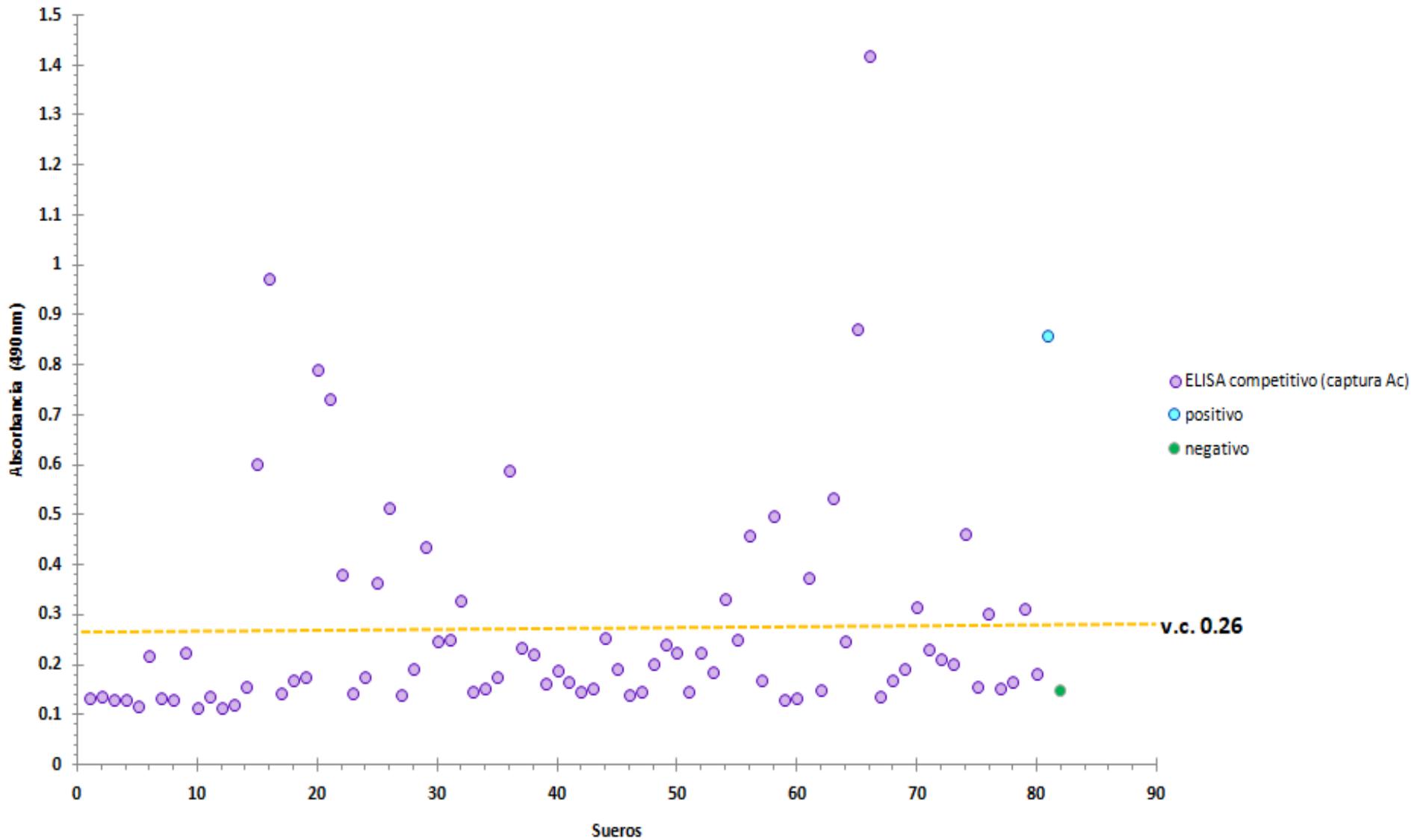


Figura 17. Distribución de las absorbancias promedio de los sueros de pacientes pediátricos con asma; ELISA competitivo (morado). Control positivo (azul) y control negativo (verde). El valor de corte se señala con línea punteada amarilla (0.26).

8.5 ELISA para determinar el índice de avidéz

Se realizaron 2 ensayos por duplicado de los sueros que resultaron positivos con el ELISA INP y los positivos después de la adsorción con Ag somático de *Ascaris suum*.

Para determinar el índice de avidéz, se dividió la absorbancia media de los pozos tratados con la solución de urea entre la absorbancia media de los pozos sin tratamiento, multiplicado por 100. Los índices de hasta 50% se consideraron como indicadores de la presencia de IgG de baja avidéz (infección reciente) y por arriba del 50%, IgG de alta avidéz por lo tanto infección antigua (crónica).

A las 23 muestras se les realizó el índice de avidéz. En todas las muestras, excepto una (suero 24), se encontró un índice de avidéz por arriba el 50%, lo que corresponde a infección crónica. La muestra 24 inicialmente fue negativa para el ELISA INP y positivizó con el ELISA competitivo, fue el único suero que mostró una baja avidéz, la cual indicaría que es una infección reciente (Fig. 18).

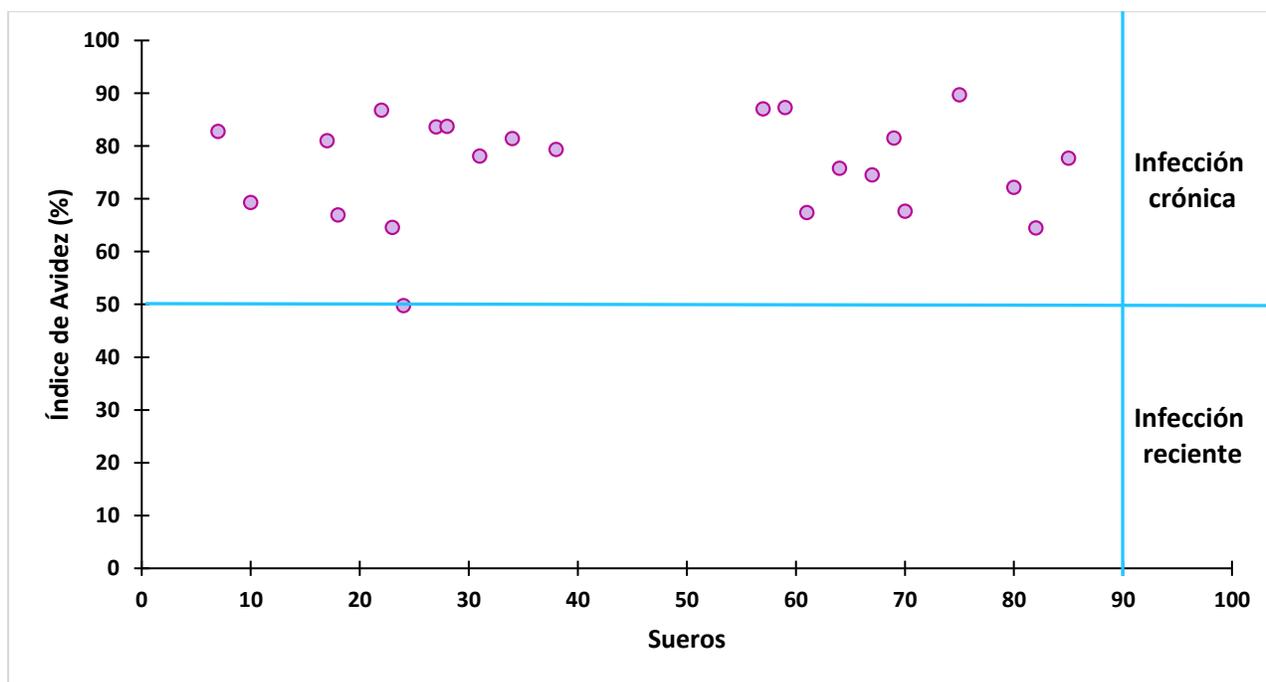


Figura 18. Índice de avidéz de los sueros que fueron positivos con el ELISA INP y después de la adsorción. Por arriba del 50% se considera infección crónica y por debajo infección reciente.

8.6 Variables de los pacientes pediátricos con asma

El 45% fueron del género femenino y el 55% masculino. El 35 %de los niños tuvo mascota (perro) y no se obtuvo el dato del 3.75%. La mayoría no tuvo geofagia (92.5%), el 3.75% sí tuvo geofagia y del 3.75% no se obtuvo el dato. En cuanto a los grupos de edad, el 5% tuvo 6 años, de 7-9 35% y el 60%, mayor de 9 años (Fig. 19).

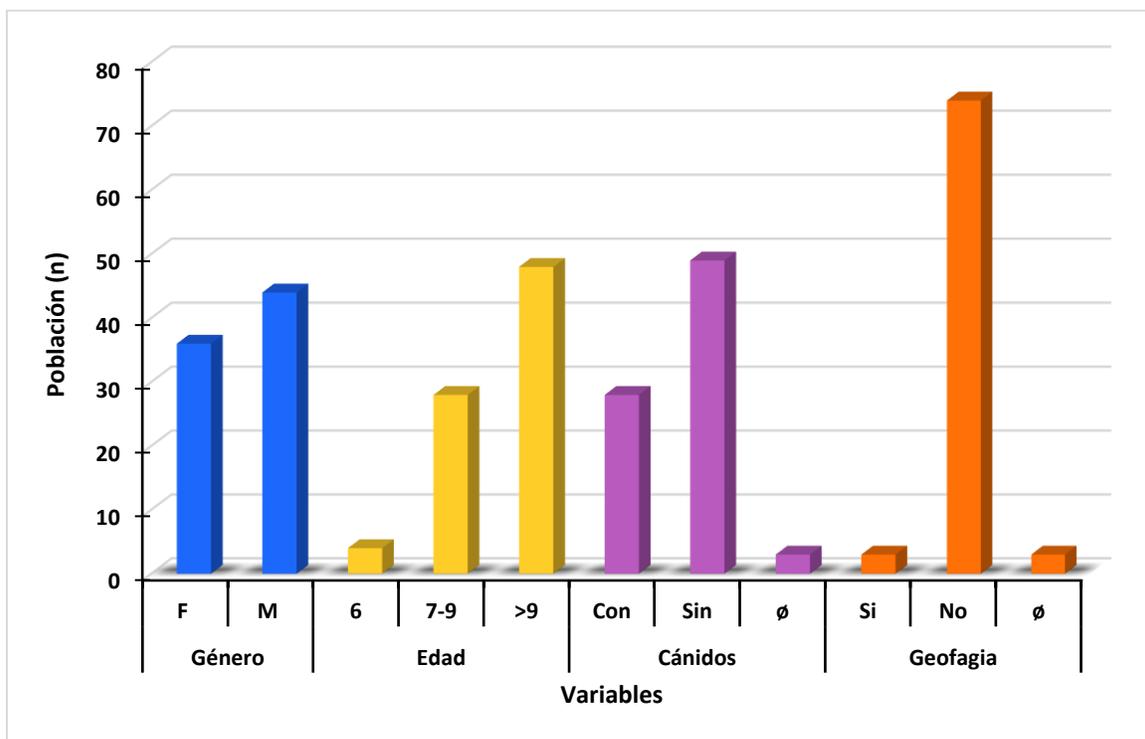


Figura 19. Datos obtenidos de la población objetivo. F=Femenino, M=Masculino, ø=no se obtuvo dato.

8.7 Resultados de la espirometría, biometría hemática, ACQ (cuestionario de control del asma) y GINA (iniciativa global para el asma).

En la Figura 20 se muestra la relación entre la espirometría y la seroreactividad a *T. canis*. El resultado con la espirometría, mostró que el 63% de los pacientes fueron normales, el 14% tuvo hiperreactividad bronquial, y no se realizó en el 20%.

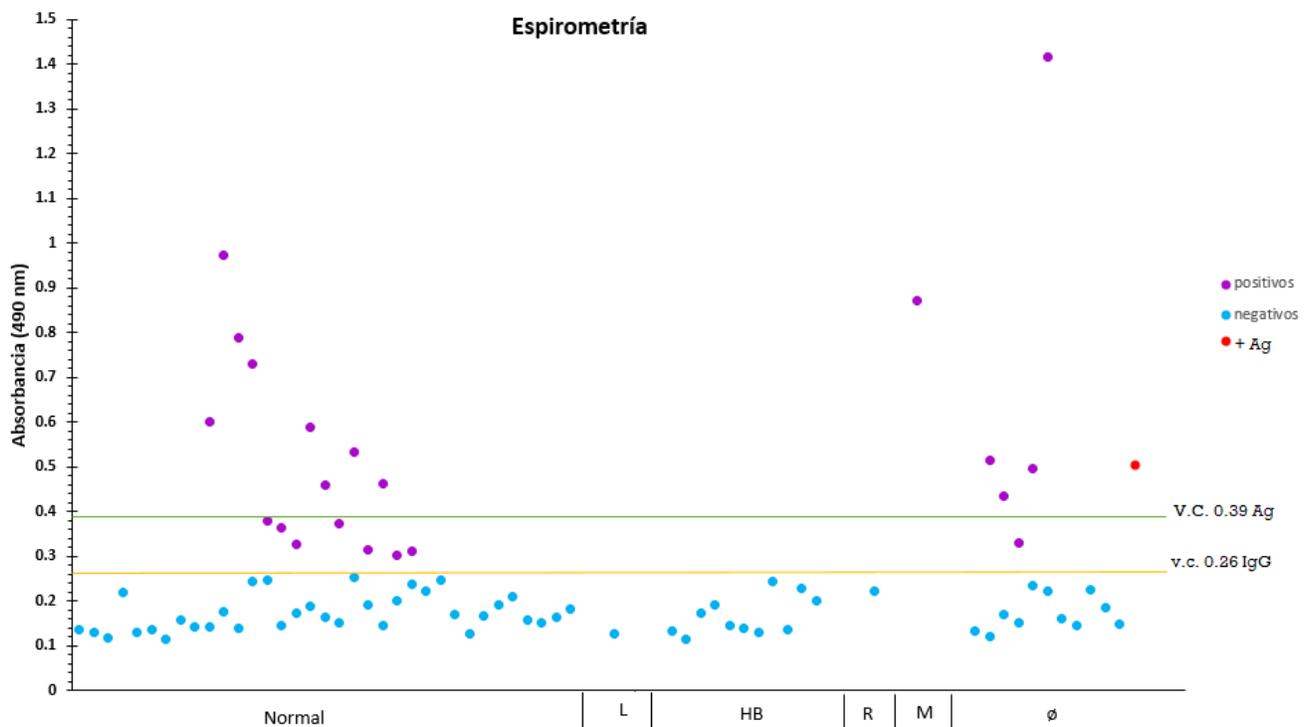


Figura 20. En la gráfica se muestra la relación del ELISA competitivo y la Espirometría. Los puntos azules representan los sueros negativos y los puntos morados los sueros positivos. Espirometría: N=Normal, L=Leve, HB=Hiperreactividad Bronquial, R=Restrictivo, M=Moderada, ø=no se obtuvo el dato.

