



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN**  
**Y DE LA SALUD ANIMAL**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE SECRECIÓN-EXCRECIÓN Y**  
**ANTICUERPOS ANTI-Toxocara canis EN BOVINOS PARA**  
**PRODUCCIÓN DE CARNE”**

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M.V.Z. ROCÍO ALEJANDRA RUIZ MANZANO

**TUTOR PRINCIPAL:**  
DRA. EN C. MARTHA PONCE MACOTELA  
(Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM,  
Instituto Nacional de Pediatría)

**COMITÉ TUTORAL:**  
DR. EN C. OSVALDO FROYLÁN IBARRA VELARDE  
(Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM)  
DRA. EN C. PAZ MARÍA SALAZAR SCHETTINO  
(Facultad de Medicina, UNAM)

MÉXICO, D.F.

MARZO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIAS

A Rocío, por no desistir, porque a pesar de todo sigues cumpliendo metas.

**“Judge your seccess by what you had to give up in order to get it.” Dalai Lama.**

A mi papá y mamá, por apoyarme siempre, consolarme y alegrarse de mis logros. Los amo con todo el corazón.

A mis queridos hermanos Mariana y Mariano, espero que esto sea un aliciente que les permita ver que los sueños se cumplen con trabajo y perseverancia, que nunca es tarde para cumplir metas.

A Ximena Elizabeth Mendoza Ruiz, porque eres el futuro.

A Emiliano.

A mis tíos Lulú, María, Pepé, Esther, a mis primas Guada, Dana, Esther, porque estén cerca o lejos siempre están conmigo.

A **Diego**, por ser mi compañero desde la mitad de esta travesía, por no juzgarme, sino escucharme, comprenderme, animarme y quererme tal como soy. Por que tu cariño y apoyo me complementan. I ch liebe dich.

A **Iván**, quien siempre estuvo para ayudarme, apoyarme, alentarme, aconsejarme. Por alentar mi entrada, ayudar a la permanencia e inspirar la culminación de este proyecto. A tu incansable búsqueda del conocimiento y por los interminables intercambios de ideas. A nuestra "ñoñez" por *Toxocara*. Por ser mi maestro, mi mejor amigo, mi ejemplo como ser humano y profesionalista, Porque tu legado vivirá en nosotros. Te extraño demasiado.

A **Miri**, por siempre estar conmigo, por ser un ejemplo de vida, por inspirarme, apoyarme y animarme, porque no se como le haces pero le haces y por eso te admiro muchísimo, me alegro de tus logros y se que siempre tendrás más. Porque eres una gran mujer que se merece lo mejor. Por ser mi mejor amiguís.

Este logro es suyo también.

**Rocío**

The best way to remember someone who has passed away is to carry on the wishes, aspirations, dreams and heart consciousness of that person. They live forever in your mind, spirit and inspirational actions when you magnify the power of love and make the world a better place.

Brian Cimins

In memoriam  
**M.C. Iván Pérez Luna.**

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater, por ser la fuente de orgullo y de creación de profesionistas e investigadores, sin la cual no hubiera podido concretar esta meta.

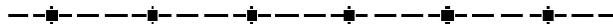
A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por permitirme desarrollar mis estudios de Posgrado en sus instalaciones.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por formarme como profesionista.

Al CONACYT, por el apoyo económico con la beca No. 447737.

Al Instituto Nacional de Pediatría y su personal.

Al CEPIPSA UNAM Topilejo.



A la Dra. Martha Ponce Macotella, por abrirme las puertas del Laboratorio de Parasitología Experimental del INP, por ser mi tutora, por la revisión de los trabajos durante los tutorales y por su apoyo y revisión en la realización de esta tesis.

Al Dr. Froylán Ibarra Velarde, por su ayuda académica y práctica para que este proyecto se realizara y por su sincera disposición.

A la Dra. Paz María Salazar Schettino, por su apoyo como comité tutorial, porque gracias a sus cuestionamientos se incrementó mi duda y conocimiento.

Al Dr. Fernando Alba Hurtado, Dra. Dolores Correa Beltrán, Dra. Irene Cruz Mendoza, Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán, por su tiempo para revisar esta tesis, por sus consejos, observaciones y correcciones que enriquecieron este trabajo.

Al personal administrativo del Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, por su ayuda, atención y amabilidad.

Al Dr. José Juan Martínez Maya y M.C. Clara Aguillón, por su apoyo y consejos.

A M.C. Laura Soto, por tu ayuda en con el análisis estadístico.

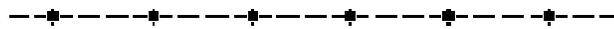
Al Biol. eM.C. Diego Coria, por las fotos de Toxocara canis.

Al M.C. Iván Pérez Luna, M.C. Silvia Caballero, M.C. Raúl Suárez, M.C. Jesús Zepeda, M.C. Rafael Heredia, M.V.Z. Jose de Jesús Valverde y Pablo Flores, por su ayuda en la colección de material biológico.

A Ing. en Tecnología Interactiva en Animación Digital Mariano Ruiz Manzano, por el apoyo con las imágenes de células de la respuesta inmune.

Al M.C. Aarón Rodríguez Caballero, por ser no solo un instructor, sino un compañero de laboratorio y aventuras. Por proveer el anticuerpo monoclonal empleado y por estar al pendiente del material que necesité.

A Karina Clavijo, por ayudarme cuando nadie lo hizo.



A mi mamá, por ser el apoyo que me ayuda a salir adelante, por quererme tal como soy y aguantarme todos los días y ser un ejemplo para mi.

A mi papá, por ser mi inspiración y una de las razones por las que me levanto todos los días, por ser un ejemplo de vida, rectitud y lealtad.

Al Biol. eM.C. Diego Coria, por estar conmigo cuando más lo necesité, por tu paciencia, comprensión, conocimiento, por "ayudarme a pensar", por ser inspiración y orgullo.

A M.C. Laura Soto, por ser mi compañera en las buenas, en las malas y en las peores, por hacernos esta cosa llevadera, por arreararme y alentarme.

A mis compañeros de laboratorio: Bere, David, Christian, Karigi, Uriel, etc., por compartir conmigo esta experiencia.

A Lau, Dianita y Lizbeth por acompañarme en nuevas experiencias internacionales.

A Iván y Miri por haber compartido 13 años académico-amistosos.

A Rogelio, Denyse, Javier, Ismael, Bety, Ime, Ray, porque los momentos con ustedes me daban aliento y relajación. A Natalia y Jimena por ser la bendición que son.

A mi Ramona, a Conchis, a Menchi, a Tisha, a Nena y a Cone-Cone, porque gracias a ustedes sigo cuerda.

A los perros, gatos, felinos, cerdos, bovinos.

**GRACIAS**

## I. ÍNDICE GENERAL

<b>I. ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>I</b>
<b>II. ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>III</b>
<b>III. ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>VI. RESUMEN</b> .....	<b>V</b>
<b>V. ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>VI. ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	
2.1 Toxocariosis.....	2
2.2 Taxonomía.....	2
2.3 Morfología.....	3
2.4 Ciclo biológico.....	6
2.5 Manifestaciones clínicas.....	9
2.6 Respuesta inmune a <i>Toxocara canis</i> .....	13
2.7 Epidemiología.....	18
2.8 Diagnóstico.....	28
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>32</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>33</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
6.1 Diseño experimental.....	35
6.2 Material biológico.....	37
6.3 ELISA indirecto para detección de anticuerpos anti- <i>T. canis</i> .....	41
6.4 ELISA sándwich para la detección de Ag S/E <i>Tc</i> .....	43

6.5 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra diferentes antígenos.....	44
6.6 ELISA competitivo para la detección de anticuerpos contra diferentes antígenos con suero adsorbido (reacciones cruzadas).....	45
6.7 Criterios para considerar un suero positivo o negativo a T. canis.....	46
6.8 Evaluación de las pruebas diagnósticas.....	47
6.9 Análisis estadístico.....	49
<b>7. RESULTADOS</b>	
7.1 Tamaño de muestra.....	50
7.2 Muestras de suero de bovinos.....	50
7.3 ELISA indirecto para detección de anticuerpos anti-T. canis.....	51
7.4 ELISA sándwich para la detección de Ag S/E Tc.....	55
7.5 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra diferentes antígenos (reacciones cruzadas).....	58
7.6 ELISA competitivo para la detección de anticuerpos anti-T. canis en sueros adsorbidos con diferentes antígenos.....	60
7.7 Sueros positivos o negativos a larva migrans por T. canis.....	61
7.8 Evaluación de las pruebas diagnósticas.....	65
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>77</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>78</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>79</b>
<b>12. APÉNDICES</b>	
12.1 Reactivos.....	97

## II. ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Especies de <i>Toxocara</i> sp. y sus hospederos definitivos.....	<b>3</b>
<b>Cuadro 2.</b> Cuadros clínicos causados por Larva Migrans por <i>T. canis</i> en humanos.....	<b>12</b>
<b>Cuadro 3.</b> Frecuencias de toxocariosis en perros en el mundo (1998-2014).....	<b>20</b>
<b>Cuadro 4.</b> Frecuencias de toxocariosis en perros en México (1967-2012).....	<b>22</b>
<b>Cuadro 5.</b> Frecuencias serológicas en humanos positivos a <i>Toxocara</i> sp. en diferentes países (1992-2015).....	<b>24</b>
<b>Cuadro 6.</b> Frecuencias de la presencia de huevos de <i>Toxocara</i> sp. en el ambiente de diferentes países (1993-2013).....	<b>26</b>
<b>Cuadro 7.</b> Hospederos paraténicos reportados de <i>T. canis</i> .....	<b>27</b>
<b>Cuadro 8.</b> ELISA para el diagnóstico de Larva Migrans por <i>T. canis</i> en hospederos paraténicos.....	<b>29</b>
<b>Cuadro 9.</b> Western blot para el diagnóstico de Larva Migrans por <i>T. canis</i> en hospederos paraténicos.....	<b>31</b>
<b>Cuadro 10.</b> Variables del estudio.....	<b>37</b>
<b>Cuadro 11.</b> Valores de kappa para la interpretación de concordancia entre dos pruebas.....	<b>48</b>
<b>Cuadro 12.</b> Características de los bovinos del rastro de Tecamachalco, Puebla, de los que se extrajo suero.....	<b>50</b>
<b>Cuadro 13.</b> Resultados de ELISAs para la detección de anticuerpos anti- <i>T. canis</i> y/o Ag A/E Tc y anticuerpos afines a diez antígenos de otros nematodos en sueros bovinos positivos a <i>T. canis</i> .....	<b>63</b>
<b>Cuadro 14.</b> Frecuencias de sueros positivos y negativos a Larva Migrans por <i>T. canis</i> y los estados de la infección.....	<b>64</b>
<b>Cuadro 15.</b> Valores obtenidos en la evaluación de ELISA indirecto con ELISA sándwich/competitivo como prueba de “oro” .....	<b>66</b>

### III. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Fotografías que muestran huevos de <i>T. canis</i> .....	<b>4</b>
<b>Fig. 2.</b> Morfología de la larva (L2) de <i>T. canis</i> .....	<b>5</b>
<b>Fig. 3.</b> Extremo cefálico de los tres ascáridos comunes en caninos y felinos.....	<b>6</b>
<b>Fig. 4.</b> Fotografías que muestran las fases adultas de <i>T. canis</i> .....	<b>6</b>
<b>Fig. 5.</b> Ciclo biológico de <i>T. canis</i> .....	<b>10</b>
<b>Fig. 6.</b> Respuesta inmune a la larva de <i>T. canis</i> .....	<b>17</b>
<b>Fig. 7.</b> Frecuencias mundiales de la toxocariosis canina (1998-2014).....	<b>19</b>
<b>Fig. 8.</b> Frecuencias de la toxocariosis canina en México (2001-2012).....	<b>23</b>
<b>Fig. 9.</b> Diseño experimental para el diagnóstico de Larva Migrans por <i>T. canis</i> en bovinos.....	<b>36</b>
<b>Fig. 10.</b> Titulación de proteína A-HRP.....	<b>51</b>
<b>Fig. 11.</b> Titulación de la concentración de Ag S/E Tc y dilución de suero.....	<b>52</b>
<b>Fig. 12.</b> Cinética de la respuesta inmune humoral en el bovino control (ELISA indirecto).....	<b>53</b>
<b>Fig. 13.</b> Distribución de los valores de absorbancias promedio con ELISA indirecto en sueros bovinos.....	<b>54</b>
<b>Fig. 14.</b> Titulación de anticuerpo monoclonal a utilizar para la captura de Ag S/E Tc.....	<b>55</b>
<b>Fig. 15.</b> Distribución de los valores de absorbancias por ELISA sándwich en sueros bovinos.....	<b>57</b>
<b>Fig. 16.</b> Distribución de los valores de absorbancias por ELISA indirecto en sueros bovinos con 10 diferentes antígenos.....	<b>59</b>
<b>Fig. 17.</b> Distribución de los valores de absorbancias por ELISA indirecto con suero adsorbido.....	<b>60</b>
<b>Fig. 18.</b> Bovinos positivos a <i>T. canis</i> , con infección aguda, activa o crónica.....	<b>56</b>

#### IV. RESUMEN

*Toxocara canis* produce una de las helmintiasis más frecuentes en perros a nivel mundial. En hospederos paraténicos como bovinos, ovinos, cerdos, aves, roedores y humanos provoca Larva Migrans. Reportes en humanos, asocian la ingestión de hígado crudo de bovinos infectados con esta enfermedad. El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de *T. canis* en bovinos infectados naturalmente en México. **MÉTODOS:** Se colectaron sueros de 127 bovinos de un rastro en Puebla, México. Se realizaron: 1) ELISA indirecto para detectar anticuerpos anti-antígenos de secreción/excreción de larvas de *T. canis* (Ag-S/E-Tc) en suero sin adsorber; 2) ELISA sándwich para captura de antígeno; 3) ELISA indirecto para detectar reacciones cruzadas con *T. cati*, *Ascaris suum*, *Trichinella spiralis*, *Taenia* spp., *Ancylostoma caninum*, *Dipylidium caninum* y *Toxascaris leonina*; 4) ELISA competitivo para detectar anticuerpos anti-*T. canis* en suero adsorbido. **RESULTADOS:** En sueros sin adsorber se detectaron anticuerpos en 20.47% (26/127) y antígenos en 12.59% (16/127). En 97.29% (36/37) de los sueros positivos se encontraron reacciones cruzadas. Después de la adsorción de los sueros positivos 59.45% (22/37) permanecieron con anticuerpos anti-Ag S/E Tc, por lo que se redujeron 7.09% las reacciones cruzadas. La frecuencia de *T. canis* en bovinos, con ELISA sándwich y competitivo fue de 22.04% (28/127), de éstos en 9.44% (12/127) se detectaron anticuerpos (infección crónica); en 7.87% (10/127) se encontraron anticuerpos y antígenos (infección activa) y en 4.72% (6/127) se detectaron antígenos (infección aguda). **CONCLUSIONES:** Se encontraron varias reacciones cruzadas, pero si el suero es pre-adsorbido con otros antígenos y se emplea un ELISA para detectar antígenos, pueden ser una herramienta eficiente para el diagnóstico de larva migrans por *T. canis*. Se detectaron anticuerpos anti-Ag S/E Tc y antígenos larvarios de *T. canis* en sueros bovinos. Se determinó la frecuencia de *T. canis* en bovinos de un rastro en Puebla, México.

**Palabras clave:** *Toxocara canis*, bovinos, ELISA, anticuerpos, antígenos, reacciones cruzadas.

## V. ABSTRACT

*Toxocara canis* produces one of the most frequent helminthiasis in dogs worldwide. In paratenics hosts as bovines, sheep, pigs, poultry, rodents and humans, provokes Larva Migrans. Reports in humans associate the ingestion of raw liver from infected bovine with this disease. The aim of this study was to determine the frequency of *T. canis* in naturally infected cattle in Mexico. **METHODS:** Serum samples were collected from 127 bovines at a slaughterhouse in Puebla, Mexico. Were carried out: 1) Indirect-ELISA to detect antibodies anti-excretory-secretory antigens of *T. canis* larvae (TES) in unabsorbed serum; 2) Sandwich-ELISA for antigen capture; 3) Indirect-ELISA to detect cross reactions with *Toxocara cati*, *Ascaris suum*, *Trichinella spiralis*, *Taenia* spp., *Ancylostoma caninum*, *Dipylidium caninum* y *Toxascaris leonina*; 4) Competitive-ELISA to detect antibodies anti-TES in absorbed serum. **RESULTS:** Antibodies were detected in 20.47% (26/127) of unabsorbed sera and antigens in 12.59% (16/127). Cross-reactions were found in 97.29% (36/37) of positives sera. After positive sera absorption, 59.45% (22/37) remain with antibodies anti-TES, therefore cross reactions were reduced in 7.09% *T. canis* frequency in bovines with sandwich-ELISA and competitive-ELISA was 22.04% (28/127), of these in 9.44% (12/127) were detected antibodies (chronic infection); in 7.87% (10/127) were found antibodies and antigen (active infection) and in 4.72% (6/127) were detected antigen (acute infection). **CONCLUSIONS:** Several cross-reactions were found, but if serum is pre-absorbed with others antigens and antigens are detected, they could be an efficient tool for diagnosis of *T. canis* larva migrans. Antibodies and antigens were detected in cattle sera. Was determined *T. canis* frequency in bovines from a slaughter house in Puebla, México.

**Key words:** *Toxocara canis*, bovines, ELISA, antibodies, antigens, cross reactions.

## VI. ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

<b>ELISA</b>	Inmuno ensayo enzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
<b>Ag S/E</b>	Antígenos de secreción y excreción
<b>Ag S/E Tc</b>	Antígenos de secreción y excreción de larva de <i>Toxocara canis</i>
<b>L2</b>	Larva 2
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>AgS</b>	Antígenos somático
<b>AgL</b>	Antígenos de larvas
<b>AgH</b>	Antígenos de huevos
<b>p.i.</b>	Post-infección
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>NFκβ</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células β activadas
<b>IFN-γ</b>	Interferón γ
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>LT</b>	Linfocitos T
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígeno
<b>Células NK</b>	Células natural killer
<b>CD</b>	Células dendríticas
<b>CLI</b>	Células linfoides innatas
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento transformante β
<b>Linfocito B</b>	LB
<b>Linfocito T</b>	LT
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos

## 1. INTRODUCCIÓN

*Toxocara canis* (Werner, 1782) es un geohelminto zoonótico cosmopolita, común en cánidos, especialmente perros, en los que se han encontrado frecuencias de 0.9 a más del 50% a nivel mundial. Los más afectados son los cachorros, que se infectan principalmente vía transplacentaria y lactogénica. Los perros adultos adquieren la infección ingiriendo huevos de *T. canis* con la larva de segundo estadio (hL2), que se encuentran en el ambiente o por consumo de tejidos de hospederos paraténicos infectados (Schnieder et al., 2011).

Los hospederos paraténicos como bovinos, ovinos, porcinos, roedores, aves y primates (incluyendo al humano), se infectan al consumir huevos larvados (hL2) o por depredación y canibalismo y causandoles larva migrans (Taira et al., 2003; Strube et al., 2013). En humanos se han reportado casos de esta enfermedad asociados al consumo de hígado o carne crudos de diferentes hospederos paraténicos incluyendo a los bovinos (Akao et al., 2007; Choi, et al, 2008; Enko et al., 2009; Hoffmeister, et al., 2007; Yoshikawa, et al., 2008), pero hay poca o como en el caso de los bovinos, ninguna información sobre la prevalencia de la infección en ellos (Lloyd 2006). Por lo que es importante la detección de la presencia de la de larva de *T. canis* en bovinos en México.

El diagnóstico de Larva Migrans se ha realizado mediante la detección de anticuerpos y/o antígenos de *T. canis* en suero, con técnicas como ELISA y Western Blot, que emplean antígenos de secreción/excreción de larvas de segundo estadio (De Savigny 1975; Maizels 2013). Pero la limitante del diagnóstico inmunológico para Larva Migrans por *T. canis*, es que los anticuerpos producidos en el hospedero en contra de otros nematodos también pueden reconocer antígenos de *T. canis*. Además la detección de anticuerpos no revela infecciones agudas, por lo que el uso combinado de diferentes técnicas para detectar anticuerpos y antígenos y la adsorción de los sueros con otras fuentes de antígenos, puede mejorar el diagnóstico.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Toxocariosis

La toxocariosis es una infección parasitaria debida a la presencia y acción del nematodo *Toxocara* sp., en el intestino delgado de diversos hospederos definitivos (Cuadro 1).

*Toxocara canis* (Werner, 1782) es un geohelminto, zoonótico, cosmopolita que infecta cánidos domésticos y silvestres. Afecta principalmente a cachorros menores de 3 meses, debido a la transmisión prenatal. Su fase infectante es el huevo que contiene la larva de segundo estadio (L2). La larva es responsable de realizar una migración intraorgánica compleja en hospederos definitivos y paraténicos (Archielli y Kozubsky 2008; Magnaval et al., 2001).

### 2.2 Taxonomía

#### 2.2.1 Phylum Nematoda

Los nematodos como *Toxocara*, son gusanos cilíndricos con simetría bilateral y radial, no segmentados y pseudocelomados. Presentan cutícula, hipodermis y capa muscular, tubo digestivo completo, sistema nervioso y excretor. Son dioicos, con dimorfismo sexual y presentan mudas en su desarrollo (Tay et al., 2010).

#### 2.2.2 Clasificación taxonómica

Dominio: Eukaryota

Reino: **Animalia**

Subreino: Bilateria

Phylum: Nematoda

Clase: **Secernentea**

Subclase: Rhabditia

Orden: **Ascaridida** (Skrjabin y Schulz, 1938).

Suborden: Ascaridina

Superfamilia: Ascaridoidea

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

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

Género: *Toxocara* (Stiles y Hassall, 1905).

Especie: *T. canis* (Werner, 1982).

(De la Fé et al., 2006; Delgado y Rodríguez-Morales, 2009).

**Cuadro 1. Especies de Toxocara y sus hospederos definitivos.**

<b>Especie</b>	<b>Hospedero definitivo</b>	<b>Distribución geográfica</b>
T. canis (Werner, 1982)	Cánidos	Cosmopolita
T. cati (Schrank, 1788)	Felinos	Cosmopolita
T. malaysiensis (Gibbons, Jacobs y Sani, 2001)	Felinos	Malasia
T. lyncis (Macchioni, 1999)	Linces	Somalia
T. vitulorum (Goeze, 1782)	Bovinos (vacas, búfalos, bisontes)	Regiones tropicales y subtropicales
T. tanuki (Yamaguti, 1941)	Cánidos	Kyoto, Japón
T. apodemi (Olsen, 1957)	Roedores	Pup' Yong-ni, Corea; Changsa, Hunan, China
T. mackerrasae (Sprent, 1957)	Roedores	Queensland, Australia
T. paradoxura (Kou, 1958)	Vivérridos	Kwangtun, China
T. sprenti (Warren, 1972)	Vivérridos	Bangkok, Tailandia
T. vajrasthiraе (Sprent, 1972)	Mustélidos	Nahkon Nuok, Tailandia
T. pteropodis (Baylis, 1936)	Murciélagos	Espíritu Santo, Nueva Hebrides; Florida, E.U.A.; Queensland, Australia

Tomado y modificado de Jia et al., 2012; De la Fé et al., 2006; Delgado y Rodríguez-Morales, 2009 y Gasser, 2013.

## **2.3 Morfología**

### **2.3.1 Huevo**

Los huevos de *T. canis* son semiesféricos y miden de 75-95  $\mu\text{m}$  de diámetro. Al salir en heces contienen al protoplasma que es color marrón y ocupa casi todo su interior (Fig. 1A) y cuando son infectantes contienen a la larva (Fig. 1B) (De la Fé et al., 2006; Despommier, 2003). La estructura externa del huevo presenta cuatro capas: la interna, que es una membrana lipoprotéica semipermeable, la capa media quitinosa, que le da resistencia mecánica y las capas vitelina y uterina de mucopolisacáridos, que le dan al huevo su apariencia externa característica con finas foseas y sus propiedades adhesivas (Fig. 1C) (Bruñaská, 1997; Gortari et al., 2008).



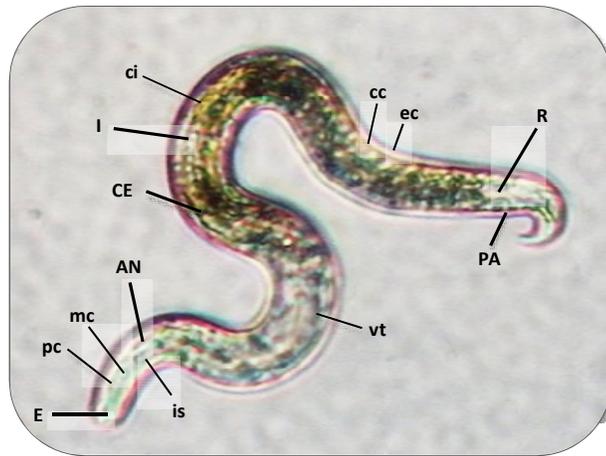
**Fig. 1. Fotografías que muestran huevos de *T. canis*.** A. Huevo con el protoplasma. B. Huevo larvado. C. Cubierta externa. Fotos tomadas en el Laboratorio de Parasitología Experimental del INP; A y C por la autora, B cortesía del Biol. Diego Coria.

### 2.3.2 Larva

La larva de *T. canis* en el medio ambiente se observa dentro del huevo (Fig. 1B) y en los tejidos de hospederos se encuentra libre después de su eclosión (Fig. 2).

Mide de 360-434  $\mu\text{m}$  de longitud, con un diámetro a nivel del esófago de 15-21  $\mu\text{m}$ . Su extremo anterior presenta aletas cervicales apenas visibles y el extremo posterior es puntiagudo y asimétrico (Bowman et al., 1993; De la Fé et al., 2006; Nichols, 1956).

La cutícula tiene estriaciones transversales y está compuesta por cuatro capas: la interna o basal, la fibrilar o medial, la cortical y la externa o epicutícula, que es una capa superficial difusa y lábil, de 10-20 nm de espesor, de carga negativa y rica en carbohidratos (Bowman et al., 1993; Maizels 2013; Page et al., 1992b). El esófago ocupa un tercio de la longitud de la larva y se divide en procorpus, metacorpus, istmo y ventrículo terminal (Fig. 2). Este último está formado por una glándula dorsal y dos subventrales, que vierten sus secreciones en lumen esofágico. El anillo nervioso rodea casi toda la región media del esófago. Al terminar el esófago está “la columna o célula excretora”, que en realidad, son cuatro células ovaladas que rodean al intestino y vierten su contenido por el poro excretor. El intestino sin lumen, está formado por siete células alargadas de núcleo grande, que se continúan con el proctodeo formado por el recto y poro anal (Bowman et al., 1993; Nichols, 1956).

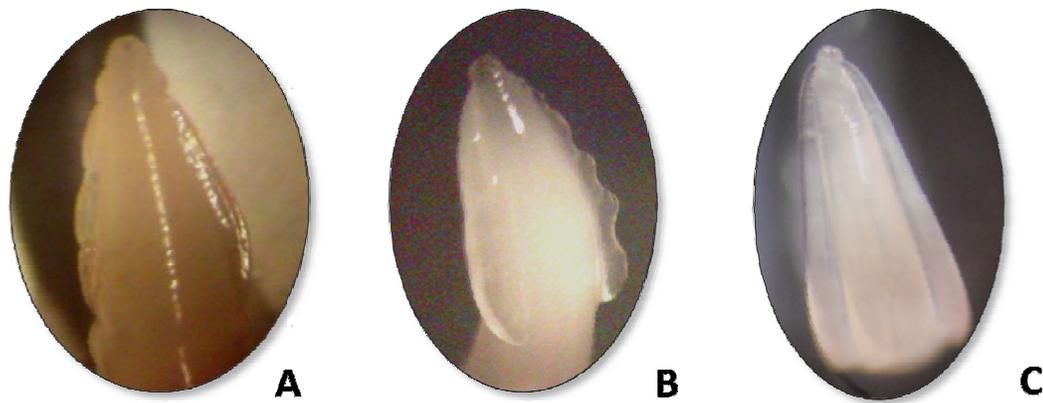


**Fig. 2. Morfología de la larva (L2) de *T. canis*.** E: estoma; pc: procorpus; mc: metacorpus; is: istmo; vt: ventrículo ó bulboterminal; CE: célula excretora; AN: anillo nervioso; I: intestino; ci: célula intestinal; cc: capa cortical; ec: epicutícula; R: recto; PA: poro anal. Foto tomada por la autora en el Laboratorio de Parasitología FMVZ, UNAM.

### 2.3.3 Adultos

Las fases adultas de *T. canis* son color marfil y recubiertas con una cutícula con estriaciones transversales. En la región cefálica se encuentra la boca con tres labios que no sobresalen del cuerpo y aletas cervicales más largas que anchas (2-4 mm x 0.2 mm), que se estrechan posteriormente (Fig. 3A), y lo diferencian de otros ascáridos como *Toxocara cati* (Fig. 3B) y *Toxascaris leonina* (Fig. 3C) (Bojanich y López, 2009; De la Fé et al., 2006, Webster, 1958).

Las hembras de *T. canis* (Fig. 4A) miden 5-18 cm x 2.5-3 mm y su extremo posterior es romo. Los machos (Fig. 4B) miden 4-10 cm x 2-2.5 mm y tienen una terminación posterior curvada, con espículas desiguales (Archielli y Kozubsky, 2008; Bojanich y López, 2009; De la Fé et al., 2006, Webster, 1958).



**Fig. 3. Extremo cefálico de los tres ascáridos comunes en caninos y felinos. A:** *T. canis*, **B:** *T. cati*, **C:** *Toxascaris leonina*. Fotos tomada por la autora en el Laboratorio de Parasitología Experimental del INP.



**Fig. 4. Fotografías que muestran las fases adultas de *T. canis*. A.** hembra. **B.** macho. Fotos tomada por la autora en el Laboratorio de Parasitología FMVZ, UNAM.

## 2.4 Ciclo biológico

*Toxocara* sp. presenta un ciclo biológico directo (Fig 5), con una migración entero-hepato-cardio-pulmonar-traqueo-esofago-gastrointestinal (Webster 1958).

En el intestino delgado del cánido la hembra de *T. canis* ovipone a las 4-5 semanas p.i. y los huevos salen en heces (Schantz y Glickman, 1983; Schnieder et al., 2011). El desarrollo de la larva dentro del huevo depende de la humedad relativa del ambiente que puede ser de 85-95%, la temperatura de 15-30°C (Azam et al., 2012; Schnieder et al., 2011) y la concentración de oxígeno. En condiciones idóneas, el embrión (L1) aparece a los 6 días y la L2, que es la fase infectante, al 12<sup>o</sup> día aproximadamente (Webster, 1958). Algunos autores mencionan dos mudas dentro del huevo y consideran a la larva tres (L3) como la fase infectante, pero no hay un acuerdo generalizado (Bruñaská et al., 1995; Schantz y Glickman, 1983).

