



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Immunodetección de *Toxocara canis* en disponentes del  
Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A :**

**DULCE MARÍA MOLINA MORENO**



**DIRECTOR DE TESIS:  
M. en C. AARÓN RODRÍGUEZ CABALLERO**

**Ciudad Universitaria, CDMX      2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

*El presente trabajo está dedicado a la memoria de Gerardo Valverde Sánchez, médico, epidemiólogo y amigo de la familia. Sé que estará acompañándome en mi examen profesional como lo prometió.*

# Agradecimientos Institucionales

---

Esta tesis fue posible gracias a:

El protocolo *Búsqueda de la asociación entre la concentración de antígenos circulantes de la fase larvaria de Toxocara canis con los diferentes niveles de gravedad del asma en pacientes pediátricos*, aprobado por CoNaCyT, en la Convocatoria S0008-2015-1 del fondo FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE, No. 262237.

El personal del Servicio de Banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría:

Quím. Roberto Enrique Jaloma Avendaño y Dra. Karla Maldonado Silva.

El personal del Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría:

Dra. Martha Ponce Macotela, Biól. Mario Noé Martínez Gordillo, Téc. Lab. Gustavo Peralta y M. C. Alma Leticia Chávez Zea, por todos sus consejos, enseñanzas y conocimientos.

El Comité de Evaluación:

Dra. Perla María del Carmen Acevedo Ramírez, Dr. Daniel Sokani Sánchez Montes, M. en C. Aarón Rodríguez Caballero, M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán y M. en C. Agustín Carmona Castro, por su disposición al revisar el presente escrito y sus detalladas correcciones.

# Agradecimientos Personales

---

Al Universo por sus maneras misteriosas de actuar y a la Magia que es la energía en la que creo y que me mueve cada día.

A mi madre por enseñarme el modelo de mujer que aspiro a ser: una mujer fuerte, valiente, dedicada y entregada.

A mi padre por darme su apoyo a pesar de la distancia y las diferencias, por enseñarme a dar siempre mi mejor esfuerzo y dejar una marca a donde sea que vaya.

A Rodolfo, que es como un padre para mí por brindarme su apoyo y su cariño cuando mi mundo colapsó.

A Laura, mi maestra espiritual, por ayudarme a encontrar la luz en medio de la oscuridad.

A mis hermanas del alma Diana, Alejandra, Sandra, Laura, Vanessa, Érika y Samantha por ayudarme a encontrar mi lugar en el mundo compartiendo su danza conmigo y por ayudarme a pensar menos y a bailar más.

A mi tutor Aarón Rodríguez Caballero por todas sus enseñanzas, sus consejos, su paciencia, su dedicación, su amistad y paternidad académica.

A mi maestro Agustín Carmona Castro por brindarme siempre sus conocimientos, su apoyo y su amistad.

A mis amigos del taller Heiri y Santiago, por hacer agradables y llevaderas las jornadas en el laboratorio con su amistad y su cariño.

A mis amigos y colegas Ana, José Manuel y Víctor, por contagiarme su pasión por la biología, compartir sus conocimientos conmigo y brindarme su amistad.

A mis amigos de las mesitas Quinantzy, Carlos, Jesús, Giovanni, Mishell, Charly, Guillermo, Ilhuicamina y los demás miembros del Club TCG FCiencias, por todos los duelos, las risas y los momentos de ocio.

Finalmente a mí amada alma gemela, Jorge Torres Hernández, por atravesar océanos de tiempo para reencontrarme y enseñarme que todo puede ser diferente... Gracias por acompañarme al final de este largo camino e invitarme a iniciar uno nuevo.

## Contenido

Dedicatoria .....	2
Agradecimientos Institucionales .....	3
Agradecimientos Personales .....	4
1. Resumen .....	8
2. Introducción.....	9
2.1 Taxonomía de <i>Toxocara canis</i> .....	10
2.2 Características generales del Phylum Nematoda .....	10
2.3 Desarrollo de los diferentes estadios de <i>T. canis</i> .....	12
2.3.1 Huevo .....	12
2.3.2 Huevo larvado .....	13
2.3.3 Larva .....	14
2.3.4 Adulto.....	15
2.3.5 Hospedero definitivo.....	16
2.3.6 Hospedero paraténico .....	16
2.4 Ciclo de vida de <i>T. canis</i> .....	17
2.5 Manifestaciones clínicas .....	20
2.5.1 En cánidos .....	20
2.5.2 En humanos.....	20
2.5.2.1 Larva <i>migrans</i> visceral (LMV) .....	21
2.5.2.2 Larva <i>migrans</i> ocular (LMO) .....	21
2.5.2.3 Neurotoxocariasis (NT).....	21
2.5.2.4 Toxocariasis oculta (TO) .....	22
2.6 Respuesta inmune a <i>T. canis</i> en el hospedero definitivo y el paraténico .....	23
2.7 Diagnóstico.....	25
2.7.1 En cánidos .....	25
2.7.2 En humanos.....	25
2.8 Epidemiología.....	28
2.8.1 Epidemiología de la toxocariasis en cánidos.....	28
2.8.2 Epidemiología de <i>larva migrans</i> en humanos.....	28