El ACQ es un cuestionario que evalúa la calidad de vida del paciente asmático. En la Figura 21 se muestra la relación entre el ACQ y la seroreactividad a *T. canis*. El 45% fue valorado con asma leve controlada, el 20% con leve parcialmente controlada, el 13% con moderada mal controlada, el 9% con moderada parcialmente controlada y el 8% con leve mal controlada.

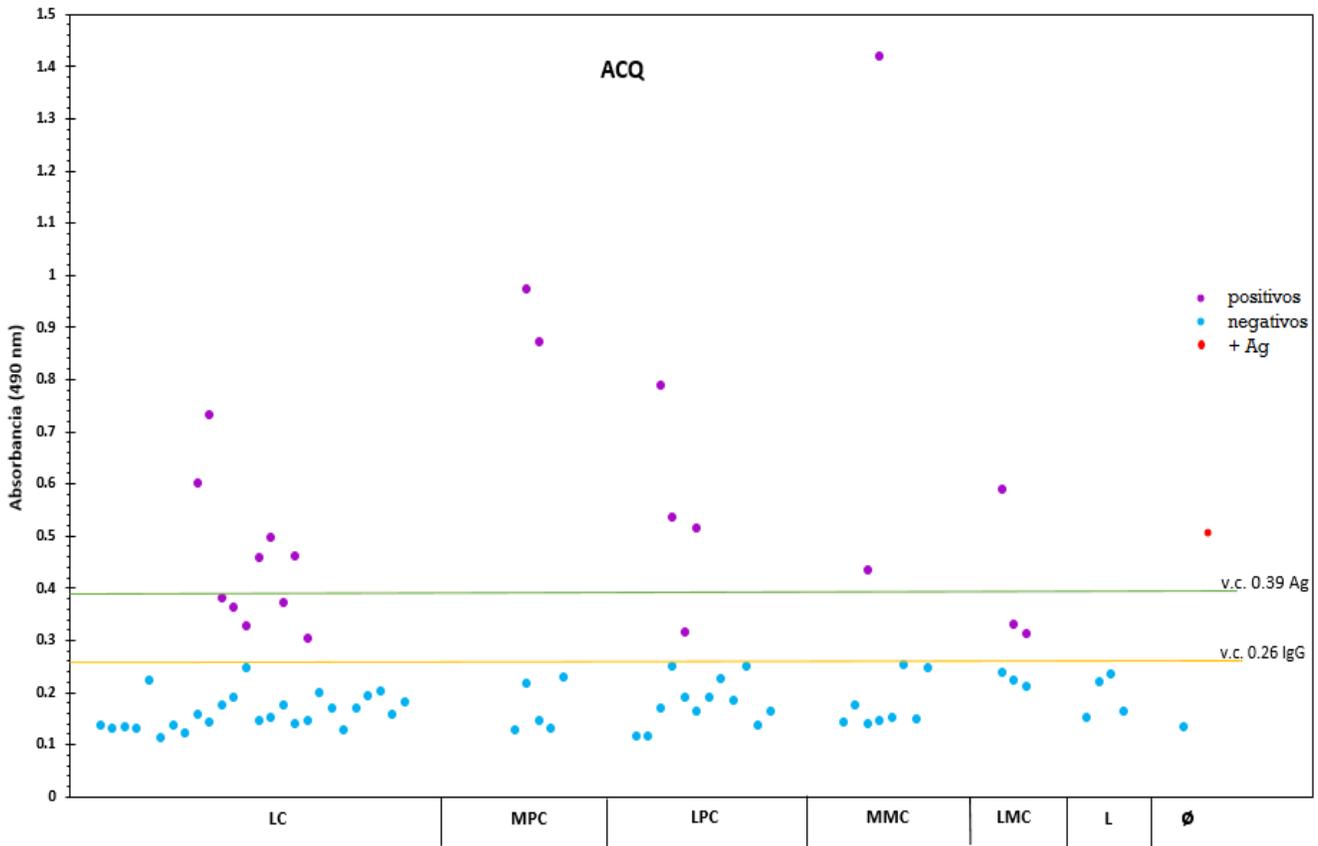


Figura 21. En la gráfica se muestra la relación del ELISA competitivo y el ACQ. Los puntos azules representan los sueros negativos y los puntos morados los sueros positivos. ACQ: LC=Leve Controlada, MPC=Moderada Parcialmente Controlada, LPC=Leve Parcialmente Controlada, MMC=Moderada Mal Controlada, LMC=Leve Mal Controlada, L: Leve, ø=no se obtuvo el dato.

Con GINA, se encontró que el 61% tuvo asma leve persistente, el 21% fue moderado persistente y el 18% leve intermitente (Fig. 22).

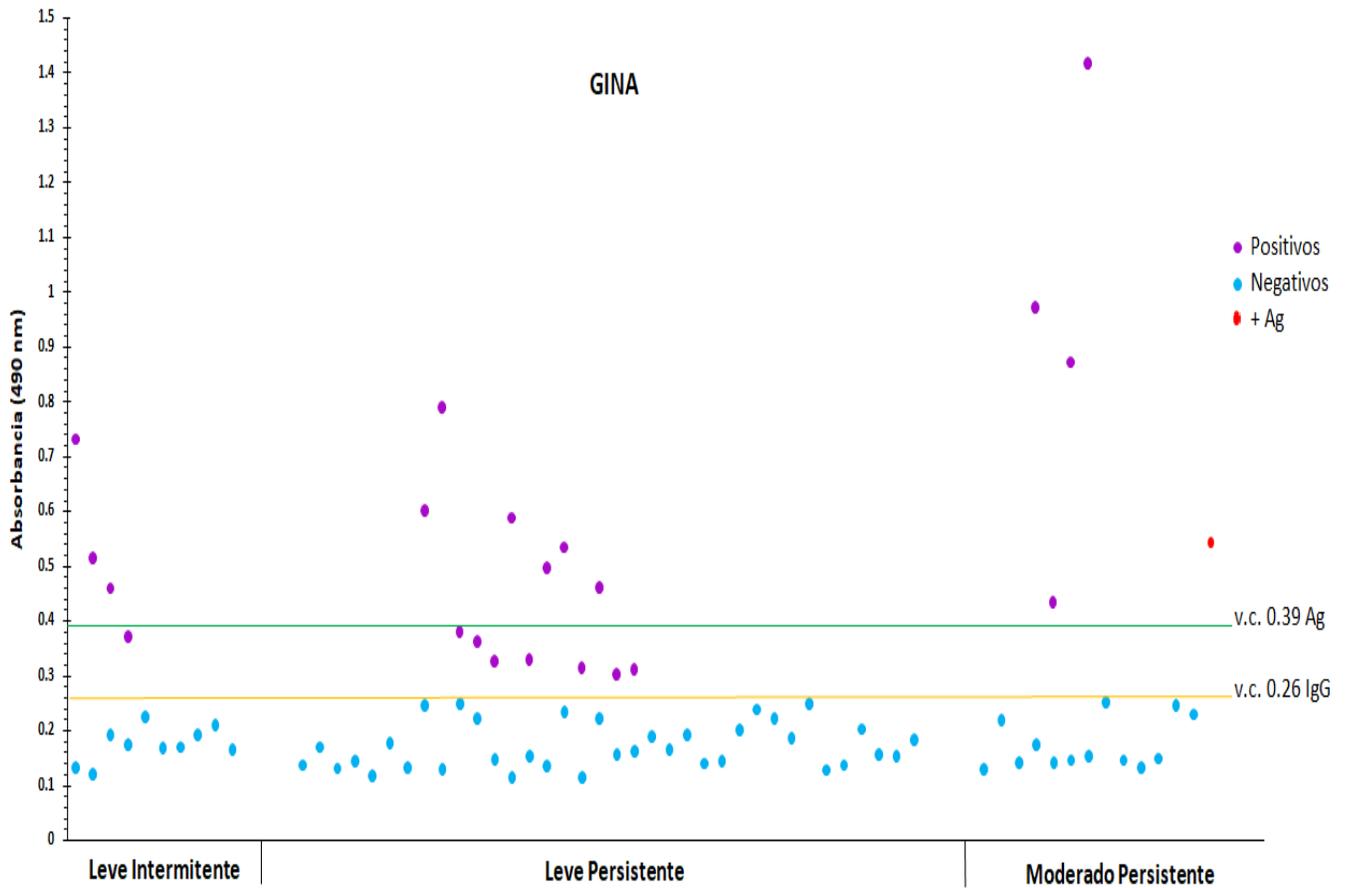


Figura 22. En la gráfica se muestra la relación del ELISA competitivo y GINA. En azul se muestran los sueros negativos y los puntos morados los sueros positivos. GINA: LI=Leve Intermitente, LP=Leve Persistente, MP=Moderada Persistente.

8.8 Resumen de la seropositividad a *Toxocara canis* y gravedad del asma

En la Tabla 7 se muestra la seropositividad a *T. canis* asociada a las diferentes variables. El niño del suero con captura de antígeno no tuvo geofagia, mascotas, ni eosinofilia. No hay datos de espirometría porque en los tres intentos no la pudo realizar. Con el cuestionario para el control del asma fue catalogado como moderado parcialmente controlado. En los CPS se encontró *Blastocystis hominis*(Anexo2).

En resumen, las variables: a) por género, geofagia y el tener mascotas, b) la prueba y cuestionarios para el asma, y c) la seropositividad demostrada por la detección de anticuerpos anti-*T. canis* y captura de antígenos de larvas de *T. canis* se muestran en la Figura 23.

Por otro lado, con respecto a los CPS, cinco muestras de los pacientes tuvieron comensales o un parásito: en la muestra 47 y 86 se encontró *Endolimax nana* (comensal), en la 63 *Entamoeba coli* (parásito) y en la 50 y 52 a *Blastocystis hominis* (parásito); todas estas muestras fueron seronegativas a *T. canis* (ELISA-INP, ELISA INP Adsorción, ELISA INP Ag).

Finalmente, la relación captura de Ag y detección de Ac con la gravedad del asma se muestra en la Figura 24.

Tabla 7. Variables y porcentaje de sueros positivos a *Toxocara canis*

Variables	ELISA INP		ELISA Adsorción		ELISA INP Ag	
	N	%	N	%	N	%
Género						
Femenino (N=36)	8	22.2	10	27.7	0	0
Masculino (N=44)	12	27.2	11	25	1	2.2
Grupo de Edad						
6 (N=4)	0	0	0	0	0	0
7-9 (N=28)	8	28.5	8	28.5	1	3.5
>9 (N=48)	12	25	13	27.1	0	0
Cánidos						
Si (N=28)	9	32.1	9	32.1	0	0
No (N=49)	11	22.4	12	24.4	1	2.04
Ø (N=3)	0	0	0	0	0	0
Geofagia						
Si (N=3)	1	33.3	1	33.3	0	0
No (N=74)	19	25.6	20	27	1	1.3
Ø (N=3)	0	0	0	0	0	0
Eosinofilia						
Si (N=18)	2	11.1	3	16.6	0	0
No (N=62)	18	29	18	29	1	1.6
Espirometría						
Normal (N=50)	13	26	15	30	0	0
Leve (N=1)	0	0	0	0	0	0
HB (N=11)	0	0	0	0	0	0
Restringido (N=1)	0	0	0	0	0	0
Moderado(N=1)	1	100	1	100	0	0
Ø (N=16)	5	31.2	5	31.2	1	6.2
ACQ						
LC (N=36)	8	22.2	10	27.7	0	0
MPC (N=7)	3	42.8	2	28.5	1	14.2
LPC (N=16)	4	25	4	25	0	0
MMC (N=10)	2	20	2	20	0	0

LMC (N=6)	3	50	3	50	0	0
Leve (N=4)	0	0	0	0	0	0
∅ (N=1)	0	0	0	0	0	0
GINA						
LI (N=14)	4	28.5	4	28.5	0	0
LP (N=49)	11	22.4	13	26.5	0	0
MP (N=17)	5	29.4	4	23.5	1	5.8

Espirometría: N=Normal, L=Leve, M=Moderada, R=Restrictivo, HB=Hiperreactividad Bronquial. ACQ: LC=Leve Controlada, MPC=Moderada Parcialmente Controlada, LPC=Leve Parcialmente Controlada, MMC=Moderada Mal Controlada, LMC=Leve Mal Controlada, L: Leve. GINA: LI=Leve Intermitente, LP=Leve Persistente, MP=Moderada Persistente, ∅=no se obtuvo el dato.

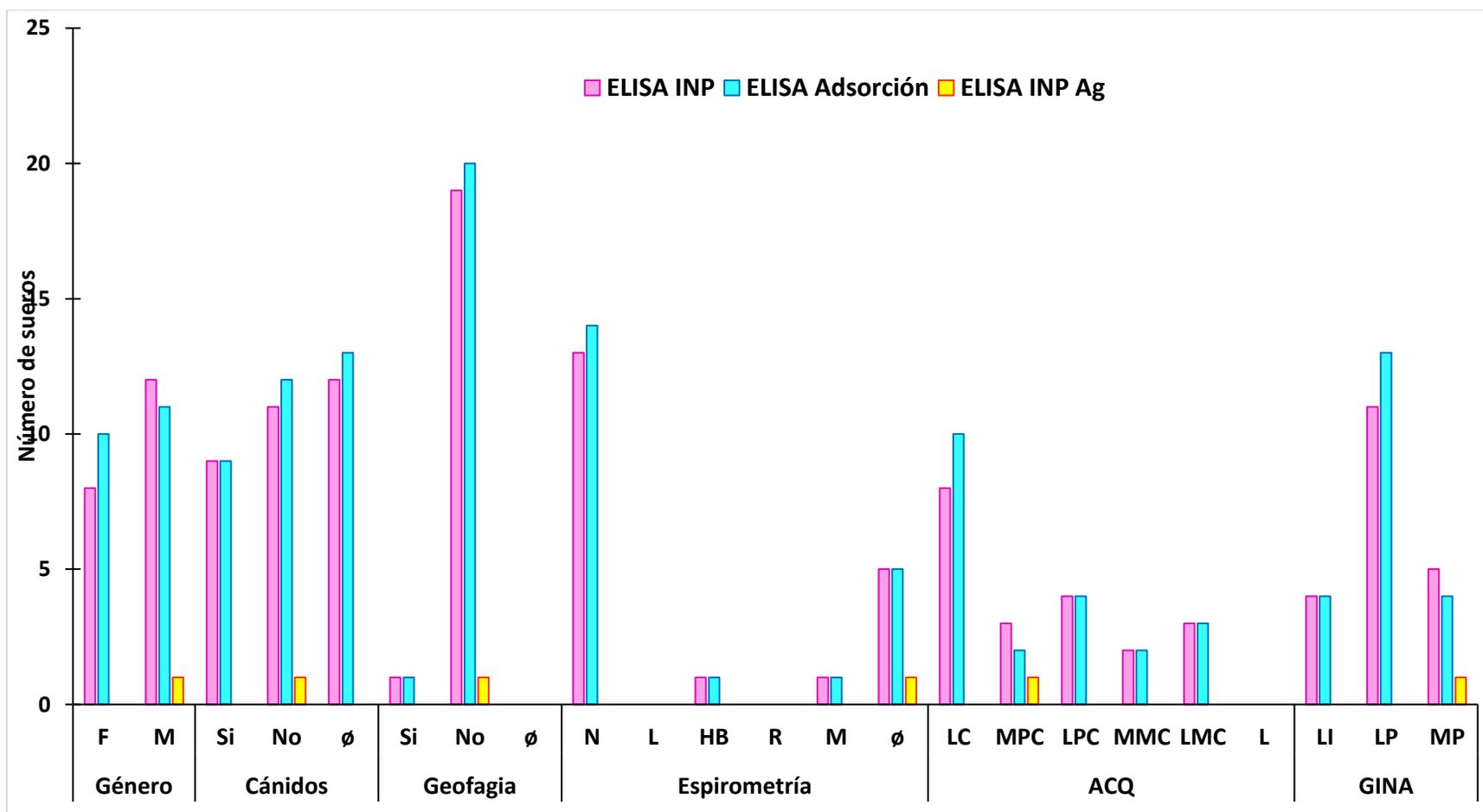


Figura 23. Sueros positivos para cada una de las pruebas, asociados con las variables. Clasificación: Espirometría: N=Normal, L=Leve, HB=Hiperreactividad Bronquial, R=Restrictivo, M=Moderada. ACQ: LC=Leve Controlada, MPC=Moderada Parcialmente Controlada, LPC=Leve Parcialmente Controlada, MMC=Moderada Mal Controlada, LMC=Leve Mal Controlada, L= Leve. GINA: LI=Leve Intermitente, LP=Leve Persistente, MP=Moderada Persistente, ø=no se obtuvo el dato.