#### **2.4.1 Transmisión transplacentaria y lactogénica**

En cachorros la transmisión es principalmente transplacentaria (intrauterina) (Schantz y Glickman, 1983) y en segundo lugar lactogénica o transmamaria, por calostro y/o leche (Burke y Robertson, 1985). El mecanismo de activación propuesto es la inmunosupresión gestacional, asociado a la disminución periparto de eosinofilia en perras infectadas con *T. canis* (Lloyd et al., 1983) y la activación larvaria en ratonas ligada a elevados niveles de prolactina (Jin et al., 2008), lo que sugiere un mecanismo similar en perras (Schnieder et al., 2011). Las larvas activadas o las recién ingeridas al final de la gestación, van por sangre a la placenta, traspasan el sincitio trofoblasto y por circulación fetal llegan al hígado y pulmones del feto, donde permanecen hasta que nace, que es cuando migran a intestino, donde se pueden encontrar dos días posparto. En la transmisión lactogénica, las larvas van vía sanguínea a la glándula mamaria, atraviesan el tejido, llegan a calostro y leche (Schnieder et al., 2011; Webster, 1958) y cuando el cachorro las ingiere van a intestino delgado y se desarrollan a adultos (Burke y Robertson, 1985).

#### **2.4.2 Transmisión por ingestión de huevos larvados (L2)**

Los perros adultos se infectan principalmente por ingestión de huevos larvados con L2 (hL2), aunque se han reportado adultos en intestino de perras que ingirieron larvas 4/5 en heces o vómito de sus cachorros (Schantz y Glickman, 1983). Fenómeno diferente a la “falsa infección”, en la que la perra ingiere huevos sin larvar que pasan por el tracto gastrointestinal y aparecen en heces (Overgaaauw, 1997; Schnieder et al., 2011).

#### **2.4.3 Transmisión por depredación o ingestión de hospederos paraténicos**

Los hospederos no cánidos en los que las L2 entran accidentalmente, son los hospederos paraténicos. Pueden ser vertebrados como ovinos, bovinos, cerdos, monos, aves, roedores, conejos, gatos, humanos, etc. ó invertebrados como lombrices de tierra, moscas, cucarachas, etc. (Overgaaauw, 1997; Revajová 2006). Éstos no son indispensables para que el ciclo biológico se complete, pero facilitan la infección, ya que las larvas pueden pasar a través de los hospederos por canibalismo o depredación (Taira et al., 2003).

El cánido puede ingerir tejidos de hospederos paraténicos con larvas, que se liberan en el tracto gastrointestinal y la mayoría se desarrollan a adultos en el intestino delgado, con o sin migración traqueal, debido tal vez, a que las larvas tuvieron una migración en el hospedero precedente (Overgaauw, 1997).

#### **2.4.4 Patrones de migración**

##### **2.4.4.1 Hospederos definitivos**

Sin importar el modo de transmisión en el cánido, la larva en el intestino delgado y ayudada por proteasas (Robertson et al., 1989), penetra la mucosa y traspasa la pared intestinal. Posteriormente, puede invadir los vasos linfáticos y migrar a los linfonodos mesentéricos y/o viajar por capilares venosos y circulación porta al hígado, llegando a las 24 horas p.i. del parénquima hepático, va por vena cava caudal a corazón derecho, arteria pulmonar y por capilares arteriales llega a alveolos pulmonares en 24-96 horas p.i. (Schnieder et al., 2011; Webster 1958). En el pulmón, la larva puede tomar dos caminos: a) establecer una infección patente en intestino o b) realizar una migración somática (Webster, 1958):

**a) Infección patente:** La larva en el alveolo pulmonar, migra por bronquiolos, bronquios, tráquea y faringe, en donde es deglutida al esófago. Durante esta migración realiza la muda a L3 (Webster, 1958). Sin importar si se considera a la L2 o L3 como infectiva (Bruñaská et al., 1995), la muda a L4 ocurre entre los bronquiolos y el estómago. La última muda a preadulto (L5) y el desarrollo a adulto, ocurren en el intestino delgado, donde vive 4 meses en promedio (Schantz y Glickman, 1983; Schnieder et al., 2011).

**b) Migración somática:** La larva atraviesa el epitelio alveolar, llega a circulación por capilares venosos y por la vena pulmonar va a corazón izquierdo y aorta. Vía sistémica alcanza el bazo, riñones, músculo esquelético, cerebro, ojo, etc. (Webster, 1958).

Los patrones de migración en el hospedero definitivo están determinados por su edad, género (Delgado y Rodríguez-Morales, 2007; Webster, 1958) y el modo de transmisión. Los cachorros menores de 3 meses son los más afectados debido a la transmisión perinatal y

conforme crecen la infección intestinal disminuye y las larvas pueden migrar y encapsularse, aunque raramente lo hacen en cerebro (Schnieder et al, 2011; Webster, 1958). Se ha observado que en hembras es más frecuente la migración y encapsulamiento somático que en machos (Webster, 1958), lo que explica el éxito de la transmisión perinatal (Overgaauw, 1997), aunque por la supresión periparto, parte de las larvas pueden migrar y establecerse como adultos en intestino (Lloyd et al., 1983).

#### **2.4.4.1 Hospederos paraténicos**

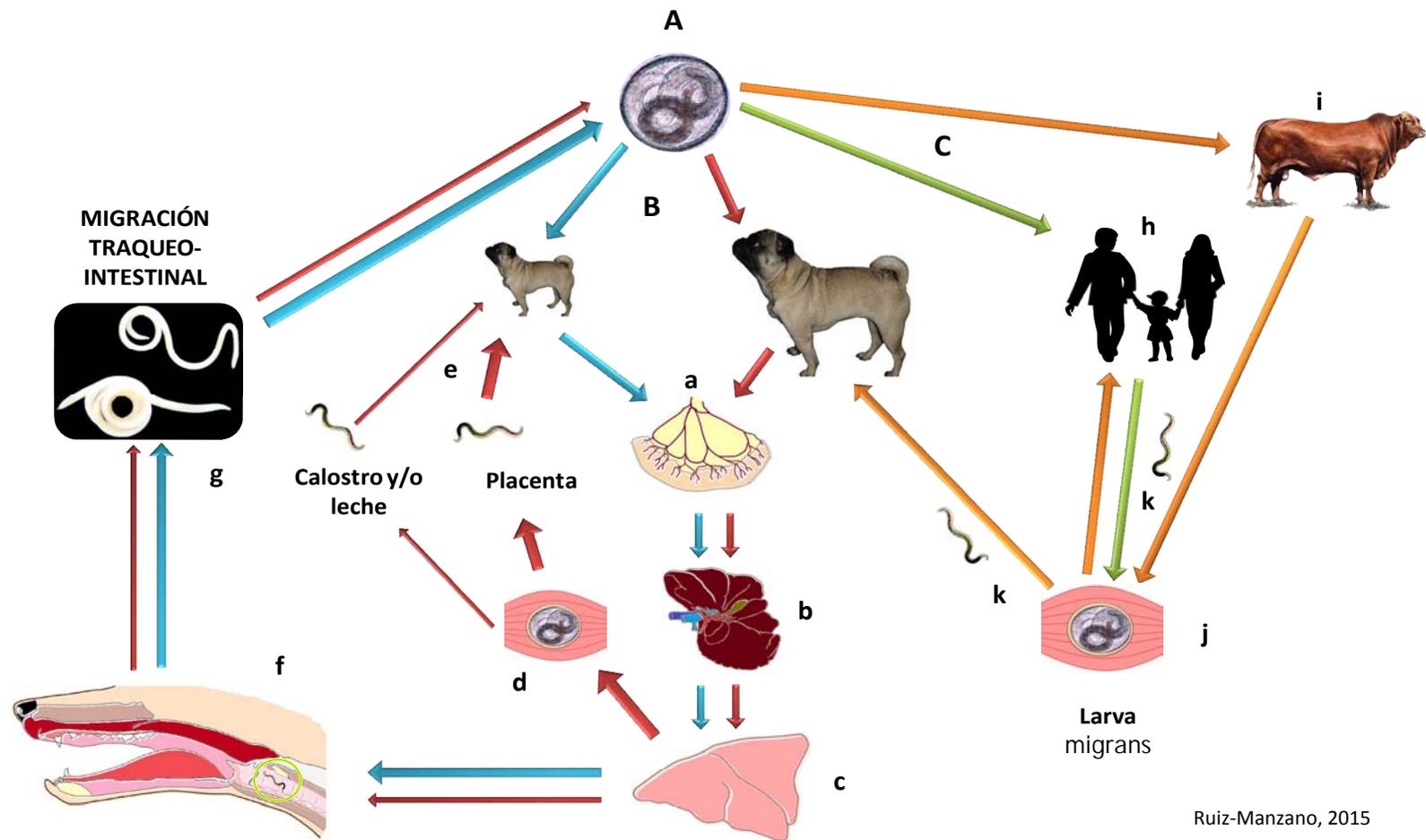
En general, el patrón de migración en los hospederos paraténicos (larva migrans), es comparable a la migración somática en el cánido (Strube et al., 2013), pero sin desarrollo larvario, por lo que no se convierte en adulto. En los tejidos del hospedero paraténico o cánido adulto (principalmente hembras en anestro) se puede formar un granuloma eosinofílico alrededor de la larva que la encapsula por lo que eventualmente entra en dormancia. En los hospederos paraténicos la larva de *T. canis* parece exhibir una afinidad al sistema nervioso central, siendo los más afectados el cerebro y los ojos (Alba-Hurtado et al., 2000).

## **2.5 Manifestaciones clínicas**

### **2.5.1 Hospederos definitivos**

Las manifestaciones clínicas de la toxocariosis dependen del número de fases infectantes ingeridas y adultos en intestino, la localización anatómica de las larvas (órganos que afecta), la inmunidad, edad, sexo, fase reproductiva y condición corporal del hospedero y otros factores poco conocidos.

En los cachorros, debido a la penetración de las larvas por la pared intestinal, se presenta enteritis mucohemorrágica y por la migración traqueo-bronco-pulmonar puede haber disnea, tos y descarga nasal (Overgaauw, 1997; Schnieder et al., 2011). Los gusanos adultos en intestino causan constipación, heces blandas, diarrea y vómito (Overgaauw, 1997; Webster, 1958). En general, se puede presentar anorexia, depresión, retraso en el crecimiento, pelo hirsuto, anemia, eosinofilia, aumento de enzimas hepáticas. En infecciones masivas por la



Ruiz-Manzano, 2015

**Fig. 5. Ciclo biológico de *Toxocara canis*.** A. El huevo con L2 puede ser ingerido por hospederos definitivos (B) o paraténicos (C). B. En el hospedero definitivo (perro), la larva atraviesa el intestino delgado (a), va por hígado (b), pulmón (c) puede encapsularse en músculo de la perra (d) y pasar vía intrauterina o por calostro y leche a su cachorro (e). O migrar por tráquea (f) a intestino delgado y convertirse en adultos (g). C. En los hospederos paraténicos (h, i) la larva migra hasta establecerse en diferentes tejidos y encapsularse (j) y el tejido infectado puede ser ingerido por otros hospederos (k).

transmisión perinatal, se pueden observar neumonía, anemia, emaciación, ascitis, diarrea mucohemorrágica, obstrucción, intususcepción, ruptura intestinal, peritonitis, convulsiones y muerte (Schnieder et al., 2011).

Los signos clínicos en perros adultos son ambiguos y raros, debido a que las infecciones intestinales son raras (Overgaauw, 1997) y las masivas no son comunes. Se pueden extrapolar los signos de infecciones leves en cachorros, principalmente la diarrea mucosa. En hembras gestantes puede haber mortinatos y muertes tempranas de cachorros (Scothorn et al., 1965) asociados probablemente al daño de la placenta por la migración larvaria y a mecanismos inmunológicos como lo reportado en ratonas (Reiterová et al., 2003).

### **2.5.2 Hospederos paraténicos**

El daño a los órganos de los hospederos paraténicos depende de la especie infectada, la carga larvaria ingerida, la irrigación sanguínea del tejido (Strube et al., 2013) y el tiempo p.i. transcurrido. En general, se pueden encontrar eosinofilia, hipergammaglobulinemia (IgE), hepatoesplenomegalia. En la necropsia se pueden observar manchas blancas en la superficie del hígado y riñones (larvas en granulomas) (Alba-Hurtado et al., 2009).

Reportes de infecciones experimentales por *T. canis* en ratones, ratas, gerbos, cobayos y conejos, pero no en todos se han documentado las manifestaciones clínicas, a excepción de cambios de comportamiento en ratones (Holland y Cox et al., 2001) y gerbos (Alba-Hurtado et al., 2009). Además en éstos últimos, se observó respiración abdominal aumentada, pelo hirsuto, ojos hundidos, pérdida de peso, paraplegia y edema palpebral (Alba-Hurtado et al., 2009). En ovinos infectados con 1000 hL2 no se reportaron manifestaciones clínicas (Alvares-Santarem et al., 2011), ni en cerdos a los que se les administró 50000 hL2 (Taira et al., 2003)

En el humano, se han caracterizado diferentes presentaciones clínicas (Cuadro 2): Larva Migrans Visceral, Ocular, Encubierta y Neurotoxocariosis.

**Cuadro 2. Cuadros clínicos causados por Larva Migrans por T. canis en humanos.**

<b>Edad</b>	<b>Sintomatología, hallazgos clínicos y de laboratorio</b>	
<b>LMV</b> Niños de 2-7 años y adultos.	<b>Generales</b>	Fiebre, astenia, sudoración, inquietud y anorexia.
	<b>Gastroentérico</b>	Náuseas, vómito, dolor abdominal y hepatoesplenomegalia.
	<b>Pulmonar</b>	Tos, estornudos, neumonía y asma.
	<b>Hematológico</b>	Eosinofilia, leucocitosis y aumento de IgM, IgG e IgE.
	<b>Cardiovascular</b>	Miocarditis, insuficiencia cardiaca.
	<b>Dermatológico</b>	Eritema, exantema, prurito, urticaria.
	<b>Otros</b>	Nefritis y artralgias.
<b>LMO</b> Niños de 5-10 años, adolescentes y adultos jóvenes.		Generalmente unilateral. Leucocoria, uveítis, granulomas retinianos o endoftalmitis crónica, corioretinitis, estrabismo, disminución de la visión. Opacidad y depósito de complejos inmunes en el humor vítreo, retracción de la retina, papilitis retinal y ceguera.
<b>NT</b> Cualquier edad.	<b>Generales</b>	Cefalea, convulsiones, trastornos conductuales.
	<b>SNC</b>	Epilepsia, vasculitis cerebral, meningitis, mielitis y/o encefalitis eosinofílicas. Neuritis óptica.
	<b>SNP</b>	Radiculitis, afecciones musculo-esqueléticas y del 7º par craneal, vejiga neurógena espástica, hipoestesias, paraparesias y hemiplejías.
<b>LME</b> Cualquier edad		Escasa o nula sintomatología, general e inespecífica. En niños sueño y trastornos del comportamiento.

LMV: larva migrans visceral; LMO: larva migrans ocular; NT: neurotoxocariosis; LME: larva migrans encubierta; SNC: sistema nervioso central; SNP: sistema nervioso periférico. Tomado y modificado de Archielli y Kozubsky, 2008; Bortoli y El Achkar, 2003; Despommier, 2003; Enko et al., 2009; Fillaux y Magnaval, 2013; Finsterer y Auer, 2007; Magnaval, 2001; Reyna-Figueroa et al., 2007 y Smith y Beaver 1953.

## **2.6 Respuesta inmune a *Toxocara canis***

Aún hay mucho que dilucidar en la relación *T. canis*-hospedero y la respuesta inmune que induce, pero se sabe que está mediada por componentes del metabolismo larvario conocidos como antígenos de secreción y excreción de larvas de *T. canis* (Ag S/E Tc). Esta respuesta se caracteriza por eosinofilia, granulomas asociados a la larva y una respuesta adquirida tipo Th2, con incremento de inmunoglobulinas, principalmente IgG e IgE (Fig. 6).

### **2.6.1 Antígenos de secreción y excreción de larvas de *T. canis* (Ag S/E Tc)**

Las secreciones de la larva de *T. canis* se sintetizan en las glándulas esofágicas y las células excretoras y son expelidos por el estoma y el poro excretor (respectivamente) y junto con las excreciones de las células intestinales eliminadas por el poro anal, constituyen las secreciones y excreciones, que De Savigny (1975) obtuvo, al cultivar larvas en medios nutritivos. Las secreciones además, forman la epicutícula de la larva que actúa como una barrera protectora (Martínez, 2005; Page et al., 1992a, b).

Los productos de secreción y excreción de larvas de *T. canis* son proteínas altamente glicosiladas, ya que por cada miligramo de proteína se presentan alrededor de 400 µg de carbohidrato (Holland y Smith, 2006). Desde su descubrimiento estos productos de secreción y excreción se han caracterizado en geles de acrilamida (SDS-PAGE) por sus pesos moleculares, con bandas evidentes de 26, 32, 45, 55, 70, 120 y 400 kDa (Page et al., 1992b) y se han utilizado en el inmunodiagnóstico, ya que algunos de sus componentes actúan como antígenos (Ag S/E Tc). Recientemente, se han caracterizado tres paquetes de proteínas/glicoproteínas: TES-26, TES-32/70 y TES-120, además de otros componentes no caracterizados totalmente (Maizels, 2013).

Dentro de los TES-26 se ha identificado una proteína de unión a fosfatidiletanolamina (Tc-PEB-1) que es homóloga a la de mamíferos y a la de otros parásitos. Los TES-32 están formados por lectinas tipo C 1-3 (Tc-CTL-1-3), homólogas de proteínas mamíferas de unión a manosa y que están presentes en la cutícula de la larva. La lectina 4 tipo C (Tc-CTL-4) pertenece a los TES-70. En los TES-120 están presentes mucinas 1-4 (Tc-MUC-1-4) asociadas a glicanos, algunos

ricos en galactosa y N-acetilgalactosamina y forman parte de la epicutícula (Page et al., 1992a, b; Maizels 2013). Los TES-45, TES-55 y TES-400, son proteoglicanos con predominio de carbohidratos (Holland y Smith, 2006). Además de estos paquetes, se han caracterizado proteasas de cisteína como las catepsinas L y Z (Tc-CPL-1 y Tc-CPZ-1), proteínas estructurales como acuaporina (Tc-AQP-1), miosina de cadena pesada (Tc-MHC-1) y de cadena ligera (Tc-MLC-1) y enzimas como la lactato deshidrogenasa (Tc-LDH-1) y cinasa de arginina (Tc-ARK-1) (Maizels 2013).

### **2.6.2 Respuesta innata y adquirida**

La respuesta innata inicia y retroalimenta a la adquirida. En el caso de la larva migrans por *Toxocara sp.*, comienza con la activación inespecífica de eosinófilos, basófilos y mastocitos. Esta activación puede darse mediante selectinas o lectinas parasitarias y/o el entrecruzamiento de IgE inespecíficas acopladas a su receptor en eosinófilos o basófilos (Behm y Ovington et al., 2000) y la activación de mastocitos por medio de IL-4 y IL-9 e IL-13 (Shea-Donohue et al., 2010). La activación provoca la liberación de mediadores químicos tóxicos y citocinas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), que retroalimentan la eosinofilia, basofilia y mastocitosis. Así, la IL-9 mantiene e incrementa la mastocitosis, al inducir el reclutamiento, supervivencia y diferenciación de mastocitos y estimular a LTh9 (linfocitos Th9) a producir IL-9 (Shea-Donohue et al., 2010). Mientras que la eosinofilia se induce por la IL-5 que estimula la proliferación de eosinófilos en médula ósea y su aumento en sangre (Foster et al., 2002) ayudada de potentes quimioatrayentes (C-C, CCL5 y eotaxina) producidos por los eosinófilos (Behm y Ovington et al., 2000; Martínez 2005). Estas células innatas (eosinófilos, basófilos y mastocitos) junto con las células linfoides innatas activadas por alarminas producidas por daño celular epitelial, producen IL-4 que estimula la respuesta Th2, la mastocitosis y promueve la diferenciación de células B y el cambio de isotipo IgE (Maizels 2013; Martínez-Labat 2005; Shea-Donohue et al., 2010).

Por otro lado, las células dendríticas reconocen antígenos glicanos que presentan sin coestimulación a LTh0 (Everts et al., 2010; Maizels 2009). Los LTh0 en presencia de IL-4 se

convierten en LTh2, que a su vez inducen la liberación de citocinas y la diferenciación y proliferación de LB (células plasmáticas y LB de memoria) y el cambio de isotipos de Ig (Fig. 6).

Otras citocinas tipo Th2, además de la IL-4, la IL-5 y la IL-9, son la IL-10 y la IL-13. La IL-10 es liberada por los LT y otras células presentadoras de antígenos, inhibe la proliferación de LT e induce la generación de LT reguladores (iTreg) en presencia de exposición crónica de antígeno (Everts et al., 2010; Wraith 2003). La presencia de iTreg asociada posiblemente a anergia clonal, hace que disminuya la intensidad de la respuesta. La IL-13 (homóloga estructural de la IL-4), es producida por LTh2, CD, mastocitos, células linfoides innatas y células NK; disminuye la producción de citocinas proinflamatorias en los macrófagos (IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12) y en humanos induce la diferenciación y proliferación de LB y el cambio de isotipo a IgG4 e IgE (Grencis et al., 2004).

Una vez que se establece la respuesta Th2, no puede cambiar a Th1, ya que se creó una memoria por infección primaria, que puede ser rápidamente activada en una segunda exposición (Foster et al., 2002).

### **2.6.3 Anticuerpos**

Havasiová-Reiterová et al. (1995), detectaron la producción de anticuerpos a partir de la administración de cinco huevos larvados de *T. canis* a ratones y observaron que la cantidad de anticuerpos detectados es proporcional a la cantidad de fases infectantes ingeridas.

El isotipo de anticuerpos generados en la infección por *T. canis*, no es excluyente y depende del hospedero y el tiempo transcurrido p.i. Las IgM específicas prevalecen en la respuesta adquirida contra *Toxocara* sp., pero no excluye la producción de otros isotipos (Maizels y Hewitson, 2011). Por ejemplo en humanos, se ha observado la producción de IgM e IgG2 en respuesta a carbohidratos, además de otros isotipos como IgE, IgG1 y en Larva Migrans Visceral a la IgG4 (Maizels, 2013). El isotipo que persiste durante más tiempo (hasta 4 años p.i.) es la IgG, mientras que los niveles de IgE decrecen al año de la infección (Elefant et al., 2006; Genchi et al., 1988).

Respecto a la producción de IgE, se ha reportado una respuesta bifásica en ratones: el primer pico de IgE inespecífica estimulado por la respuesta innata en el día 10 p.i., mientras que el segundo de IgE específica a Ag S/E Tc, establecido por la respuesta adaptativa en el día 21 p.i. (Takamoto et al., 1998).

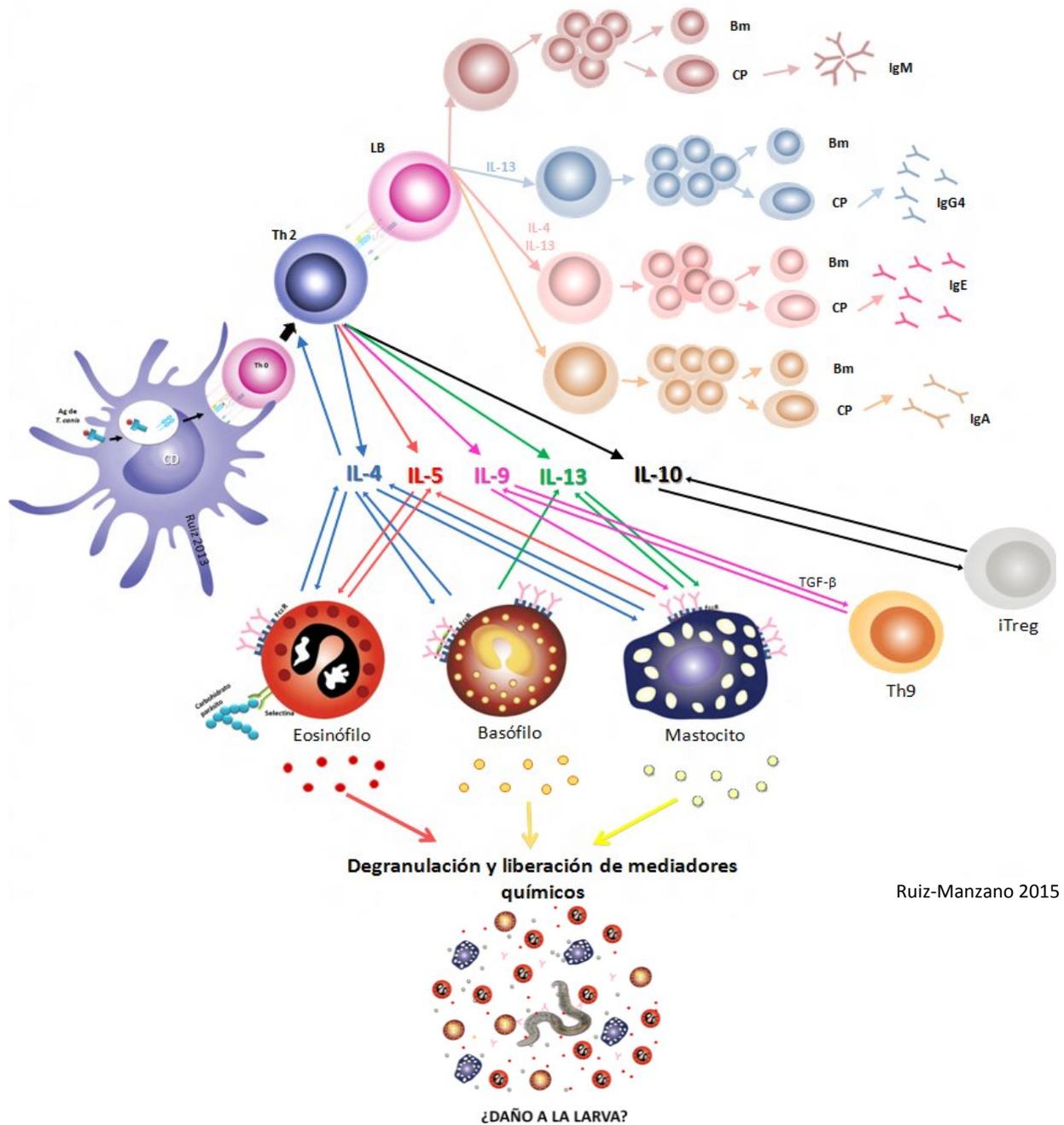
En cachorros con toxocariosis, se han reportado niveles elevados de IgA, pero conforme crecieron, estos niveles disminuyeron, probablemente por la eliminación de nematodos adultos del intestino. En perros adultos con infección crónica se detectó IgM posiblemente por la estimulación de la larva (Matsumara et al., 1983).

En ovinos a los que se les administró 100 hL2 de *T. canis* diariamente durante 23 días, se observó en el día 14 p.i. el inicio de la producción de IgG y un incremento en la actividad proliferativa de LT y LB, que se conservó en los LB, pero disminuyó a los 49 días p.i. en los LT, además de un aumento de LB-IgM+ en el día 28 p.i. (Revajová et al., 2006).

La presencia de anticuerpos en los hospederos es importante desde el punto de vista diagnóstico más que de protección al hospedero, ya que se ha observado que larvas de *T. canis* en tejidos de ratones, ratas, cobayos y conejos pueden sobrevivir al menos dos años (Beaver, 1959), que la reinfección en ratones no los protege y no impide que las larvas de *T. canis* continúen migrando hasta llegar al sistema nervioso (Wnukowska et al., 2008) y que la producción de anticuerpos específicos en jerbos no impide la migración larvaria (Alba-Hurtado et al., 2009). Por lo que, el fallo en la eliminación de las larvas, se explica no por la falta de producción de anticuerpos anti-*T. canis*, sino por mecanismos de inmunoevasión, como el desprendimiento de epicutícula de la larva al contacto con granulocitos y/o anticuerpos (Martínez-Labat, 2005), el mimetismo con moléculas y receptores similares a las del hospedero (lectinas), a la distracción del sistema inmune y la inmunosupresión por anergia clonal e inducción de linfocitos Treg y citocinas supresoras (Maizels, 2013).

Los mecanismos inmunológicos significan un desgaste y junto con los productos liberados por las células del sistema inmune del hospedero tienen efectos en detrimento de sus tejidos (Martínez-Labat, 2005). Al paso del tiempo los procesos inflamatorios crónicos asociados a la

respuesta Th2 hacia larvas de *T. canis*, hacen que el daño a los tejidos se focalice en el granuloma que las encapsula e inmoviliza, siempre que los mecanismos de inmunosupresión inespecíficos (gestación, enfermedad, fármacos, etc.) no inactiven la respuesta que mantiene a la larva dormante en el granuloma.



Ruiz-Manzano 2015

**Fig. 6. Respuesta inmune a la larva de *T. canis*.** CD: célula dendrítica; LB: linfocito B; Bm: linfocito B de memoria; TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante  $\beta$ ; CP: célula plasmática; iTreg: LT regulador inducido.