2.8.3 Factores de riesgo .....	29
2.9 Prevención .....	31
3. Justificación .....	32
4. Pregunta de Investigación .....	32
5. Objetivo Principal .....	32
6. Objetivos Específicos .....	32
7. Diseño del estudio .....	33
8. Población Objetivo.....	33
8.1 Criterios de selección .....	33
8.1.1 Criterios de inclusión.....	33
8.1.2 Criterios de exclusión.....	33
9. Material y Método.....	34
9.1 Obtención de material biológico .....	34
9.1.1 Obtención de sueros .....	34
9.1.2 Obtención de adultos de <i>T. canis</i> y huevos larvados.....	34
9.1.3 Obtención de larvas de 2º estadio .....	34
9.1.4 Antígenos de excreción-secreción (E/S) de larvas .....	35
9.2 Pruebas serológicas .....	36
9.2.1 ELISA directo con Kit comercial.....	36
9.2.2 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG .....	36
9.2.3 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgM .....	36
9.2.4 ELISA competitivo, adsorción de los sueros con antígeno de <i>Ascaris suum</i> .....	37
9.2.5 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgE.....	37
9.2.6 ELISA para determinar el índice de avidéz.....	38
9.2.7 ELISA directo para la detección de Ag E/S <i>T. canis</i> (Captura de Antígeno) .....	38
9.3 Análisis Estadístico .....	39
10. Resultados .....	40
10.1 Obtención de Antígeno.....	40
10.2 Obtención de sueros y procesamiento de los datos .....	42
10.3 ELISA para detección de anticuerpos IgG anti- <i>T. canis</i> con un Kit comercial.....	42

10.4 ELISA-INP estandarizado para la detección de anticuerpos IgG, IgM e IgE anti- <i>T. canis</i> y Captura de Ag .....	43
10.5 ELISA para determinar el índice de avidéz.....	45
10.6 ELISA competitivo, adsorción de los sueros con antígeno de <i>A. suum</i> (reacción cruzada).....	46
10.7 Evaluación de variables epidemiológicas .....	46
11. Discusión.....	49
12. Conclusiones.....	53
13. Perspectivas.....	54
14. Anexos .....	57
14.1 Anexo I. Carta de consentimiento informado para sujetos sanos .....	57
14.2 Anexo II. Reactivos .....	60
15. Referencias .....	66

## 1. Resumen

*Toxocara canis* es un nematodo específico de cánidos con alta prevalencia en cánidos juveniles. Los humanos son hospederos accidentales, ocasionando larva *migrans* visceral y ocular. Uno de los métodos diagnósticos para los humanos es el inmunológico, sin embargo existen pocos estudios de seroprevalencia en la población mexicana y no hay reportes de donadores de sangre seropositivos. El objetivo de este trabajo fue determinar la seroreactividad ante larvas de *T. canis* en donadores del banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría. Se obtuvieron muestras de 286 donadores, la detección de IgG se realizó con un kit comercial y con un kit casero. Los sueros también fueron pre-adsorbidos con *Ascaris suum* con el fin de descartar reacciones cruzadas. Adicionalmente, se determinó el índice de avidéz y se realizaron los ELISA para la detección de IgM, IgE y captura de Ag para diferenciar entre infección aguda y crónica. Los resultados mostraron que se detectó una seroreactividad ante IgG en 10% (30/286) de las muestras analizadas, mientras que con el kit casero fue de 9% (27/286). En contraste, se detectó IgM en 7% (20/286) de los sueros y de estos, 7 fueron positivos tanto para IgG como para IgM. En relación a la detección de anticuerpos IgE sólo 4 sueros fueron positivos, sin embargo, ninguno de estos sueros coincide positivamente con las demás pruebas realizadas. Con excepción de 3 muestras, en las demás se encontró un índice de avidéz mayor al 50%. En el caso del ELISA competitivo, antes de la adsorción se encontró un 10% (30/286) sueros positivos; después de la adsorción de los sueros con el Ag de *A. suum* 45 fueron positivos, con respecto a la captura de antígeno ninguna muestra fue positiva. Finalmente, con el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre las variables epidemiológicas, pero hay más donadores masculinos que son positivos, así como los que tienen un nivel educativo básico y en los habitantes de zonas rurales de la CDMX. Este estudio permite concluir la existencia de seroreactividad a *T. canis* en sueros de donantes del Banco de Sangre. La positividad a IgG pero no a otra prueba y el índice de avidéz superior al 50% indica memoria inmunológica en esta población.