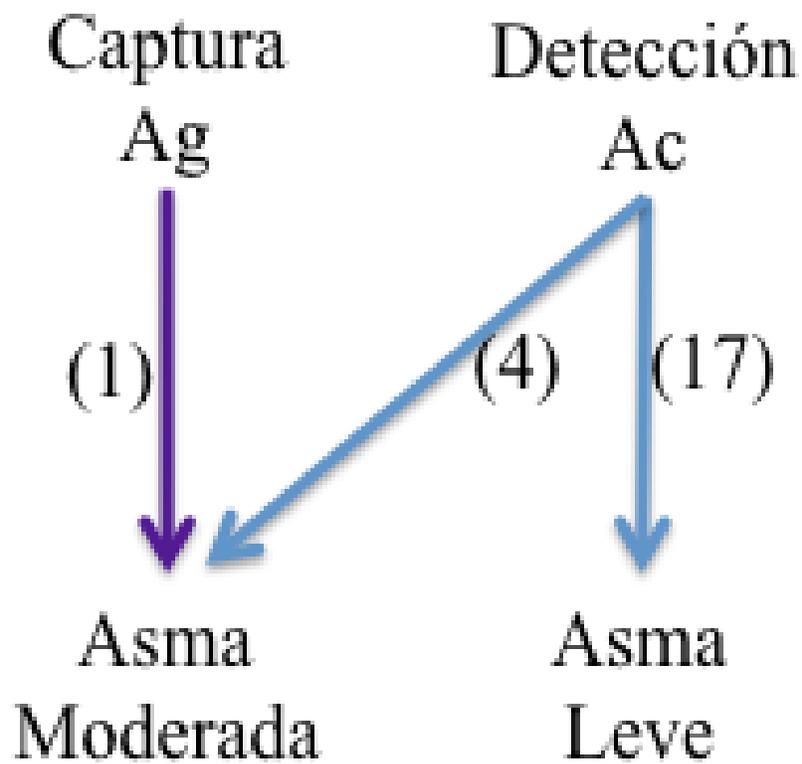


Figura 24. Relación del resultado de los ELISA con la gravedad del asma. **(Número de pacientes).**

9 DISCUSIÓN

Hasta donde sabemos, éste es el primer reporte en donde se realiza captura del AgE/S L₂*T.canisy* detección de anticuerpos anti-*T. canis* en pacientes pediátricos con diferentes estados de gravedad del asma.

Los resultados son importantes, porque a los niños en el momento de la toma de las muestras de sangre (para la biometría hemática y para los ELISA) se les realizó la espirometría para registrar el estado clínico de la gravedad del asma, así como los cuestionarios: cuestionario para el control del asma (ACQ), e iniciativa global para el asma (GINA). Además, para descartar parasitosis intestinales, se les solicitaron muestras de heces en serie de tres para los coproparasitoscópicos.

Se consideraba que era difícil distinguir entre una infección reciente, una larva *migrans* activa o una exposición pasada (Cooper, 2008). Pero recientemente, el grupo de la Dra. Ponce-Macotela está proponiendo que se puede detectar una infección reciente sí en el suero del paciente se captura el antígeno de larva de *T. canis* mediante un anticuerpo monoclonal; una larva *migrans* activa sí se detecta antígeno y anticuerpos anti-larva de *T. canis*; y probablemente memoria inmunológica sí solamente se detectan anticuerpos anti-larva de *T. canis* (Rodríguez-Caballero et al., 2017).

Para la captura de antígeno se utilizó el AcMo INP-1E4G4C2 (producido en el laboratorio). En una de las 80 muestras de los pacientes se capturó antígeno (1%); la frecuencia es baja, pero es la primera vez que se detecta antígeno en pacientes pediátricos con asma. Luo et al. (1999) utilizaron anticuerpos policlonales y encontraron antígeno en el 39% de 43 sueros positivos a anticuerpos. Robertson et al. (1988) con un anticuerpo monoclonal detectaron antígeno en 10/23 muestras de niños. Ishiyama et al. (2009) probaron su anticuerpo monoclonal en nueve muestras de pacientes con sospecha clínica de larva *migrans* y altos títulos de anticuerpos; ellos encontraron cinco muestras con antígeno.

En nuestro caso, el resultado de los CPS (serie de tres) del paciente fueron negativos a nematodos. Debido a que el ELISA para detección de anticuerpos fue negativo y la biometría hemática no registró eosinofilia, y con base en los resultados propuestos por Rodríguez-Caballero et al. (2017), consideramos que este paciente cursaba con una infección reciente.

En la muestra del paciente se detectó 0.1 ug/mL de antígeno. El resultado es interesante porque Rodríguez-Caballero et al. (2017) reportaron que en ratones inoculados por vía oral con 50 huevos larvados de segundo estadio de *T. canis* capturaron 0.063 ug/mL y 0.315 ug/mL de antígeno a los 7 y 14 días post infección, respectivamente. En relación al asma y mediante el GINA y ACG el paciente estuvo clasificado como moderado persistente y moderado parcialmente controlado, respectivamente. Se realizó la espirometría, pero, en tres intentos, el paciente no la pudo llevar a cabo. Consideramos que es necesario dar un seguimiento a la evolución de este paciente y determinar si la parasitosis indujo una respuesta inmune del niño.

Por otro lado, para la detección de anticuerpos se utilizan kits comerciales o cada autor implementa herramientas en su laboratorio para poder detectarlos. Los estudios realizados con población mexicana muestran diferente seroprevalencia. Romero et al. (2013) reportaron un 22.22% (24/108) en muestras de niños (población abierta) del municipio de Ecatepec, estado de México. En Durango, Alvarado-Esquivel (2013) encontró 6/128 pacientes psiquiátricos y en 3/276 controles. El mismo autor en el 2014, reportó un 26.2% (33/126) en muestras de personas de comunidades rurales del estado de Durango (Alvarado-Esquivel, 2014). Nava et al. (2015) encontraron el 12.02% (22/183) de seroprevalencia en niños (población abierta) de Amecameca y Chalco, Estado de México. En todos estos estudios se utilizaron Kits comerciales y no se buscaron reacciones cruzadas con otros nematodos.

En esta tesis utilizamos dos estrategias para la detección de anticuerpos anti-larvas de *T. canis*: i) utilizamos un kit comercial y con éste se detectaron anticuerpos en dos muestras (2.5%), ii) herramientas implementadas en el laboratorio y con éstas se detectaron 20/80 muestras dando un 25% de seroprevalencia. Esta diferencia probablemente se debe al número de epítopes que detecta el kit; será necesario dilucidar por qué hubo tanta diferencia entre las dos estrategias. Cabe señalar que las dos muestras seroreactivas con el kit también fueron seroreactivas con nuestras herramientas.

Se ha sugerido que la población que vive en países en desarrollo tiene más probabilidades de infectarse con geohelminos, tales como: *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus* y *Strongyloides stercoralis*, y que las pruebas inmunológicas para la detección de anticuerpos anti-larvas de *T. canis* podrían dar reacciones cruzadas con estos geohelminos (Muñoz-Guzmán et al., 2009, Noemi H., 1999). Por tal motivo, en nuestro caso, una alícuota de cada uno de los 80 sueros se adsorbió con antígeno de *Ascaris suum*. Después de la adsorción, 18 de los 20 sueros que fueron seroreactivos antes de la adsorción, volvieron a dar reactividad, y otros tres sueros (previamente negativos) fueron positivos, dando una seroprevalencia del 26.25%. La seroreactividad después de la adsorción nos estaría diciendo que hay una alta probabilidad de que los pacientes estuvieron en contacto con el parásito. Por otro lado, la seroreactividad de los tres sueros (previamente negativos), después de ser adsorbidos con el antígeno de *A. suum*, probablemente fue porque se liberaron epítopes que se encontraban enmascarados por los antígenos de *A. suum*. Es importante mencionar que en ningún paciente se encontraron nematodos en los CPS (en serie de tres). Muñoz-Guzmán et al. (2010) reportaron una seroprevalencia mayor a la que nosotros encontramos, 30.8% (88/285) en muestras (previamente adsorbidas con antígeno de *A. suum*) de pacientes pediátricos mexicanos con asma.

Actualmente sabemos que la etiología del asma es multifactorial y aunado al cuadro clínico, los pacientes tienen leucocitosis a expensas de eosinófilos (Plaza et al., 2003) y, por otro lado, se ha documentado que cuando las larvas de los geohelminthos (*A. lumbicoides*, *N. camericanus* y *S. stercoralis*) llegan a pulmones, al romper la membrana alveolo capilar producen un cuadro semejante al asma, caracterizado por estertores, fiebre y eosinofilia (Mortimer et al., 2006, Botero et al., 2001). Debido a que las larvas de *T. canis* también viajan por pulmones, ésta parasitosis puede contribuir en la etiología del asma.

En esta tesis, todos los pacientes tenían antecedentes de asma, y se encontró eosinofilia en 18/80 pacientes. Solamente tres pacientes con seroreactividad a larvas de *T. canis* tuvieron aumento de los eosinófilos. Ninguno de los dos pacientes seroreactivos al kit tuvo eosinofilia. Probablemente en algunos casos la eosinofilia fue producida por otra fuente etiológica del asma.

El resultado del índice de avidéz (mayor del 50%) en el 96% de los casos nos indicaba un cuadro crónico; pero, por el resultado negativo en la captura de antígeno de todos los sueros positivos a anticuerpos, no podemos hablar de una larva *migrans* activa. Con base en el reporte de Rodríguez-Caballero et al. (2017) proponemos que estos pacientes tenían memoria inmunológica por una infección pasada. Cabe mencionar que el suero de un paciente tuvo un índice de avidéz muy cercano al valor del 50% (49.75%), aunque, este paciente no tuvo eosinofilia y fue negativo a la captura de antígeno.

En relación a la gravedad del asma, Muñoz-Guzmán et al. (2010), encontraron mayor frecuencia de pacientes con asma media intermitente y media persistente. En nuestro caso, la espirometría de 15/50 (30%) pacientes fue normal. Con GINA, se determinó que 13/36 (36%) pacientes cursaban con un cuadro leve persistente. Con ACQ se detectó que 10/26 (38%) estaban con asma leve controlada. Los resultados son interesantes porque el cuadro clínico del asma concuerda con los datos de avidéz, y de captura de antígeno negativo; probablemente, estos pacientes, en el momento de la toma de la muestra no cursaban con una larva *migrans* activa.

10 CONCLUSIONES

Este es el primer reporte en donde se capturó el AgE/S L₂T. *canis* y anticuerpos anti- *T. canis* en pacientes pediátricos con diferentes estados de gravedad del asma.

Se encontró una seroprevalencia total del 28%. El 1.0% de los sueros fue positivo al Ag E/S L₂T. *canis* y el 26% fue positivo a anticuerpos anti-*T. canis*.

Mediante el índice de avidez se detectó que el 96% cursaba con un cuadro crónico de la enfermedad.

El paciente con suero positivo al Ag E/S L₂T. *canis* cursaba con asma moderada parcialmente controlada (ACQ) y moderada persistente (GINA).

La mayoría de los pacientes con serología positiva tuvieron espirometría normal, con asma leve controlada (ACQ) y asma leve parcialmente controlada (GINA).

11 PERSPECTIVAS

Incrementar el tamaño de la muestra.

Realizar el western blot para determinar el peso molecular de los antígenos que reconoce el AcMo.

12 REFERENCIAS

- Abo-Shehada MN, Sharif L, El-Sukhon SN, Abuharfeil N, Atmeh R. Seroprevalence of *Toxocara canis* antibodies in humans in Northern Jordan. *J Helminthol.* 1992; 66:75-78.
- Aceró M, Mercedes MM, Flórez AC, Santiago RN. Seroprevalencia de anticuerpos contra *Toxocara canis* y factores de riesgo en niños, Ciudad Bolívar, Bogotá, DC, 2000. *Biomed.* 2001; 21.
- Acevedo-Ramírez, PMC, Peralta-Abarca GE. "No tiene la culpa el perro, sino quien lo deja en la calle". *Revista Ciencia y Desarrollo.* 2010; 36 (245):6-12.c.
- Acevedo N, Caraballo L. IgE cross-reactivity between *Ascaris lumbricoides* and mite allergens: posible influences on allergic sensitization and asthma. *Parasite Immunology.* 2011; 33:309-321.
- Ajayi OO, Duhlinska DD, Agwale SM, Njoku M. Frequency of human Toxocariasis in Jos, Plateau State, Nigeria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95:147-149.
- Akao N, Chu AE, Tsukidate S, Fujita K. A rapid and sensitive screening kit for the detection of anti-*Toxocara* larval ES antibodies. *Parasitol Int.* 1997; 46:189-195.
- Alcântara-Neves N, Barbosa dos Santos A, Ribeiro ML, Figueiredo CAV, Pontes-de-Carvalho L. An important method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis*. *Exp Parasitol.* 2008; 119:349-351.
- Alderete JMS, Jacob CMA, Pastorino AC, Elefant GR, CastroAPM, Fomin ABF, Chieffi PP. Prevalence of *Toxocara* infection in schoolchildren from the Butantã Region, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98:593-597.