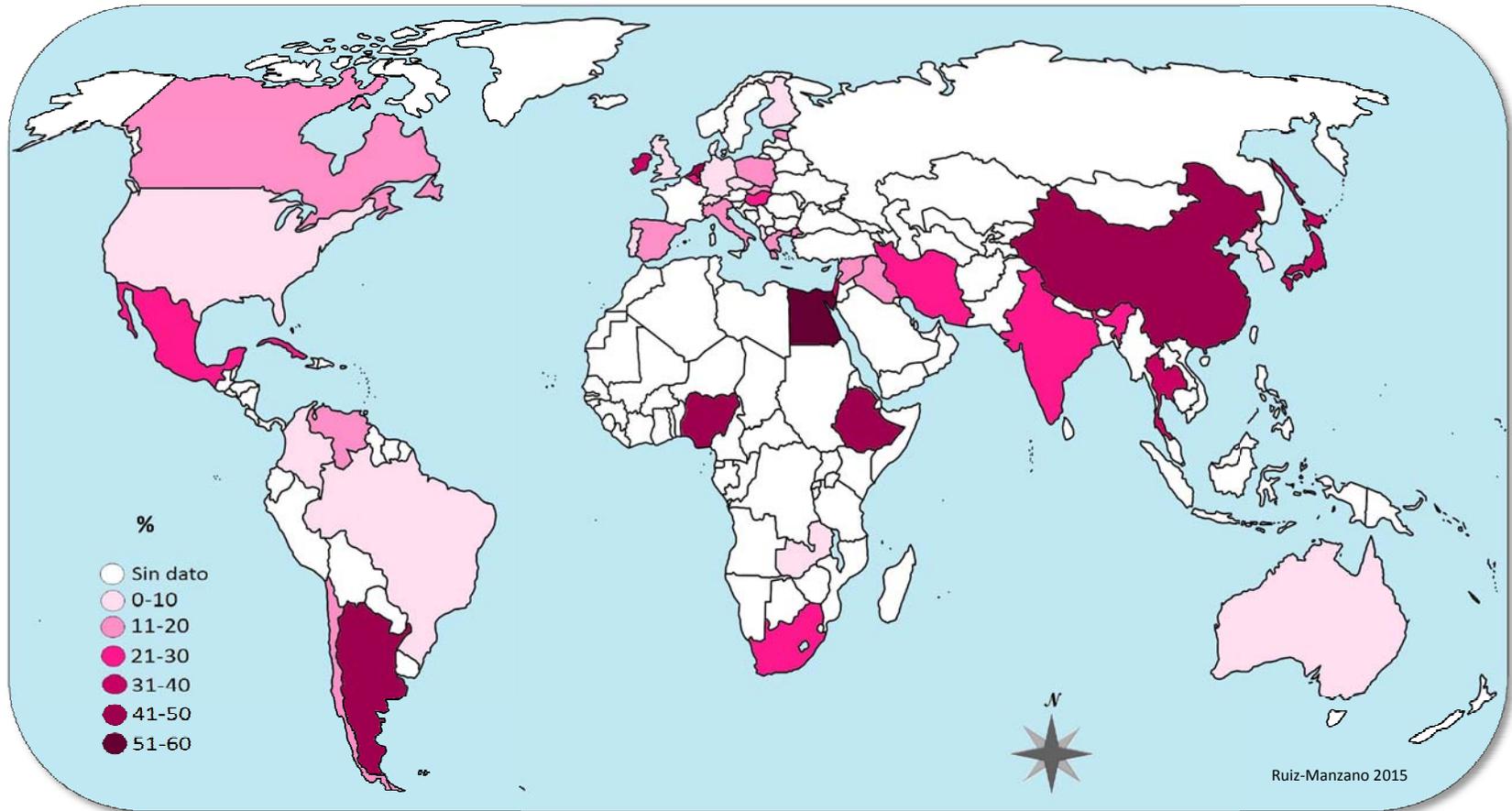
## **2.7 Epidemiología**

### **2.7.1 Toxocariosis en el mundo**

La toxocariosis en perros está presente en todo el mundo, sobre todo en climas templados a tropicales. Esta ubicuidad se explica por: a) la eficacia en la transmisión perinatal ya que los cachorros nacen con la enfermedad y se convierten en los principales diseminadores; b) la alta capacidad prolífica de las hembras de *Toxocara*; c) la capacidad del nematodo para infectar diferentes hospederos que funcionan como reservorios y d) la presencia de canidos en nuestro entorno cercano. Dentro de las poblaciones caninas con las que interactuamos están los perros con dueño que son desparasitados regularmente y tienen un menor impacto epidemiológico que los perros callejeros, los perros semi-domésticos y los ferales, que junto con los canidos de poblaciones rurales y los silvestres son los principales diseminadores de la toxocariosis (Martínez-Labat, 2004).

Algunos estudios de frecuencia de toxocariosis en perros han mostrado un amplio rango en los índices de infección a nivel mundial en los últimos 16 años, que va de menos del 1 a más del 50% (Fig. 7, Cuadro 3), dependiendo de la técnica diagnóstica y la población estudiada. Se observan prevalencias mayores en cachorros y se considera el hallazgo de los nematodos adultos por necropsia, la técnica más específica de diagnóstico.

En cachorros diagnosticados por necropsia las frecuencias van de 29.6 a 35% y en adultos de 3.4 a 45%. Las frecuencias obtenidas con técnicas coproparasitológicas, revelan que en los cachorros en su mayoría son del 34-48%, aunque hay un estudio en Brasil que muestra una frecuencia de 1.8% (Funada et al., 2007). En los adultos hay más variación entre estudios (0.74-32.6%), así como en las poblaciones mixtas. A pesar de las variaciones entre estudios, en los cachorros la mayoría de las frecuencias son más elevadas que en los adultos, lo que tiene explicación por la transmisión perinatal (Delgado y Rodríguez-Morales, 2009).



**Fig. 7. Frecuencias de toxocarosis en perros en el mundo (1998-2014).** (Datos del Cuadro 3).

**Cuadro 3. Frecuencias de toxocarosis en perros en el mundo (1998-2014).**

<b>Continente/ País</b>	<b>Frecuencia %</b>	<b>Edad</b>	<b>Método</b>	<b>Referencia</b>
<b>AMÉRICA</b>				
Argentina, Cd. de la Plata	44.4	C	CPS	Radman et al., 2006
	32.6	A	CPS	
Brasil, Sao Paulo	1.8	C	CPS	Funada et al., 2007
	0.74	A	CPS	
Canadá, Saskatchewan	11.8	M	CPS	Schurer et al., 2012
Chile, Santiago	11	M	CPS	López et al., 2006
Colombia, Popayán	4.3	M	CPS	Vásquez et al., 2004
Cuba	29,6	C	N	Hernández et al., 2007
	11.3	A	N	
E.U.A.	5.04	M	CPS	Mohamed et al., 2009
Venezuela, Cd. Bolívar	16.7	M	CPS	Devera et al., 2008
<b>EUROPA</b>				
Albania, Tirana	0.9	M	CPS/N	Xhaxhiu et al., 2011
Alemania	6.1	M	CPS	Barutzki et al., 2011
Alemania	4	M	CPS	Becker, 2012
Bélgica	26.3	M	SD	Claerebout et al., 2009
Eslovaquia	16.6	M	CPS	Antolová, 2004
España, Córdoba	17.22	M	CPS/N	Martínez et al., 2007
Estonia, Tartu	14.6	M	N	Talvik et al., 2006
Grecia	12.8	M	CPS	Papazahariadou et al. 2007
Holanda	21	A	CPS	Overgaauw, 1998
	48	C	CPS	
Holanda	4.4	M	CPS	Overgaauw et al., 1999
Hungría, Budapest	24.3-30.1	M	CPS	Fok et al., 2001
Inglaterra	1.4	M	CPS	Batchelor et al., 2008
Irlanda Dublín	39	M	N	Roddie et al., 2008
Italia	13	M	CPS	Riggio et al., 2012
Polonia, Pomerania	20.62	M	CPS	Tylkowska et al., 2010
Portugal, Gran Oporto	5.1	M	CPS	Neves et al., 2014

Rep. Checa, Praga	6.2	M	CPS	Dubná et al., 2006
Suiza	7.1	M	CPS	Sager et al., 2006
<b>ASIA</b>				
China, Hunan	45.2	A	N	Dai et al., 2009
Corea, Chuncheon	0.9	M	N	Kim et al., 2005
India, Uttar Pradesh	24.3	M	CPS	Sahu et al., 2014
Iran, Moghan Plain	23.7	M	CPS	Zare-Bidaki et al., 2010
Israel, Palestina	36.4	M	CPS	Othman, 2011
Japón, Osaka	34.9	C	CPS	Kimura et al., 2013
	8.8	A	CPS	
Tailandia, Bangkok	37.5	C	N	Rojekittikhun et al., 1998
	3.4	A	N	
Turquia, Aydin	20	M	CPS	Unlü y Eren, 2007
<b>ÁFRICA</b>				
Egipto, Giza	56	M	N	Shalaby et al., 2010
Etiopia, Debre Zeit	21	M	CPS	Yacob et al., 2007
	45	C	N	
Nigeria, Ilorin	41.7	M	CPS	Ugbomoiko et al., 2008
Sudáfrica	21	M	CPS/N	Minnaar et al., 2002
Zambia	7.6	M	CPS	Nonaka et al., 2011
<b>OCEANÍA</b>				
Australia	1.2	M	CPS	Palmer et al., 2008

C: cachorros; A: adultos; M: población mixta; SD: sin dato; CPS: coproparascopícos; N: necropsia.

### 2.7.2 Toxocariosis en México

En México se han realizado múltiples estudios epidemiológicos con diferentes técnicas diagnósticas para la toxocariosis en cachorros, adultos y poblaciones caninas mixtas (Cuadro 4). La mayoría de los estudios se han hecho en el centro del país, aunque hay reportes de otros estados (Fig. 8). El diagnóstico definitivo por necropsia en cachorros muestra un decremento en la presentación de la toxocariosis de 93% en 1967 (Styles et al., 1967) y 75.6% en 1968 (Schantz y Biagi, 1968) a 23% en 2002 (Fernández et al., 2002) y un posterior incremento (más del 60%)

en 2005 y 2010 (Eguía et al., 2005; Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado, 2010). Los estudios serológicos muestran una frecuencia mayor del 80% (Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado, 2010). En general se observa una mayor presentación en cachorros que en adultos, a excepción del diagnóstico por hemaglutinación con antígeno de adulto de *T. canis* (Martínez-Barbabosa et al., 2008a), que puede ser por acumulación de casos por la edad y/o reacciones cruzadas.

**Cuadro 4. Frecuencias de toxocariosis en perros en México (1967-2012).**

Lugar	Frecuencia % (+/N)	Edad	Método	Referencia
D.F.	93 (119/128)	C	N	Styles et al., 1967
D.F.	75.6 (69/91)	C	N	Schantz y Biagi, 1968
	7.1 (3/42)	A	N	
D.F.	17.3 (123/710)	M	CPS	Martínez-Barbabosa et al., 1998
Yucatán	7.75 (77/993)	M	CPS	Rodríguez-Vivas et al., 2001
Querétaro	23 (26/113)	C	N	Fernández et al., 2002
	7.9 (7/88)	A	N	
D.F.	12-18	M	CPS/ N	Ponce-Macotela et al., 2005
D.F.	66.6 (8/12)	C	N	Eguía et al., 2005
	7.4 (8/108)	A	N	
D.F.	17.0 (24/141)	C	HA ATc	Martínez-Barbabosa et al., 2008a
	50.3 (71/141)	A	HA ATc	
Chiapas	19 (38/200)	M	CPS	Martínez-Barbabosa et al., 2008b
D.F.	67.5 (135/200)	M	CPS	Romero et al., 2009
Estado de México	64.4 (20/31)	C	N	Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado,
	87.0 (27/31)	C	ELISA	2010
	80.6(25/31)	C	WB	
Querétaro	15.1 (57/375)	M	N	Cantó et al., 2011
Guerrero	11.8 (34/292)	M	CPS	Márquez, et al., 2012

C: cachorros; A: adultos; M: población mixta; CPS: coproparasitoscópicos; N: necropsia; S: serología; HA ATc: hemaglutinación con antígeno de adulto de *T. canis*; WB: Western blot.



**Fig. 8. Frecuencias de la toxocariosis canina en México (2001-2012).** (Datos del Cuadro 4).

### 2.7.2 Larva Migrans por *T. canis* en humanos

En humanos la infección por *T. canis*, es una enfermedad prevalente y desatendida, aún en países industrializados (Jia et al., 2012). Es de gran importancia en términos de morbilidad por lo difícil que puede resultar su control y diagnóstico (Delgado y Rodríguez-Morales, 2009). Las seroprevalencias mundiales en humanos varían del 1.9 al 86.75% (Cuadro 5). Aunque principalmente afecta a niños por sus hábitos de juego y falta de higiene, se reportan casos clínicos cada vez con más frecuencia en adultos (Bachtiar et al., 2012; Finsterer et al., 2010; Enko et al., 2009).

**Cuadro 5. Frecuencias serológicas en humanos positivos a *Toxocara* sp. en diferentes países (1992-2015).**

<b>CONTINENTE/País</b>	<b>Frecuencia % (+/N)</b>	<b>Edad</b>	<b>Referencia</b>
<b>AMÉRICA</b>			
Argentina, Cd. de la Plata	38.88 (46/120)	N	Archielli et al., 2014
Bolivia, Santa Cruz	34 (73/260)	M	Cancrini et al., 1998
Brasil	15.5 (39/252)	N	Cassenote et al., 2014
Canadá, Saskachewan	13 (26/201)	M	Schurer et al., 2013
Cuba	38.8 (392/1011)	N	Sariego et al., 2012
E.U.A	13.9 (2834/20,395)	N	Won et al., 2008
México, D.F.	7.5 (28/378)	N	Martínez-Barbabosa et al., 1997
México, D.F.	1.9 (4/207)	N	Fernández et al., 1999
México, D.F.	30.8 (88/285)	N As	Muñoz-Guzman et al., 2010
	19.7 (30/152)	N S/As	
México, Durango	26.2 (33/126)	M	Alvarado-Esquivel, 2013a
México, Durango	13 (12/90)	A*	Alvarado-Esquivel, 2013b
México, Edo. de México	22.22 (24/108)	N	Romero et al., 2013
México, Durango	2.5 (5/204)	M DV	Alvarado-Esquivel et al., 2015
	0 (0/19)	M C	
Perú, Lima	20.46 (62/303)	M	Espinoza et al., 2010
Venezuela, Perijá	21.7 (18/83)	M	Díaz-Suárez et al., 2010
<b>EUROPA</b>			
Croacia	31 (44/142)	N *E	Sviben et al., 2009
Dinamarca	2.4 (79/3,247)	M	Stensvold et al., 2009
Eslovaquia	13.65 (124/908)	M	Havasiová et al., 1993
Eslovenia	72 (172/239)	M	Logar et al., 2004
España, Gipuzkoa	17.4 (140/803)	N	Cilla et al., 1996
Francia	22 (404/1836)	M *E	Gueglio et al., 1994
Hungría	32 (136/425)Tc	N	Bede et al., 2008
Italia, Ancona	4.29 (7/163)	M	Giacometti et al., 2000
Polonia	72.59 (249/343)	N	Zarnowska et al., 2008
<b>ASIA</b>			
China, Chengdu	4.11 (64/1557)	N	Luo et al., 1999
India, Chandigarh	6.4 (6/94)	M	Malla et al., 2002
Indonesia, Manado	84.6 (99/117)	N	Hayashi et al., 2005

Irán	8.8 (48/544)	N	Fallah et al., 2007
Jordania	10.9 (76/699)	M	Abo-Sheada et al., 1992
Malasia, Orang Asli	4.8 (9/188)	M	Romano et al., 2010
Nepal	81 (162/200)	M	Rai et al., 1996
Sri Lanka	5.1 (10/196)	N	Deepika et al., 2009
Taiwan (Este)	76.6 (252/329)	N	Fan et al., 2004
Turquia	12.95 (74/571)	N	Dogan et al., 2007
<b>ÁFRICA</b>			
Egipto	6.2 (9/150)	N	Antonios et al., 2008
Líbano	19 (30/159)	M	Kanafani et al., 2006
Nigeria, Jos	29.8 (31/104)	A	Ajayi et al., 2000
Suazilandia	44.6 (41/92)	N	Liao et al., 2010
<b>OCEANÍA</b>			
República de las Islas Marshall	86.75 (144/166)	N	Fu et al., 2014

N: niños; A: adultos; M: población mixta; As: pacientes con asma; S/As: pacientes sin asma; \*: recolectores de basura; C: pacientes con ceguera; DV: pacientes débiles visuales; \*E: pacientes con eosinofilia.

En niños el principal mecanismo de infección es por la ingestión de hL2 asociado a geofagia, donde la contaminación del suelo juega un papel importante en la prevalencia ya que se han encontrado huevos de *Toxocara* sp. en la tierra de los espacios de confluencia entre humanos y hospederos definitivos en los cinco continentes (Archielli y Kozubsky, 2008) (Cuadro 6). La contaminación de los espacios comunes no sólo es importante para la transmisión al humano sino también para otros hospederos incluyendo los cánidos, que también pueden ingerir las fases infectantes por esta vía.

En humanos adultos se han tratado de dilucidar los mecanismos de transmisión. Hay reportes de la presencia de huevos larvados de *Toxocara* sp. en vegetales crudos (Travieso-Valles et al., 2004), agua (Kozan et al., 2007) y pelo de perro (Keegan y Holland 2010), pero sin el reporte de casos clínicos relacionados. Por otro lado, un mecanismo de transmisión con reporte de casos clínicos en humanos, es el consumo de tejidos de hospederos paraténicos. Hay reportes de enfermedad con sintomatología y diagnóstico serológico positivo a Larva Migrants por *Toxocara* sp. relacionados con el consumo de hígado de bovino (Choi et al., 2008;

Yoshikawa et al., 2008), pato (Hoffmeister et al., 2007), pollo (Morimatsu et al., 2006), ovino (Salem et al., 1992) y de carne cruda de venado (Enko et al., 2009).

**Cuadro 6. Frecuencias de la presencia de huevos de *Toxocara* spp. en el ambiente de diferentes países (1993-2013).**

País	Frecuencia %	Lugar de Muestreo	Referencia
<b>AMÉRICA</b>			
Argentina, Buenos Aires	18.6	R	Rubel et al., 2009
	8.3	U	
Brasil, Sao Paulo	29.7	AP	Muradian et al., 2005
Chile, Sgo. de Chile	33.3	PP	Castillo et al., 2000
	66.7	P	
Cuba, Habana	42.2	AJ	Duménigo et al., 1995
México, D.F.	14.6	P, J	Martínez-Barbabosa et al., 1998
México, D.F.	60.0	P	Romero et al., 2009
México, D.F.	12.9	JU	Celis et al., 2012
Venezuela, Cd. Bolívar	55	PP, P	Devera et al., 2008
<b>EUROPA</b>			
República Checa, Praga	20.4	P	Dubná et al., 2007
Estonia, Tartu	17.8	P, AR	Talvik et al., 2006
Francia, Besancon	86.2	AJ,AR	Janin-Noureddine et al., 1997
Italia	50	G	Habluetzel et al., 2003
España, Madrid	16.4	P	Dado et al., 2012
Polonia, Lodz	30.4	R (J)	Borecka et al., 2010
	23.3	U (JR)	
<b>ASIA</b>			
India, Andhra	38.5	AP	Kumar et al., 1998
Irán, Khoram Abad	63.3	P	Zibaei et al., 2013
Iraq, Basrah	12.2	AP, J	Mahdi et al., 1993
Japón, Tokio	41	AJ	Macuhova et al., 2012
Malasia	26.7	U (AP)	Azian et al., 2008
	4.9	R (AP)	
Rusia	1-3, 50-60	U (AP)	Uspenskii et al., 2011
Tailandia, Bagkok	5.71	P	Wiwanitkit et al., 2004
<b>ÁFRICA</b>			
Egipto, Heliopolis	30.3	P	Oteifa et al., 1997
Nigeria, Kadma	50.4	AJ	Maikai et al., 2008
<b>OCEANÍA</b>			
Australia, Melbourne	0.55	P	Carden et al., 2003

R: zona rural; U: zona urbana; AP: áreas públicas; PP: plazas públicas; P: parques; AJ: áreas de juego; J: jardines; JR: jardines residenciales; JU: jardines de universidad; AR: áreas residenciales; G: granjas.

Se han identificado diferentes organismos como hospederos paraténicos de *T. canis*, ya sea por detección del parásito o por inoculación experimental (Cuadro 7). En los bovinos a pesar de la relación entre el consumo de hígado crudo y signos clínicos, no se han realizado estudios en los que se detecte de manera directa o indirecta la presencia de Larva Migrans por *T. canis*, por medio de la detección de la larva en los tejidos o con técnicas inmunológicas que detecten anticuerpos o antígeno en suero.

**Cuadro 7. Hospederos paraténicos reportados de *T. canis*.**

Especie	País	Frecuencia (%)	Tipo de estudio	Referencia
Gatos ( <i>Felis silvestris catus</i> )	EUA		E	Parsons et al., 1989
Tortugas ( <i>Testudo graeca</i> )	Turquía		E	Merdivenci y Sezen, 1965
Cerdos ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	Argentina		E	Sommerfelt et al., 2006
Cerdos ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	Dinamarca		E	Taira et al., 2003
Cerdos salvajes ( <i>Sus scrofa</i> )	Rep. Checa	7.2 (85/1173)	P/F	Antolová et al., 2006
Ovinos ( <i>Ovis aries</i> )	Eslovaquia		E	Revajová et al., 2006
Ovinos ( <i>Ovis aries</i> )	Inglaterra	7-47 (S/D)	P/F	Lloyd et al., 2006
Ovinos ( <i>Ovis aries</i> )	Brasil	50.1 (183/365)	P/F	Alvarés-Santarém et al., 2011
Ovinos ( <i>Ovis aries</i> )	Brasil	29.0 (477/1,642)	P/F	Lopes et al., 2013
Moscas ( <i>Chrysomya megacephala</i> )	Brasil	0.05 (15/28485)	P/F	De Oliveira et al., 2002
Moscas ( <i>C. putoria</i> )		0.05 (1/1857)		
Caballos ( <i>Equus ferus caballus</i> )	México	13.82 (13/96)	P/F	Reyes-Climaco et al., 2014

P/F: estudio de prevalencia o frecuencia; E: estudio experimental; S/D: sin dato.

## **2.8 Diagnóstico**

### **2.8.1 Diagnóstico clínico**

En el hospedero definitivo el diagnóstico de las infecciones patentes se realiza a partir de la historia clínica y el examen físico. La confirmación se da al observar huevos en heces y/o la presencia de los adultos en heces o vómito. La técnica microscópica directa no es siempre efectiva, pero las técnicas coproparasitológicas de flotación (Willis) o de concentración-flotación (Faust) son más certeras (De la Fé et al., 2006; Overgaauw, 1997).

### **2.8.2 Inmunodiagnóstico**

La detección de Larva Migrans se basa en el inmunodiagnóstico, principalmente por ELISA con antígenos obtenidos de cultivos larvarios (Cuadro 8). Esta técnica se usa para detectar anticuerpos anti-*T. canis* o bien, Ag S/E Tc con anticuerpos monoclonales o policlonales. Se han diseñado diferentes ensayos para establecer el estado infectivo del paciente: el ELISA sándwich con anticuerpos monoclonales o policlonales (Bowman et al., 1987; Gillespie et al., 1993; Matsumara et al., 1984; Robertson et al., 1988) y el ELISA-avidez-IgG en el que los anticuerpos de baja afinidad se relacionan con infecciones agudas y los de alta afinidad con infecciones crónicas (Marino et al., 2011). El inconveniente de esta técnica es que los anticuerpos generados por otras infecciones y que reconocen Ag S/E Tc, no necesariamente presentan la misma afinidad que los específicos. Así, la disociación del complejo antígeno-anticuerpo, puede ser no solo por el tiempo de unión, por lo que la detección de antígeno, posiblemente es más confiable para identificar el estado infectivo.

Debido a que en los cuadros clínicos por Larva Migrans Ocular se han asociado con bajas cargas parasitarias, la detección de antígenos o anticuerpos circulantes séricos es poco probable, por lo que se recomienda obtener una muestra de humor acuoso por medio de una paracentesis de la cámara anterior del ojo, para detectar anticuerpos con ELISA indirecto o Western blot o antígenos larvarios con ELISA sándwich. Aunque se ha reportado la presencia de eosinófilos en el humor acuoso asociado a Larva Migrans Ocular, el volumen reducido de la

muestra que se puede tomar hace que esta prueba sea poco práctica, a diferencia de la detección de antígenos o anticuerpos (Archielli y Kozubsky, 2008; Fillaux y Magnaval, 2013).

**Cuadro 8. ELISA para el diagnóstico de Larva Migrans por T. canis en hospederos paraténicos.**

<b>Técnica</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Se</b>	<b>Es</b>	<b>Referencia</b>
<b>ELISA indirecto</b>	Ag S/E Tc	78 NA	92 NA	Glickman et al., 1978
<b>ELISA indirecto</b>	Ag S/E Tc	80 NA	93 NA	Speiser y Gottstein 1984
<b>ELISA indirecto</b>	Ag S/E Tc	91 NA	86 NA	Jacquier et al. 1991
<b>ELISA indirecto</b>	Ag Sh	100 NA	57.1 NA	Camargo et al., 1992
		95.4 A	83.7 A	
	Ag S/E Tc	100 NA	90.5 NA	Camargo et al., 1992
		95.4 A	90.5 A	
<b>ELISA indirecto</b>	Ag S/E Tc	100 A	90 A	Roldán et al., 2006
<b>ELISA indirecto</b>	Ag S/E Tc	S/D	S/D	Robertson et al., 1988
<b>ELISA-dot</b>	Ag Sh	100 NA	85.7 NA	Camargo et al., 1992
		100 A	95.3 A	
	Ag S/E Tc	95.4 NA	95.3 NA	Camargo et al., 1992
		95.4 A	97.6 A	
<b>ELISA-dot</b>	Ag S/E Tc	100 A	95 A	Roldán et al., 2006
<b>ELISA-Ag recombinante</b>	TES-26, TES-32, TES120	S/D	S/D	Mohamad et al., 2009
<b>ELISA-sándwich</b>	Ag S/E 57 kDa	S/D	S/D	Iddawela et al., 2007
<b>ELISA-sándwich</b>	AcPo	S/D	S/D	Bowman et al., 1987
<b>ELISA-sándwich</b>	AcPo	S/D	S/D	Matsumura et al., 1984
<b>ELISA-sándwich doble</b>	Tcn-2, Tcn-3	S/D	S/D	Robertson et al., 1988
<b>ELISA-sándwich</b>	Tcn-2	S/D	S/D	Gillespie et al., 1993

NA: sueros no absorbidos; A: sueros absorbidos con Ag Ascaris sp., Ag Sh: Ag de huevo larvado; S/D: sin dato.

Para mejorar el diagnóstico de Larva Migrans por *T. canis*, se han desarrollado técnicas como el Western blot. La detección de anticuerpos anti-Ag S/E Tc con Western blot, se menciona como una prueba específica cuando se consideran las bandas de bajo peso molecular (24, 30-35, 55 y 70 kDa) (Archielli y Kozubsky, 2008; Magnaval, et al., 1991; Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado, 2010). Pero, los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para detectar anticuerpos anti-Ag S/E Tc han producido diferentes resultados dependiendo del tiempo transcurrido post-infección y la especie de hospedero (Cuadro 9), ya que la inmunodominancia de los antígenos es particular para cada especie (Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado, 2010). En conjunto, la heterogeneidad en la producción de anticuerpos dependiendo de la especie, el tiempo post-infección y la gran variedad de bandas reportadas (Alba-Hurtado et al 2009; Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado et al., 2010), dependiendo de la técnica empleada y la calidad del antígeno, hacen que el Western blot sea una técnica efectiva, pero que necesita de la caracterización de proteínas que se reconocen por especie y el tiempo post-infección transcurrido al tomar la muestra, además de estandarizar la producción y obtención de antígenos o el uso de proteínas recombinantes ayudado por el uso de sueros adsorbidos.

Aunque la sensibilidad y especificidad de ELISAs basadas en Ag S/E Tc, varían alrededor del 90% (Cuadro 8), no toman en cuenta reacciones cruzadas con otros nematodos, ni infecciones agudas en las que no se han producido anticuerpos. Por lo que combinar una técnica que detecte anticuerpos con otra que detecte antígenos, es probablemente el medio más eficaz para diagnosticar la infección por *Toxocara* sp. (Robertson et al., 1988).

Debido a que los productos secretados y excretados por la L2 de *T. canis* son numerosos, complejos y semejantes a los de otros nematodos, aunado a la intrincada respuesta inmune que presenta variantes entre los diferentes hospederos, el diagnóstico etiológico certero es difícil de alcanzar y por lo tanto es muy probable que reportes de seroprevalencias en los hospederos (definitivos y paraténicos) tengan falsos positivos, porque los anticuerpos generados en contra de otros nematodos reconocen antígenos de larvas de *T. canis*.

**Cuadro 9. Western blot el diagnóstico de Larva Migrans por T. canis en hospederos paraténicos.**

<b>Especie / Tipo infección</b>	<b>No. bandas</b>	<b>PM bandas (kDa)</b>	<b>Bandas diagnósticas</b>	<b>Referencia</b>
Perros (cachorros)/ Toxocariosis	14	16, 20, 23, 24, 28, 32, 38, 47, 66, 74, 86, 120, 200 y 400	32, 38, 66, 120 y 200	Muñoz-Guzmán y Alba- Hurtado, 2001
Humanos/ Larva migrans	7	24, 28, 30, 35, 132, 147 y 200	24, 28, 30 y 35	Magnaval et al., 1991
Humanos/ Larva migrans	10	24, 28, 30, 35, 48, 56, 67, 117, 136 y 152	24-35	Roldan y Espinoza, 2009
Humanos/ Larva migrans	11	24, 28, 30, 35, 36, 43, 51, 74, 106, 120 y 219	24, 30-35, 55 y 70	Muñoz-Guzman et al., 2010
Humanos/ Larva migrans	10	25, 28, 30, 35, 40, 46, 56, 70, 120 y 150*	28 y 30*	Jin et al., 2013
Humanos/ Larva migrans	6	250, 150. 75, 50, 35 y 24	24 y 35	Zibaei et al., 2013
Gerbos	1	Día 20 p.i.: 32	S/D	Alba-Hurtado et al., 2009
	4	Día 30 p.i.: 24, 29, 32, 120		
	7	Días 40–60 p.i.: 24, 29, 32, 55, 66, 70, 120		
	8	Día 130 p.i.: 24, 29, 32, 55, 66, 70,120, 200		
Conejos / Larva migrans	4	Primer mes p.i.: 35, 92, 116 y 200	35 y 92**	Morales et al., 2002
	6	Posteriormente: 28, 31, 45, 66, 80 y 92	35 y 92**	

\*Detección con extracto crudo de larvas; \*\*Recomendación para futuros estudios; S/D: Sin dato.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

*Toxocara canis* es uno de los geohelminintos más frecuente en perros en México, especialmente en cachorros, que son los principales diseminadores de las fases infectantes. La ubicuidad de los cánidos en el país hace que una gran variedad de hospederos paraténicos sean proclives a infectarse, presentar Larva Migrans y en algunos casos, puedan transmitirla al ser ingeridos por otros hospederos paraténicos o definitivos. Diversos reportes serológicos identifican a hospederos paraténicos como ovinos, cerdos salvajes y equinos, pero en bovinos sólo se han presentado casos clínicos asociados al consumo de hígado crudo en humanos. Por lo tanto, es necesario identificar la Larva Migrans por *T. canis* en bovinos susceptibles a consumo, no solo del humano, sino también de perros y cánidos, que en México son los que con más frecuencia se alimentan de carne ó vísceras crudas.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si se detectan anticuerpos anti-Toxocara canis después de remover antígenos afines a otros nematodos y/o la presencia de antígenos de secreción-excreción de larvas de T. canis en sueros de bovinos de carne, entonces, se demostrará que los bovinos pueden presentar Larva Migrans por T. canis y ser una fuente de probable de infección para otros hospederos.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

- Determinar la frecuencia de *Toxocara canis* en sueros de bovinos para consumo de carne.