## 2. Introducción

*Toxocara canis* es un nematodo, geohelminto cuyos hospederos definitivos son los cánidos. La toxocariasis es altamente prevalente en cachorros porque se pueden infectar por vía transplacentaria y/o por vía transmamaria; otras vías de infección son por la ingestión de los huevos larvados que se encuentran en el ambiente y por depredación de hospederos paraténicos (Traversa 2012).

El ser humano puede adquirir la infección por geofagia, por la ingesta de alimentos o agua contaminada y por la ingesta de carne o vísceras infectadas e insuficientemente cocidas (Rojas et al., 2017). *T. canis* produce síndromes denominados como larva *migrans* visceral, larva *migrans* ocular, toxocariasis cerebral y encubierta (Ma et al., 2018).

El diagnóstico de esta parasitosis en humanos se realiza mediante ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) que detectan IgG, IgM o IgE (Fillauxa y Magnavalc, 2013; Smith et al., 2009). Se ha propuesto la adsorción de suero con antígenos de *Ascaris suum* y *Ascaris lumbricoides* para evitar reacciones cruzadas (Muñoz-Guzmán et al., 2010), y el índice de avidéz de la IgG para discriminar entre infección aguda o crónica (Boldiš et al., 2015). De acuerdo con un estudio de revisión sistemática realizado en América del Norte, México es el país que tiene mayor seroprevalencia, del 4.7% al 30.8% en comparación con Canadá, que está entre un 0.6% y un 13.4% (Lee et al., 2014).

Existen escasos reportes de captura de antígeno (Guillespie et al., 1993), en el Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría (INP) se cuenta con un anticuerpo monoclonal que solamente reconoce antígenos de larvas de *T. canis*; con la detección del antígeno en sangre periférica se puede inferir que la infección es reciente (Aguila et al., 1987; Rodríguez et al., 2015).

El reporte de un modelo de interacción hospedero-parásito, mostró que se puede identificar una infección reciente si solamente se detectan antígenos de larvas de *T. canis*, infección activa cuando se detectan antígenos junto con IgG e infección crónica o memoria inmunológica cuando únicamente se encuentra IgG (Rodríguez-Caballero et al., 2017).

## 2.1 Taxonomía de *T. canis* (Ruggiero et al, 2015).

Reino: Metazoa (Linnaeus, 1758)

Phylum: Nematoda (Diesing, 1861)

Clase: Chromadorea (Inglis, 1983)

Orden: Spirurida (Railliet, 1914)

Suborden: Ascaridina (Inglis, 1983)

Superfamilia: Ascaroidea (Baird, 1853)

Familia: Ascarididae (Baird, 1853)

Subfamilia: Toxocarinae (Osche, 1958)

Género: *Toxocara* (Stiles, 1905)

Especie: *T. canis* (Werner, 1782)