- Alonso JM, López MA, Bojanich MV, Marull J. Infección por *Toxocara canis* en población adulta sana de un área subtropical de Argentina. *Parasitol Latinoam.* 2004; 59:61-64.
- Alvarado-Esquivel C. Seroepidemiology of Toxocariasis in a rural Tepehuanos population from Durango, México. *J Helminthol.* 2014; 88:173-176.
- Alvarado-Esquivel C. *Toxocara* infection in psychiatric in patients: a case control seroprevalence study. *Plos One.* 2013; 8:1-3.
- Anaruma FF, Chieffi PP, Correa CRS, Camargo ED, Silveira EPR, Aranha JJB, Ribeiro MCSA. Human Toxocariasis: A seroepidemiological survey in the municipality of Campinas (SP), Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2002; 44:303-307.
- Antonios SN, Eid MM, Khalifa EA, Othman AA. Seroprevalence study of *Toxocara canis* in selected Egyptian patients. *J Egypt Soc Parasitol.* 2008; 38:313-318.
- Archelli S, Kozubsky L. *Toxocara* y Toxocariosis. *Acta Bioquím Clin Latinoam.* 2008; 42:379-84.
- Archelli S, Santillan GI, Fonrouge R, Céspedes G, Burgos L, Radman N. Toxocariosis: Seroprevalencia en infantes expósitos, abandonados e institucionalizados. *Rev Argent Microbiol.* 2014; 46:3-6.
- Aydenizöz-Özkayhan M, Yağci BB, Erat S. The investigation of *Toxocara canis* eggs in coats of different dog breeds as a potential transmission route in human toxocariosis. *Vet Parasitol.* 2008; 152:94-100.
- Bass J, Mehta KA, Glickman LT, Blocker R, Eppes BM. Asymptomatic toxocarosis in children. A prospective study and treatment trial. *Clin Pediat* 1987; 17:287-294.
- Beaver P, Snyder H, Carrera G, Dent J, Lafferty J. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans report of three cases. *Pediatrics.* 1952; 9:7-19.

- Becerril M. Parasitología Médica. Tercera edición. Mc Graw Hill. 2008
- Becker AC, Rohen M, Epe C, Schinieder T. Prevalence of endoparasites in stray and fostered dogs and cats in Northern Germany. J Parasitol Res. 2012; 111:849-857.
- Bede O, Szénási Z, Dnka J, Gyuricovits K. Toxocariasis associated with chronic cough in childhood: A longitudinal study in Hungary. J Helminthol. 2008; 82:357-363.
- Bolívar-Mejía A, Rodríguez-Morales AJ, Paniz-Mondolfi AE, Delgado O. Manifestaciones cardiovasculares de la toxocariasis humana. Arch Cardiol Mex. 2013; 83:120-129.
- Botero GJ, Zuluaga ENA. Nemátodos intestinales de importancia médica en Colombia: ¿un problema resuelto?. Latreia. 2001; 14:47-56.
- Bowman DD, Montgomery SP, Zajac AM, Eberhard ML, Kazacos KR. Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. Cell Press. 2010; 26:162-167.
- Breña CJP, Hernández DR, Hernández PA, Castañeda IR, Espinoza BY, Roldán GW, Ramírez BC, Maguiña VC. Toxocariosis humana en el Perú: Aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. Acta Med Peruana. 2011; 28: 228-236.
- Brunáská M, Dubiniský P, Reiterová K. *Toxocara canis*: ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs. Int J Parasitol. 1995; 25:683-690.
- Camargo ED, Nakamura PM, Vaz AJ, da Silva MV, Chieffi PP, Melo EO. Standardization of dot-Elisa for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1992; 34:55-60.

- Cancrini G, Bartoloni A, Zaffaroni E, Guglielmetti P, Gamboa H, Nicoletti A, Genchi C. Seroprevalence of *Toxocara canis*-IgG antibodies in two rural Bolivian communities. *Parasitol.* 1998; 40:473-475.
- Canese A, Domínguez R, Otto C, Ocampos C, Mendoza E. Huevos infectivos de *Toxocara*, en arenas de plazas y parques de Asunción, Paraguay. *Rev Chil Pediatr.* 2003; 74:611-616.
- Cassenote AJF, Abreu ARL, Pinto JMN, Rubinsky GE. Seroprevalence and modifiable risk factors for *Toxocara* spp. in Brazilian schoolchildren. *Plos Negl Trop Dis.* 2014; 8:1-11.
- Castillo D, Paredes C, Zañartu C, Castillo G, Mercado R, Muñoz V, Schenone H. Contaminación ambiental por huevos de *Toxocara* sp. en algunas plazas y parques públicos de Santiago de Chile, 1999. *Bol Chil Parasitol.* 2000; 55.
- Castillo Y, Bazan H, Alvarado D, Saez G. Estudio epidemiológico de *Toxocara canis* en parques recreacionales del distrito de San Juan de Lurigancho, Lima Perú. *Parasitol día.* 2001; 25.
- Cazorla D, Morales PM, Acosta MEQ. Contaminación de suelos con huevos de *Toxocara* spp. (Nematoda, Ascaridida) en parques públicos de la ciudad de Coro, Estado Falcon, Venezuela. *Revista Científica.* 2007; 17:117-122.
- Choi D, Hoon LJ, Choi DC, Soo LK, Woon PS, Kim SH, Choi YH, Huh S. Transmission of *Toxocara canis* via ingestion of raw cow liver: a cross-sectional study in healthy adults. *Korean J Parasitol.* 2012; 50:23-27.
- Cilla G, Pérez-Trallero E, Gutiérrez C, Part C, Gomáriz M. Seroprevalence of *Toxocara* infection in middle-class and disadvantaged children in Northern Spain (Gipuzkoa, Basque Country). *Eur J Epidemiol.* 1996; 12:541-543.
- Cobzaru RG, Rîpă C, Leon MM, Luca MC, Ivan A, Luca M. Correlation between asthma and *Toxocara canis* infection. *Rev Med Chir Soc Med Nat.* 2012; 116:727-30.

- Cooper PJ. *Toxocara canis* infection: an important and neglected environmental risk factor for asthma?. Clin Exp Allergy. 2008; 38:551-553.
- Da Cunha AHL, Lopes RG, Soares PM, Gallina T, Marreiro VM, de Oliveira NM, James SC, Aires BME. Presence of *Toxocara canis* eggs on the hair of dogs: A risk factor for Visceral Larva Migrans. Vet Parasitol. 2010; 174:115-118.
- Dantas-Torres F, Otranto D. Dogs, cats, parasites and humans in Brazil: opening the black box. Parasites & Vectors. 2014; 7:22.
- De Abreu A, Delgado R, Diaz D, Garrido N, López Y, Medina Z, Torres M, Cárdenas E, Pérez D, Vidal A, Sánchez J. Seroprevalencia contra *Toxocara canis* en niños de 1 a 6 años con y sin síntomas respiratorios de Barquisimeto, Venezuela. Arch Venez Pueri Pediatr. 2011; 74:100-104.
- De Andrade LCR, Bezerra CL, Pessoa PE, AAlaki K, Takeuchi T, Ito A, Aoki T, Yamasaki H. Prevalence of toxocariasis in northeastern Brazil based on serology using recombinant *Toxocara canis* antigen. J Trop Med Hyg. 2005; 72:103-107.
- De la Fé RP, Duménigo RBE, Brito AE, Aguilar SJ. *Toxocara canis* y síndrome larva migrans visceralis. Rev Electrón Vet. 2006; 7:1-42.
- De Savigny DH, Voller A, Woodruff AW. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. J Clin Pathol. 1979; 32:284-288.
- Deepika F, Wickramasinghe P, Kapilananda MG, Dewasurendra RL, Amarasooriya MS, Dayaratne GAK. *Toxocara* seropositivity in Sri Lankan children with asthma. Pediatrics Int. 2008; 50:1-5.
- Degregorio OJ, Sommerfelt IE, De Cousandier AS, López CM, Franco AJ. Evolución de huevos de *Toxocara canis* a su estadio infectante. Avance en Ciencias Veterinarias. 1997; 12:101-103.

- Delgado O, Rodríguez-Morales AJ. 2009. Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariasis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina. Bol Malariología y Salud Ambiental. XLIX, 1.
- Demirci M, Korkmar M, Sakru N, Kaya S, Kuman A. Diagnostic importance of serological methods and eosinophilia in tissue parasites. J Health Popul Nutr. 2002; 20:352-355.
- Dent JH, Nichols RL, Beaver PC, Carrera GM, Staggers RJ. Visceral larva migrans with a case report. Amer J Path. 1956; 32:777-803.
- Desowitz RS, Rudoy R, Barnwell JW. Antibodies to canine helminth parasites in asthmatic and nonasthmatic children. Int Arch Allergy Immun. 1981; 65:361-366.
- Despommier D. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. Clin Microbiol Rev. 2003; 16:265-272.
- Devoy KJ, Holland CV. Contamination of the hair of owned dogs with the eggs of *Toxocara spp.* Vet Parasitol. 2010; 173:161-164.
- Doğan N, Dinleyici EC, Bor Ö, Özensoytöz S, Özbel Y. Seroepidemiological survey for *Toxocara canis* infection in the Northwestern part of Turkey. Türkiye Parazitol Derg. 2007; 31:288-291.
- Draski LJ, Summers B, Cypess RH, Burrig RG, Donovan PJ. The impact of single versus repeated exposure of mice to *Toxocara canis*. PhysiolBehav. 1987; 40:301-306.
- Duménigo B, Gálvez D, Soil contamination in ciudad de La Habana province with *Toxocara canis* eggs. Rev Cubana Med Trop Parasitol. 1995; 47:178-180.
- Dunsmore JD, Thompson RCA, Bates IA. Prevalence and survival of *Toxocara canis* eggs in the urban environment of Perth, Australia. Vet Parasitol. 1984; 16:303-311.

- Durant JF, Irengue LM, Fogt-Wyrwas R, Dumont C, Doucet JP, Mignon B, Losson B, Gala JL. Duplex quantitative real-time PCR assay for the detection and discrimination of the eggs of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* (Nematoda, Ascaridoidea) in soil and fecal samples. *Parasites & Vectors*. 2012; 5:288.
- Dziemian E, Zarnowska H, Kolodziej-Sobocińska M, Machnicka B. Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in human Toxocariasis. *Parasite Immunol*. 2008; 30:187-190.
- Eguía-Aguilar P, Cruz-Reyes A, Martínez-Maya JJ. Ecological analysis and description of the intestinal helminths present in dogs in Mexico City. *Vet Parasitol*. 2005; 127:139-146.
- El-Tras WF, Holt HR, Tayel AA. Risk of *Toxocara canis* eggs in stray and domestic dog hair in Egypt. *Vet Parasitol*. 2011; 178:319-323.
- Espinoza Y, Huapaya P, Sevilla C, Huiza A, Jimenez S, Naquira C. Toxocariosis humana: seroprevalencia en población de Lima mediante la técnica de ELISA. *An Fac Med*. 2003; 64:228-232.
- Espinoza YB, Vildozola HG, Jiménez SR, Roldán WG, Huapaya PH, Villar CH, Rfojas CA. Prevalencia estimada de Toxocariosis humana en la region de Lima. *An Fac Med*. 2016; 77:21-4.
- Fahrion AS, Schnyder M, Wichert B, Deplazes P. Toxocara eggs shed by dogs and cats and their molecular and morphometric species-specific identification: is the finding of *T. cati* eggs shed by dogs of epidemiological relevance?. *Vet Parasitol*. 2011; 177:186-189.
- Fallah M, Azimi A, Taherkhani H. Seroprevalence of Toxocariasis in children aged 1-9 years in Western Islamic Republic of Iran, 2003. *East Mediterr Health J*. 2007; 13:1073-1077.

- Fan CK, Hung CC, Du WY, Liao CW, Su KE. Seroepidemiology of *Toxocara canis* infection among mountain aboriginal schoolchildren living in contaminated districts in Eastern Taiwan. *Trop Med Int Health*. 2004; 19:1312-1318.
- Fernández AMP, Martínez-Barbosa I, Gutiérrez MQ, Vázquez OT, Pérez MJL, García YY. Serología para la detección de helmintos extraintestinales en niños con alteraciones neurológicas. *Rev Mex Pathol Clin*. 1999; 46:217-221.
- Fernández PAM, Martínez-Barbabosa I, Gutiérrez QM, Vázquez TO, Pérez LMJ, García YY. Serología para la detección de helmintos extraintestinales en niños con alteración neurológica. *Rev Méx Patol Clin*. 1999; 46:217-221.
- Fernández-Campos F, Cantó-Alarcón GJ. Frecuencia de helmintos en intestinos de perros sin dueño sacrificados en la ciudad de Querétaro, Querétaro, México. *Vet Méx*. 2002; 33:247-253.
- Fillaux J, Magnaval JF. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Vet Parasitol*. 2013; 193:327-336.
- Fillaux J, Santillan G, Magnaval JF, Jensen O, Larrieu E, Sobrino-Becaria CD. Epidemiology of toxocariasis in a steppe environment: The Patagonia study. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 76:1145-1147.
- Finsterer J, Auer H. Neurotoxocarosis. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2007; 49:279-287.
- Fonrouge R, Guardis MV, Radman NE, Archell SM. Contaminación de suelos con huevos de *Toxocara* sp. en plazas y parques públicos de la ciudad de La Plata. Buenos Aires Argentina. *Bol Chil Parasitol*. 2000; 55:3-4.
- Fontanarrosa MF, Vezzani D, Basabe J, Eiras DF. An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): age, gender, breed, mixed infections and seasonal and spatial patterns. *Vet Parasitol*. 2006; 136:283-95.

- Fu CJ, Chuang TW, Lin HS, Wu CH, Liu YC, Langinwr MR, Lu MY, Hsiao WWW, Fan CK. Seroepidemiology of *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in the capital area of the Republic of the Marshall Islans. BMC Infectious Diseases. 2014; 14:261.
- Gawor J, Borecka A, Zarnowska H, Marczyńska M, Dobosz S. Environmental and personal risk factors for toxocariosis in children with diagnosed disease in urban and rural areas of central Poland. Vet Parasitol. 2008; 155:217-222.
- Gems D, Maizels RM. An abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: the precursor of the larval surface coat glycoproteins. Proc Natl Acad Sci. 1996; 93:1665-1670.
- Giacometti A, Cirioni O, Fortuna M, Osimani P, Antonicelli L, Prete MS, D'Errico MM, Petrelli E, Scalise G. Environmental and serological evidence for the presence of Toxocariasis in the urban area of Ancona, Italy. Eur J Epidemiol. 2000; 16:1023-1026.
- Gillespie SH, Bidell D, Voller A, Robertson BD, Maizels RM. Diagnosis of human Toxocariasis by antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. J Clin Pathol. 1993; 46:551-554.
- Gillespie SH, Bidwell D, Voller A, Robertson BD, Maizels RM. Diagnosis of human toxocariosis by antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. J Clin Pathol. 1993; 46:551-554.
- Gillespie SH. The epidemiology of *Toxocara canis*. Parasitology Today. 1988; 4:180-82.
- Glickman L, Schantz P, Dombroske R, Cypess R. Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. Am J Trop Med Hyg. 1978; 27:492-498.
- Glickman LT, Schantz PM. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. Epidemiol Rev. 1981; 3:230-250.