### **5.2 Objetivos Particulares**

- Detectar antígenos de secreción-excreción y anticuerpos anti-*Toxocara canis* en bovinos para producción de carne.
- Detectar reacciones cruzadas con antígenos de otros nematodos.

### **5.3 Metas**

- Estandarizar el ELISA para la detección de anticuerpos anti-*T. canis* y de antígenos de secreción y excreción de larvas de *T. canis* en suero bovino.
- Optimizar el diagnóstico de Larva Migrans por *T. canis* empleando la adsorción de suero con diferentes fuentes de antígenos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Diseño experimental

Para el diagnóstico de Larva Migrans por *T. canis* en los 127 sueros bovinos, se estandarizaron el ELISA indirecto para detectar anticuerpos anti-Ag S/E Tc y el ELISA sándwich para la captura de antígenos. Posteriormente, en los sueros positivos por cualquiera de las dos técnicas se detectaron con ELISA indirecto, anticuerpos afines a 10 antígenos de 8 nematodos. Por último, con estos antígenos se adsorbieron los sueros positivos a anticuerpos anti- *T. canis* y Ag S/E Tc y se realizó un ELISA competitivo (Fig. 9).

El presente estudio fue observacional, descriptivo, prospectivo, transversal y de frecuencia. Los criterios de inclusión empleados fueron: Sueros de *Bos taurus* y/o *Bos indicus* sacrificados en el rastro, de todas las edades y ambos sexos. Mientras que los criterios de exclusión fueron: sueros contaminados, tubos rotos.

#### 6.1.1 Localización de los lugares de trabajo

**Trabajo experimental:** se realizó en el Laboratorio de Parasitología Experimental del I.N.P. Ssa. (Insurgentes Sur 3700, Col. Insurgentes Cuicuilco, Del. Coyoacán, CP. 04530).

**Toma de muestras:** Se tomaron muestras de sangre de 127 bovinos sacrificados en el Rastro Municipal Tecamachalco, situado en la Carretera Tecamachalco-Cañada km 59, Puebla, México.

**Alojamiento del bovino control:** El bovino para obtener el control negativo y positivo se alojó en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal, CEIPSA Topilejo, de la FMVZ, UNAM, emplazado en la Av. Cruz Blanca No. 486, San Miguel Topilejo km 28.5 de la Carretera Federal México-Cuernavaca, Delegación Tlalpan, C.P. 14500 México, D.F. El Centro cuenta con una superficie total de 33,755 m<sup>2</sup>, ubicado a 19° latitud norte y 99° longitud Oeste, a una altura de 2760 metros sobre el nivel del mar, el clima de la región es semifrío-semihúmedo con lluvias en verano, con una precipitación pluvial de 800-1200 mm anuales y una temperatura promedio de 19°C.

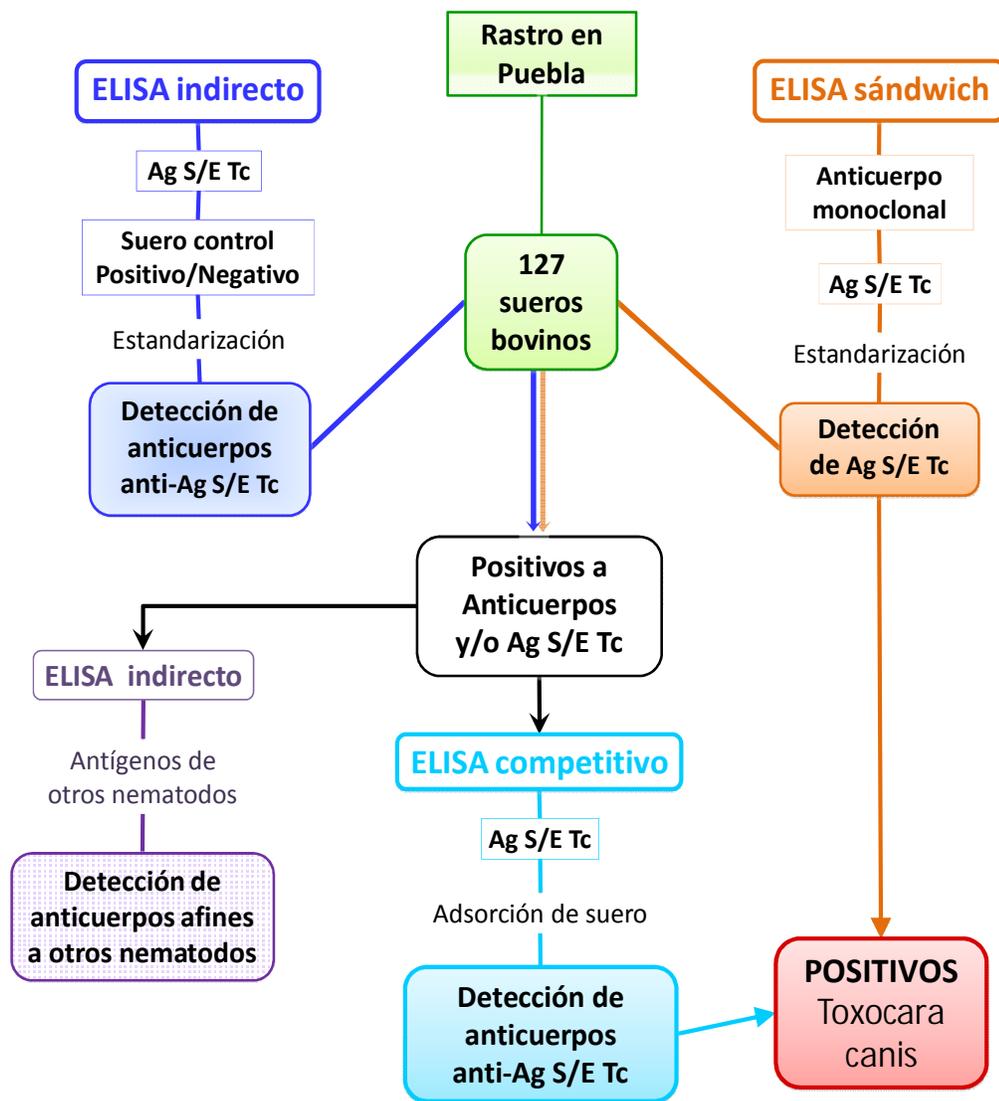


Fig. 9. Diseño experimental para el diagnóstico de Larva Migrans por *T. canis* en bovinos.

### 6.1.2 Tamaño de muestra

Se determinó el tamaño mínimo de muestra para prevalencias pequeñas (menores al 30%) con un error estimado del 5%, con la siguiente ecuación obtenida de Jaramillo-Arango y Martínez-Maya, 2010:

$$n = (1-p) / (p d)$$

Dónde:

**n**= tamaño mínimo de muestra.

**p** = probabilidad de que el evento ocurra (20.7%).

**d** = error estimado (5%).

### 6.1.3 Variables

**Cuadro 10. Variables del estudio.**

<b>Variable</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Tipo de variable</b>
Diagnóstico	Positivo	Cualitativa
	Negativo	Dicotómica
Género	Hembra	Cualitativa
	Macho	Dicotómica
Edad	Becerros	Cualitativa
	Adultos	Dicotómica
Especie	Bos taurus	Cualitativa
	Bos indicus	Policotómica
	Bos indicus-aurus	

## 6.2 Material biológico

### 6.2.1 Recolección de muestras sanguíneas de bovinos.

Se le entrego al responsable del rastro una carta solicitando el permiso para la toma de muestras. Posteriormente se tomaron aproximadamente 6.0 ml de sangre en el momento del sacrificio del bovino. Las muestras se transportaron al laboratorio en refrigeración, al llegar se centrifugaron (2500 rpm/5min) y se obtuvo el suero. Se obtuvieron alícuotas y se almacenaron en tubos Eppendorf a -20°C, hasta su uso. El suero se dividió en dos lotes: 1) para la detección

de anticuerpos; 2) para la captura de Ag S/E Tc, a este lote se le agregó el 1% de inhibidores de proteasas (Proteinase Inhibitor Cocktail P2714 Sigma-Aldric®).

## **6.2.2 Obtención de antígenos**

### **6.2.2.1 Colección de adultos.**

Se obtuvieron aproximadamente: 50 adultos de *T. canis*, 100 de *A. caninum*, 12 de *Taenia* spp. y 50 de *Dipylidium caninum* de perros, además de 18 *T. cati* adultos de gatos, 3 hembras adultas de *A. suum* de un cerdo y 61 *Ts. leonina* de felinos salvajes del Zoológico de Atlixco, Puebla. Los ejemplares se obtuvieron por eliminación espontánea y recuperación en heces o vómito, por obtención de proglótidos grávidos en la zona perianal o administrando piperacina (100-200 mg/kg) vía oral. Las 500 larvas musculares de *T. spiralis* fueron donadas por el Laboratorio de Parasitología Experimental del I.N.P.

Los parásitos adultos se colocaron en recipientes con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril pH 7.2 para transportarlos al laboratorio y al llegar, se siguió el siguiente procedimiento: se sumergieron 2 veces con PBS estéril, formol al 5% (2 segundos), 3 veces con PBS estéril, formol al 0.05% (2 segundos), 3 veces en PBS. Los parásitos se almacenaron a -20°C en PBS estéril en 1% con inhibidores de proteasas (Proteinase Inhibitor Cocktail P2714 Sigma-Aldric®). Las hembras adultas de *T. canis* (35) se cultivaron para obtener huevos fértiles según el método descrito por Rodríguez-Caballero et al. (2007).

### **6.2.2.2 Obtención de huevos larvados de *T. canis*.**

Los huevos de *T. canis* se obtuvieron a partir de hembras adultas mediante el método reportado por Rodríguez-Caballero et al. (2007) y se incubaron en PBS estéril pH 7.2 a temperatura ambiente hasta que las larvas se desarrollaron dentro de los huevos.

### **6.2.2.3 Eclosión de huevos de *T. canis***

La eclosión de huevos larvados se realizó con el método descrito por Ponce-Macotela et al. (2011).

#### **6.2.2.4 Cultivo de larvas**

Para eliminar las larvas muertas y restos de huevos, se utilizó un método por diferencia de gradientes. En un tubo de ensayo de 10 mL se colocaron 3 mL de solución Lymphoprep™ (1114544 Axis-Shield®) y 4 mL de suspensión de larvas recién eclosionadas y se centrifugaron a 1400 rpm/30 minutos. Las larvas vivas se recuperaron del sedimento y se incubaron en medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO®) a 37°C en ambiente de CO<sub>2</sub> (Rodríguez-Caballero, 2012).

#### **6.2.2.4 Recolección y concentración de Ag S/E Tc.**

El sobrenadante del cultivo larvario se recolectó semanalmente. Se almacenó a -70°C con 1% de inhibidores de proteasas (Proteinase Inhibitor Cocktail P2714 Sigma-Aldric®) hasta su uso. Para concentrar las proteínas del sobrenadante del cultivo de larvas de *T. canis*, se utilizaron columnas (AMICON®). Posteriormente, el concentrado se precipitó con acetona a -20°C (1:1) durante 30-60 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm/4°C/10 minutos. El sobrenadante se decantó y el sedimento se dejó secar. Se agregaron 200 µL de PBS estéril pH 7.2 y 1% de inhibidores de proteasas (Proteinase Inhibitor Cocktail P2714 Sigma-Aldric®) y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

#### **6.2.2.5 Recolección y concentración de antígenos de otros parásitos.**

Los proglótidos grávidos de *Taenia* spp., *D. caninum*, los adultos de *A. caninum*, *T. cati*, *A. suum* y *T. leonina* se cultivaron individualmente en condiciones de esterilidad en cajas para cultivo celular (Corning®) con medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO®). El medio en el que se encontraban los proglótidos de *Taenia* spp. se colectó diariamente, durante 3-5 días. El medio de cultivo de cada nematodo se centrifugó 2500 rpm/5 min. y el sobrenadante se precipitó con acetona a -20°C (1:1) durante 30-60 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm/4°C/10 minutos, se agregaron 200 µL de PBS estéril pH 7.2 y 1% de inhibidores de proteasas (Proteinase Inhibitor Cocktail P2714 Sigma-Aldric®) y se almacenó a -70°C hasta su uso. Del sedimento se obtuvieron huevos de *Taenia* spp. se lavaron 3 veces con PBS estéril y se conservaron a -20°C en PBS estéril con 1% de inhibidores de proteasas (Proteinase Inhibitor Cocktail P2714 Sigma-Aldric®).

Los parásitos adultos y los proglótidos grávidos en PBS estéril fueron cortados finamente con tijeras y se trituraron mientras se encontraban parcialmente congelados, durante 3 ciclos de congelación-descongelación. Los huevos de *A. suum* y *T. leonina* se obtuvieron después de la disección del útero de la hembra adulta, se eliminaron los restos de tejido, se lavaron 2 veces con PBS estéril y se conservaron a temperatura ambiente en PBS estéril. A los extractos crudos de adultos y a los huevos, se les agregó acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  (1:1) durante 30-60 min y se centrifugaron a 12,000 rpm/ $4^{\circ}\text{C}$ /10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 200-400  $\mu\text{l}$  de PBS y 1% de inhibidores de proteasas (Proteinase Inhibitor Cocktail P2714 Sigma-Aldric®) en tubos Eppendorf. Se homogeneizó y se colocaron verticalmente para coleccionar el sobrenadante que se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Las larvas musculares de *T. spiralis*, se lisaron mediante 3 ciclos de congelación-descongelación y se trituraron con un homogeneizador. Se siguió el mismo procedimiento que con el extracto crudo de adulto para precipitar las proteínas con acetona y se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **6.2.2.5 Cuantificación de proteínas**

Los antígenos larvarios, somáticos de adultos y larvas, así como de huevos, se cuantificaron por el método de Bradford, (1976) con modificaciones. Se utilizó la tinción concentrada Bradford Protein Assay (500-0006 Bio Rad)®.

#### **6.2.3 Anticuerpo monoclonal.**

Se empleó un anticuerpo monoclonal anti-Ag S/E Tc caracterizado como IgG1, que mediante ELISA indirecto no demostró afinidad con Ag somático (AgS) de *T. canis* adulto, ni con AgS de adultos de *T. cati*, *Ancylostoma caninum*, *Ascaris suum*, *Dipylidium caninum*, *Fasciola hepatica*, AgS de larva muscular de *Trichinella spiralis*, ni contra AgS de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* y *Acanthamoeba* spp. (Rodríguez-Caballero, 2012).

### **6.3 ELISA indirecto para detección de anticuerpos anti-Toxocara canis.**

Para realizar el ELISA indirecto para detectar Ac anti-T. canis se obtuvo la dilución de proteína A acoplada a peroxidasa (ELISA directo), la concentración de Ag S/E y la dilución de suero a emplear (ELISA indirecto) para la detección de anticuerpos en sueros bovinos (ELISA indirecto).

#### **6.3.1 ELISA indirecto**

##### **6.3.1.1 Obtención del control positivo a T. canis.**

El bovino empleado para obtener el suero control, se alojó en el CEPIPSA Topilejo (UNAM) alimentada con concentrado y paja de avena y se mantuvo bajo condiciones libres de nematodos gastroentéricos, monitoreando su ausencia en heces mediante la técnica de Faust, durante todo el experimento.

Se lisaron 15,000 larvas 2 de T. canis en PBS estéril (2 mL) con el método de congelación-descongelación y se les agregó adyuvante completo de Freund (F5851 Sigma®) (0.5 mL). En el día 0 del experimento, se obtuvieron 5 mL de sangre del bovino (control negativo) de la vena coccígea, posteriormente se le inoculó el preparado de larvas vía intramuscular. El día 14 se aplicó por la misma vía la mezcla de 15,000 larvas y adyuvante completo de Freund (Sigma®). El día 28 se administró 0.5 mL de Ag S/E Tc (21 µg/mL) en PBS estéril pH 7.2 con inhibidores de proteasas (Sigma®) (1:100), mezclados con 0.5 mL de adyuvante completo de Freund, por vía intramuscular.

Se tomaron muestras de sangre y heces los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 y se obtuvieron los sueros, que se almacenaron a -20°C hasta su uso.

##### **6.3.1.2 ELISA directo para la obtención de la dilución de proteína A acoplada a peroxidasa (HRP)**

Los pozos en las microplacas de poliestireno (3370 Corning®) se sensibilizaron con suero negativo del bovino control (día 0) diluido en solución de carbonatos pH 9.0 (1:1000) y se mantuvieron a 4°C durante toda la noche. Se lavaron tres veces con la solución PBS-Tween 20. Se agregó la solución de bloqueo I, durante 30 min a 37°C. Se lavó tres veces. Se añadieron 100

$\mu\text{L}$ /pozo de diferentes diluciones de proteína A acoplada a peroxidasa (170-6522 Bio Rad®) (1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000 y 1:32000) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó tres veces y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de solución de cromógeno a cada pozo y la placa se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se paró con 100  $\mu\text{L}$  de solución de ácido sulfúrico 2N. La placa se leyó en un espectrofotómetro (Modulus Microplate Multimode Reader 9300-010 Turner Biosystems) a 490 nm. Se realizó la curva de titulación y se obtuvo la dilución a emplear. Se realizaron tres ensayos por triplicado.

### **6.3.1.3 ELISA indirecto para la obtención de la dilución de suero y concentración de Ag S/E de T. canis**

Los pozos en las microplacas de poliestireno (3370 Corning®) se sensibilizaron con Ag S/E Tc (0.5, 1, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) diluidos en solución de carbonatos pH 9.0, se mantuvieron a 4°C durante toda la noche. Se lavaron tres veces con solución PBS-Tween 20. Cada pozo se bloqueó con 200  $\mu\text{L}$  de solución de bloqueo I a 37°C/30 minutos y se lavaron tres veces. A cada pozo se le añadieron 100  $\mu\text{L}$  diferentes diluciones de suero bovino (1:16, 1:32, 1:64) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Se lavaron tres veces. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de proteína A acoplada a peroxidasa (170-6522 Bio Rad®) diluida en PBS-Tween 20 (1:500) y se mantuvieron 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces y se agregó la solución de cromógeno que permaneció a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se paró con 100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 2N. La placa se leyó en un espectrofotómetro (Modulus Microplate Multimode Reader 9300-010 Turner Biosystems) a 490 nm. Se realizó la curva de titulación y se obtuvieron la concentración de Ag S/E Tc y de dilución de suero a emplear. Se realizaron 3 ensayos por duplicado. El punto de corte se obtuvo con el promedio de las absorbancias del suero negativo (día 0) de los 3 ensayos por duplicado más tres desviaciones estándar.

### **6.3.2 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos en sueros de bovinos.**

Los pozos de las microplacas de poliestireno (3370 Corning®) se sensibilizaron con antígenos de S/E de larvas de T. canis (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) diluido en solución de carbonatos pH 9.0, a 4°C durante

toda la noche. Se lavó tres veces con PBS-Tween 20 y se bloqueó con 200  $\mu$ L de solución de bloqueo I a 37°C por 30 min. Se lavó tres veces. A cada pozo se le añadieron 100  $\mu$ L de suero de los bovinos del rastro de Puebla, México (1:16 con PBS estéril) y se incubaron durante 1 hora a 37° C. Se lavaron tres veces. Se adicionaron 100  $\mu$ L de proteína A acoplada a peroxidasa (170-6522 Bio Rad®) diluída en PBS-Tween 20 (1:500) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces y se agregó la solución de cromógeno. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos, sin luz. La reacción se detuvo con 100  $\mu$ L solución de ácido sulfúrico 2N. La placa se leyó en un espectrofotómetro (Modulus Microplate Multimode Reader 9300-010 Turner Biosystems) a 490 nm. El ensayo se realizó por duplicado y se incluyeron los controles negativo y positivo.

## **6.4 ELISA sándwich para la detección de Ag S/E Tc**

### **6.4.1 ELISA sándwich para la obtención de la concentración de anticuerpo monoclonal a emplear y curva de titulación de Ag S/E Tc**

Para realizar la prueba de ELISA sándwich se utilizó el anticuerpo monoclonal G4C12 (Rodríguez-Caballero, 2012). Los pozos de la placa de poliestireno (3370 Corning®) se sensibilizaron con diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal (256, 128, 64, 32  $\mu$ g/mL) en solución de carbonatos pH 9.0, durante 48 horas a 4°C. Se lavaron tres veces con 200  $\mu$ L de solución de NaCl 0.9%-Tween 20. Se bloquearon con 200  $\mu$ L de solución de bloqueo II, incubándolo a 37°C por 30 min. Se lavaron cuatro veces. Se añadieron 100  $\mu$ L/pozo de diferentes concentraciones de Ag S/E de Tc (10, 1, 0.1, 0.01  $\mu$ g/mL) y se incubaron a 37°C por 1 hora. Se lavaron tres veces. Se agregaron los anticuerpos policlonales de conejo anti-Ag S/E Tc acoplados a biotina (1  $\mu$ g/mL con solución para dilución) y se incubó 37°C durante 1.5 h. Se lavó tres veces. Se agregó avidina-peroxidasa (170-6528 Bio Rad®) en solución para dilución (1:2000) y se incubó a 37°C/1 hora. Se lavó tres veces. Se agregaron 100  $\mu$ L de la solución de cromógeno y se dejó a 37°C durante 15 minutos. La reacción se paró con 100  $\mu$ L de ácido sulfúrico 2 N. La

placa se leyó en un espectrofotómetro (Modulus Microplate Multimode Reader 9300-010 Turner Biosystems) a 490 nm. El ensayo se realizó por duplicado.

#### **6.4.2 ELISA sándwich para la detección de Ag S/E Tc**

Los pozos de poliestireno (3370 Corning®) se sensibilizaron con el anticuerpo monoclonal a una concentración de 256 µg/mL en solución de carbonatos pH 9.0, durante 48 horas a 4°C. La placa se lavó tres veces con 200 µL de solución de NaCl 0.9%-Tween 20. Se bloqueó con 200 µL de solución de bloqueo II, incubándolo a 37°C por 30 min. Se lavó cuatro veces. Los sueros bovinos se trataron EDTA 0.1 M, pH 7.5 (1:1), se colocaron en baño María durante 10 minutos y se centrifugaron a 5000 rpm/15 min. Se añadieron 100 µL del sobrenadante de cada suero preparado. Se incubó a 37°C por 1 hora y se lavó tres veces. Se agregaron los anticuerpos policlonales de conejo anti-Ag S/E Tc acoplados a biotina (1 µg/mL con sol. para dilución) y se incubó 37°C durante 1.5 h. Se lavó tres veces. Se agregó avidina-peroxidasa (170-6528 Bio Rad®) en solución para dilución (1:2000) y se incubó a 37°C por 1 h. Se lavó tres veces. Se agregó la solución de cromógeno y se dejó a 37°C durante 15 minutos. La reacción se detuvo con 100 µL de ácido sulfúrico 2N. La placa se leyó en un espectrofotómetro (Modulus Microplate Multimode Reader 9300-010 Turner Biosystems) a 490 nm. El ensayo se realizó por duplicado, con los controles negativo y positivo.

#### **6.5 ELISA indirecto para la detección de Ac contra antígenos de diferentes nematodos**

Se utilizaron los extractos crudos de adultos de *T. canis*, *T. cati*, *A. suum*, *A. caninum* y *D. caninum*; extractos de huevos de *Ts. leonina*, *A. suum* y *Teania spp.*, extracto de larvas de *T. spiralis* y de secreciones y excreciones de ploglótidos grávidos de *Taenia spp.* Los pozos de las microplacas de poliestireno (3370 Corning®) se sensibilizaron con 100 µL de cada antígeno a una concentración de 1 µg/mL, diluidos en solución de carbonatos pH 9.0 y se mantuvieron a 4°C durante toda la noche. Se lavaron tres veces con solución PBS-Tween 20 y se bloquearon con 200 µL de solución de bloqueo I a 37°C por 30 min. Se lavaron tres veces. A cada pozo se le añadieron 100 µL (1:16 con PBS estéril) de cada suero positivo, en el que se encontraron

anticuerpos anti-T. canis o Ag S/E Tc con ELISA indirecto y ELISA sándwich. Se incubaron durante 1 hora a 37°C y se lavaron tres veces. Se adicionaron 100 µL/pozo, de proteína A acoplada a peroxidasa (170-6522 Bio Rad®) diluida en PBS-Tween 20 (1:500) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces y se agregó la solución de cromógeno. La placa se mantuvo sin luz, a temperatura ambiente, durante 15 minutos. La reacción se detuvo con 100 µL de ácido sulfúrico 2N. Se leyó en el espectrofotómetro (Modulus Microplate Multimode Reader 9300-010 Turner Biosystems) a 490 nm. El ensayo se realizó por duplicado con los sueros negativo y positivo a T. canis del bovino control. Los puntos de corte para cada antígeno, se obtuvieron con el promedio de las absorbancias de un lote de 14 sueros negativos (por duplicado) más tres desviaciones estándar, ya que no se contaba con suero control para cada antígeno.

#### **6.6 ELISA competitivo para la detección de Ac contra diferentes antígenos con suero adsorbido (reacciones cruzadas)**

Se utilizaron los extractos crudos de: antígenos somático de adultos de T.canis, T. cati, A. suum, A. caninum y D. caninum; antígenos de huevos de T. leonina, A. suum y Teania spp., antígeno somático de larvas de T. spiralis y antígenos de secreciones y excreciones de proglótidos de Taenia spp., a una concentración de 1 µg/mL cada uno y se aforo al volumen final con PBS estéril. Se utilizó esta mezcla para adsorber cada suero positivo a anticuerpos anti-T. canis y/o a Ag S/E Tc (dilución 1:16, con la mezcla de antígenos), en tubos Eppendorf, durante 2 horas a 37°C, para que los anticuerpos afines a estos antígenos se les unieran y dejar disponibles los específicos a antígenos de secreciones y excreciones de larvas de T. canis. Por otro lado, los pozos de las microplacas (3370 Corning®) se sensibilizaron con Ag E/S Tc (1 µg/mL) en solución de carbonatos pH 9.0 y se mantuvieron a 4°C durante toda la noche. Las placas se lavaron tres veces con solución PBS-Tween 20 y se bloquearon con 200 µL de solución de bloqueo I a 37°C durante 30 minutos. Se lavaron tres veces y a cada pozo se le añadieron 100 µL de los sueros de bovinos positivos y adsorbidos y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Se lavaron tres veces. Se adicionaron 100 µL de proteína A acoplada a peroxidasa (170-6522 Bio

Rad®) diluida con PBS-Tween 20 (1:500) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces y se agregó la solución de cromógeno. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos, sin luz. La reacción se detuvo con 100 µL de ácido sulfúrico 2N. La placa se leyó en un espectrofotómetro (Modulus Microplate Multimode Reader 9300-010 Turner Biosystems) a 490 nm. El ensayo se realizó por duplicado y con el control positivo y negativo. El punto de corte se obtuvo con el promedio de las absorbancias del suero control negativo (por cuadruplicado) más tres desviaciones estándar.

### **6.7 Criterios para considerar un suero positivo/negativo a T. canis.**

Los sueros en los que se detectó Ac anti-Ag S/E Tc y/o Ag S/E Tc debían de cumplir con cualquiera de los siguientes criterios para considerarlos **positivos**:

- a) Al suero se le detectaran Ac anti-T. canis (absorbancia igual o superior al valor de corte) y su presencia se conservara, después de la adsorción, aunque presentara reacciones cruzadas con otros nematodos.
- b) El suero presentara Ac anti-T. canis post-adsorción y Ag S/E Tc, sin importar la presencia de Ac en contra de otros nematodos.
- c) En el suero se capturara Ag S/E Tc, aunque no se detectaran anticuerpos.

Los sueros considerados **negativos** fueron en los que:

- a) No se detectaron Ac anti-S/E Tc (absorbancia por abajo del valor de corte).
- b) Se hayan detectado Ac anti-S/E Tc por ELISA indirecto y después de la adsorción fueran negativos y que tampoco se les detectara antígeno.
- c) No presentaron Ag S/E Tc.

## 6.8 Evaluación de las pruebas diagnósticas

### 6.8.1 Evaluación del ELISA indirecto con el ELISA sándwich/competitivo

Se realizó el cuadro 2x2:

		ELISA sándwich/competitivo		
		+	-	Total
<u>ELISA indirecto</u>	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
Total		a+c	b+d	a+b+c+d

Donde:

**a** = Verdaderos positivos.

**b** = Falsos positivos.

**a+b= Positivos a ELISA indirecto**

**a+c= Positivos a ELISA sándwich/competitivo.**

**c** = Falsos negativos.

**d** = Verdaderos negativos.

**b+d= Negativos por todas las pruebas.**

**a+b+c+d= n.**

Se determinaron la sensibilidad, la especificidad, la frecuencia aparente y la frecuencia real, los valores de exactitud, así como los valores predictivos positivo y negativo:

$$\text{Sensibilidad} = a/a+c$$

$$\text{Especificidad} = d/b+d$$

**Frecuencia aparente:** Positivos/N

$$\text{Frecuencia real} = \frac{FA + Es - 1}{Se + Es - 1}$$

**Enfermos totales (a+c) = (FR) (N)**

**Verdaderos positivos (a) = (a+c) (Se)**

**Verdaderos negativos (d) = (b+d) (Es)**

**Exactitud:** a+d/N

**Valor predictivo positivo= a/a+b**

**Valor predictivo negativo= d/c+d**

## 6.8.2 Medición de concordancia

### 6.8.2.1 Coeficiente o índice Kappa ( $\kappa$ )

Para evaluar la concordancia entre el ELISA indirecta (prueba estándar) y las ELISA sándwich y competitiva (empleadas en conjunto como pruebas de oro) se utilizó el coeficiente o índice Kappa ( $\kappa$ ).

$$\kappa = \frac{Co - Ce}{1 - Ce}$$

Donde:

$$Co = \text{Concordancia observada} = \frac{(a+d)}{n}$$

$$Ce = \text{Concordancia esperada} = \frac{(a+b)(a+c)}{n^2} + \frac{(c+d)(b+d)}{n^2}$$

### 6.8.2.2 Valores de Kappa ( $\kappa$ )

El valor de concordancia o Kappa ( $\kappa$ ), puede interpretar la concordancia entre dos pruebas con diferentes valores que clasifican como una concordancia casi perfecta y la ausencia de concordancia como se observa en el Cuadro 11 (Landis y Koch, 1977).

**Cuadro 11. Valores de Kappa para la interpretación de concordancia entre dos pruebas** (Landis y Koch 1977).

Rango	Concordancia
< 0	Pobre
0 a 0.20	Leve
0.21 a 0.40	Mediana
0.41 a 0.60	Moderada
0.61 a 0.80	Sustancial
☑ 0.8 a 1.00	Casi perfecta

## **6.9 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con los programas IBM® SPSS® Statistics v.20 y Microsoft Office Excel® 2007. Se realizó la prueba de intervalo de confianza para diferencia de proporciones, para saber si hay diferencia entre las proporciones de las variables: macho-hembra, adulto-becerro, Bos taurus-indicus-taurus/indicus. Y para una prueba t para la diferencia entre las absorbancias del control negativo/positivos con diferentes diluciones. Ambas pruebas con una significancia de 0.05 y nivel de confianza de 95%.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Tamaño de muestra

Se realizó el cálculo del tamaño de muestra mediante la ecuación para la determinación de tamaño mínimo de muestra para prevalencias pequeñas (menores al 30%):

Se buscó la referencia de un trabajo previo para obtener una frecuencia esperada, no se encontró ningún reporte en bovinos, pero si en muestras obtenidas de sueros de ovinos (*Ovis orientalis*) de diferentes edades, en un rastro en Brasil, con una frecuencia del **20.7%** (Alvares et al., 2011).

Cálculo con 5% de error estimado:

$$n = (1-p) / (p d) = (1-0.207) / (0.207) (0.05) = 76.61$$

**≈ 77 + 7.7 sueros bovinos.**

### 7.2 Muestras de suero de bovinos.

Se obtuvieron 127 muestras de sangre de bovinos de las que se extrajo el suero (Cuadro 12).

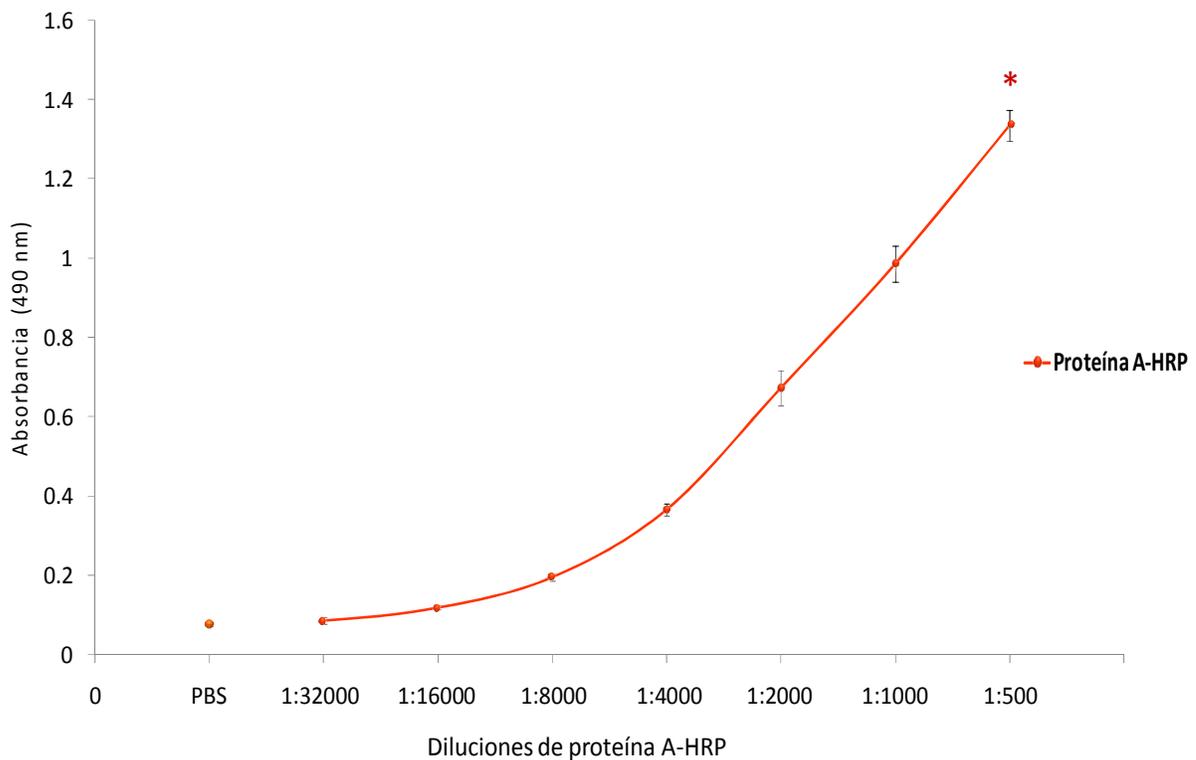
**Cuadro 12. Características de los bovinos del rastro de Tecamachalco Puebla, de los que se extrajo suero.**

Característica	Clasificación	No. sueros obtenidos
<b>Especie</b>	Bos taurus	78
	Bos indicus	43
	Bos taurus-indicus	6
<b>Género</b>	Machos	109
	Hembras	18
<b>Edad</b>	Becerras	53
	Adultos	74

### 7.3 ELISA indirecto para detección de anticuerpos anti-Toxocara canis.

#### 7.3.1 ELISA directo para la obtención de la dilución de proteína A-HRP

Se realizó el ELISA directo para estimar la dilución de proteína A acoplada a peroxidasa (170-6522 Bio Rad®) a emplear, basada en la afinidad de los anticuerpos de bovino a la proteína. Se utilizó la concentración de 1:500 para continuar la estandarización (Fig. 10).

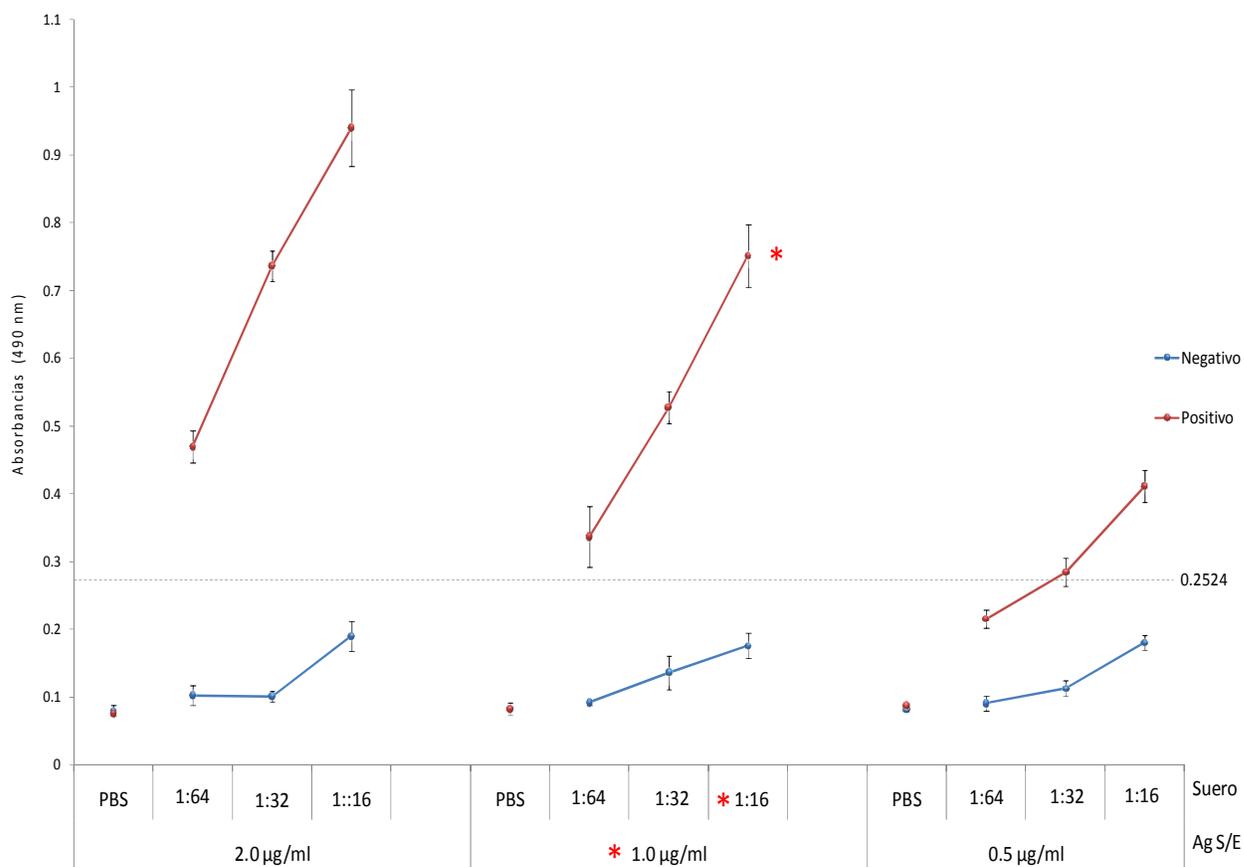


**Fig. 10. Titulación de proteína A-HRP.** Suero 1:1000. PBS: Control negativo. \* Dilución de proteína A-HRP elegida.

#### 7.3.2 ELISA indirecto para la obtención de la dilución de suero y concentración de Ag E/S

Con la dilución 1:500 de proteína A, diferentes concentraciones de antígeno y diferentes diluciones de los sueros positivo y negativo del bovino inoculado se llevó a cabo el ELISA y se obtuvieron las absorbancias (Fig. 11).

El valor de corte fue 0.25, se obtuvo con el promedio de las absorbancias del suero negativo más tres veces su desviación estándar.

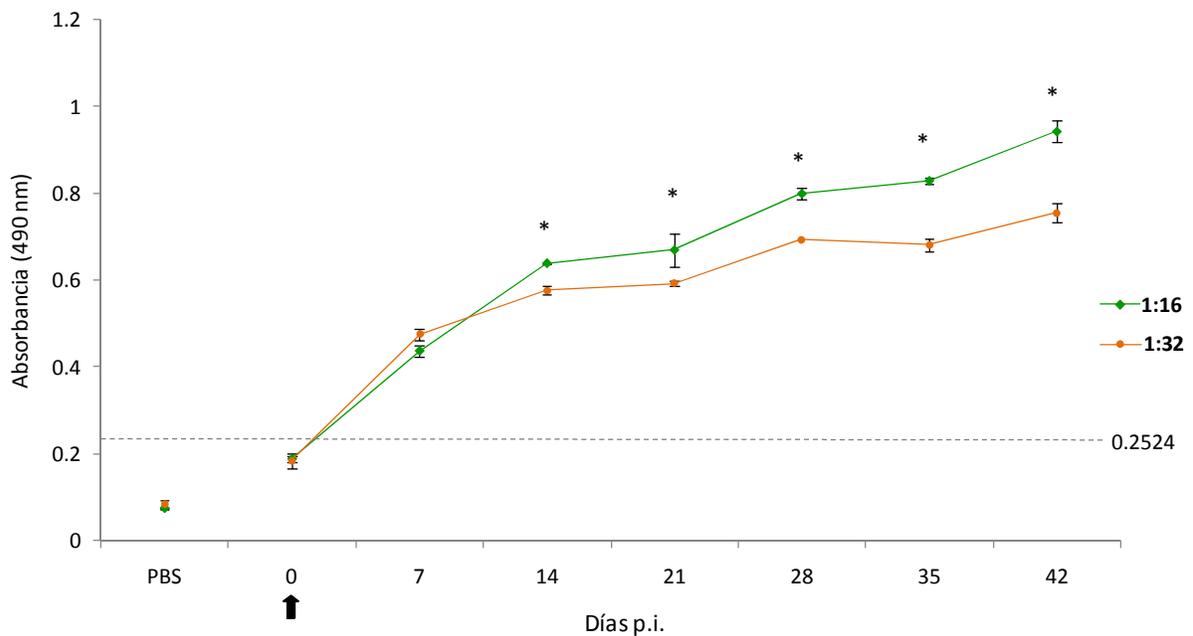


**Fig. 11. Titulación de la concentración de Ag S/E Tc y dilución de suero.** \*Dilución de suero y concentración de antígeno elegidos. PBS (control negativo).

### 7.3.3 Detección de anticuerpos anti-T. canis en el bovino inoculado

Con los resultados que se obtuvieron en la estandarización, se realizaron dos ensayos con el suero negativo y los positivos del bovino control.

Como se puede observar en la Fig. 12 las absorbancias con ambas diluciones se incrementaron en función del tiempo y fueron mayores al valor de corte de 0.25, a partir del día 7 p.i. Además, las absorbancias con la dilución 1:16 los son mayores ( $p=0.05$ ) a los obtenidos con la dilución 1:32, a partir del día 14 p.i.

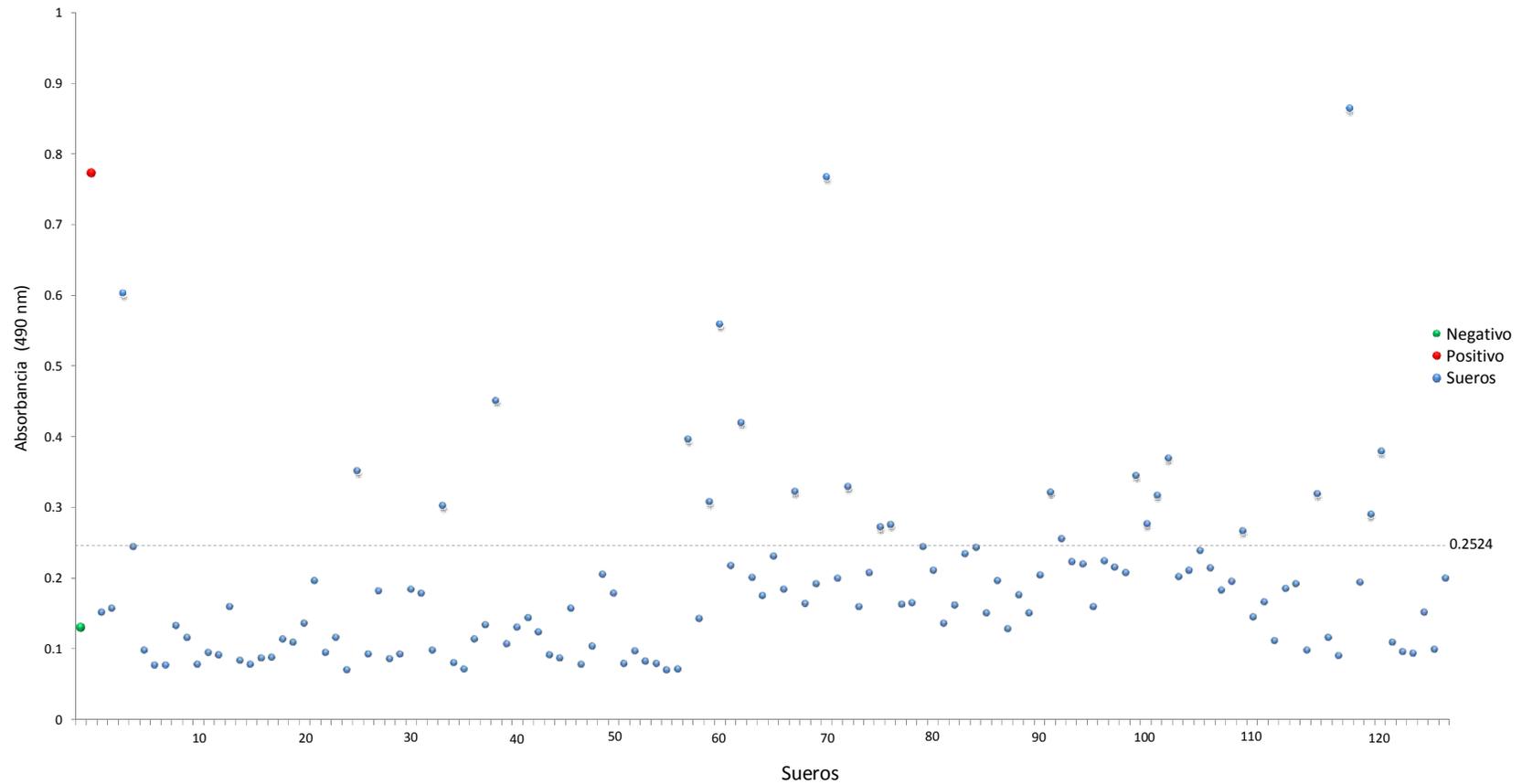


**Fig. 12. Cinética de la respuesta inmune humoral en el bovino control (ELISA indirecto).** PBS: Control negativo. Día 0: Suero control negativo (flecha). \*Diferencias significativas entre diluciones.

### 7.3.4 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos en sueros de bovinos

Se realizó el ELISA por duplicado, de los 127 sueros y los controles positivo y negativo, para la detección de anticuerpos anti-T. canis.

De los 127 sueros bovinos, en 26 se detectaron anticuerpos anti-T. canis, determinándose una frecuencia del 20.47% (Fig. 13).

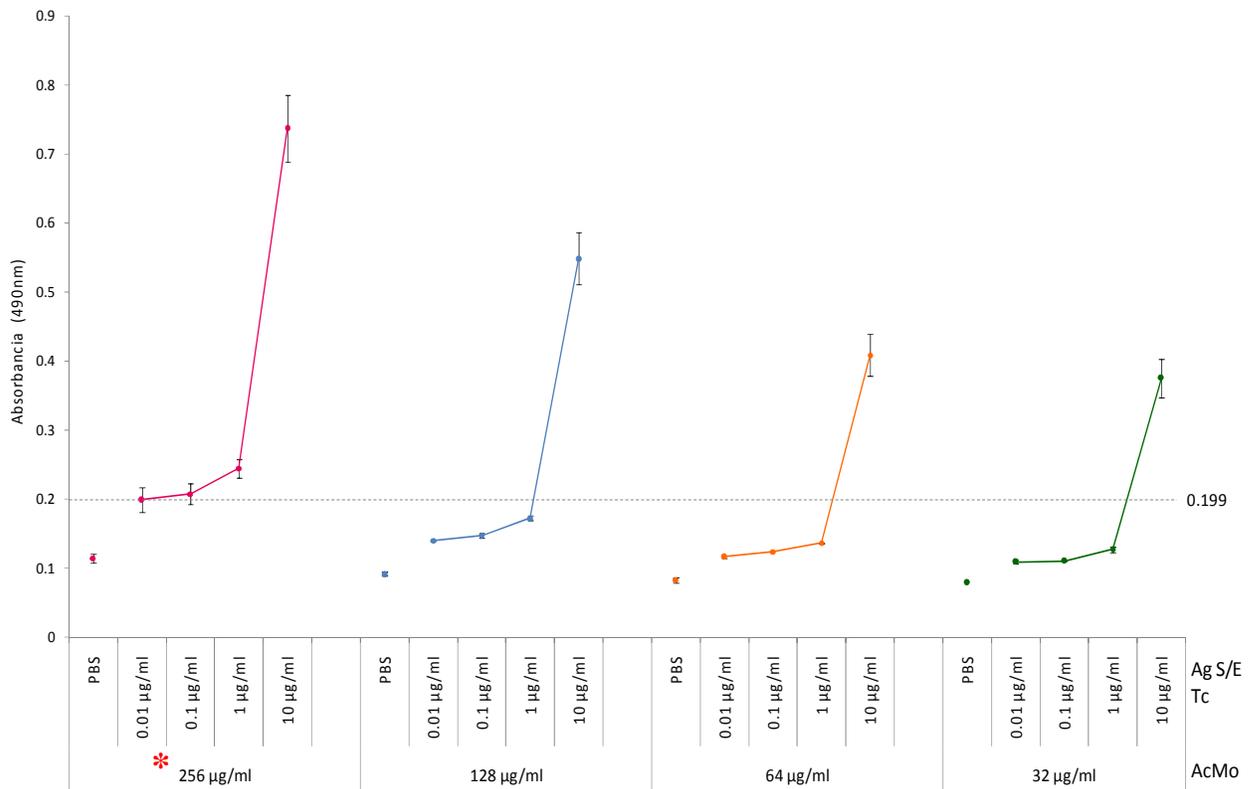


**Fig. 13. Distribución de los valores de absorbancias promedio con ELISA indirecto en sueros bovinos.** Ag S/E Tc 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , proteína A acoplada a peroxidasa 1:500 y dilución de suero 1:16. Control negativo: verde; control positivo: rojo; sueros bovinos del rastro de Puebla, México (127): azul. El punto de corte (línea punteada): 0.2524 (promedio negativo +3 desviaciones estándar).

## 7.4 ELISA sándwich para la detección de Ag S/E Tc

### 7.4.1 ELISA sándwich para la obtención de la concentración de anticuerpo monoclonal a emplear y curva de titulación de Ag S/E Tc

Con 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se detectó la menor concentración de Ag E/S (0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Fig. 14), por lo que esta fue la concentración que se empleó en la detección de antígeno.



**Fig. 14. Titulación de anticuerpo monoclonal a utilizar para la captura de Ag S/E Tc.** \* Concentración de anticuerpo monoclonal elegida para realizar la detección de Ag S/E Tc. AcMo: anticuerpo monoclonal.

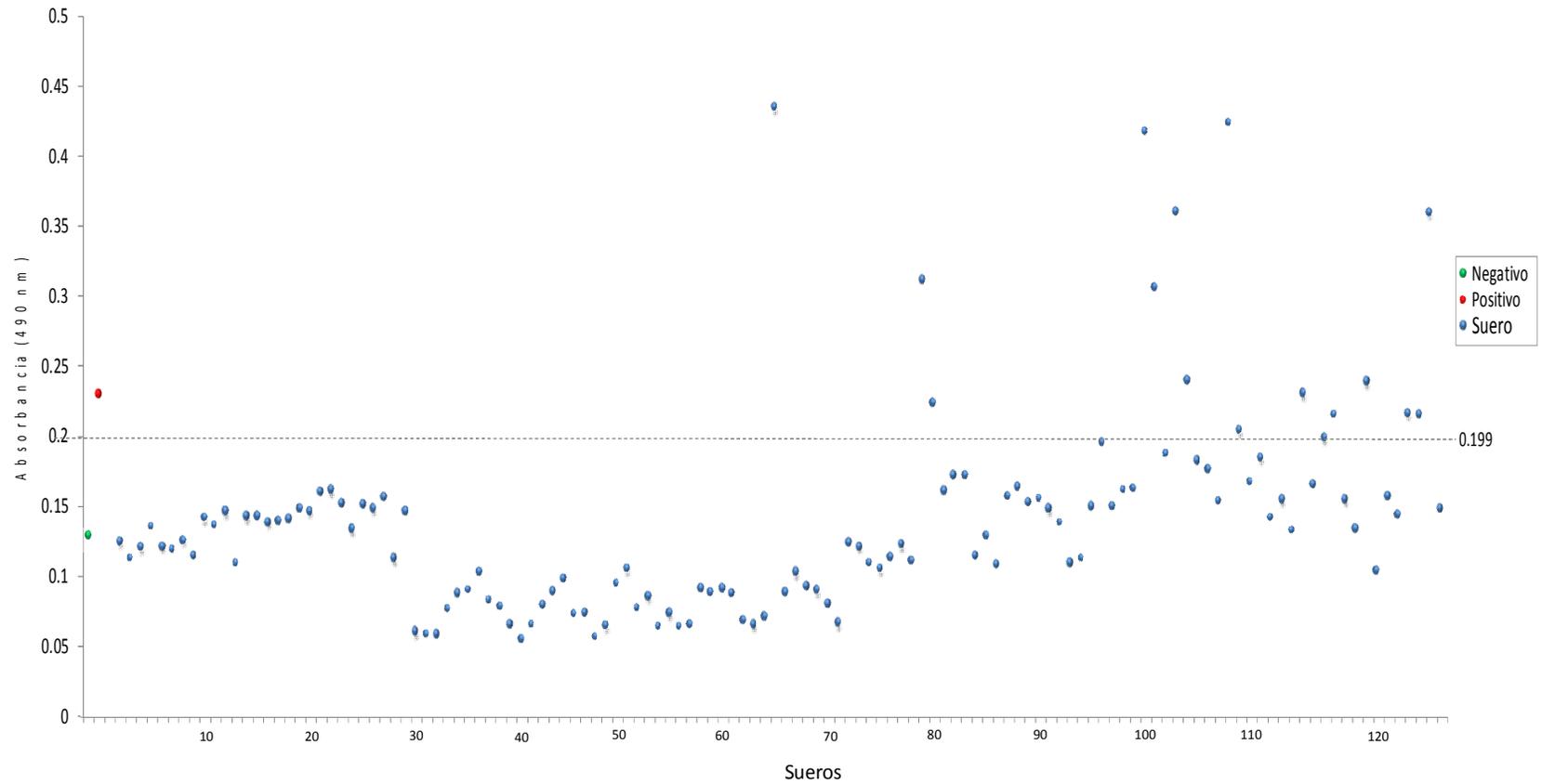
### 7.4.2 ELISA sándwich para la detección de Ag S/E Tc

Se realizó el ELISA por duplicado, de los 127 sueros y los controles positivo y negativo tratados con EDTA, para la detección de Ag S/E Tc con 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal de conejo acoplado a biotina (1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y avidina-peroxidasa (Bio Rad®) (1:2000).

Se encontró una frecuencia del 12.59%, es decir, de los 127 sueros en 16 se capturaron antígenos larvarios de *T. canis* (Fig. 15). De los 16 sueros en 5 se encontraron también anticuerpos anti-*T. canis* con ELISA indirecta. En la mayoría de los sueros en los que se capturó antígeno (11) no se detectaron anticuerpos.

En siete sueros se encontraron más de 1.0 µg/mL, en siete se detectó de 0.1 a 1.0 µg/mL; uno de los sueros presentó de 0.01 a 0.1 µg/mL y en otro se capturó aproximadamente 0.01 µg/mL.

Con estas dos técnicas diagnósticas (ELISA indirecto y sándwich), se encontró una frecuencia aparente del 29.13% (37/127) de sueros bovinos positivos a *T. canis*. Del total de positivos en el 20.47% (26/127) de los sueros se detectaron anticuerpos anti-*T. canis*, con ELISA indirecto, mientras que en el 12.59% (16/127) se detectaron al menos 0.01 µg/mL de Ag S/E Tc con ELISA sándwich y en el 3.93% (5/127) de los sueros se detectaron, anticuerpos anti-*T. canis* y Ag S/E Tc, con estas dos técnicas.



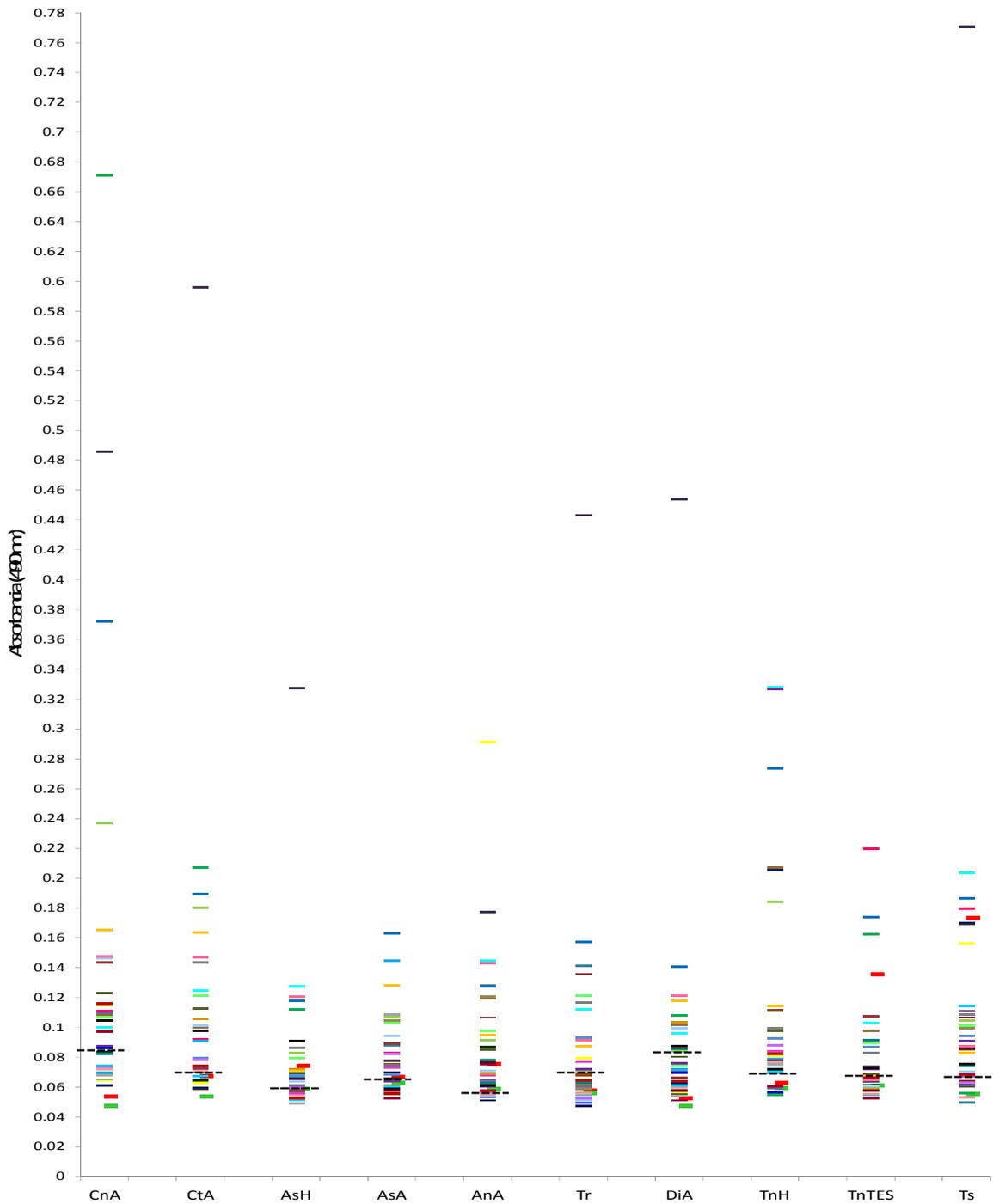
**Fig. 15. Distribución de los valores de absorbancias por ELISA sándwich en sueros bovinos.** Control negativo (verde) y control positivo (rojo) y 127 sueros bovinos del rastro de Puebla México (azul). El “valor de corte” (0.199), se señala con una línea punteada y es el valor con la que el anticuerpo monoclonal reconoció la menor cantidad de antígeno (0.01 µg/mL).

### **7.5 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra diferentes antígenos (reacciones cruzadas)**

Debido a los reportes que indican reacciones cruzadas con diferentes parásitos mediante ELISA indirecta para la detección de anticuerpos anti-*T. canis*, se llevó a cabo la detección de anticuerpos contra antígenos de 8 diferentes parásitos (Cuéllar et al., 1992; Iglesias et al., 1996; Speiser y Weiss, 1979).