- Gonzalez-Quintela A, Gude F, Campos J, Garea MT, Romero PA, Rey J, Meijide LM, Fernandez-Merino MC, Vidal C. Toxocara infection seroprevalence and its relationship with atopic features in a general adult population. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006; 139:317-324.
- Good B, Holland CV, Taylor MRH, Larragy J, Moriarty P, Óregan M. Ocular Toxocariasis in school children. *Clin Infect Dis.* 2004; 39:173-178.
- Grover R, Bhatti G, Aggarwal A, Malla N. Isolation of Toxocara eggs in and around Chandigarh, India. *J Parasit Dis.* 2000; 24:57-59.
- Gueglio B, Gentile L, Nguyen JM, Achard J, Chabasse D, Marjolet M. Epidemiologic approach to human Toxocariasis in Western France. *Parasitol Res.* 1994; 80:531-536.
- HabluetzEl A, Traldi G, Ruggieri S, Attili AR, Scuppa P, Marchetti R, Menghini G, Esposito F. An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. *Vet Parasitol.* 2003; 113:243-252.
- Hackett T, Lapain MR. Prevalence of enteric pathogens in dogs of North-Central Colorado. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2003; 39:52-56.
- Havasiová K, Dubinský P, Stefancíková A. A seroepidemiological study of human *Toxocara* infection in the Slovak Republic. *J Helminthol.* 1993; 67:291-296.
- Hayashi E, Tuda J, Imada M, Akao N, Fujita K. The high prevalence of asymptomatic *Toxocara* infection among schoolchildren in Manado, Indonesia. *South Asian J Trop Med Public Health.* 2005; 36:1399-1406.
- Holland CV, Lorcaín PO, Taylor MRH, Kelly A. Sero-epidemiology of toxocariasis in school children. *J Parasitol.* 1995; 110:535-545.
- Iddawela RD, Rajapakse RPVJ, Perera NAND, Agatsuma T. Characterization of a *Toxocara canis* species-specific excretory-secretory antigen (TcES-57) and

development of a double sandwich ELISA for diagnosis of visceral larva migrans. *Korean J Parasitol.* 2007; 1:19-26.

Ishiyama I, Ono K, Rai SK, Uga S. Method for detecting circulating *Toxocara canis* antigen and its application in human serum samples. *Nepal Med Coll J.* 2009; 11:9-13.

Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J. Immunodiagnosis of toxocariosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol.* 1991; 29:1831-1835.

Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J. Immunodiagnosis of Toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol.* 1991; 29:1831-1835.

Janecek E, Beineke A, Schnieder T, Strube C. Neurotoxocarosis: marked preference of *Toxocara canis* for the cerebrum and *T. cati* for the cerebellum in the paratenic model host mouse. *Parasites & Vectors.* 2014; 7:194.

Kanafani ZA, Skoury A, Araj GF, El-Khoury M. Seroprevalence of Toxocariasis in Lebanon: a pilot study. *Parasitol.* 2006;132: 635-639.

Kimura A, Morishima Y, Nagahama S, Horikosh T, Edgawa A, Kawabuchi-ñKurata T, Sugiyama H, Yamasaki H. A coprological survey of intestinal helminthes in stray dogs captured in Osaka Prefecture, Japan. *J Vet Med Sci.* 2013; 75:1409-1411.

Laird RP, Carballo DA, Reyes EMZ, García RR, Prieto VD. *Toxocara* sp. en parques y zonas públicas de ciudad de la Habana 1995. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 2000; 38:112-6.

Lee ACY, Schantz PM, Kazacos KR, Montgomery SP, Bowman DD. Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. *Cell Press.* 2010; 26:155-161.

- Liao CW, Sukati H, D'lamini P, Chou CM, Liu YH, Huang YC, Chung MH, Mtsetfwa JS, Jonato J, Chiu WT, Chang PWS, Du WY, Chan HC, Chu TB, Cheng HC, Su WW, Tu CC, Cheng CY, Fan CK. Seroprevalence of *Toxocara canis* infection among children in Swaziland, Southern Africa. *Ann Trop Med Parasitol.* 2010; 104:73-80.
- Lima CRA, Bezerra CJRL, Pessoa PE, Araki K, Takeuchi T, Ito A, Aoki T, Yamasaki H. Prevalence of Toxocariasis in northeastern Brazil based on serology using recombinant *Toxocara canis* antigen. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 72:103-107.
- Logar J, Šoba B, Kraut A, Stirn-Kranjc B. Seroprevalence of *Toxocara* antibodies among patients suspected of ocular Toxocariasis in Slovenia. *Korean J Parasitol.* 2004; 42:137-140.
- López JD, Abarca KV, Paredes PM, Inzunza ET, Parásitos intestinales en caninos y felinos con cuadros digestivos en Santiago, Chile. Consideraciones en salud pública. *Rev Med Chile.* 2006; 134:193-200.
- López MA, Bojanich MV, Alonso JM. Efecto de la exposición a *Toxocara canis* en pacientes con asma bronquial. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.* 2006.
- Lozano DFB, Suarez EB, Ortuño EU, Cruz MT, Cordova MR, Getaz GJ, Getaz L. Relación entre asma y Toxocariasis en pacientes pediátricos en Cochabamba, Bolivia. *Gac Med Bol.* 2011; 34:76-79.
- Luo ZJ, Wang GX, Yang CL, Luo CH, Cheng SW, Liao L. Detection of circulating antigens and antibodies in *Toxocara canis* infection among children in Chengdu, China. *J Parasitol.* 1999; 85:252-256.
- Lynch NR, Wilkes LK, Hodgen AN, Turner KJ. Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. *Parasite Immunol.* 1988; 10:323-337.
- MagnaVal JF, Fabre R, Mauriere P, Charlet JP, Larrard B. Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* immunoglobulin E

for diagnosis and posttreatment follow-up of human Toxocariasis. *J Clin Microbiol.* 1992; 30:2269-2274.

MagnaVal JF, Fabre R, Maurières P, Charlet JP, Larrard B. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human Toxocariasis. *Parasitol Res.* 1991; 77:697-702.

MagnaVal JF, Fabre R, Maurières P, Charlet JP, Larrard B. Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-toxocara Immunoglobulin E for diagnosis and posttreatment follow-up of human toxocariosis. *J Clin Microbiol.* 1992; 30:2269-2274.

MagnaVal JF, Glickman LT, Dorchies P, Morassin B. Highlights of human toxocariosis. *Korean J Parasitol.* 2001; 39:1-11.

MagnaVal JF, Michault A, Calon N, Charlet JP. Epidemiology of human toxocariasis in La Réunion. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994; 88:531-533.

Maizels RM, Tetteh KKA, Loukas A. *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *Int J Parasitol.* 2000; 30:495-508.

Malla N, Aggarwal AK, Mahajan RC. A serological study of human Toxocariasis in North India. *Natl Med J India.* 2002; 15:145-147.

Martínez-Barbabosa I, Fernández PAM, Vázquez TO, Ruiz TO, Ruiz HA. Frecuencia de *Toxocara canis* en perros y áreas verdes del sur de la ciudad de México, Distrito Federal. *Vet Méx.* 1998; 29:239-244.

Martínez-Barbabosa I, Gutiérrez EMC, Sosa AAE, Pimienta LRJ. Contaminación parasitaria en heces de perros, recolectadas en calles de la ciudad de San Cristobal de las Casas, Chiapas, México. *Vet. Méx.* 2008; 39:173-180.

- Martínez-Barbosa I, Gutiérrez MQ, Fernández AMP, Pérez MJL, Vázquez OT, García YY. Reactividad serológica a antígeno de *Toxocara canis* en una población escolar. *Rev Mex Pathol Clin.* 1997; 44:85-89.
- Martínez-Barbosa I, Gutiérrez MQ, Ruiz LAG, Gutiérrez EMC, Sosa AAE, Valencia JLJ, Gaona E. Prevalence of anti-*T. canis* antibodies in stray dogs in Mexico City. *Vet Parasitol.* 2008; 153:270-276.
- Minvielle MC, Niedfeld G, Ciamela ML, De Falco A, Ghiani H, Basualdo JA. Asthma and covert Toxocariasis. *Medicina.* 1999; 59:243-248.
- Mizgajska H. Eggs of *Toxocara* spp. in the environment and their public health implications. *J Helminthol.* 2001; 75:147-151.
- Mohamad S, Azmi NC, Noordin R. Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human Toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). *J Clin Microbiol.* 2009; 47:1712-1717.
- Morrondo P, Diez-Morrondo C, Pedreira J, Diez-Baños N, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Diez-Baños P. *Toxocara canis* larvae viability after disinfectant-exposition. *Parasitol Res.* 2006; 99:558-561.
- Mortimer K, Brown A, Feary J, Jagger C, Lewis S, Antoniak M, Pritchard D, Britton J. Dose-ranging study for trials of therapeutic infection with *Necator americanus* in humans. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 75:914-920.
- Mosayebi M, Moini L, Hajihosseini R, Didehdar M, Eslamirad Z. Detection of specific antibody reactivity to *Toxocara* larval excretory-secretory antigens in asthmatic patients (5-15 years). *Open Microbiol J.* 2016; 10:162-167.
- Muñoz-Guzmán MA, Alba-Hurtado F. Antígenos de secreción-excreción de *Toxocara canis* reconocidos por cachorros del área metropolitana de la Ciudad de México. *Vet Mex.* 2010; 41:59-64.

- Muñoz-Guzmán MA, del Río-Navarro BE, Valdivia-Anda G, Alba-Hurtado F. The increase in seroprevalence to *Toxocara canis* in asthmatic children is related to cross-reaction with *Ascaris suum* antigens. *Allergol Immunopathol.* 2009; 9:001-007.
- Muradian V, Genmari SM, Glickman LT, Pinheiro SR. Epidemiological aspects of visceral larva migrans in children living at São Paulo (SP), Brazil. 2005; 134:93-97.
- Nadler SA, Hudspeth DSS. Ribosomal DNA and phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Secernentea): implications for morphological evolution and classification. *Mol Phylogenet Evol.* 1998; 10:221-36.
- Nadler SA. Phylogeny of some Ascaridoid nematodes, inferred from comparison of 185 and 285 rRNA sequences. *Mol Biol Evol.* 1992; 9:932-44.
- Navarrete N, Rojas E. Seroprevalencia de Toxocariosis en donantes de sangre. *Arch Med Vet.* 1998; 30.
- Nava CN, Romero NC, Bautista GLG, Hernández GPA, Heredia CR. Presence of anti-*Toxocara canis* antibodies and risk factors in children from the Amecameca and Chalco regions of Mexico. *BMC Pediatrics.* 2015; 15:1-5.
- Neves D, Lobo L, Simoes PB, Lardoso L. Frequency of intestinal parasites in pet dogs from an urban area (Greater Oporto, Northern Portugal). *Vet Parasitol.* 2014; 200:295-298.
- Nicholas WL, Stewart AC, Walker JC. Toxocariasis: A serological survey of blood donors in the Australian capital territory together with observations on the risks of infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986; 80:217-221.
- Nichols RL. The etiology of visceral larva migrans. Diagnostic and morphology of infective second-stage *Toxocara canis* larvae. *J Parasitol.* 1956; 42:349-362.

- Nijse R, Mughini-Gras L, Wagenaar JA, Ploeger HW. Recurrent patent infections with *Toxocara canis* in household dogs older than six months: a prospective study. *Parasites & Vectors*. 2016; 9:531.
- Nikolić A, Dimitrijević S, Katić-Radivojević S, Klun I, Bobić B, Djurković-Djaković O. High prevalence of intestinal zoonotic parasites in dogs from Belgrade Serbia- Short communication. *Acta Vet Hung*. 2008; 56:335-340.
- Nonaka N, Nakamura S, Inoue T, Oku Y, Katakura K, Matsumoto J, Mathis A, Chembesofu M, Phiri IG. Coprological survey of alimentary tract parasites in dogs from Zambia and evaluation of a coproantigen assay for canine *Echinococcosis*. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011; 105:521-531.
- Noordin R, Smith HV, Mohamad S, Maizels RM, Fong MY. Comparison of IgG-ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. *Acta Trop*. 2005; 93:57-62.
- Nunes CM, Tundisi RN, Heinemann MB, Ogassawara S, Richtzenhain LJ. Toxocariasis: serological diagnosis by indirect antibody competition ELISA. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1999; 41.
- Öge S, Öge H, Gönenç B, Özbakis G, Vildiz C. Presence of *Toxocara* eggs on the hair of dogs and cats. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*. 2013; 60:171-176.
- Oliveira-Sequeira TC, Amarante AF, Ferrari TB, Nunes LC. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*. 2002; 103:19-27.
- Oteifa NM, Moustafa MA. The potential risk of contracting Toxocariasis in Heliopolis district, Cairo, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol*. 1997; 27:197-203.
- Othman RA. Prevalence of *Toxocara canis* in dogs, North West Bank of Palestine. *Korean J Parasitol*. 2011; 49:181-182.
- Overgaauw PAM, Van Knapen F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet Parasitol*. 2013; 193:398-403.

- Paludo ML, Falavigna DLM, Elefant GR, Gomes ML, Baggio MLM, Amadei LB, Falavigna-Guilherme AL. Frequency of *Toxocara* infection in children attended by the health public service of Maringá, South Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2007; 49:343-348.
- Park HY, Lee SU, Huh S, Kong Y, Magnaval JF. A seroepidemiological survey for toxocariosis in apparently healthy residents in Gangwon-do, Korea. *Korean J Parasitol*. 2002; 40:113-117.
- Perteguer MJ, Cuellar C, Guillén JL, Águila C, Fenoy S, Chivato T, Laguna R. Cross-reactivity between *Anisakis simplex* sensitization and visceral larva migrans by *Toxocara canis*. *Acta Trop*. 2003; 89:85-89.
- Plaza MV, Álvarez GFJ, Casan CP, Cobos BN, López VA, Llauger RMA, Quintano JJA. Guía Española para el manejo del asma. *Arch Bronconeumol*. 2003; 39:3-42.
- Ponce-Macotela M, Peralta-Abarca GE, Martínez-Gordillo MN. *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: Prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico City. *Vet Parasitol*. 2005; 131:1-4.
- Ponce-Macotela M, Rodríguez-Caballero A, Peralta-Abarca GE, Martínez-Gordillo MN. A simplified method for hatching and isolating *Toxocara canis* larvae to facilitate Excretory-Secretory antigen collection in vitro. *Vet Parasitol*. 2011. 175:382-385.
- Ponce-Macotela M., Martínez-Gordillo MN, Caballero-Salazar S, Rodríguez-Caballero A, De la Rosa Arana JL. Toxocariosis. en Becerril-Flores, M.A. Editor. *Parasitología médica. Tercera Edición*. Editorial, Mc Graw-Hill, Interamericana, México. 2011. ISBN:978-607-15-0512-5.
- Rai SK, Uga S, Ono K, Nakanishi M, Shrestha HG, Matsumura T. Seroepidemiological study of *Toxocara* infection in Nepal. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1996; 27:286-290.