Se encontraron en total 172 reacciones cruzadas, en 36 de los 37 sueros (Fig. 16). Las más frecuentes fueron contra el antígeno de adulto de *A. caninum* (27/37) y de huevos de *T. leonina* (25/37), mientras que en menor proporción contra antígenos de adultos de *D. caninum* (9/37) y *A. suum* (10/37).

De dos sueros en los que se detectaron Ag S/E Tc, pero no anticuerpos anti-*T. canis*, uno reaccionó con todos los antígenos y el otro no tuvo reacción positiva a alguno.



**Fig. 16. Distribución de los valores de absorbancias por ELISA indirecto en sueros bovinos con 10 diferentes antígenos.** CnA: antígenos somáticos de adultos (AgS) *T. canis*; CtA: AgS *T. cati*; AgH: antígenos de huevos de *A. suum*; AsA: AgS *A. suum*; AnA: AgS *A. caninum*; Tr: antígenos somáticos de larvas de *T. spiralis*; DiA: AgS *D. caninum*; TnH: AgH *Teania* spp.; antígenos de secreción-excreción de proglótidos: Ag S/EA de *Taenia* spp.; Ts: antígenos de de huevos de *T. leonina*. Valor de corte de cada ELISA: promedio de 14 negativos +3 desviaciones estándar (línea punteada). Control positivo *T. canis*: línea roja desalineada; Control negativo *T. canis*: línea verde desalineada.

## 7.6 ELISA competitivo para la detección de anticuerpos anti-T. canis en sueros adsorbidos con diferentes antígenos

Se realizó el ELISA de competición por duplicado de los 37 sueros positivos, los controles positivo y negativo adsorbidos con antígeno somático de adultos de *T. canis*, *T. cati*, *A. suum*, *A. caninum* y *D. caninum*, antígeno de huevos de *T. leonina*, *A. suum* y *Teania spp.*, antígeno somático de larvas de *T. spiralis* y antígenos de secreciones y excreciones de proglótidos de *Taenia spp.*, para la detección de anticuerpos anti-*T. canis* en ellos. Se llevó a cabo con Ag S/E Tc 1.0 µg/mL, dilución de suero 1:16 y proteína A acoplada a peroxidasa (Bio Rad®) 1:500.

De los 37 sueros en los que se detectaron anticuerpos anti-*T. canis* y/o a Ag S/E Tc y que fueron adsorbidos con los diferentes antígenos, en 22 se detectaron anticuerpos anti-*T. canis* (Fig. 17).

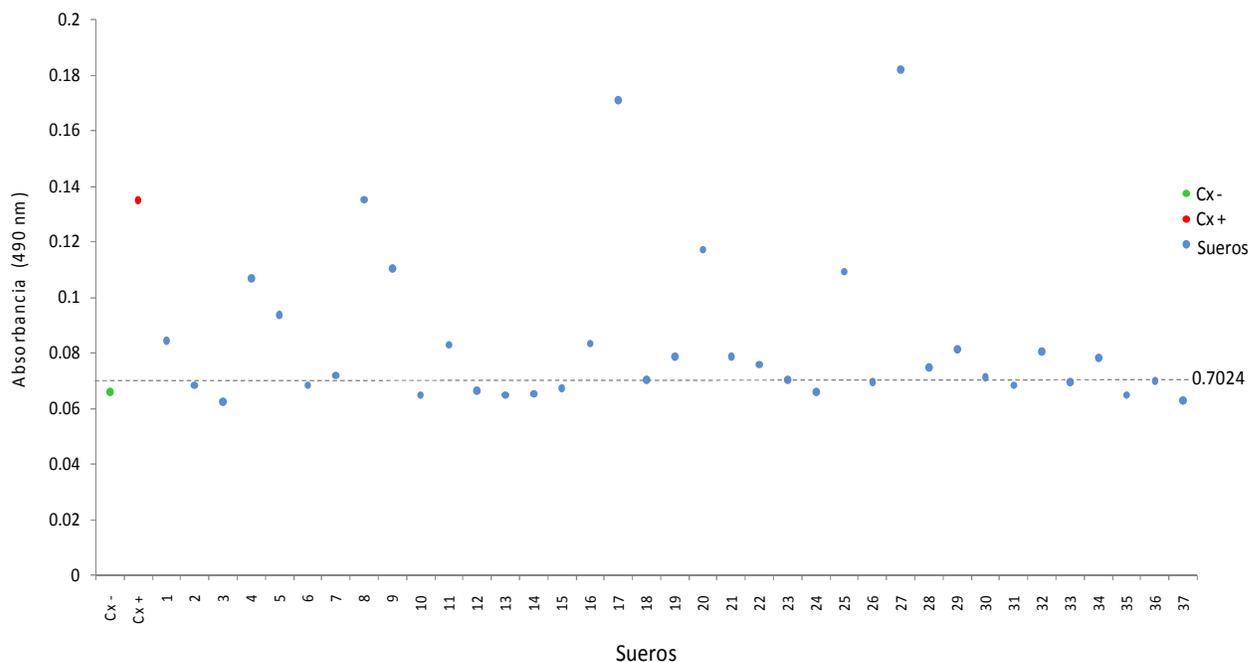


Fig. 17. Distribución de los valores de absorbancias por ELISA indirecto con suero adsorbido.

### **7.7 Sueros positivos o negativos a Larva Migrans por T. canis.**

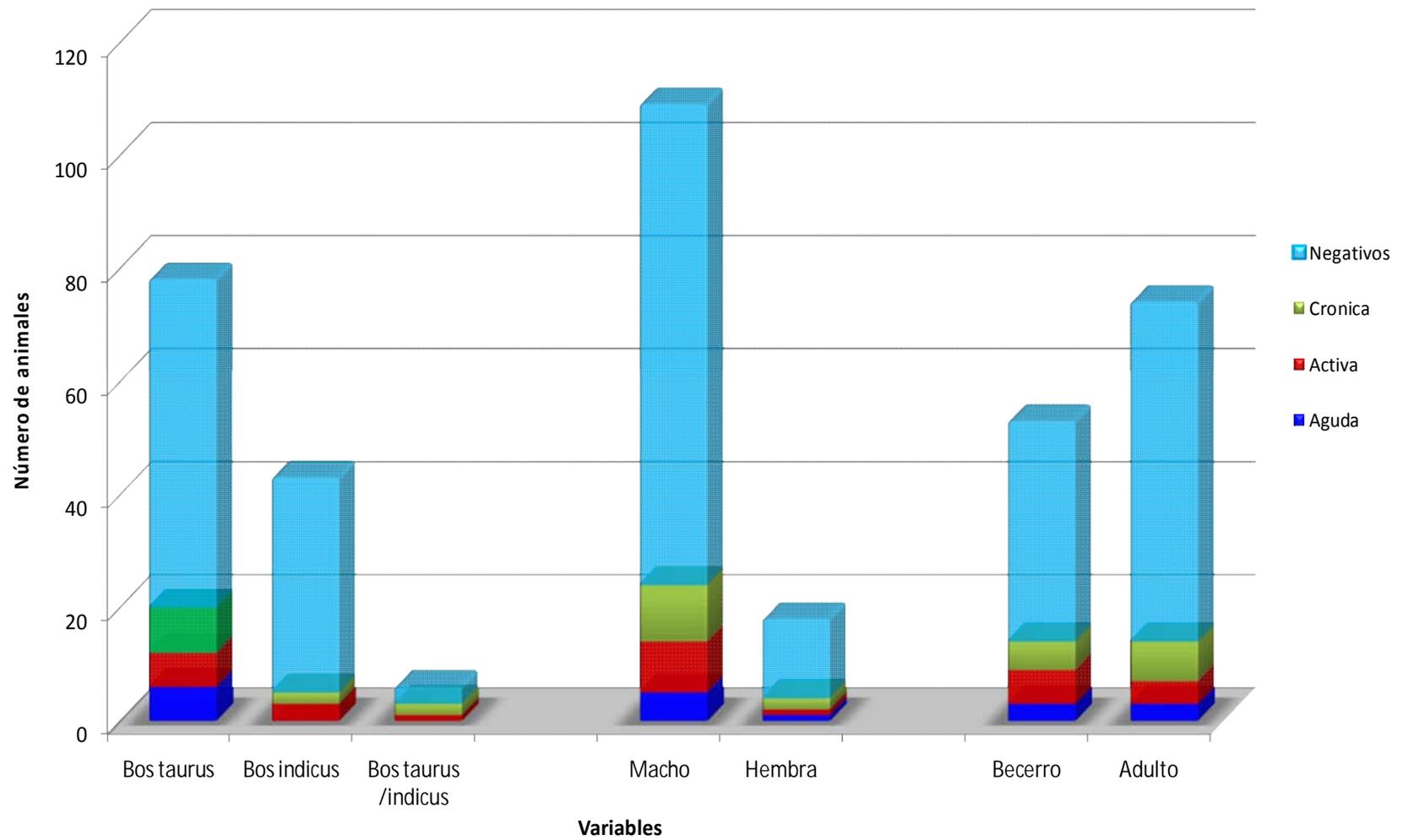
De los 127 sueros de bovino, en 37 se detectaron anticuerpos anti- S/E T. canis y/o Ag S/E Tc. De estos 37 “positivos”, después de adsorberlos en 12 se encontraron anticuerpos, en 10 anticuerpos y antígenos, en 6 solamente antígenos y en 9 no se detectaron ninguno de los dos, por lo que, en total el 24.32% (9/37) de los sueros fueron falsos positivos (Cuadro 12).

Se encontraron diferentes estados de infección: 1) aguda, si solo se detectó antígeno como en el 4.72% de los sueros (6/127); 2) crónica, si solo se encontraban anticuerpos, como en el 7.87% (10/127) de los sueros; 3) activa si se detectaban antígenos y anticuerpos, como en 12 de 127 sueros (9.44%) (Cuadro 13).

La mayoría de los animales a los que se les tomó muestra fueron Bos taurus (78/127), de éstos, el 25.64% (20/78) fueron positivos a T. canis, con infección aguda (6/78), activa (6/78) o crónica (8/78) (Cuadro 13, Fig. 18). De los 43 Bos indicus, cinco (11.62%) fueron positivos, 3 por infección activa y 2 por infección crónica. De los seis Bos taurus/indicus, tres (50%) se consideraron positivos, uno con infección activa y dos con infección crónica (Cuadro 13, Fig.18).

El 22.01% (24/109) de los sueros de bovinos machos (109/127), fueron positivos, en éstos cinco por infección aguda, nueve por activa y diez por crónica. De las 18 hembras, en una se detectó infección aguda, dos presentaron infección crónica y una infección activa (Cuadro 13, Fig. 18).

De los 74 adultos a los que se les tomo muestra, el 18.91 (14/74) fueron positivos a T. canis, con infección aguda (3), activa (4) y crónica (7). Catorce de los 53 becerros (26.41%) fueron positivos a T. canis, siendo la más frecuente la infección activa con seis animales, seguida de la crónica con cinco y de la aguda con tres (Cuadro 13, Fig. 18).



**Fig. 18. Bovinos positivos a *T. canis*, con infección aguda, activa o crónica.**

**Cuadro 13. Resultados de ELISAs para la detección de anticuerpos anti-T. canis y/o Ag S/E Tc y anticuerpos afines a 10 antígenos de otros nematodos en sueros bovinos positivos a T. canis.**

Bovino	CtTES	TESTc	CtTESA	CnA	CtA	AsH	AsA	AnA	Tr	DiA	TnH	TnTES	Ts
Cx (+)	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
Cx (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
2	+*	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
3	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
4	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
5	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
6	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
7	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
8	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
10	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
11	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
12	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
13	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
14	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
16	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
17	+*	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
18	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
19	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
20	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
21	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
22	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
23	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
24	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
26	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
27	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
30	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
31	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
32	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
33	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
34	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
35	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
36	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>Total</b>	<b>24*±2</b>	<b>16</b>	<b>22</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	<b>27</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>16</b>	<b>11</b>	<b>25</b>

**CtTES:** Ac  $\alpha$ -Ag S/E Tc; **TESTc:** Ag S/E Tc; **CtTES2:** Ac  $\alpha$ -Ag S/E Tc en sueros absorbidos con los 10 diferentes Ag; **CnA:** Ac  $\alpha$ -AgS T. canis; **CtA:** Ac  $\alpha$ -AgS de T. cati; **AsH:** Ac  $\alpha$ -AgH de A. suum; **AsA:** Ac  $\alpha$ -AgS A. suum; **AnA:** Ac  $\alpha$ -AgS A. caninum; **Tr:** Ac  $\alpha$ -AgLde T. spiralis; **DiA:** Ac  $\alpha$ -AgS D. caninum; **TnH:** Ac  $\alpha$ -AgH Teania spp.; **TnTES Ts:** Ac  $\alpha$ -Ag S/E de adultos de Taenia spp.; **TsH:** Ac  $\alpha$ -AgH T. leonina. \*Los sueros fueron negativos en su valor promedio, pero uno de los dos pozos tuvo un valor mayor al punto de corte. (Ac: anticuerpos;  $\alpha$ : anti).

**Cuadro 14. Frecuencias de sueros positivos y negativos a Larva Migrans por T. canis y los estados de la infección.**

Variables	(n/N)	Positivos	Negativos	Infección aguda	Infección activa	Infección crónica
		% (+/n) % (+/N)	% (-/n) % (-/N)	% (+/n) % (+/N)	% (+/n) % (+/N)	% (+/n) % (+/N)
Bos taurus	78/127	25.64 (20/78)	74.35 (58/78)	7.69 (6/78)	7.69 (6/78)	10.25 (8/78)
		15.74 (20/127)	84.25 (107/127)	4.72 (6/127)	4.72 (6/127)	6.29 (8/127)
Bos indicus	43/127	11.62 (5/43)	88.37(38/43)	0 (0/43)	6.97 (3/43)	4.65 (2/43)
		3.93 (5/127)	96.06 (122/127)	0 (0/127)	2.36 (3/127)	1.57 (2/127)
Bos taurus – indicus	6/127	50 (3/6)	50 (3/6)	0 (0/6)	16.66 (1/6)	33.33 (2/6)
		2.36 (3/127)	97.63 (124/127)	0 (0/127)	0.78(1/127)	1.57 (2/127)
<b>Machos</b>	109/127	22.01 (24/109)	77.89 (85/109)	4.58 (5/109)	8.25 (9/109)	9.17 (10/109)
		18.89 (24/127)	81.10 (103/127)	3.93 (5/127)	7.08 (9/127)	7.87 (10/127)
<b>Hembras</b>	18/127	22.22 (4/18)	77.77 (14/18)	5.55 (1/18)	5.55 (1/18)	11.11 (2/18)
		3.14 (4/127)	96.85 (123/127)	0.78 (1/127)	0.78 (1/127)	1.57 (2/127)
<b>Becerras</b>	53/127	26.41 (14/53)	73.58 (39/53)	5.66 (3/53)	11.32 (6/53)	9.43 (5/53)
		11.02 (14/127)	88.97 (113/127)	2.36 (3/127)	4.72 (6/127)	3.93 (5/127)
<b>Adultos</b>	74/127	18.91 (14/74)	81.08 (60/74)	4.05 (3/74)	5.40(4/74)	9.54 (7/74)
		11.02 (14/127)	88.97 (113/127)	2.36 (3/127)	3.14 (4/127)	5.51 (7/127)
<b>Total</b>		<b>22.04 (28/127)</b>	<b>77.95 (99/127)</b>	<b>4.72 (6/127)</b>	<b>7.87(10/127)</b>	<b>9.44 (12/127)</b>

## 7.8 Evaluación de las pruebas diagnósticas

**7.8.1 Cuadro 2x2.** Con los resultados del ELISA indirecto, comparados con el ELISA sándwich/competitivo se realizó el cuadro 2x2.

		ELISA sándwich/competitivo		
		+	-	Total
ELISA indirecto	+	22 (a)	4 (b)	26 (a+b)
	-	6 (c)	95 (d)	101 (c+d)
	Total	28 (a+c)	99 (b+d)	127 (a+b+c+d)

Donde:

- a** = Positivos a ELISA indirecto/ELISA sándwich/competitivo (verdaderos positivos).
- b** = Positivos a ELISA indirecto/ negativos a ELISA sándwich/competitivo (falsos positivos).
- a+b= Positivos a ELISA indirecto**
- a+c= Positivos a ELISA sándwich/competitivo.**
- c** = Positivos por ELISA sándwich y negativos por ELISA indirecto (falsos negativos).
- d** = Negativos a ELISA sándwich/competitivo (verdaderos negativos).
- b+d= Negativos por todas las pruebas.**
- a+b+c+d= n.**

Se determinaron la sensibilidad, la especificidad, la frecuencia aparente y la frecuencia real, los valores de exactitud, así como los valores predictivos positivo y negativo a partir de los datos del cuadro 2x2. Los resultados se resumen en el Cuadro 14:

$$\begin{aligned} \text{Sensibilidad} &= 22/28 = 0.7857 = 78.57\% \\ \text{Especificidad} &= 95/99 = 0.9595 = 95.95\% \\ \text{Frecuencia aparente} &= 26/127 = 0.2047 = \mathbf{20.47\%} \\ \text{Frecuencia real} &= \frac{0.2047 + 0.9595 - 1}{0.7857 + 0.9595 - 1} = \frac{0.1642}{0.7452} = 0.2203 = \mathbf{22.03\%} \\ \text{Enfermos totales (a+c)} &= (0.2203) (127) = \mathbf{27.97 \approx 28 \text{ animales}} \\ \text{Verdaderos positivos (a)} &= (28) (0.7857) = \mathbf{21.99 \approx 22 \text{ animales}} \\ \text{Verdaderos negativos (d)} &= (99) (0.9595) = \mathbf{94.99 \approx 95 \text{ animales}} \\ \text{Exactitud} &= 22+95/127 = 0.9212 = \mathbf{92.12\%} \\ \text{Valor predictivo positivo} &= 22/26 = 0.8461 = \mathbf{84.61\%} \\ \text{Valor predictivo negativo} &= 95/101 = 0.9405 = \mathbf{94.05\%} \end{aligned}$$

**Cuadro 15. Valores obtenidos en la evaluación de ELISA indirecto con el ELISA sándwich/competitivo como “prueba de oro”.**

	<b>ELISA indirecta vs ELISA sándwich/competitiva (%)</b>
Frecuencia aparente	<b>20.47</b>
Frecuencia real	<b>22.03</b>
Verdaderos positivos (a)	<b>22 *</b>
Falsos positivos (b)	<b>4 *</b>
Falsos negativos (c)	<b>6 *</b>
Verdaderos negativos (d)	<b>95 *</b>
Sensibilidad	<b>78.57</b>
Especificidad	<b>95.95</b>
Exactitud	92.12
Valor predictivo positivo	<b>84.61</b>
Valor predictivo negativo	<b>94.05</b>

\* Número de bovinos.

## **7.8.2 Medición de concordancia**

### **7.8.2.1 Coeficiente o índice Kappa ( $\kappa$ )**

Con los valores del cuadro 2x2 se obtuvo el valor de  $\kappa$  para evaluar la concordancia entre el ELISA indirecta y el ELISA sándwich y competitiva.

$$Co = \text{Concordancia observada} = \frac{(22 + 95)}{127} = \mathbf{0.9212}$$

$$Ce = \text{Concordancia esperada} = \frac{(26)(28)}{127^2} + \frac{(101)(99)}{127^2} = \mathbf{0.6650}$$

$$\mathbf{\kappa} = \frac{Co - Ce}{1 - Ce} = \frac{0.9212 - 0.6650}{1 - 0.6650} = \frac{0.256}{0.335} = \mathbf{0.7647}$$

Tomando en cuenta los criterios de Landis y Koch, la fuerza de concordancia entre las pruebas fue sustancial, lo que significa que los resultados de ambas pruebas coinciden de manera importante (Jaramillo-Arango y Martínez Maya, 2010; Landis y Koch, 1977).

## 8. DISCUSIÓN

Varios hospederos paraténicos de *T. canis* pueden ser una fuente de infección para otros hospederos (Schnieder et al., 2011), incluyendo al humano (Choi et al., 2008; Enko et al., 2009; Hoffmeister et al., 2007; Morimatsu et al., 2006; Salem et al., 1992; Yoshikawa et al., 2008). El diagnóstico de Larva Migrans se ha realizado exitosamente empleando Ag S/E Tc, para detectar anticuerpos anti-*T. canis*, con kits comerciales o con técnicas desarrolladas en los laboratorios, utilizando técnicas como ELISA y Western blot. Pero, las frecuencias registradas pueden estar sobrevaloradas por la presencia de reacciones cruzadas con otras helmintiasis (Cuéllar et al., 1992; Speiser y Weiss, 1979) y por el fallo en la detección de positivos dependiendo del tiempo transcurrido post-infección al colectar el suero.

Los Ag S/E Tc al ser heterogéneos, complejos, diversos y comunes entre nematodos, hacen que la purificación e identificación de alguno específico a *T. canis* sea complicada. Así, la búsqueda de técnicas complementarias que sean sensibles y específicas, fáciles de realizar, baratas, que se puedan emplear a gran escala y ayuden a determinar el estado infectivo, se hace imperativa para la demostración de Larva Migrans por *T. canis*, en diferentes hospederos.

En este trabajo se realizó el ELISA indirecto que previamente había sido empleado en el laboratorio de Parasitología Experimental del INP y se estandarizó. Además, éste se complementará con ELISA sándwich y el ELISA indirecto se optimizó con una metodología no reportada que empleo varias fuentes de antígeno. Con lo anterior se demostró la presencia de anticuerpos anti-*T. canis* y antígenos de S/E Tc en sueros de bovinos destinados para el consumo de carne.

Primero, para realizar el ELISA indirecto y competitivo, se determinó la dilución de proteína A-HRP a emplear. Se utilizó la dilución 1:500 debido a que: 1) la diferencia entre absorbancias de fue menor entre las diluciones 1:500 y 1:1000; 2) con un suero positivo la curva estándar tuvo una caída a partir de la dilución 1:500 (datos no mostrados) debido a

la saturación del sistema; 3) la proteína A de *Staphylococcus aureus* tiene una especificidad restringida a la fracción Fc de la IgG bovina, que tiene dos subclases IgG1 e IgG2 (subtipos IgG2a e IgG2b), pero se une solo a la IgG2 (Lindmark et al., 1983). Diferentes ensayos para la detección de Ac anti-Ag S/E Tc usan comúnmente anticuerpos anti-IgG acoplados a peroxidasa (Glickman 1985, Roldán 2006) o fosfatasa alcalina (Camargo et al., 1992; De Savigny et al., 1979), pero ninguno reporta el uso de proteína A acoplada a peroxidasa. La desventaja del uso de esta proteína radica en la especificidad a IgG2, lo que hace necesario el uso de una mayor concentración de suero para obtener reacciones positivas, por lo que a pesar de haber utilizado varias diluciones (1:16, 1:32 y 1:64) en la estandarización del ELISA indirecto, se optó por la más alta, ya que se observó que ensayos similares en el laboratorio con suero humano presentaban absorbancias mayores.

Para la detección de anticuerpos se han montado diferentes ensayos que emplean diversas concentraciones de Ag S/E Tc, por ejemplo en las primeras pruebas para diagnóstico en humanos se utilizaron 0.15 µg/mL (De Savigny et al., 1979), 1 µg/mL (Camargo et al., 1992), 12 µg/mL (Glickman et al., 1985), 12.5 µg/mL e incluso concentraciones empíricas (van Knapen et al., 1983). En ensayos para determinar Larva Migrans en otros hospederos utilizaron en ovinos 10 µg/mL (Lloyd, 2006), 25 µg/mL (Alvares-Santarém et al., 2011) y 1 µg/mL (Lopes et al., 2013) y en cerdos 1 µg/mL (Antolová et al., 2006), todos con diversos resultados.

Aunque la concentración de 1 µg/mL, es la más usada, ninguno de los ensayos menciona la estandarización o la razón por la cual se usó. Aunado a lo anterior, se debe tomar en cuenta la calidad y los métodos de extracción, concentración y cuantificación del antígeno. Todos estos ensayos usaron del método de De Savigny (1975), excepto Antolová et al. (2006) y todos utilizaron diferentes técnicas de concentración (desde diálisis hasta ultrafiltración) con filtros con poros de 6000 hasta 20,000 Da. La mayoría menciona recolectar el medio de cultivo de las larvas semanalmente, almacenarlo a -70°C. Ninguno

menciona el tiempo transcurrido desde la primera colecta hasta su uso y solo Lopes et al., (2013) utilizó inhibidores de proteasas. Es importante considerar que parte de los productos de excreción y secreción de la larva de *T. canis* son proteasas (Robertson et al., 1989; Maizels 2013), que les permiten digerir tejidos para migrar a través de ellos y probablemente degradar proteínas secretadas o excretadas por la larva en el medio de cultivo y cambiar su conformación antigénica, siendo mayor el daño a temperaturas elevadas, por lo que los inhibidores de proteasas y el almacenamiento a bajas temperaturas (-70°C) de los Ag S/E Tc, puede ayudar a disminuir su deterioro. Como se puede apreciar, a pesar de las diferentes cantidades de Ag S/E Tc empleadas, los métodos de obtención, concentración y cuantificación son bastante similares, lo que nos lleva a pensar que probablemente sean la calidad del antígeno, el método de conservación y los reactivos empleados, las principales variables que determinan el empleo de las diferentes concentraciones de antígeno.

Se utilizó 1.0 µg/mL, porque con diferentes concentraciones de antígeno la absorbancia de uno de los valores positivos con la concentración 0.5 µg/mL se encontró debajo del valor de corte y debido a que es la concentración de antígeno más empleada en los diferentes reportes (Antolová et al., 2006; Camargo et al., 1992; Lopes et al 2013). Debido a la moderada afinidad de la proteína A a la IgG bovina, se utilizó una mayor concentración de suero (1:16) comparada con otros ensayos que usaron anticuerpos anti-IgG de la especie a diagnosticar: 1:1000 (De Savigny et al., 1979), 1:40 (Camargo et al., 1992), 1:20 (van Knapen et al., 1983); 1:50 (Lloyd, 2006), 1:100 (Alvares et al., 2011), 1:200 (Lopes et al., 2013) 1:100 (Antolová et al., 2006), a excepción de Glickman et al. (1985) que empleo una dilución 1:8.

En relación al punto de corte, Antolová et al. y Camargo et al., (1992) emplearon el promedio más cuatro desviaciones estándar, Glickman et al. (1985) no define el valor ni como lo obtuvo, solo mencionó a la media de las absorbancias negativas y positivas y De Savigny et al. (1979) emplearon un método diferente, considerando positivos los valores

por encima de la suma de 5 veces el promedio de todos los sueros obteniendo un punto de corte de 0.5, que por ser tan elevado favorece la presencia de falsos negativos. El método más empleado y menos arbitrario es sumar al promedio de los negativos más tres desviaciones estándar, como en el presente trabajo. Con este método los valores obtenidos para puntos de corte van de 0.26 a 0.407 (Alvares-Santarém et al., 2011; Lloyd, 2006; Lopes et al., 2013; van Knapen et al., 1983).

Con respecto a la cinética en la producción y detección de anticuerpos específicos, Alvares-Santarém et al., en 2011, infectaron experimentalmente con 1,000 hL2 ovinos y reportaron la seroconversión el día 21 p.i., pero solo ese día se realizó la detección de anticuerpos, aunque como en el presente trabajo el día 21 p.i. los valores fueron positivos. En cerdos inoculados artificialmente con 50,000 hL2 se tomaron muestras de sangre los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y se observó que la primera absorbancia por encima del valor de corte fue el día 14 p.i. y los valores disminuyeron el día 28, por lo que a otro grupo de cerdos les administraron otra dosis de hL2 el día 28 y encontraron un aumento en la absorbancia el día 35 y una disminución en el día 42 (Taira et al., 2003). En el presente trabajo, en el bovino que se utilizó como control, la producción de anticuerpos aumentó constantemente en el tiempo (Fig. 12), con la aplicación de larvas y Ag S/E cada 15 días, como en cerdos al administrar más hL2, pero en el bovino se detectaron anticuerpos el día 7 p.i. a diferencia del día 14 p.i. en cerdos, probablemente porque al bovino se le inocularon las larvas por vía intramuscular.

Es relevante destacar, no hay reportes de algún ensayo realizado para la detección de Larva Migrans por *T. canis* en bovinos, pero se ha efectuado la detección en humanos (Tabla 5) y otras especies, como en cerdos silvestres (República Checa) con una frecuencia de 7.2% (Antolová et al., 2006), en ovinos en Inglaterra con frecuencias de 7 hasta 47% (Lloyd, 2006) y en Brasil con prevalencias de 50.1% en 2011 y 29.0% en 2013 (Alvares-Santarém et al., 2011; Lopes et al., 2013 respectivamente), además de el diagnóstico en caballos (México) con frecuencia del 13.82%. (Reyes-Climaco et al., 2014). En los bovinos

se obtuvo una frecuencia con ELISA indirecto de 20.47% (26/127), pero al adsorber el suero el porcentaje bajo a 13.38% (17/127), lo que hace manifiesto que a pesar de que en algunos de los trabajos mencionados adsorbieron el suero con antígeno de *A. suum* (Alvares-Santarém et al., en 2011; Lloyd., 2006; Lopes et al., 2013), en ninguno de estos reportes se realizó la detección con antígenos de otros parásitos y no podemos saber si esas frecuencias fueron por una infección real o por reacciones cruzadas.

Es ampliamente reportado que las reacciones cruzadas cuando se emplean extractos crudos son más frecuentes que con antígenos de secreciones y excreciones de larvas (Cuéllar et al., 1992), lo que los hace una buena fuente de antígeno para emplearlos como adsorbentes para el suero y disminuir así, la incertidumbre de las reacciones cruzadas. En el presente trabajo se había considerado el uso de antígeno de *Toxocara vitulorum*, pero recientes reportes en diferentes estados de la República Mexicana muestran la ausencia de este parásito en ganado (Acevedo-Ramírez et al., 2014) y búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) (Escobar-Olan et al., 2014), y aunque no lo podemos considerar erradicado, si muy poco frecuente. Por lo anterior y tomando en cuenta que es del género *Toxocara* sp. y que el que bovino porta la fase adulta, se utilizó el antígeno de adulto de *T. canis* para eliminar anticuerpos compartidos entre ambas especies, aunque en el proceso se descartaron antígenos compartidos con la larva.

El resultado obtenido post-adsorción es importante, porque al eliminar las reacciones cruzadas se da más certeza de la frecuencia de la parasitosis. Al seguir un esquema de adsorción de suero existen tres fuentes de antígeno, que no son excluyentes una de la otra y se pueden usar juntas para futuros trabajos: 1) emplear antígenos de parásitos que aunque no sean del mismo Phylum sean comunes en la especie a diagnosticar; 2) emplear parásitos que son transmitidos por la misma vía (fecal-oral) y que están presentes en el hospedero definitivo y 3) emplear antígenos de un mismo parásito en diferentes formas (antígenos de secreción-excreción, huevos, larvas y adultos), sobre todo considerando cual es la fase en el hospedero paraténico en que se encuentra naturalmente el parásito.

Los sueros reactivos al extracto crudo de adulto de *A. suum* fueron de los menos frecuentes (10/37), junto con *D. caninum* (9/37) y los más frecuentes fueron contra el antígeno de adulto de *A. caninum* (27/37), lo que se explica porque las nematodiasis gastrointestinales en rumiantes regularmente son mixtas y producidas por estrogilidos, que comparten el orden Strongylida con *A. caninum*, por lo que probablemente están más relacionados antigénicamente, que con otros ordenes como Ascaridida o platelmintos.

Se ha descrito que la frecuencia de Larva Migrans en ovinos es directamente proporcional a la edad de los animales (Alvares-Santarém et al., 2011; Lloyd., 2006; Lopes et al., 2013). En bovinos se encontró una frecuencia en adultos de 11.02%, que fue igual a la de los becerros (11.02%) ( $p=0.05$ ), aunque la mayoría de los animales eran adultos (74/127). Alvares-Santarém et al., 2011 detectó mayor prevalencia en ovinos hembras, pero en los bovinos de este estudio fue más frecuente en machos (18.89%) que en hembras (3.14%), probablemente fue porque eran más machos que hembras. Considerando la variable especie ninguno de los trabajos reporta este dato. En bovinos se observaron diferencias entre los grupos ( $p=0.05$ ): *Bos taurus* (78/127) que presentaron mayor frecuencia (20/78), comparados con los *Bos indicus* (43/127) y positivos en un 3.93% y la cruce *Bos taurus-indicus* (6/127) con 2.36% de positivos.

Este es el primer trabajo que reporta la captura de antígeno de *T. canis* en bovinos. Se utilizó un anticuerpo monoclonal que no reconoció antígenos de otros helmintos (Rodríguez-Caballero, 2012). En la estandarización de la técnica se encontró que los valores de las concentraciones de 32-128  $\mu\text{g/mL}$  de anticuerpo monoclonal (Fig. 15) estuvieron por debajo de la absorbancia que detectó 0.01  $\mu\text{g/mL}$  de antígeno con 256  $\mu\text{g/mL}$  de anticuerpo monoclonal, por lo que ésta fue la cantidad empleada para la captura de Ag E/S Tc en suero. Se sabe que el ideal de esta prueba es detectar la menor cantidad de antígeno posible con la menor concentración de anticuerpo monoclonal, debido a que no sabemos la cantidad de larvas que fueron ingeridas y tomando en cuenta que por su ciclo biológico, después de migrar en los hospederos paraténicos, se encuentra

en hipobiosis en granulomas rodeados de células fagocíticas, la cantidad de Ag S/E, que puedan llegar al torrente sanguíneo para ser detectados es mínima y variable, ya que una larva puede producir 200 pg (0.0002 µg) de proteína por día, lo que forma parte de los antígenos de secreción y excreción (Meghji y Maizels et al., 1986). Pero en el sistema que se probó se necesitaron grandes cantidades de anticuerpo monoclonal 1E4G4C2, probablemente debido a que el anticuerpo monoclonal fijado en su región Fc a la placa, se puede unir al “mismo epitopo en diferentes antígenos”, ya que el anticuerpo monoclonal 1E4G4C2 reconoce bandas de diferentes pesos moleculares (153.7, 146, 111.7, 94.9, 80.7, 68.7, 55.3 y 38.1 kDa) (Rodríguez-Caballero et al., 2012) y se puede deducir que la parte discreta compartida que probablemente detecta, son los carbohidratos de las glicoproteínas, ya que con más frecuencia son cadenas repetidas, similares, que “cubren” el núcleo proteico y son los componentes con los que probablemente la respuesta inmune tiene un contacto continuo, por lo que posiblemente solo algunos de los anticuerpos policlonales detectaron las partes menos expuestas del antígeno.

En cuatro sueros con más de 1.0 µg/mL de antígeno, no se encontraron anticuerpos, pero en tres sí. En seis sueros con 0.1 µg/mL no se encontraron anticuerpos pero en uno la absorbancia promedio para la detección de anticuerpos fue muy cercano (0.24) al valor de corte (0.25), por lo que en este suero puede ser de un animal en el que apenas se comenzaban a producir anticuerpos. En el suero con 0.01 µg/mL, si se encontraron anticuerpos anti-T. canis. El otro suero que fue positivo en ELISA indirecto, con valores por arriba y debajo del valor de corte, fue negativo a la presencia de antígeno y después de la adsorción ya no se detectaron anticuerpos anti-T. canis, por lo que evaluar los sueros “sospechosos” con técnicas confirmatorias ayuda a ratificar o descartar el diagnóstico.

Existen pocos reportes que demuestren la detección de antígenos de T. canis en diferentes hospederos, en éstos se utilizaron anticuerpos policlonales para la captura de antígeno en perros (Matsumara et al., 1984) y ratones (Bowman et al., 1987) y los anticuerpos monoclonales Tcn2 (IgM) y Tcn3 (IgG1), afines a epitopos carbohidratos y Tc-

CTL-1 (lectinas-1 tipo C), respectivamente, para el diagnóstico en humanos (Guillespie et al., 1993; Robertson et al., 1988). El inconveniente del empleo de anticuerpos policlonales, es que detectan una gran variedad de antígenos, incluidos los de otros parásitos, como lo reportó Rodríguez-Caballero (2012), al generar anticuerpos policlonales de conejo que reconocieron antígenos somáticos de *T. cati*, *A. suum*, *F. hepatica*, *A. caninum*, *D. caninum* y *T. spiralis*. Robertson et al. (1988), emplearon ambos anticuerpos monoclonales (Tcn2 y Tcn3) y detectaron 20 ng/ml de Ag S/E, y mencionó que el Tcn2, no es reactivo a *T. cati*. Gillespie et al., (1993) capturó antígeno en suero humano, pero no reportó la cantidad mínima detectada y demostró reacciones del anticuerpo monoclonal con sueros de pacientes con fasciolosis, triquinosis, esquistosomiasis y filariasis. Por lo anterior, el anticuerpo monoclonal empleado en este estudio con el que se capturaron hasta 10 ng de antígeno y que no presentó reacción a *T. cati*, *Fasciola hepatica* ni *Tichinella spiralis* y que es una IgG1 (como el Tcn3), puede ser una buena opción para la detección de antígenos de *T. canis*.

En los sueros bovinos se detectaron: a) anticuerpos anti-S/E Tc en suero adsorbido b) Ag S/E Tc en suero tratado; c) anticuerpos anti-S/E Tc en suero adsorbido y Ag S/E Tc en suero. Con lo que se planteó la asociación entre la presencia de anticuerpos y/o antígenos con diferentes fases de la infección debidos a la Larva Migrans, como lo sugiere Gillespie et al. (1993), quienes detectaron que 19 de 28 pacientes diagnosticados con toxocariosis aguda clínica y uno de 10 de los casos inactivos presentaron antígenos. Así, se propuso: a) que el suero en el que se detectaron solo antígenos sea clasificado con una “infección aguda”, ya que al principio de la infección la larva migra por vía sanguínea y órganos, liberando Ag S/E Tc y la producción de anticuerpos específicos no se ha desarrollado; b) que cuando un suero presente antígenos y anticuerpos anti-S/E Tc, se catalogue con “infección activa”, debido a que la larva sigue produciendo secreciones y excreciones detectables en suero y los anticuerpos nos dicen que ya se ha montado una respuesta específica; y c) que el suero en el que solo se detecten anticuerpos anti-S/E Tc se clasifique con “infección crónica”, debido a que la larva se encuentra dormante o muerta.

Con base en esta clasificación, en los bovinos a los que se les extrajo suero, se encontró que la infección crónica fue la más frecuente (12/127), seguida de la infección activa (10/127) y la infección aguda (3/127), lo que tiene lógica desde el punto de vista del desarrollo natural de la enfermedad. El encontrar solamente antígeno en un becerro (infección aguda), puede sugerir que fue por la reciente ingestión de la larva.

En la presentación “activa” detectada en este trabajo, probablemente influyó el tratamiento del suero con EDTA, que hizo que el complejo antígeno-anticuerpo se disocie, por lo el antígeno detectado no es solo el “libre” si no el que fue opsonizado por anticuerpos específicos y liberado con el tratamiento, además con el tratamiento de calor la estructura del anticuerpo que es termolábil hace que su unión posterior con su anticuerpo sérico sea menos probable.

En la evaluación del ELISA indirecto se empleó la “prueba de oro” con una combinación de métodos (Jaramillo-Arango y Martínez-Maya, 2010) con el ELISA sándwich y el ELISA competitivo.

La sensibilidad del ELISA indirecto con la “prueba de oro” en este trabajo fue de 78.57%, y es igual a la obtenida por Glickman et al. (1992) de 78%, difiere a la reportada por Speiser y Gottstein (1984) de 80%, Jacquier et al. (1991) de 91% y Camargo et al. (1992) de 100%. Camargo et al. (1992) adsorbieron suero humano con antígeno somático de *A. suum* y reportaron una disminución de la sensibilidad de 100 a 95.4%, debido a que ya no se reconocieron anticuerpos anti-*Ascaris suum*. Los valores de especificidad de 92% (Glickman et al., 1978), 93% (Speiser y Gottstein 1984), 86% (Jacquier et al. 1991) y 90.5% (Camargo et al., 1992), son menores al que obtuvimos (95.95%).

La frecuencia aparente de 20.47% de los 127 sueros con el ELISA indirecto fue menor que la frecuencia real de 22.03%, lo que concuerda con la exactitud de 92.12% que dice que  $\approx 92$  de cada/100 sueros son clasificados correctamente con ELISA indirecto. El valor predictivo positivo moderadamente alto (84.61%), indica que la probabilidad de un

individuo positivo con ELISA indirecto tenga Larva Migrans por *T. canis* es de 0.8461 y el valor predictivo negativo más elevado de 94.05, muestra que la probabilidad de que un individuo resulte negativo con ELISA indirecto y esté libre de *Toxocara* es de 0.9405. El valor predictivo negativo de 94.05% y la especificidad de 95.95%, se explican porque se presentaron 6 sueros falsos negativos, detectados con el ELISA sándwich.

Por lo anterior, la sensibilidad de 78% y especificidad de 95% para el ELISA indirecto en bovinos, son consideradas admisibles debido a que: 1) de 100 sueros positivos 78 serán detectados, por lo que como prueba de tamiz es aceptable, siempre y cuando se acompañe con la detección de antígeno; 2) de 100 animales negativos se clasifican como verdaderos negativos a 95, porque no detecta infecciones agudas.

En el presente trabajo se realizó por primera ocasión la detección de anticuerpos anti-*T. canis* y antígenos de secreción y excreción de larvas de *T. canis* en bovinos, la adsorción de suero con más de un antígeno, la caracterización de diferentes fases de la infección usando la detección de antígenos y anticuerpos, y la detección simultánea de anticuerpos en contra de once antígenos diferentes. Se demostró que el ELISA indirecto, a pesar de ser una buena técnica para la detección de anticuerpos, no detecta infecciones agudas, ni discrimina infecciones cruzadas. Lo anterior contribuye a la desarrollo del diagnóstico y epidemiología de las infecciones por *T. canis* en hospederos paraténicos.

En México, las reacciones inespecíficas entre anticuerpos anti-S/E *Tc* y antígenos de otros nematodos justifica la investigación, especialmente por la presencia de parasitosis múltiples, ya que la detección acertada de hospederos paraténicos y el entendimiento de su función en el ciclo biológico de *T. canis* ayudará a la implementación de medidas de control y prevención.

## 9. CONCLUSIONES

- La frecuencia de *T. canis* en sueros de bovinos del rastro de Tecamachalco Puebla, fue de 22.04% (28/127).
- Se detectaron anticuerpos anti-*T. canis* y antígenos de secreción-excreción de larvas de *T. canis*, en sueros bovinos, mediante diferentes ELISAs.
- Se demostraron reacciones cruzadas entre antígenos de *T. canis* y *T. cati*, *A. caninum*, *Taenia spp.*, *D. caninum*, *A. suum*, *T. leonina* y *T. spiralis* en los sueros de bovinos positivos a *T. canis*.
- La adsorción de los sueros con antígenos de extractos crudos redujo un 7.09% las reacciones cruzadas en bovinos positivos a *T. canis*.
- Los sueros de bovinos se clasificaron por su estado de infección como aguda 2.36% (3/127), activa 7.87% (10/127) y crónica 9.44% (12/127).

## 10. PERSPECTIVAS

- Mejorar el diagnóstico en bovinos con anticuerpos anti-IgG bovina y/o con proteína G y/o conjugados de proteína A/proteína G.
- Realizar la detección de anticuerpos anti-T. canis adsorbiendo los sueros con antígenos de parásitos comunes y frecuentes al bovino (o especie en la que se quiere diagnosticar), además de los comunes en perros y que tengan un modo de transmisión similar a T. canis.
- Caracterizar la respuesta del bovino a T. canis en un modelo con animales control y que puedan ser inoculados con huevos larvados.
- Identificar antígenos cuyos epitopos no presenten reacciones cruzadas con otros nematodos.
- Combinar el uso de suero tratado y no tratado, para detectar antígeno libre, además del unido a anticuerpos.
- Emplear secreciones y excreciones de los diferentes parásitos además de extractos crudos de adultos, larvas y huevos y verificar cual es el que presenta mayor avidéz, para ser empleado para adsorber suero.
- Caracterizar los isotipos presentes por especie de hospedero.
- Realizar conteos celulares o citometría de flujo para detectar las diferentes poblaciones reactivas en el momento de la infección.

## 11. REFERENCIAS

### A

**Abo-Sheada** MN, Sharif L, el-Sukhon SN, Abuharfeli N, Atmeh RF. Seroprevalence of *Toxocara canis* antibodies in humans in northern Jordan. *J Helminthol* **1992**; 66 (1): 75-78.

**Acevedo-Ramírez PMC**, Quiroz-Romero H, Landeros-López H, Campos-Sánchez JJ, Landeros-Mellado Brianda, Cruz-Mendoza I. Frequency of parasites of cattle in Sinaloa Mexico. 13<sup>th</sup> International Congress of Parasitology **2014**. México.

**Ajayi** OO, Duhlińska DD, Agwale SM, Njoku M. Frequency of human toxocariasis in Jos, Plateau State, Nigeria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2000**; 95 (2): 147-149.

**Akao** N, Ohta N. Toxocariasis in Japan. *Parasitol Int* **2007**; 56: 87-93.

**Alba-Hurtado** F, Tortora PJ, Tsutsumi V, Ortega-Pierres MG. Histopathological investigation of experimental ocular toxocariasis in gerbils. *Int J Parasitol* **2000**; 30: 143-147.

**Alba-Hurtado** F, Muñoz-Guzmán MA, Valdivia-Anda G, Tortora JL, Ortega-Pierres MG. *Toxocara canis*: Larval migration dynamics, detection of antibody reactivity to larval excretory-secretory antigens and clinical findings during experimental infection of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp Parasitol* **2009**; 122: 1-5.

**Alvarado-Esquivel** C. Seroepidemiology of toxocariasis in a rural Tepehuanos population from Durango, Mexico. *J of Helminthology* **2013a**; 1-4.

**Alvarado-Esquivel** C. Toxocariasis in Waste Pickers: A case control seroprevalence study. *PLoS One* **2013b**; 8(1): e54897.

**Alvarado-Esquivel** C, Hernández-Tinoco J, Sánchez-Anguiano LF. Seroepidemiology of *Toxocara* infection in patients with vision impairment and blindness in Durango, Mexico. *J Clin Med Res* **2015**; 7 (3): 176-181.

**Alvares-Santarém** V, Fabris P, Leme B, Rubinsky-Elefant G, Giuffrida R. Anti-*Toxocara* spp. antibodies in sheep from southeastern Brazil. *Vet Parasitol* **2011**; 179: 283-286.

**Antolová** D, Reiterová K, Dubinský P. The role of wild boars (*Sus scrofa*) in circulation of trichinellosis, toxocariosis and ascariasis in the Slovak Republic. *Helminthol* **2006**; 43 (2): 92-97.

**Antolová** D, Reiterová K, Miterpáková M, Stanko M, Dubinský P. Circulation of *Toxocara* spp. in suburban and rural ecosystems in the Slovak Republic. *Vet Parasitol* **2004**; 126 (3): 317-324.

**Antonios** SN, Eid MM, Khalifa EA, Othman AA. Seroprevalence study of *Toxocara canis* in selected Egyptian patients. *J Egypt Soc Parasitol* **2008**; 38 (1): 313-318.

**Archielli S, Kozubsky L.** Toxocara y toxocariosis. Acta Bioquím Clín Latinoam **2008**; 42 (3): 379-384.

**Archielli S, Santillan GI, Fonrouge R, Céspedes G, Burgos L, Radman N.** Toxocariasis: seroprevalence in abandoned-institutional children and infants. Rev Argent Microbiol **2014**; 46 (1): 3-6.

**Azam D, Ukpai OM, Said A, Abd-Allah GA, Morgan ER.** Temperature and the development and survival of infective Toxocara canis larvae. Parasitol Res **2012**; 110: 649-656.

**Azian MY, Sakhone L, Hakim SL, Yusri MY, Nurulsyamzawaty Y, Zuhaizam AH, Rodi IM, MaslawatyMN.** Detection of helminth infections in dogs and soil contamination in rural and urban areas. Southeast Asian J Trop Med Public Health **2008**; 39(2): 205-212.

## **B**

**Bachtiar A, Auer H, Finsterer J.** Parálisis de Bell y dolor facial asociados con infección por Toxocara sp. Rev Chilena Infectol **2012**; (5): 551-553.

**Barutzki D, Schaper R.** Results of parasitological examinations of faecal samples from cats and dogs in Germany between 2003 and 2010. Parasitol Res **2011**; 109 (1): 45-60.

**Batchelor DJ, Tzannes S, Graham PA, Wastling JM, Pinchbeck GL, German AJ.** Detection of endoparasites with zoonotic potential in dogs with gastrointestinal disease in the UK. Transbound Emerg Dis **2008**; 55(2): 99-104.

**Beaver PC.** Visceral and cutaneous larva migrans. Public Health Reports **1959**; 74 (4): 328-322.

**Bede O, Szénasi Z, Danka J, Gyurkovits K, Nagy D.** Toxocariosis associated with chronic cough in childhood: a longitudinal study in Hungary. J Helminthol **2008**; 82 (4): 357-363.

**Becker AC, Rohen M, Epe C, Schnieder T.** Prevalence of endoparasites in stray and fostered dogs and cats in Northern Germany. Parasitol Res **2012**; 111 (2): 849-857.

**Behm CA y Ovington KS.** The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. Parasitol today **2000**; 16: 5.

**Bojanich MV, MA López.** Toxocara canis bajo la lupa. Rev Arg de Microbiol **2009**; 41: 28.

**Borecka A, Gawor J, Niedworok M, Sordyl B.** Occurrence of Toxocara spp. eggs in household environment of children with diagnosed toxocariasis in Łódźvoivodeship. Wiad Parazytol **2010**; 56(2): 141-144.

**Bortoli AM y El Achkar ME.** Visceral larva migrans: case report. An Bras Dermatol **2003**; 78(2): 215-219.

**Bowman** DD, Mika-Grieve M, Grieve RB. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. *The Am J of Trop Med and Hyg* **1987**; 36 (1): 75-82.

**Bowman** D, Oaks JA, Grieve RB. Ultrastructure of the infective-stage larva of *Toxocara canis* (Nematoda: Ascaridoidea) *J Helminthol Soc Wash* **1993**; 60 (2): 183-204.

**Bradford** MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**; 72: 248-254.

**Bruňanská** M, Dubinsky P, Reiterová K. *Toxocara canis*: Ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs. *Int J of Parasitol* **1995**; 25 (6): 683-690.

**Bruňanská** M. *Toxocara canis* (Nematoda: Ascaridae): the fine structure of the oviduct, oviduct-uterine junction and uterus. *Folia Parasitologica* **1997**; 44: 55-61.

**Burke** TM, Roberson EL. Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum* experimental infection of the bitch before pregnancy. *Int Jour for Paras* **1985**; 15 (1): 71-75.

## C

**Camargo** de D, Nakamura PM, Vaz AJ, de Silva MV, Chieffi PP, de Melo EO. Standardization of DOT-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. *Inst Med trop Sao Paulo* **1992**; (1): 55-60.

**Cantó** GJ, García MP, García A, Guerrero MJ, Mosqueda. The prevalence and abundance of helminthparasites in stray dogs from the city of Queretaro in central Mexico *J Helminthol* **2011**; 85 (3): 263-269.

**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 (4): 473-475.

**Carden** SM, Meusemann R, Walker J, Stawell RJ, Mackinnon JR, Smith D, Stawell Am, Hall AJ. *Toxocara canis*: egg presence in Melbourne parks and incidence in Victoria. *Clin & Exp Ophtalmol* 2003; 31: 143-146.

**Cassenote** AJ, de Abreu LAR, Pinto NJM, Rubinsky-Elefant G. Seroprevalence and modifiable risk factors for *Toxocara* spp. In Brazilian schoolchildren. *Negl Trop Dis* **2014**; 8(5): 28-30.

**Castillo** D, Paredes C., Zanartu C, Castillo G, Mercado R, Muñoz V, Schenone H. Environmental contamination with *Toxocara* sp. eggs in public squares and parks from Santiago, Chile, 1999. *Bol Chil Parasitol* **2000**; 55: 86-91.

**Celis** TCA, Romero-Núñez C, García-Contreras AC, Mendoza-Barrera GE. Soil contamination by *Toxocara* spp. eggs in a University in Mexico City. *Rev Bras Parasitol Vet* **2012**; 21(3): 298-300.

**Choi** D, Lim JH, Choi DC, Paik SW, Kim SH, Huh S. Toxocariasis and ingestion of raw cow liver in patients with eosinophilia. *Korean J Parasitol* **2008**; 46: 139-143.

**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 (5): 541-543.

**Claerebout** E, Casaert S, Dalemans AC, De Wilde N, Levecke B, Vercruysse J, Geurden T. *Giardia* and other intestinal parasites in different dog populations in Northern Belgium. *Vet Parasitol* **2009**; 161 (1-2): 41-46.

**Cuéllar** C, Fenoy S, Guillén JL. Cross-reactions of sera from *Toxocara canis*-infected mice with *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* antigens *Int J Parasitol* **1992**. 22 (3): 301-307.

## D

**Dado** D, Izquierdo F, Vera O, Montoya A, Mateo M, Fenoy S, Galván AL, García S, García A, Aránguez E, López L, del Águila C, Miró G. Detection of zoonotic intestinal parasites in public parks of Spain. Potential epidemiological role of microsporidia. *Zoonoses Public Health* **2012**; 59 (1): 23-28.

**Dai** RS, Li ZY, Li F, Liu DX, Liu W, Liu GH, He SW, Tan MY, Lin RQ, Liu Y, Zhu XQ. Severe infection of adult dogs with helminths in Hunan Province, China poses significant public health concerns. *Vet Parasitol* **2009**; 160 (3-4): 348-350.

**Deepika** F, Wickramasinghe P, Kapilana G, Dewasurendra RL, Amarasooriya M, Dayarante A. *Toxocara* seropositivity in Sri Lankan children with asthma. *Pediatrics Int* **2009**; 51: 241-245.

**De la Fé** RP, Duménigo RBE, Brito AE, Aguiar SJ. *Toxocara canis* y síndrome larva migrans visceralis. *REDVET* **2006**; VII, 4. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040406.html>

**Delgado** O, Rodríguez-Morales AJ. Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariasis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina. *Bol Malariología y Salud Ambiental* **2009**; XLIX, 1.

**De Oliveira** VC, Pinto de Mello R, d'Almeida JM. Muscoid dipterans as helminth eggs mechanical vectors at the zoological garden, Brazil. *Rev Saúde Pública* **2002**; 36 (5): 614-620.

**De Savigny** DH. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J Parasitol* **1975**; 61: 781-782.

**De Savigny** DH, Voller A, Woodruff AW. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* **1979**; 32 (3): 284-288.

**Despommier** D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev* **2003**; 16: 265-272.

**Devera** R, Blanco Y, Hernández H, Simoes D. *Toxocara* spp. and other helminths in squares and parks of Ciudad Bolívar, Bolívar State (Venezuela). *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2008**; 26 (1): 23-26.

**Díaz-Suárez** O, García ME, Meléndez F, Estévez J. Seroepidemiology of toxocariasis in a Yucpa Amerindian community from the Perija Mountains, Western Venezuela. *Kasmera* **2010**; 38 (2): 138-146.

**Dogan** N, Dinleyici EC, Bor O, Töz SO, Ozbel Y. Seroepidemiological survey for *Toxocara canis* infection in the northwestern part of Turkey. *Turkiye Parazitoloj Derg* **2007**; 31 (4): 288-291.

**Dubná** S, Langrová I, Nápravník J, Jankovská I, Vadlejch J, Pekár S, Fechtner J. The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic *Vet Parasitol* **2006**; 145(1-2): 120-128.

**Dubná** S, Langrova I, Jankovská I, Vadlejch J, Pekár S, Nápravník J, Fechtner J. Contamination of soil with *Toxocara* eggs in urban (Prague) and rural areas in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 2007; 144: 81-86.

**Duménigo** B, Gálvez D. Soil contamination in Ciudad de La Habana province with *Toxocara canis* eggs. *Rev Cubana Med Trop* **1995**; 47 (3): 178-80.

## E

**Eguia** AP, Cruz RA, Martínez MJJ. Ecological analysis and description of the intestinal helminthes presents in Mexico City. *Vet Parasitol* **2005**; 127: 139-146.

**Elefant** GR, Shimizu SH, Arroyo SMC, Jacob CMA, Ferreira AW. A serological follow-up of toxocariasis patients after chemotherapy based on the detection of IgG, IgA, and IgE antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J of Clin Lab Analysis* **2006**; 20: 164-172.

**Enko** K, Tada T, Ohgo KO, Nagase S, Nakamura K, Ohta K, Ichiba S, Ujike Y, Nawa Y, Maruyama H, Ohe T, Kusano K. Fulminant Eosinophilic Myocarditis associated with visceral larva migrans caused by *Toxocara canis*. *Inf Circ J* **2009**; 73: 1344-1348.

**Espinoza** YA, Huapaya PE, Roldán WH, Jiménez S, Abanto EP, Rojas CA, Cavero YA, Gutiérrez CA. Seroprevalence of human toxocariasis in Andean communities from the Northeast of Lima, Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **2010**; 52(1): 31-36.

**Everts** B, Smits H, Hokke C, Yazdanbakhsh M. Helminths and dendritic cells: sensing and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses. *Eur J of Immun* **2010**; 40: 1525-1537.

**Escobar-Olan** C, Romero-Salas D, Ortega-Jiménez E, Díaz-Rivera P, Laderos-Sánchez C, García-Vázquez Z, Pérez de León AA. Gastrointestinal parasites infecting water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Veracruz, Mexico. 13<sup>th</sup> International Congress of Parasitology **2014**. México.

## **F**

**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 (5): 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**; 9 (12): 1312-1318.

**Fernández** AM, Martínez I, Gutiérrez M, Vázquez O, Pérez MJ, García Y. Serología para detección de helmintos extraintestinales en niños con alteración neurológica. *Rev Mex de Patol Clín* **1999**; 46: 4.

**Fernández** FC, Cantó GJ. Frecuencia de helmintos en intestinos de perros sin dueño sacrificados en la ciudad de Querétaro, Querétaro, México. *Vet Mex* **2002**; 33: 247-253.

**Fillaux** J y Magnaval, F. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Vet Parasitol* **2013**; 193: 327-336.

**Finsterer** J y Auer H. Neurotoxocarosis. *Rev Inst Med Trop* **2007**; 49 (5): 279-287.

**Finsterer** J, Kallab V, Auer, H. Neurotoxocariasis associated with lower motor neuron disease. Report of one case. *Rev Med Chile* **2010**; 138: 483-486.

**Fok** E, Szatmári V, Busák K, Rozgonyi F. Prevalence of intestinal parasites in dogs in some urban and rural areas of Hungary *Vet Q* **2001**; 23: 96-98.

**Foster** PS, Hogan SP, Yang M, Mattes J, Young IG, Matthaei KI, Kumar RK, Mahalingam S, Webb DC. Interleukin-5 and eosinophils as therapeutic targets for asthma. *Trends in Molecular Med* **2002**; 8: (4) 162-167.

**Fu** CJ, Chuang TW, Lin HS, Wu CH, Liu YC, Langinlur MK, Lu MY, Hsiao WW, Fan Ck. Seroepidemiology of *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in the capital area of the Republic of the Marshall Islands. *Infect Dis* **2014**; 14 (1): 261.

**Funada** MR, Pena HFJ, Soares RM, Amaku M, Gennari SM. Frequency of gastrointestinal parasites in dogs and cats referred to a veterinary school hospital in the city of São Paulo. *Arq Bras Med Vet Zootec* **2007**; 59 (5): 1338-1340.

## G

**Gasser** RB. A perfect time to harness advanced molecular technologies to explore the fundamental biology of *Toxocara* species. *Vet Parasitol* **2013**; 193: 353-364.

**Genchi** C, Falagiani P, Riva G. IgE and IgG antibodies in *Toxocara canis* infection. A clinical evaluation. *Annals of Allergy* **1988**; 61: 43-46.

**Giacometti** A, Cirioni O, Fortuna M, Osimani P, Antonicelli L, Del Prete MS, Riva A, D'Errico MM, Petrelli E, Scalise G. Environmental and serological evidence for the presence of toxocarosis in the urban area of Ancona, Italy. *Eur J Epidemiol* **2000** 16 (11): 1023-1026.

**Glickman** LT, Schantz PM, Dombroske ER, Cypess R. Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *Am J Trop Med Hyg* **1978**; 27: 495-498.

**Glickman** LT, Grieve RB, Lauria SS, Jones DL. Serodiagnosis of ocular toxocarosis: a comparison of two antigens. *J Clin Pathol* **1985**; 38: 103-107.

**Gortari** MC, Hours RA. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism on to nematode eggs. A review. *Mycol Progress* **2008**; 7: 221-238.

**Grencis** RK, Bancroft AJ. Interleukin-13. A Key Mediator in resistance to gastrointestinal-dwelling nematode parasites. *Clin Rev in Allergy and Immunol* **2004**; 26: 51-60.

**Gueglio** B, de Gentile L, Nguyen JM, Achard J, Chabasse D, Marjolet M. Epidemiologic approach to human toxocarosis in western France. *Parasitol Res* **1994**; 80 (6): 531-536.