- Ramírez-Barrios RA, Barboza-Mena G, Muñoz J, Angulo-Cubillán F, Hernández E, González F, Escalona F. Prevalence of intestinal parasites in dogs under veterinary care in Maracaibo, Venezuela. *Vet Parasitol.* 2004; 121:11-20.
- Robertson BD, Burkot TR, Gillespie SH, Kennedy MW, Wambai Z, Maizels RM. Detection of circulating parasites antigen and specific antibody in *Toxocara canis* infections. *Clin Exp Immunol.* 1988; 74:236-241.
- Roddie G, Stafford P, Holland C, Wolfe A. Contamination of dog hair with eggs of *Toxocara canis*. *Vet Parasitol.* 2008; 152:85-93.
- Rodríguez-Caballero A, Luna-Ochoa RI, Ponce-Macotela M, Peralta-Abarca GE, Martínez-Gordillo MN. A simple and inexpensive in vitro method for retrieving fertilized *Toxocara canis* eggs. *Parasitol Res.* 2007; 101:829-832.
- Rodríguez-Caballero A, Martínez-Gordillo MN, Medina-Flores Y, Medina-Escutia ME, Meza-Lucas A, Correa D, Caballero-Salazar S, Ponce-Macotela M. Successful capture of *Toxocara canis* larva antigens from human serum samples. *Parasit Vectors.* 2015; 8:264.
- Rodríguez-Caballero A, Martínez-Gordillo MN, Caballero-Salazar S, Rufino-González Y, Ponce-Macotela M. *Toxocara canis*: Analysis of the kinetics of antigen release and antibody production in an in vivo model for the detection of past or present infection. *Vet Parasitol.* 2017; 243:183-187.
- Roldán WH, Espinoza YA, Huapaya PE, Huiza AF, Sevilla CR, Jiménez S. Frequency of human toxocariasis in a rural population from Cajamarca, Perú, determined by dot-ELISA test. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2009; 51:67-71.
- Roldán WH, Espinoza YA, Huapaya PE, Jimenez S. Diagnóstico de la toxocarosis humana. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 2010; 27.
- Romano N, Nor A, Rahmah N, Lim YAL, Rohela M. Seroprevalence of Toxocariasis among Orang Asli (Indigenous people) in Malaysia using two immunoassays. *Trop Biomed.* 2010; 27:585-594.

- Romero NC, Mendoza MGD, Yañez AS, Ponce-Macotela M, Bustamante MP, Ramírez DN. Prevalence and risk factors associated with *Toxocara canis* infection in children. *Sci World J.* 2013; Artic, Id 572089; 1-4.
- Rubel D, Zunino G, Santillán G, Wisnivesky C. Epidemiology of *Toxocara canis* in the dog population from two areas of different socioeconomic status, Greater Buenos Aires, Argentina. *Vet Parasitol.* 2003; 115:275-286.
- Sahu S, Samantha S, Riana OK, Gupta SC, Sudhakar NR, Maruya PS, Pawde AM, Kumar A. Prevalence of canine Toxocariasis in Bareilly, Uttar Pradesh, India. *Parasit Dis.* 2014; 38:111-115.
- Santarém VA, Leli FNC, Rubinsky-Elefant G, Giuffrida. Protective and risk factors for Toxocariasis in children from two different social classes of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2011; 53:67-72.
- Sariego I, Kanobana K, Rojas L, Speybroeck N, Polman K, Nuñez FA. Toxocariasis in Cuba: a literature review. *Plos Negl Trop Dis.* 2012; 6:1-7.
- Schnieder T, Laabs EM, Welz C. Larval development of *Toxocara canis* in dogs. *Vet Parasitol.* 2010; 175:193-206.
- Schnieder T, Laabs EM, Welz C. Larval development of *Toxocara canis* in dogs. *Vet Parasitol.* 2011; 175:193-206.
- Schurer JM, Ndao M, Skinner S, Irvine J, Elmore SA, Epp T, Jenkins EJ. Parasitic zoonoses: one health surveillance in Northern Saskatchewan. *Plos Negl Trop Dis.* 2013; 7:1-7.
- Smith AF, Semeniuk AD, Kutz SJ, Massolo A. Dog-walking behaviours affect gastrointestinal parasitism in park-attending dogs. *Parasites & Vectors.* 2014; 7:429.

- Smith H, Holland C, Taylor M, Magnaval JF, Schantz P, Maizels R. How common is human Toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Cell Press*. 2009; 25:182-188.
- Speiser F, Gottstein B. A collaborative study on larval excretory/secretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human Toxocariasis with ELISA. *Acta Trop*. 1984; 41:361-372.
- Stensvold CR, Skov J, Møller LN, Jensen PM, Kapel CMO, Petersen E, Nielsen HV. Seroprevalence of human toxocariasis in Denmark. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16:1372-1373.
- Strube C, Heuer L, Janecek E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Vet Parasitol*. 2013; 193:375-389.
- Sviben M, Čavlek T, Missoni E, Galinović G. Seroprevalence of *Toxocara canis* infection among asymptomatic children with eosinophilia in Croatia. *J Helminthol*. 2009; 83:369-371.
- Taranto NJ, Cajal SP, Marzi D, Fernández MM, Frank FM, Brú AM, Minvielle MC, Basualdo JA, Malchiodi EL. Clinical status and parasitic infection in a Wichi aboriginal community in Salta, Argentina. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003; 97:554-558.
- Tavassoli M, Javadi S, Firozi R, Rezaei F, Khezri AR, Hadian M. Hair contamination of sheepdog and pet dogs with *Toxocara canis* eggs. *Iran J Parasitol*. 2012; 7:110-115.
- Taylor MR, Keane CT, O'Connor P, Girdwood RW, Smith H. Clinical features of covert toxocariasis. *Scand J infect Dis*. 1987; 19:693-696.
- Torres P, Franjola T, Pérez J, Avad S, Hermosilla C, Flores L, Riquelme J, Salazar S, Miranda JC, Montefusco A. Geohelminthosis intestinales en el hombre y animals domésticos de sectores ribereños de la Cuenca del río Valdivia Chile. *Bol Chil Parasitol*. 1995; 50:57-66.

- Traversa D, Frangipane RA, Di Cesare A, La Torre F, Drake J, Pietrobelli M. Environmental contamination by canine geohelminths. *Parasites & Vectors*. 2014; 7:67.
- Tullis DCH, MB, CHB. Bronchial asthma associated with intestinal parasites. *N Engl J Med*. 1970; 282:370-372.
- Uga S, Matsuo J, Kimura D, Rai SK, Koshino Y, Igarashi K. Differentiation of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs by light and scanning electron microscopy. *Vet Parasitol*. 2000; 92:287-294.
- Vásquez-Tsuji O, Ruiz-Hernández A, Martínez-Barbosa I, Merlín-Marín PN, Tay-Zavala J, Pérez-Torres A. Soil contamination with *Toxocara* sp. eggs in public parks and home gardens from Mexico City. *Bol Chil Parasitol*. 1996; 51:54-58.
- Webster GA. A report on *Toxocara canis* Werner, 1782. *Can J Comp Med*. 1958; 22:272-279.
- Wo ZJ, Wang GX, Yang CL, Wo CH, Cheng SW, Liao L. Detection of circulating antigens and antibodies in *Toxocara canis* infection among children in Chengdu, China. *J Parasitol*. 1999; 85:252-256.
- Wolfe A, Wright IP. Human toxocariosis and direct contact with dogs. *Vet Rec*. 2003; 152:419-422.
- Won KY, Kruszon-Moran D, Schantz PM, Jones JL. National seroprevalence and risk factors for zoonotic *Toxocara spp.* infection *Am J Trop Med Hyg*. 2008; 79:552-557.
- Won KY, Kruszon-Moran D, Schantz PM, Jones JL. National seroprevalence and risk factors for zoonotic *Toxocara spp.* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2008; 79:552-557.

- Xhaxhiu D, Kusi I, Rapti D, Kondi E, Postol R, Rinaldi L, Dimitrova ZM, Visser M, Knaus M, Rehbein I. Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania. *J Parasitol Res.* 2011; 108:341-353.
- Yacob HT, Ayele R, Fikrv R, Basvak. Gastrointestinal nematodes in dogs from Debre Zeit, Ethiopia. *Vet Parasitol.* 2007; 148:144-148.
- Yamasaki H, Araki K, Lim PKC, Zasmy N, Mak JW, Taib R, Aoki T. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larvae excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human Toxocariasis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:1409-1413.
- Yamasaki H, Taib R, Watanabe Y, Mak JW, Zasmy N, Araki K, Chooi LPK, Kita K, Aoki T. Molecular characterization of a cDNA encoding an excretory-secretory antigen from *Toxocara canis* second stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human Toxocariasis. *Parasitol Int.* 1998; 47:171-181.
- Yan J, Chenghua S, Sun H, Woon-Mok S, Min-Ho C, Sung-Tae H. Serodiagnosis of Toxocariasis by ELISA using crude antigen of *Toxocara canis* larvae. *Korean J Parasitol.* 2013; 51:433-439.
- Yokoi K, Kobayashi F, Sakai J, Usui M, Tsuji M. Sandwich ELISA detection of excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* larvae using a specific monoclonal antibody. *Sotheast Asian J Trop Med Public Health.* 2001; 33.
- Zahabiun F, Sadjjadi SM, Yunus MH, Rahumatullah A, Moghaddam MHF, Saidin S, Noordin R. Production of *Toxocara cati* TES-120 recombinant antigen and comparison with its *T. canis* homolog for serodiagnosis of Toxocariasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2015; 93:319-325.
- Zarnowska H, Borecka A, Gawor J, Marczyńska M. A serological and epidemiological evaluation of risk factors for Toxocariasis in children in central Poland. *J Helminthol.* 2008; 82:123-127.

Zunino MG, Francesco MV, Kurvc JA, Schweigmann N, Wisnivesky-Colli MC, Jensen O. Contaminación por helmintos en espacios públicos de la provincia de Chubut, Argentina. Bol Chil Parasitol. 2000; 55.

13 ANEXOS

Anexo 1: CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN

Por este medio y en acuerdo a las Buenas Práctica Clínicas, en este acto otorgo el consentimiento bajo forma voluntaria como padre, madre o tutor, directamente responsable del cuidado y atención del paciente, para formar parte del estudio que se realiza en el Servicio de Alergia y Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, intitulado “Búsqueda de la asociación entre la concentración de antígenos circulantes de la fase larvaria de *Toxocara canis* con los diferentes niveles de gravedad del asma en pacientes pediátricos” Se me ha informado que mi hijo (a) tiene el diagnóstico de Asma y que puede ser debido a la migración de un parásito llamado *Toxocara canis* y que para poderlo diagnosticar es necesario tomar 3 mL de sangre del paciente que se utilizará para el diagnóstico de larva migrans mediante el ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas).

La larva del parásito *Toxocara canis* cuando migra por el aparato respiratorio produce fiebre, tos, y ruidos pulmonares anormales (cuadro asmatiforme).

1.- ¿En qué consiste este estudio? A los pacientes que lleguen al Servicio de Alergia con un cuadro clínico de asma, también se les diagnosticará larva migrans producida por el parásito *Toxocara canis*, para descartar que el asma sea producido por este parásito.

2.- ¿Cómo se realiza? Para el diagnóstico de larva migrans es necesario obtener 3 mL de sangre del paciente, que se utilizará para realizar las pruebas inmunológicas: para la detección de antígenos de larvas de *T. canis* y para la detección de anticuerpos anti *T.canis*, lo que llevará al diagnóstico de larva migrans aguda, activa o crónica.

Se realizarán todos los estudios necesarios para tener el diagnóstico de asma (espirometría y biometría hemática) y se solicitarán coproparasitoscópicos en serie

de tres para la búsqueda de otras parasitosis con ciclo de vida extraintestinal y que pudieran dar reacción cruzada.

3.- ¿Puede tener alguna complicación? Sera mínima al tomar la muestra de sangre, se podrá formar un hematoma en la región de la venopunción.

En caso de presentar algún efecto no deseado, se notificará al médico encargado del Servicio de Alergia, al investigador titular de este protocolo, al comité de investigación, de ética y a su familiar; se iniciará el tratamiento específico para el tipo de complicación, y se vigilarán las condiciones clínicas de paciente.

Los gastos que generen (espirometría, biometría hemática, ELISA y coproparasitoscópicos) serán cubiertos por el protocolo

Ante todo lo anterior estoy enterado y acepto que tal procedimiento forma parte del manejo que mi paciente requiere y de los beneficios que con ellos se pretende lograr, del mismo modo estoy consciente y se me ha explicado el procedimiento a realizar.

Al firmar esta carta hago constar que he sido informado de los riesgos que corre mi paciente, conozco el estado actual de su enfermedad y el procedimiento al que será sometido, y que en caso de complicaciones derivadas de factores propios de la enfermedad de mi paciente, como factores externos que pueden modificar el estado, así como situaciones de urgencia que pueden presentarse en cualquier momento durante y posterior al manejo de mi paciente y que no son previsibles; autorizo al personal de la Institución para que actúe con libertad prescriptiva bajo los principios científicos y éticos que orientan la práctica médica.

En caso de no aceptar que mi paciente ingrese al estudio, esto no modificará en forma alguna el tratamiento que se realice a mi paciente en las mejores condiciones posibles.

También se me ha aclarado que, en caso de aceptar su inclusión en el estudio, puedo decidir no continuar con el estudio en cualquier momento y no habrá ninguna sanción por este motivo.

Cabe mencionar que la información que se obtenga de mi paciente se mantendrá en absoluta confidencialidad y respeto por parte de los investigadores de dicho protocolo; se me informarán los resultados obtenidos y su inclusión a dicho estudio no causará ningún costo para el paciente. Así mismo el paciente no recibirá ninguna remuneración económica por su participación en este estudio.

Se otorga el presente Consentimiento Bajo Información en la Ciudad de México, Distrito Federal a los _____ días del mes de _____ del año _____.

Nombre completo y firma del padre: _____

Nombre completo y firma de la madre: _____

Dirección: _____

Nombre y firma de testigo: _____

Nombre y firma de testigo: _____

Nombre del Médico del Servicio de Alergia: Álvaro Pedroza Meléndez

Teléfono: _____

Firma: _____

Nombre del Investigador responsable del protocolo: Martha Ponce Macotella

Teléfono: _____

Firma: _____

Av. Insurgentes Sur 3700, Col. Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, 04530 México, D.F. Tel: 10840900.

*Se dará copia del consentimiento informado al familiar responsable y se guardará esta carta de consentimiento informado durante los próximos 5 años y se asegurará la confidencialidad de los pacientes. c/copia al protocolo y al familiar

Anexo 2: CARTA DE ASENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN

Por este medio y en acuerdo con las Buenas Práctica Clínicas, en esta carta doy el permiso en forma voluntaria yo _____ (paciente) para participar en el estudio del Servicio de Alergia y Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, “Búsqueda de la asociación entre la concentración de antígenos circulantes de la fase larvaria de *Toxocara canis* con los diferentes niveles de gravedad del asma en pacientes pediátricos”.

1.- ¿En qué consiste este estudio? En el Servicio de Alergia, además de diagnosticarme asma, también me harán estudios para diagnosticar larva migrans producida por el parásito *Toxocara canis*, para descartar que el asma sea producido por este parásito.

2.- ¿Cómo se realiza? Para que los doctores descarten el diagnóstico de larva migrans será necesario que me tomen 3 mL de sangre, que se utilizará para realizar las pruebas inmunológicas: para la detección de antígenos de larvas de *T. canis* y para la detección de anticuerpos anti *T. canis*, lo que llevará al diagnóstico de larva migrans aguda, activa o crónica.

¿Puedo tener alguna complicación?

Sera mínima al tomar la muestra de sangre, se me podrá formar un hematoma en la región de la venopunción.

En caso de presentar algún efecto no deseado se le notificará al doctor responsable del proyecto del Servicio de Alergia, al investigador titular de este proyecto, al comité de investigación, de ética y a mis padres; y se me dará tratamiento de las complicaciones. Ante todo lo anterior estoy enterado y acepto que este estudio es parte una investigación que ayudará a niños como yo para saber si el asma que padezco es debido a la larva del parásito *Toxocara canis* y se me ha explicado el procedimiento a realizar.

Al firmar esta carta hago constar que he sido informado de los riesgos que puedo presentar, conozco el estado actual de mi padecimiento y el procedimiento al que seré sometido, y que en caso de complicaciones autorizo al personal de la Institución para que actúe con libertad prescriptiva bajo los principios científicos y éticos que orientan la práctica médica.

En caso de no aceptar mi participación en el estudio, no modificaré en forma alguna el tratamiento que se me realice en las mejores condiciones posibles.

También se me ha aclarado que, en caso de aceptar mi ingreso al estudio, puedo decidir no continuarlo en cualquier momento.

Cabe mencionar que mi información se mantendrá en absoluta confidencialidad y respeto por parte de los investigadores de dicho protocolo, en caso de duda; se me informarán los resultados obtenidos y mi ingreso a este estudio no causará costos a mis papas.

Se otorga el presente Consentimiento Bajo Información en la Ciudad de México, Distrito Federal a los _____ días del mes de _____ del año _____.

Nombre completo y firma: _____

Dirección: _____

*Nombre y firma del testigo: _____

Dirección del testigo: _____

Relación con el paciente: _____

*Nombre y firma del testigo: _____

Dirección del testigo: _____

Relación con el paciente: _____

Responsable del Servicio de Alergia: Dr. Álvaro Pedroza Meléndez, Investigador responsable: Dra. Martha Ponce Macotela. Av. Insurgentes Sur 3700, Col. Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, 04530 México, D.F. Tel: 10840900.

*Se dará copia del consentimiento informado al familiar responsable y se guardará esta carta de consentimiento informado durante los próximos 5 años y se asegurará la confidencialidad de los pacientes.

Anexo 2: Tabla 8: Resultados de gabinete, clínicos y de laboratorio de los niños incluidos en este estudio.

NO. DE MUESTRA	GÉNERO	EDAD	GINA	ACQ	DX ESPIRO	EOSINÓFILOS		CPS	GEOFAGIA	PERROS
2	M	11	LEVE INTERMITENTE	-	-	0.015	0.213		NO	NO
3	M	9	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.244	4.41		NO	NO
4	F	15	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.468	8.37		NO	NO
5	M	10	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA PARCIALMENTE CONTROLADA	LEVE	0.424	8.25		NO	SI
6	F	12	LEVE PERSISTENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	NORMAL	1.31	14.9		NO	NO
7	F	15	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA PARCIALMENTE CONTROLADA	NORMAL	0.134	1.1		NO	SI
8	M	10	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL	0.164	3.08		NO	NO
9	M	8	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.539	8.83		NO	SI
10	M	13	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	RESTRICTIVO	0.307	6.73		NO	NO
12	M	8	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL	0	5.47		NO	NO
13	M	8	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.093	1.94		NO	NO
14	F	13	LEVE PERSISTENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	NORMAL	0.06	1.14		NO	SI
15	M	11	LEVE INTERMITENTE	LEVE CONTROLADA	-	0.902	12.6		NO	NO
16	M	14	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.114	1.4		SI	SI
17	M	15	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.104	1.45		NO	NO
18	M	13	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA PARCIALMENTE CONTROLADA	NORMAL	0.33	4.45		NO	NO
19	F	10	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA MAL CONTROLADA	NORMAL	0.272	4.38		NO	NO
20	M	11	LEVE PERSISTENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	-	0.41	5.9		NO	SI
21	M	6	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA MAL CONTROLADA	HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL	0.008	0.088		SI	SI
22	M	9	LEVE PERSISTENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	NORMAL	0.298	3.06		NO	SI
23	M	9	LEVE INTERMITENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.108	2.03		NO	SI
24	F	11	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.496	4.1		NO	NO
25	F	9	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.077	1.05		NO	NO

26	M	6	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.032	0.404		NO	NO
27	F	9	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.52	6.35		NO	NO
28	F	7	LEVE INTERMITENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	-	0.28	3.7		NO	NO
29	F	13	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA MAL CONTROLADA	NORMAL	0.11	1.52		NO	NO
30	F	9	LEVE INTERMITENTE	LEVE CONTROLADA	HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL	1.51	18.7		NO	NO
31	M	10	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA MAL CONTROLADA	-	.412	6.69		NO	NO
32	F	11	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	.351	3		NO	NO
33	M	9	LEVE PERSISTENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	NORMAL	.020	.214		NO	SI
34	F	12	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.036	4.94		NO	SI
35	F	14	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.445	4.75		NO	SI
36	F	9	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	-	0.026	0.628		NO	SI
37	M	17	LEVE INTERMITENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.405	6.12		NO	NO
38	F	17	LEVE PERSISTENTE	LEVE MAL CONTROLADA	NORMAL	0.299	3.92		NO	NO
39	F	15	LEVE PERSISTENTE	LEVE	-	0.116	1.61			
40	F	13	LEVE PERSISTENTE	LEVE	-	0.018	0.434			
41	F	11	LEVE PERSISTENTE	LEVE	-	0.19	3.1			
42	M	12	LEVE PERSISTENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	NORMAL	0.315	5.96		NO	NO
43	M	11	LEVE PERSISTENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	NORMAL	0.498	7.09		NO	SI
44	M	9	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA MAL CONTROLADA	HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL	0.369	12.1		NO	SI
45	F	7	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA MAL CONTROLADA	NORMAL	0.227	2.94		NO	NO
46	M	11	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA MAL CONTROLADA	NORMAL	0.309	3.52		NO	NO
47	F	10	LEVE PERSISTENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	NORMAL	0.1	1.66	<i>Endolimax nana</i>	NO	NO
48	M	9	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL	0.647	9.64		NO	NO
50	M	11	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.288	4.84	<i>Blastocystis hominis</i>	NO	SI
51	M	11	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.582	11.7		NO	SI
52	M	10	LEVE PERSISTENTE	LEVE MAL CONTROLADA	NORMAL	0.3	5.5	<i>Blastocystis hominis</i>	NO	NO
53	M	12	LEVE PERSISTENTE	LEVE MAL CONTROLADA	NORMAL	0.2	3.3		NO	NO

54	M	8	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA PARCIALMENTE CONTROLADA	-	0.1	1.4	<i>Blastocystis hominis</i>	NO	NO
55	F	6	LEVE INTERMITENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	-	0	0.5		NO	NO
56	F	15	LEVE PERSISTENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	-	0.5	8.8		NO	SI
57	M	10	LEVE PERSISTENTE	LEVE MAL CONTROLADA	-	0.3	5.5		NO	NO
58	F	9	LEVE PERSISTENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	NORMAL	0.2	3.7		NO	NO
59	M	15	LEVE INTERMITENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.5	7		NO	SI
60	F	14	LEVE INTERMITENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.4	6.9		NO	NO
61	M	12	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	-	0.1	2		NO	NO
62	F	15	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.67	8.84		NO	NO
63	F	11	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA PARCIALMENTE CONTROLADA	HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL	0.467	10.2	<i>Entamoeba coli</i>	NO	NO
64	M	8	LEVE INTERMITENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.244	3.21		NO	SI
65	F	15	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA MAL CONTROLADA	-	0	0.6		NO	SI
67	F	7	LEVE PERSISTENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	NORMAL	0.1	1.5		NO	NO
68	M	11	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA MAL CONTROLADA	HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL	0.5	8.4		NO	NO
69	F	11	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA PARCIALMENTE CONTROLADA	MODERADA	2.1	12.7		NO	SI
70	F	17	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA MAL CONTROLADA	-	0.1	1		NO	SI
71	F	8	LEVE PERSISTENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL	0.2	2.3		NO	SI
72	M	7	LEVE INTERMITENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.3	4.2		NO	SI
74	M	10	LEVE INTERMITENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.3	4.9		NO	NO
75	M	8	LEVE PERSISTENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	NORMAL	0.4	6		SI	SI
76	F	7	MODERADA PERSISTENTE	MODERADA PARCIALMENTE CONTROLADA	HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL	0.1	1.2		NO	SI
78	F	6	LEVE INTERMITENTE	LEVE MAL CONTROLADA	NORMAL	0.4	3.2		NO	NO
79	M	8	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL	0.6	10.3		NO	NO
80	F	15	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.6	4		NO	NO
81	M	7	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.1	1		NO	NO
82	F	17	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.8	9		NO	NO

83	M	11	LEVE PERSISTENTE	LEVE	NORMAL	0.2	3.2		NO	NO
84	M	8	LEVE INTERMITENTE	LEVE PARCIALMENTE CONTROLADA	NORMAL	1.1	20.7		NO	NO
85	M	8	LEVE PERSISTENTE	LEVE MAL CONTROLADA	NORMAL	1.7	17.6		NO	SI
86	M	9	LEVE PERSISTENTE	LEVE CONTROLADA	NORMAL	0.1	2.5	<i>Endolimax nana</i>	NO	NO

Anexo 3: Tabla 9: Absorbancia detectada en cada suero, con las diferentes pruebas.

NO. SUERO	ELISA INP Ac	ELISA KIT Ac	ELISA ADSORCIÓN	ÍNDICE AVIDEZ	ELISA CAP. Ag
1	0.1505	0.152	0.1505		0.281
2	0.171	0.135	0.132666667		0.27
3	0.1775	0.13	0.136833333		0.328
4	0.16	0.144	0.1305		0.261
5	0.1865	0.138	0.128333333		0.263
6	0.135	0.128	0.116		0.251
7	0.3285	0.149	0.218333333	82.79	0.2985
8	0.12775	0.153	0.132333333		0.304
9	0.1435	0.151	0.129833333		0.301
10	0.4455	0.153	0.222666667	69.32	0.2675
12	0.1485	0.146	0.113		0.2675
13	0.22025	0.149	0.135333333		0.2715
14	0.14075	0.147	0.114166667		0.263
15	0.16	0.149	0.1205		0.285
16	0.11175	0.148	0.156		0.298
17	0.6375	0.153	0.601166667	80.99	0.3035
18	0.849	0.148	0.9735	66.96	0.288
19	0.123	0.142	0.1415		0.263
20	0.183	0.152	0.169833333		0.2615
21	0.1305	0.145	0.174166667		0.256
22	0.85775	0.151	0.789	86.80	0.261
23	0.35775	0.147	0.731833333	64.60	0.2715
24	0.208	0.149	0.3805	49.75	0.3025
25	0.135	0.153	0.143333333		0.2995
26	0.17275	0.13	0.176333333		0.29
27	0.3345	0.146	0.363333333	83.63	0.277
28	0.42975	0.139	0.514833333	83.70	0.266
29	0.1475	0.14	0.14		0.2585
30	0.16775	0.139	0.191833333		0.2785
31	0.344	0.136	0.435166667	78.10	0.268
32	0.20525	0.131	0.245166667		0.278
33	0.22875	0.226	0.248333333		0.2705
34	0.226	0.149	0.326666667	81.41	0.2625
35	0.12925	0.137	0.146833333		0.2555
36	0.1375	0.125	0.152833333		0.2505
37	0.15825	0.137	0.174833333		0.2455
38	0.46425	0.136	0.588833333	79.35	0.246
39	0.14825	0.131	0.233333333		0.242
40	0.153	0.132	0.221666667		0.268

41	0.17425	0.138	0.162166667		0.2405
42	0.17125	0.133	0.1895		0.232
43	0.13925	0.141	0.164833333		0.243
44	0.12775	0.143	0.145333333		0.245
45	0.1385	0.135	0.152333333		0.2345
46	0.23025	0.167	0.252666667		0.241
47	0.17275	0.131	0.191666667		0.243
48	0.2445	0.161	0.139		0.2635
50	0.16425	0.149	0.144666667		0.2425
51	0.15725	0.242	0.2		0.305
52	0.2155	0.127	0.238666667		0.3095
53	0.1995	0.132	0.222833333		0.361
54	0.1375	0.139	0.1455		0.5045
55	0.21525	0.161	0.225166667		0.3665
56	0.188	0.138	0.185666667		0.3365
57	0.3145	0.166	0.33	87.04	0.3195
58	0.21575	0.145	0.248166667		0.3345
59	0.478	0.131	0.459666667	87.28	0.3045
60	0.1615	0.138	0.1695		0.3015
61	0.4385	0.205	0.496333333	67.40	0.31
62	0.1265	0.131	0.127833333		0.3085
63	0.13175	0.133	0.1315		0.32
64	0.62725	0.622	0.372	75.79	0.3145
65	0.156	0.135	0.148833333		0.299
67	0.4565	0.135	0.5345	74.52	0.3035
68	0.2465	0.149	0.245333333		0.3375
69	0.6925	0.137	0.872333333	81.52	0.27
70	1.1995	0.126	1.418666667	67.64	0.285
71	0.127	0.136	0.136166667		0.301
72	0.1975	0.139	0.168333333		0.3205
74	0.2305	0.136	0.192		0.314
75	0.839	0.482	0.315333333	89.69	0.309
76	0.20225	0.135	0.229333333		0.289
78	0.1805	0.144	0.2105		0.288
79	0.139	0.154	0.202166667		0.311
80	0.35825	0.139	0.461833333	72.20	0.3075
81	0.14825	0.137	0.156		0.324
82	0.2115	0.142	0.3026	64.51	0.325
83	0.1345	0.142	0.1522		0.294
84	0.16075	0.137	0.1642		0.304
85	0.285	0.141	0.3128	77.71	0.2885
86	0.1685	0.14	0.1822		0.2955

En color azul se resaltan los valores de los sueros positivos en cada unade los ELISA. Valor de Corte (VC). ELISA INP Y ELISA Adsorción: 0.26; V.C. ELISA KIT: 0.3, V.C. ELISA Captura Ag: 0.39.

Anexo 4: Preparación de reactivos

➤ Amortiguador de boratos (pH 8.2)

Reactivos	Cantidad (g)
Ácido bórico	6.18
Tetraborato de sodio	9.54
NaCl	4.38

Los reactivos se mezclaron en 800 ml de Agua destilada grado II, se ajustó a pH 8.2, se aforó a 1.0 L y se mantuvo a 4°C.

➤ Amortiguador de carbonatos (0.1M, pH 9.6)

Reactivos	Cantidad (g)
Na ₂ CO ₃	3.18
NaHCO ₃	5.86

Los reactivos se mezclaron en 800 ml de Agua destilada grado II, se ajustó a pH 9.6, se aforó a 1.0 L y se mantuvo a 4°C.