**Guillespie** SH, Bidwell D, Voller A, Robertson BD, Maizels RM. Diagnosis of human toxocarosis by antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Pathol* **1993**; 46: 551-554.

## H

**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.

**Havasiová** K, Dubinský P, Stefancíková A. A seroepidemiological study of human *Toxocara* infection in the Slovak Republic. *J Helminthol* **1993**; 67(4): 291-296.

**Havasiová-Reiterová** K, Tomasoviková O, Dubinsky P. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol Res* **1995**; 81: 13-17.

**Hayashi** E, Tuda J, Imada M, Akao N, Fujita K. The high prevalence of asymptomatic *Toxocara* infection among schoolchildren in Manado, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **2005**; 36 (6): 1399-1406.

**Hernández MR**, Núñez FA, Pelayo DL. Potencial zoonótico de las infecciones por helmintos intestinales en perros callejeros de Ciudad de La Habana. *Rev Cubana Med Trop* **2007**; 59 (3): 234-240.

**Hoffmeister B**, Glaeser S, Flick H, Pornschleger S, Suttorp N, Bergmann F. Cerebral toxocariosis after consumption of raw duck liver. *Am J Trop Med Hyg* **2007**; 76 (3): 600-602.

**Holland CV** y Cox DM. *Toxocara* in the mouse: a model for parasite-altered host behaviour? *J of Helminthol* **2001**; 75: 125-135.

**Holland CV** y Smith HV. *Toxocara: The Enigmatic Parasite*. CABI, Cambridge MA **2006**; 3-12.

## I

**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 Migrants. *Korean J of Parasitol* **2007**; 45 (1): 19-26.

**Iglesias R**, Leiro J, Ubeira FM, Santamarina MT, Navarrete I, Sanmartín ML. Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitol Res* **1996**; 82: 378-381.

## J

**Janin-Noureddine V**, Barale T. *Toxocara* sp. in the playgrounds and sand pits in Besançon. Impact in urban hygiene. Prophylactic measurements for a clean city. *Ann Pharm Fr* **1997**; 55 (5): 224-227.

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

**Jaramillo ACJ**, Martínez MJJ. *Epidemiología veterinaria*. Ed. El Manual Moderno. **2010**; 112-113.

**Jia C**, Dong-Hui Z, Alasdair JN, Min-Jun X, Si-Yang H, Ming-Wei L, Chun-Ren W, Xing-Quan Z. Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. *Inf Genet and Evol* **2012**; 12: 1344-1348.

**Jin Z**, Akao N, Ohta N. Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasitol Int* **2008**; 57: 495-498.

**Jin Y**, Shen C, Huh S, Sohn W, Choi M Hong S. Serodiagnosis of Toxocariasis by ELISA using crude antigen of *Toxocara canis* larvae. *Korean J Parasitol* **2013**; 51 (4): 433-439.

## K

**Kanafani** ZA, Skoury A, Araj GF, El-Khoury M, Sawaya RA, Atweh SF, Kanj SS. Seroprevalence of toxocariosis in Lebanon: a pilot study. *Parasitol* **2006**; 132 (5): 635-639.

**Keegan** JD y Holland CV. Contamination of the hair of owned dogs with the eggs of *Toxocara* spp. *Vet Parasitol* **2010**; 173: 161-164.

**Kim** YH, Huh S. Prevalence of *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina* and *Dirofilaria immitis* in dogs in Chuncheon, Korea (2004). *Korean J Parasitol* **2005**; 43 (2): 65-67.

**Kimura** A, Morishima Y, Nagahama S, Horikoshi T, Edagawa A, Kawabuchi-Kurata 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 (10): 1409-1411.

**Kozan** E, Sevimli FK, Köse M, Eser M, Çiçek H. Examination of helminth contaminated wastewaters used for agricultural purposes in Afyonkarahisar. *Turkiye Parazitolojisi Dergisi* **2007**; 31(3): 197-200.

**Kumar** BV, Hafeez M. A study on the prevalence of *Toxocara* spp eggs at public places in Andhra Pradesh. *J Commun Dis* **1998**; 30 (3): 197-198.

## L

**Landis** R y Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **1977**; 159-174.

**Lloyd** S. Seroprevalence of *Toxocara canis* in sheep in Wales. *Vet Parasitol* **2006**; 137: 269-272.

**Lloyd** S, Amerasinghe PH, Soulsby E. Periparturient immune-suppression in the bitch and its influence on infection with *Toxocara canis*. *J Small Anim Pract* **1983**; 24: 237-247.

**Liao** CW, Sukati H, D´Lamini P, Chou CM, Liu YH, Huang YC, Chung MH, Mtsefwa JS, Jonato J, Chiu WT, Chang PW, 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 (1): 73-80.

**Lindmark** R, Thorén-Tolling K, Sjoquist J. Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *J Immunol Methods* **1983**; 12; 62 (1): 1-13.

**Logar** J, Soba B, Kraut A, Stirn-Kranjc B. Seroprevalence of *Toxocara* antibodies among patients suspected of ocular toxocariasis in Slovenia. *Korean J of Parasitol* **2004**; 42(3): 137-140.

**Lopes** RG, Borsuk S, Pappen F, Scaini CJ, Gallina T, Marreiro VM, da Rosa Farias NA, Vieira BM, Aires BME. *Toxocara* spp. seroprevalence in sheep from southern Brazil. *Parasitol Res* **2013**; 112: 3181-3186.

**López** J, Abarca K, Paredes P, Inzunza E. Intestinal parasites in dogs and cats with gastrointestinal symptoms in Santiago, Chile. *Rev Med Chil* **2006**; 134: 193-200.

**Luo** ZJ, Wang GX, Yang CI, 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 (2): 252-256.

## **M**

**Macuhova** K, Akao N, Fujinami Y, Kumagai T, Ohta N. Contamination, distribution and pathogenicity of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs from sandpits in Tokyo, Japan. *J Helminthol* **2012**; 13: 1-6.

**MagnaVal** JF, Glickman LT, Dorchie P, Morassin B. Highlights of human toxocariasis. *Korean J of Parasitol* **2001**; 39 (1): 1-11.

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

**Mahdi** NK, Ali HA. *Toxocara* eggs in the soil of public places and schools in Basrah, Iraq. *Ann Trop Med Parasitol* **1993**; 87(2): 201-205.

**Maikai** BV, Umoh JU, Ajanusi OJ, Ajogi I. Public health implications of soil contaminated with helminth eggs in the metropolis of Kaduna, Nigeria. *J Helminthol* **2008**; 82(2): 113-138.

**Maizels** RM. Exploring the immunology of parasitism—from surface antigens to the hygiene hypothesis. *Parasitol* **2009**; 136: 1549–1564.

**Maizels** RM. *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. *Vet Parasitol* **2013**; 193: 365-374.

**Maizels** RM y Hewitson JP. *Molecular Basis to Clinical Applications* Ed. Paul Kosma; Springer, New York, United States, **2011**.

**Malla** N, Aggarwal AK, Mahajan RC. A serological study of human toxocariasis in north India. *Natl Med J India* **2002**; 15(3): 145-147.

**Marino** GL, Bojanich MV, López MA, Alonso JM. Prueba de aidez de los anticuerpos IgG en la infección por *Toxocara canis*. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2011; 45 (2): 323-327.

**Márquez** NA, García BG, Alvarez FBE, Avila CLP, Santos AI, Díaz CDL, Sánchez MRM, Rodríguez BE, NogueraTB. *Trichuris vulpis* (Froelich, 1789) Infection in a Child: A Case Report. *Korean J Parasitol* **2012**; 50 (1): 69-71.

**Martínez-Barbabosa I**, Gutiérrez M, Fernández AM, Pérez MJ, Vásquez O, García Y. Reactividad serológica a antígeno de *Toxocara canis* en una población escolar. *Rev Mexicana de Patología Clínica* **1997**; 44: 85-89.

**Martínez-Barbabosa I**, Fernández PAM, Vásquez TO, Ruiz HA. Frecuencia de *Toxocara canis* en perros y áreas verdes del sur de la ciudad de México, D.F. *Vet Mex* **1998**; 29: (3).

**Martínez-Barbabosa I**, Gutiérrez CEM, Alpizar SEA, Pimienta LRJ. Contaminación parasitaria en heces de perros recolectadas en calles de la ciudad de San Cristobal de las Casas, Chiapas, México. *Vet Mex* **2008a**; 39 (2).

**Martínez-Barbabosa I**, Gutiérrez QM, Ruiz GLA, Gutiérrez CEM, Alpizar SEA, Valencia JLL, Gaona E. Prevalence of anti-*T.canis* antibodies in stray dogs in Mexico City. *Vet Parasitol* **2008b**; 153: 270–276.

**Martínez-Labat JP**. Detección del depósito de antígenos de excreción-secreción de larvas somáticas de *Toxocara canis* en los tejidos de jerbos con infección inducida (Tesis de Maestría). Estado de México (Cuautitlán Izcalli) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Univ Nacional Autónoma de México **2004**.

**Martínez-Labat JP**. Eosinofilia y evasión inmune en la toxocariosis. *AMMVEPE* **2005**; 16(2): 59-62.

**Martínez MFJ**, Hernández S, López CE, Becerra C, Acosta I, Martínez MA. Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health. *Vet Parasitol* **2007**; 143 (1): 7-13.

**Matsumura K**, Kazuta Y, Endo R, Tanaka K. The IgA antibody activities in relation to the parasitologic status of *Toxocara canis* in dogs. *Zentral Bakteriell Mikrobiol Hyg* **1983**; 256: 239-243.

**Matsumura K**, Kazuta Y, Endo R, Tanaka K. Detection of circulating toxocaral antigens in dogs by sandwich enzyme-immunoassay. *Immunol* **1984**; 51: 609.

**Meghji M** y Maizels RM. Biochemical properties of larval excretory-secretory (ES) glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol Biochem Parasitol* **1986**; 18: 155-170.

**Merdivenci A** y Sezen Y. The resistance of tortoises, *Testudo graeca*, against *Toxocara canis* infection. *Parasitenkunde* **1965**; 25: 387-392.

**Minnaar WN**, Krecek RC, Fourie LJ. Helminths in dogs from a peri-urban resource-limited community in Free State Province, South Africa. *Vet Parasitol* **2002**; 107: 343-349.

**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 of Clinical Microbiology* **2009**; 47 (6): 1712-1717.

**Mohamed AS**, Moore GE, Glickman LT. Prevalence of intestinal nematode parasitism among pet dogs in the United States (2003-2006). *J Am Vet Med Assoc* **2009**; 234 (5): 631-637.

**Morales OL**, López MC, Nicholls RS, Agudelo C. Identification of *Toxocara canis* antigens by Western blot in experimentally infected rabbits. *Rev Inst Med trop S Paulo* **2002**; 44 (4): 213-216.

**Morimatsu Y**, Akao N, Akiyoshi H, Kawazu T, Okabe Y, Aizawa H. A familial case of visceral larva migrans after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. *Am J Trop Med Hyg* **2006**; 75: 303-306.

**Muñoz-Guzmán MA** y Alba-Hurtado F. Secretory-excretory antigens of *Toxocara canis* recognized by puppies of the Mexico City metropolitan area. *Vet Mex* **2010**; 41 (1): 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. *Allergologia et Immunopathol* **2010**; 38 (3): 115-121.

**Muradian V**, Gennari SM, Glickman LT, Pinheiro SR. Epidemiological aspects of visceral larva migrans in children living at São Remo community, São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* **2005**; 134: 93-97.

## N

**Neves D**, Lobo L, Simoes PB, Cardoso L. Frequency of intestinal parasites in pet dogs from an urban area (Greater Oporto, northern Portugal). *Vet Parasitol* **2014**; 200 (3-4): 295-298.

**Nichols RL**. The etiology of visceral larva migrans. I. Diagnostic and morphology of infective second-stage *Toxocara canis* larvae. *J Parasitol* **1956**; 42, (4): 349-362.

**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 (7): 521-531.

## O

**Oteifa NM**, Moustafa MA. The potential risk of contracting toxocariasis in Heliopolis district, Cairo, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* **1997**; 27(1): 197-203.

**Othman RA**. Prevalence of *Toxocara canis* in dogs, North West Bank of Palestine. *Korean J Parasitol* **2011**; 49(2): 181-182.

**Overgaauw PAM**. Aspects of *Toxocara* Epidemiology: Toxocarosis in dogs and cats. *Critical Rev in Microb* **1997**; 23 (3): 233-251.

**Overgauw**, PAM. Prevalence of intestinal nematodes of dogs and cats in the Netherlands. *Vet Q* **1998**; 19 (1): 14-17.

**Overgauw** PAM, van Zutphen L, Hoek D, Yaya FO, Roelfsema J, Pinelli, van Knapen F, Kortbeek LM. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Vet Parasitol* **1999**; 163: 115-122.

## **P**

**Page** AP, Maizels RM. Biosynthesis and glycosylation of serine/threonine-rich secreted proteins from *Toxocara canis* larvae. *Parasitol* **1992a**; 105: 297-308.

**Page** AP, Rudin W, Fluri E, Blaxter ML, Maizels RM. *Toxocara canis*: a labile antigenic coat overlying the epicuticle of infective larvae. *Exp Parasitol* **1992b**; 75: 72-86.

**Palmer** CS, Thompson RCA. Traub RJ, Rees R, Ian D. Robertson National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. *Vet Parasitol* **2008**; 151 181-190.

**Papazahariadou** M, Founta A, Papadopoulos E, Chliounakis S, Antoniadou-Sotiriadou K, Theodorides Y. Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres Prefecture, Northern Greece. *Vet Parasitol* **2007**; 148 (2): 170-173.

**Parsons** JC, Bowman DD, Grieve RB. Pathological and haematological responses of cats experimentally infected with *Toxocara canis* larvae. *Int J for Parasitol* **1989**; 19 (5): 479-488.

**Ponce-Macotella** 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-Macotella** 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.

## **R**

**Rai** SK, Uga S, Ono K, Nakanishi M, Shrestha HG, Matsumara T. Seroepidemiological study of *Toxocara* infection in Nepal. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **1996**; 27 (2): 286-290.

**Radman** NE, Archelli SM, Burgos L, Fonrouge RD, del Valle GM. *Toxocara canis* en caninos. Prevalencia en la ciudad de La Plata. *Acta Bioquím Clin Latinoam* **2006**; 40 (1): 41-44.

**Reyna-Figueroa** J, Limón-Rojas AE, Nava-Jácome R. Invasión intestinal por *Toxocara canis* como diagnóstico diferencial de linfoma: informe de un caso. *Enf Inf Microb* **2007**; 27 (3): 100-102.

**Reiterová** K, Toma O, Ovicová S, Dubinsky P. Influence of maternal infection on offspring immune response in murine larval toxocarasis. *Parasite Immunol* **2003** 25: 361-368.

**Revajová V**, Levkut M., Aldawek1 AM, Herich R, Dvorožňáková E, Krupicer I. Immunological changes after multiple *Toxocara canis* infection of lambs. *Helminthol* **2006**; 43; (2): 69-75.

**Reyes-Climaco L**, Maldonado-Domínguez MCI, Romero-Nuñez C., Morones-Soto ME. Presence of anti-*Toxocara canis* antibodies in equine. 13<sup>th</sup> International Congress of Parasitology **2014**. México.

**Riggio F**, Mannella R, Ariti G, Perrucci S. Intestinal and lung parasites in owned dogs and cats from central Italy. *Vet Parasitol* **2012**; 193 (1-3): 78-84.

**Robertson BD**, Bianco AE, McKerrow JH, Maizels RM. Proteolytic enzymes secreted by larvae of the nematode *Toxocara canis*. *Exp Parasitol* **1989**; 69: 30-36.

**Robertson BD**, Burkot TR, Gillespie SH, Kennedy MW, Wambait Z, Maizels RM. Detection of circulating parasite 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 (1-2): 85-93.

**Rodríguez-Caballero A**. Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales especie-específicos de *Toxocara canis*. Tesis de Maestría. México. **2012**. Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, UNAM.

**Rodríguez-Caballero A**, Luna-Ochoa RI, Ponce-Macotela M, Peralta-Abarca GE, Martínez-Gordillo MN. A simple and inexpensive method for retrieving fertilized *Toxocara canis* eggs. *Parasitol Res* **2007**; 101: 829-832.

**Rodríguez-Vivas RI**, Cob-Galera LA, Domínguez-Alpizar JL. Frecuencia de parásitos gastrointestinales en animales domésticos diagnosticados en Yucatán, México. *Rev Biomed* **2001**; 12: 19-25.

**Rojekittikhun W**, Nuamtanong S, Anantaphruti MT, Pubampen S, Maipanich W, Visedsuk K. *Toxocara* and *Gnathostoma* among stray canines in Bangkok. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **1998**; 29 (7): 44-47.

**Roldán WH**, Cornejo W, Espinoza YA. Evaluation of the dot enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with standard ELISA for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* **2006**; 101 (1): 71-74.

**Roldán WH** y Espinoza YA. Evaluation of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for the confirmatory serodiagnosis of human toxocariasis *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**; 104 (3): 411-418.

**Romano N**, Nor Azah MO, Rahmah N, Lim Y AL, Rohela M. Seroprevalence of toxocariasis among Orang Asli (Indigenous people) in Malaysia using two immunoassays. *Trop Biomed* **2010**; 27(3): 585-594.

**Romero** NC, García CAC, Mendoza MGD, Torres CNC, Ramírez DN. Contaminación por *Toxocara* spp. en parques de Tulyehualco, México. *Rev Cient* **2009**; 19 (3): 253-256.

**Romero** NC, Mendoza MGD, Yañez AS, Ponce-Macotela M, Bustamante MP, Ramírez DN. Prevalence and risk factors associated with *Toxocara canis* infection in children. *The Scientific World J* **2013**; Artic. Id. 572089: 1-4.

**Rubel** D, Zunino G, Santillan 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.

## S

**Sager** H, Moret CS, Grimm F, Deplazes P, Doherr MG, Gottstein B. Coprological study on intestinal helminths in Swiss dogs: temporal aspects of anthelmintic treatment. *Parasitol Res* **2006**; 98 (4): 333-338.

**Sahu** S, Samantha S, Sudhakar NR, Raina OK, Gupta SC, Maruya PS, Pawde AM, Kumar A. Prevalence of canine toxocarosis in Bareilly, Uttar Pradesh, India. *J Parasit Dis* **2014**; 38 (1): 111-115.

**Salem** G, Schantz P. *Toxocara* visceral larva migrans after ingestion of raw lamb liver. *Clin Infect Dis* **1992**; 15: 743-744.

**Sariego** K, Kanobana R, Junco K, Vereecken FA, Nuñez K, Polman M, Bonet L, Rojas. Frequency of antibodies to *Toxocara* in Cuban schoolchildren. *Trop Med and International Health* **2012**; 17 (6): 711-714.

**Schantz** PM y Biaggi FF. Coexistence of *Toxocara* and *Toxascaris* in dogs in Mexico City. *J Parasitol* **1968**; 54: 185-186.

**Schantz** PM y Glickman LT. Ascaridos de perros y gatos: un problema de salud pública y de medicina veterinaria. *Bol of Sanit Panam* **1983**; 94 (6): 571-585.

**Schnieder** T, Laabs EM, Welz C. Larval development of *Toxocara canis* in dogs. *Vet Parasitol* **2011**; 175 (3-4): 193-206.

**Schurer** JM, Hill JE, Fernando C, Jenkins EJ. Sentinel surveillance for zoonotic parasites in companion animals in indigenous communities of Saskatchewan. *Am J Trop Med Hyg* **2012**; 87(3): 495-8.

**Schurer** JM, Ndao M, Skinner S, Irvine J, Elmore SA, Epp T, Jenkins EJ. Parasitic zoonoses: one health surveillance in northern Saskatchewan. *Negl Trop Dis* **2013**; 7(3): 21-41.

**Scothorn** MW, Koutz FR, Groves HF. Prenatal *Toxocara canis* infection in pups *J Am Vet Med Assoc* **1965**; 146: 45-48.

**Shalaby** HA, Abdel-Shafy S, Derbala AA. The role of dogs in transmission of *Ascaris lumbricoides* for humans. *Parasitol Res* **2010**; 106 (5): 1021-1026.

**Shea-Donohue** T, Stiltz J, Zhao A, Notari L. Mast Cells. *Currents in Gastroenterology Reports* **2010**; 12: 349-357.

**Smith** MHD, Beaver PC. Persistence and distribution of *Toxocara* larvae in the tissues of children and mice. *Pediatrics* **1953**; 12 (5): 491-497.

**Sommerfelt** IE, Santillán G., Mira G, Ribicich M, Betti A, De Torres R. *Toxocara canis* infections in a pig model: immunological, haematological and blood biochemistry responses. *J of Helminthol* **2006**; 80: 73-77.

**Speiser** F y Gottstein B. A collaborative study on larval excretory/secretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human toxocariasis with E.L.I.S.A. *Acta Trop* **1984**; 41: 361-372.

**Speiser** F, Weiss N. Comparative evaluation of 7 helminth antigens in the enzyme-linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.). *Experientia* **1979**; 35: 1512-1514.

**Stensvold** CR, Skov J, Møller LN, Jensen PM, Kapel CMO, Petersen E, Nielsen HV. Seroprevalence of Human Toxocariasis in Denmark. *Clin and Vaccine Immunol* **2009**; 16 (9): 1372-1373.

**Strube** C, Heuer L, Janecek E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Vet Parasitol* **2013**; 193: 375-389.

**Styles** TJ. Incidence of *Toxocara canis* and other helminth parasites of dogs in Mexico City. *J Parasitol* **1967**; 53: 822-823.

**Sviben** M, Cavlek TV, Missoni EM, Galinovic GM. Seroprevalence of *Toxocara canis* infection among asymptomatic children with eosinophilia in Croatia. *J Helminthol* **2009**; 83 (4): 369-371.

## T

**Taira** K, Saeed I, Lind P, Murrell KD, Kapel CMO. Population dynamics of *Toxocara canis* in pigs receiving a single or multiple infection. *Parasitol* **2003**; 127: 593-602.

**Takamoto** M, Wang ZX, Watanabe N, Matsuzawa A, Nariuchi H, Sugane K. Eosinophilia, IgE production, and cytokine production by lung T cells in surface CD4- deficient mutant mice infected with *Toxocara canis*. *Immunol* **1998**; 95: 97-104.

**Talvik** H, Moks E, Mägi E, Jarvis T, Miller I. Distribution of *Toxocara* infection in the environment and in definitive and paratenic hosts in Estonia. *Acta Vet Hung* **2006**; 54(3): 399-406.

**Tay J**, Gutiérrez M, Lara R, Velasco O. Parasitología médica de Tay. 8a ed. Ed Méndez México, **2010**, 40-43.

**Traviezo-Valles L**, Dávila J, Rodríguez R, Perdomo O, Pérez J. Contaminación enteroparasitaria de lechugas expandidas en mercados del estado Lara. Venezuela. Parasitol Latinoam **2004**; 59: 167-170.

**Tylkowska A**, Pilarczyk Vásquez TO, Ruiz HA, Martínez BI, Merlín MPN, Tay ZJ, Pérez TA. Soil contamination with *Toxocara* sp. eggs in public parks and home gardens from Mexico City. Bol Chil Parasitol **1996**; 51(3-4): 54-58.

## U

**Ugbomoiko US**, Ariza L, Heukelbach J. Parasites of importance for human health in Nigerian dogs: high prevalence and limited knowledge of pet owners. BMC Vet Research **2008**; 4 (49): 1-9.

**Unlü H y Eren H**. Gastro-intestinal helminths detected by fecal examination in stray dogs in the Aydin province. Turkiye Parazitol Derg **2007**; 31(1): 46-50.

**Uspenskii AV**, Peshkov RA, Gorokhov VV, Gorokhova EV. Toxocariasis under the present conditions. MedParazitol **2011**; (2): 3-6.

## V

**Van Knapen F**, van Leusden J, Polderman AM, Franchimont JH. Visceral Larva Migrans: Examinations by Means of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Human Sera for Antibodies to Excretory-Secretory Antigens of the Second-Stage Larvae of *Toxocara canis*. Z Parasitenkd **1983**; 69: 113-118.

**Vásquez R**, Campo DVH, Vergara CD, Rivera OC, Harold DJ. Prevalencia de *Toxocara canis* y otros parásitos intestinales en caninos en la ciudad de Popayán. Rev Fac Ciencias Salud **2004**; 7: 4.

## W

**Webster GA**. A report on *Toxocara canis* Werner, 1782. Canadian J of Comparative Med **1958**; XXII; (8): 272-279.

**Wiwanitkit V**, Waenlor W. The frequency rate of *Toxocara* species contamination in soil samples from public yards in a urban area "Payathai", Bangkok, Thailand. Rev Inst Med Trop Sao Paulo **2004**; 46(2): 113-114.

**Wnukowska N**, Dzbeński TH. Studies on the development and role of some cell-mediated immune responses in experimental toxocarosis in mice. Acta Parasitológica **2008**; 53 (2): 205-210.

**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 (4): 552–557.

**Wraith** DC. Role of interleukin-10 in the induction and function of natural and antigen-induced regulatory T cells. *J of Autoimmunity* **2003**; 20: 273-275.

## **X**

**Xhaxhiu** D, Kusi I, Rapti D, Kondi E, Postoli R, Rinaldi L, Dimitrova ZM, Visser M, Knaus M, Rehbein S. Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania. *Parasitol Res* **2011**; 108 (2): 341-353.

## **Y**

**Yacob** HT, Ayele T, Fikru R, Basu AK. Gastrointestinal nematodes in dogs from DebreZeit, Ethiopia. *Vet Parasitol* **2007**; 148 (2): 144-8.

**Yoshikawa** M, Nishofuku M, Moriya K, Uji Y, Ishizaka S, Kasahara K, Mikasa K, Hirai T, Mizuno Y, Ogawa S, Nakamura T, Maruyana H, Akao N. A familiar case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver. *Parasitol Int* **2008**; 57 (4) 525-529.

## **Z**

**Zarnowska** H, Boreka A, Gawor J, Marczyńska M, Dobosz S, Basiak W. A serological and epidemiological evaluation of risk factors for toxocariasis in children in central Poland. *J Helminthol* **2008**; 82 (2): 123-127.

**Zibaei** M, Firoozeh F, Bahrami P, Sadjjadi SM. Investigation of Anti-*Toxocara* antibodies in epileptic patients and comparison of two methods: ELISA and Western Blotting. *Epilepsy Res Treatment* **2013**; article ID 156815, 1-5.

**Zare-Bidaki** M, Mobedi I, Sadeghieh-Ahari S, Habibzadeh S, Naddaf SR, Siavashi MR. Prevalence of Zoonotic Intestinal Helminths of Canids in Moghan Plain, Northwestern Iran. *Iranian J Parasitol* **2010**; 5 (2): 42-51.

## 12. APÉNDICES

### 12.1 Reactivos

#### 12.2.1 Reactivos para ELISA

##### **Solución de carbonatos (0.1 M, pH 9.6):**

- 3.18 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (carbonato de sodio).
- 5.68 g de  $\text{NaHCO}_3$  (bicarbonato de sodio).

- I) Los reactivos se mezclaron en 800 mL de agua destilada grado II.
- II) La solución se ajustó a pH 9.6 y se aforó a 1.0 L. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

##### **Solución salina de fosfatos (PBS 10x).**

- 80.06 g de  $\text{NaCl}$  (cloruro de sodio).
- 2.0 g de  $\text{KCl}$  (cloruro de potasio).
- 6.12 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (fosfato disódico anhidro).
- 1.9 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (fosfato de potasio monobásico).

- I) Los reactivos se mezclaron en 800 mL de agua destilada grado II.
- II) La solución se ajustó a pH 7.2 y se aforó a 1.0 L.
- III) Se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.
- IV) La solución PBS empleada en este trabajo fue 1x, por lo que se agregaron 100 mL de PBS 10x y se aforó con agua destilada grado II a 1 L. la solución se ajustó a a pH 7.2 y se esterilizó, se conservaron en frascos de vidrio a temperatura ambiente hasta su uso

##### **Solución de lavado (PBS-Tween 20 al 0.05%).**

- 500  $\mu\text{L}$  de Tween 20.
- 100 mL de PBS 10x pH 7.2.

- I) Los reactivos se aforaron a 1 L de agua destilada grado II.
- II) Se almacenó a 4° C hasta su uso.

**Solución de lavado (NaCl 0.9%-Tween 20 al 0.05%).**

- 500 µL de Tween 20.
- 1.0 L de solución salina estéril al 0.9% (Solución CS-PISA®).

I) Los reactivos se mezclaron y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

**Solucion de bloqueo I (para una placa de ELISA).**

- 0.2 g de gelatina de piel porcina (Sigma®).
- 20 ml de solución PBS-Tween 20 al 0.05%.

I) Se calentó la solución PBS-Tween 20 al 0.05% en baño María.

II) Se agregó la gelatina y se agitó hasta disolverla.

III) Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se realizó en el momento que se realizó el ensayo.

**Solucion de bloqueo II (para una placa de ELISA).**

- 1.0 g de gelatina de piel porcina (Sigma®).
- 20 mL de solución PBS-Tween 20 al 0.05%.

I) Se calentó la solución PBS-Tween 20 al 0.05% en baño María.

II) Se agregó la gelatina y se agitó hasta disolver.

III) Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se usó en el momento que se realizó el ensayo.

**Solucion para dilución (para una placa de ELISA).**

- 0.1 g de gelatina de piel porcina (Sigma®).
- 20 mL de solución PBS Tween 20 al 0.05%.

I) Se calentó la solución PBS-Tween 20 al 0.05% en baño María.

II) Se agregó la gelatina y se agitó hasta disolver.

III) Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se usó en el momento que se realizó el ensayo.

**Solución de cromógeno** (para una placa de ELISA).

- 5 mL de citrato de sodio 0.1 M.
- 5 mL de ácido cítrico 0.1 M.
- 4 µg de ortofenildiamina (OPD).
- 4 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%.

I) Se preparó la solución agregando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% al final y se usó inmediatamente después de su preparación.

**12.2.2 Medio de cultivo**

**RPMI 1640 (GIBCO®).**

- I) Se vació el medio en polvo con 2 g de NaHCO<sub>3</sub> en un vaso de precipitado de 1 L.
- II) Se agregaron 800 mL de agua destilada grado II y se disolvió.
- III) Se ajustó el pH a 7.2-7.4 con HCl 1N (gota a gota).
- IV) Una vez que se alcanzó el pH requerido, se aforó a 1L con agua destilada grado II.
- V) Se filtró al vacío con una membrana de 0.22 µm.
- VI) Se agregaron los antibióticos (penicilina/estreptomicina), se homogeneizó y se hicieron alícuotas de 250 mL.
- VII) Se dejó a prueba de esterilidad a 37°C por una noche.
- VIII) Se guardó a 4°C hasta su uso.