➤ Solución amortiguada de fosfatos (PBS 1X)

Reactivos	Cantidad (g)
NaCl	8.006
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	0.612
KH ₂ PO ₄	0.19

Los reactivos se mezclaron en 800 ml de Agua destilada grado II, se ajustó a pH 7.2, se aforó a 1.0 L y se mantuvo a 4°C.

➤ **Solución de lavado I (SL I) (PBS Tween 20 al 0.05%)**

Reactivos	Cantidad (ml)
Tween 20	0.5
PBS 1x pH 7.2	1000

Los reactivos se mezclaron en 800 ml de Agua destilada grado II, se aforó a 1.0 L y se mantuvo a 4°C.

➤ **Solución de lavado II (SLII) (NaCl 0.9% - Tween 20 al 0.05%)**

Reactivos	Cantidad
NaCl	9.0 g
Tween 20	0.5 µl

Los reactivos se mezclaron en 800 ml de Agua destilada grado II, se aforó a 1.0 L y se mantuvo a 4°C.

➤ **Solución de lavado III (SLIII) (Urea al -PBS Tween 20 al 0.05%)**

Reactivos	Cantidad
Urea	9.0 g
PBS Tween 20	20 ml

La urea se disolvió en 10 ml de PBS Tween 20 al 0.05%, se aforó a 20ml

➤ **Solución de bloqueo I (Albúmina al 0.5%, PBS Tween 20 al 0.05%)**

Reactivos	Cantidad
Albúmina bovina (Fracc. V)	0.1g
PBS (pH 7.2) Tween 20	20.0 ml

La Albúminase mezcló con 10ml de PBS Tween, la albúmina disuelta, se aforó a 20.0 ml. La solución se preparó y se usó en el momento (para una placa de ELISA).

➤ **Solución de bloqueo II (Leche descremada al 5%, PBS Tween 20 al 0.05%)**

Reactivos	Cantidad
Leche descremada	1.0g
PBS (pH 7.2) Tween 20	20.0 ml

Se mezcló la leche con 10ml de PBS Tween, y posteriormente se aforó a 20.0 ml. La solución se preparó y se usó en el momento (para una placa de ELISA).

➤ **Solución de dilución (Leche descremada al 1%)**

Reactivos	Cantidad
Leche descremada	0.2g
PBS (pH 7.2) Tween 20	20.0ml

Se mezcló la leche con un poco de PBS Tween, ya disuelta, se aforo a 20ml. La solución se prepara en el momento de su uso.

➤ **Solución para detener la reacción**

Reactivos	Cantidad (ml)
H ₂ SO ₄	55.17
H ₂ O (aforar)	1000

En un matraz (colocado en una cama de hielo) se pusieron 500ml de agua, se agregó el ácido poco a poco y se aforó. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

➤ **Solución cromógeno I**

Reactivos	Cantidad (ml)
Citrato de sodio	5.0
Ácido cítrico	5.0

A la solución preparada se le adicionó 0.004g de Ortofenildiamina y 4.0 µl de H₂O₂ al 30%. Esta solución se preparó al momento de usarla y siempre se mantuvo en obscuridad antes y durante su uso.

➤ **Medio de cultivo SGPH (500 ml)**

Reactivos	Cantidad ml o mg
PBS estéril	500
Plasma humano	5.0
Sacarosa (azúcar comercial)	10
Antibióticos y antimicóticos	
• Gentamicina	20
• Penicilina	200
• Estreptomina	20
• Ampicilina	10
• Ceftazidina	10
• Anfoterizina B	1

El PBS (30ml) se homogeneizó con los antibióticos y la sacarosa. Se esterilizó por filtración (membrana 0.2 μ m) y se agregó el resto del PBS estéril y el plasma. Para control de esterilidad, una alícuota se sembró en medio de gelosa de sangre. El medio se almacenó a 4°C hasta su uso.



¿Qué es la toxocariosis?

¿Nos causa daño?

¿Cómo prevenirla?

Laboratorio de Parasitología Experimental

P Biol. Karina Clavijo-Sánchez.

M. en C. Aarón Rodríguez-Caballero.

Biol. Mario Noé Martínez-Gordillo.

TL. Gustavo Peralta-Abarca.

Dra. Martha Ponce-Macotela.

¿Tienes mascotas?

iSiii!

¿Tu mascota es un perro?

iiSí!!



Tengas o no tengas mascota, esta información es muy importante para ti

¿Sabes qué es un parásito?

¿No? Un parásito es un organismo al que le damos alojamiento, le damos de comer y nos produce daño.

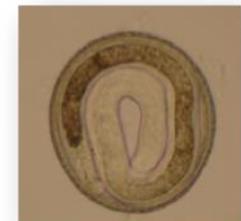
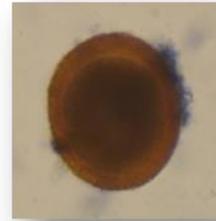
¿Qué características tienen los nematodos?

Son gusanos cilíndricos, de color nacarado, son dioicos (hay hembras y machos), la hembra es más grande que el macho. La región caudal del macho termina en curva. Tienen una cubierta (cutícula), aparato digestivo completo, excretor, nervioso y reproductor.



¿Qué es un geohelminto?

Es un parásito que necesita que una de sus fases (huevo) estén en el suelo (parques, jardines, camellones) para poder formar la fase que infecta (huevo larvado).



¿Conoces a *Toxocara canis*?

¿Nooo?

No te preocupes, ahorita la conocerás.

Toxocara canis es un nematodo, geohelminto, que mide de 4-15 cm de largo y 2.5 mm de diámetro.



¿*Toxocara canis* es un parásito?

¡¡¡Si!!!

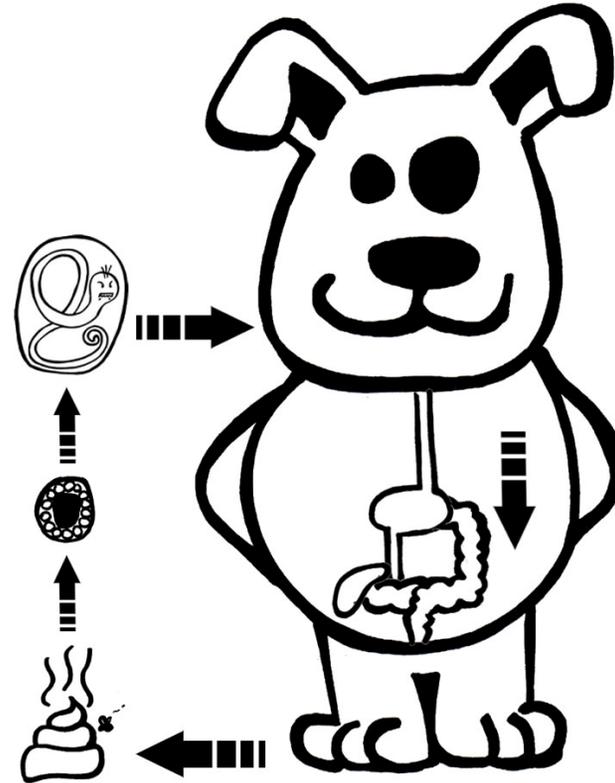
¿Sabes en dónde vive?

¡Siii!, ¡¡Te lo imaginaste y acertaste!!

Vive en el intestino delgado de los perros.

¿Qué es esto?

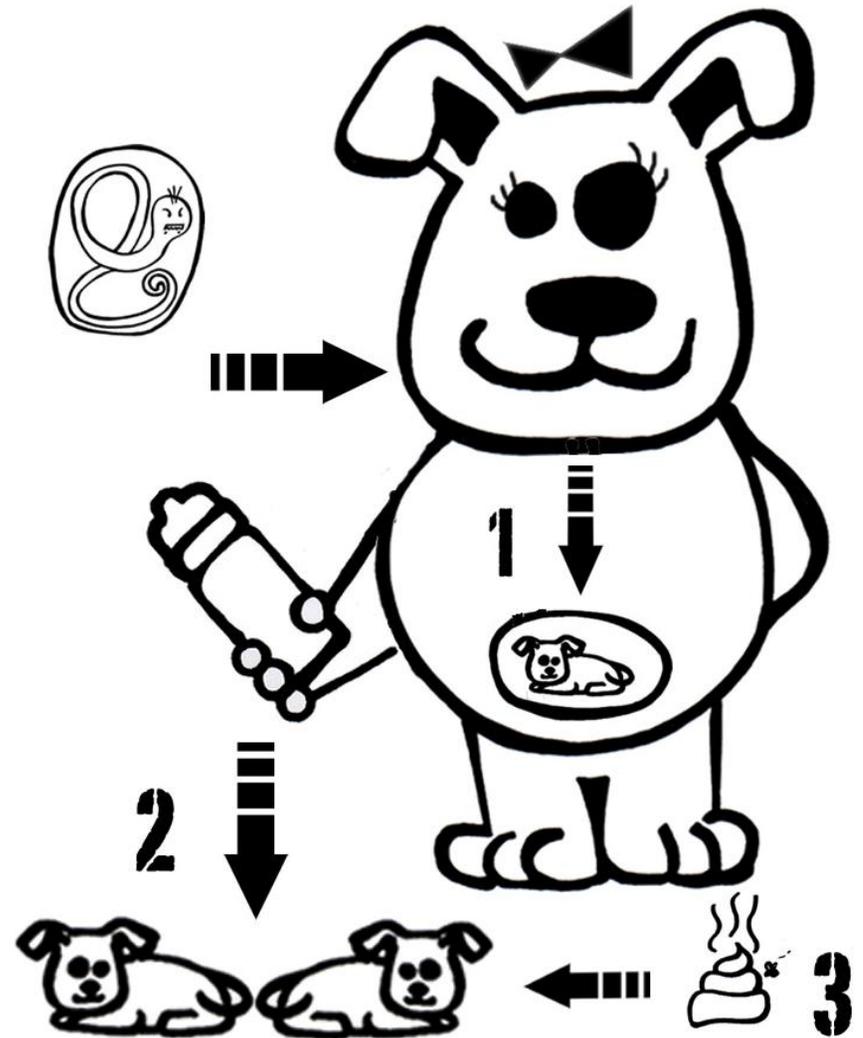
Es un esquema del ciclo de vida de *Toxocara canis*



¿Por qué dicen que *Toxocara canis* es un parásito muy exitoso?

Porque los perros se pueden infectar por tres vías:

- 1.- Intrauterina. El 90 % de los perros cachorritos cuando nacen ya están infectados. **¡¡¡Ya tienen lombrices!!!**
- 2.- Transmamaria. Se infectan cuando toman la leche de su mamá
- 3.- Se infectan cuando comen huevos de *Toxocara canis* que se encuentran en la popo de otros perros.



¿Esta parasitosis se puede prevenir?

¡¡¡¡¡Si!!!!!! Es muy fácil

1. Cuida a tu mascota
2. Desparasítala frecuentemente
3. Levanta las heces de tu mascota y deposítalas en el lugar adecuado
4. Lávate las manos después de jugar.
5. No comas tierra
6. Pídele a tu mami que lave muy bien las verduras.



Tú ¿levantas las heces de tu mascota?

¿No?



¿Sabes por qué es importante que levantes las heces de tu mascota?

- 1.- Porque las mascotas se enferman
 - Molestias pulmonares
 - Diarrea

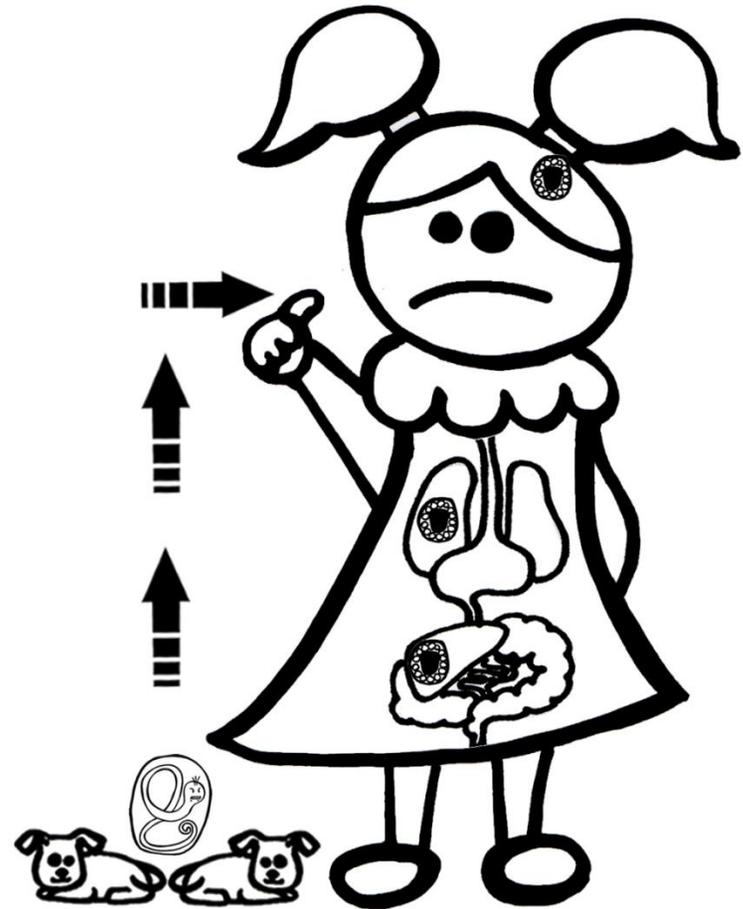
2.- Porque las mascotas con lombrices contaminan el ambiente con miles de huevos de este parásito. Cada hembra de *Toxocara canis* elimina 70 000 huevos al día.

3.- Porque *Toxocara canis* también le puede causar daño a los niños

¿Cómo se infectan los niños con *Toxocara canis*?

- Cuándo juegan en parques o jardines en donde defecan los perros con lombrices y los dueños no levantan la popo.
- Cuando comen tierra con huevos larvados de *Toxocara canis*.

- Cuando juegan con tierra y no se lavan las manos antes de ingerir alimentos.
- Cuando comen verduras contaminadas.



- **¿Los niños también tendrán lombrices de *Toxocara*?**

- iiiiNo!!!!
- Cuando los niños comen tierra con huevos larvados de *Toxocara*: en el intestino delgado sale la larva del huevo y viaja al hígado, pulmón, cerebro u ojo.
- En el niño, el parásito no crece, siempre se queda como larva y le produce:

Larva *migrans* visceral

- Fiebre
- Dolor hepático
- Neumonitis: asma
- Convulsiones

Larva *migrans* ocular

- ✓ Disminución de la visión
- ✓ Pérdida de la visión

¿Cómo se hace el diagnóstico de *larva migrans* en los niños?

Se le piden dos muestras de sangre (cada tubito con 3.0 ml de sangre) para:

- Diagnóstico inmunológico.
- Biometría hemática para el conteo de sus eosinófilos.



Sabías que en el D.F



Población canina

2,753,299,

Cada perro deja 200g. de materia fecal por día.



Perros cachorros con *T. canis*

75-100%



Seroprevalencia de asma por *T. canis*

30.8%



Seroprevalencia de LMV en México

7.5% en niños de 6 a 13 años.