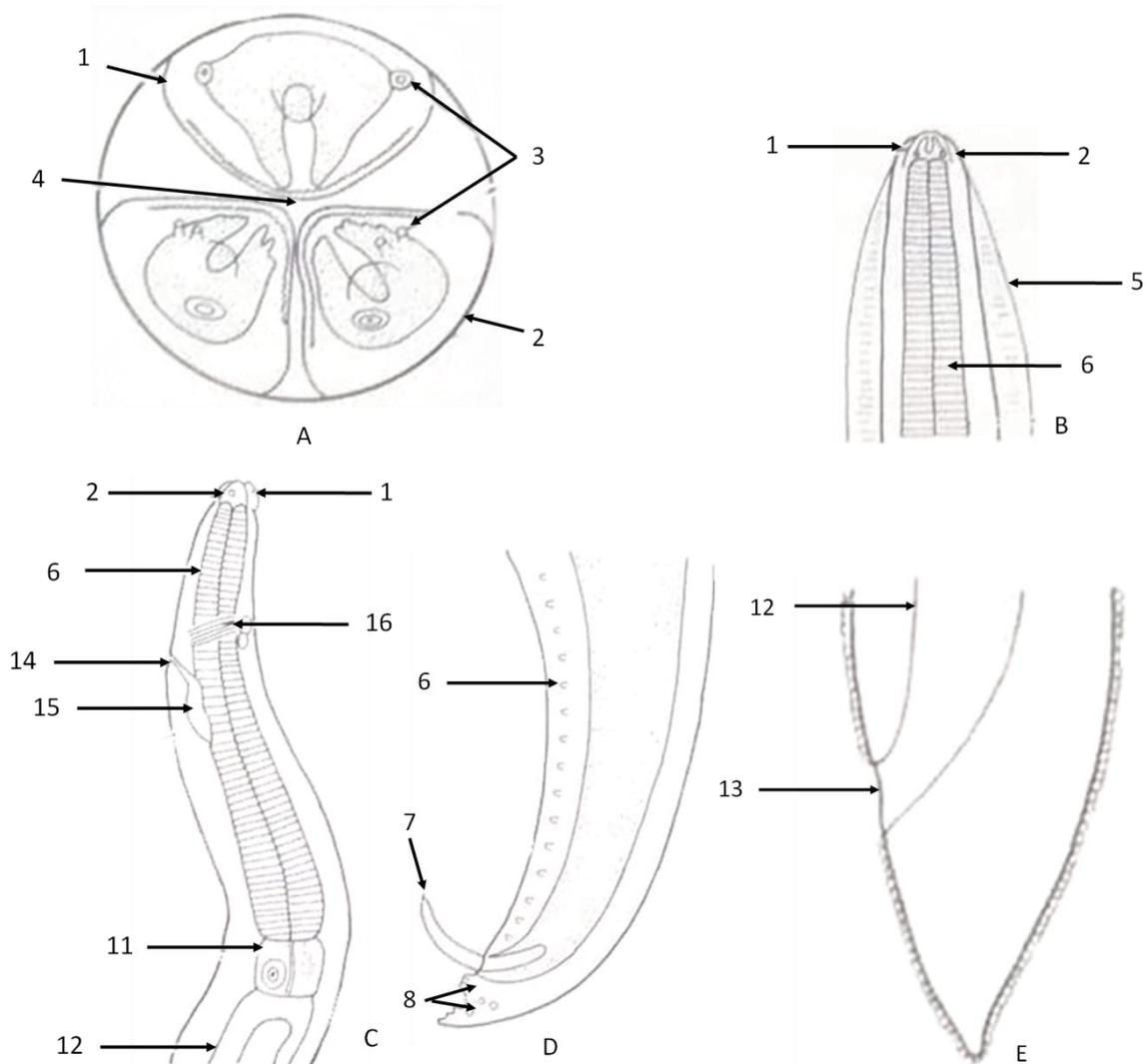
## 2.2 Características generales del Phylum Nematoda

Son gusanos cilíndricos, no segmentados. Su pared corporal está formada por tres capas: cutícula, hipodermis y una capa interior de células musculares. Presentan una falsa cavidad corporal o pseudoceloma, aparato digestivo completo, sistema excretor, nervioso y reproductor. Son dioicos y tienen dimorfismo sexual marcado, en los machos la cloaca se encuentra en el extremo posterior, la cual está curvada centralmente, y presenta una estructura denominada bursa copulatriz, la cual tiene ornamentaciones, papilas y espículas. En las hembras la vulva se localiza en la región superior del cuerpo y el ano en la parte inferior. Presentan receptores táctiles, quimiorreceptores y mecanorreceptores, en organismos de vida libre hay fotorreceptores (Nadler y Hudspeth, 1998). Los organismos de la Clase Chromadorea, en general, se caracterizan por tener cuerpos con anillos, anfidios (quimiorreceptores) de formas elaboradas y espiraladas, de tres a cinco glándulas esofágicas y faringes muy sofisticadas (Wijova et al 2006).

Los nemátodos del Orden Spirurida poseen normalmente dos labios laterales en la región bucal y el orificio bucal puede poseer dientes. Los anfidios están generalmente situados en posición lateral, aunque en algunos grupos pueden localizarse inmediatamente por detrás de los labios. El esófago se divide normalmente en una porción anterior muscular y una porción posterior glandular dilatada. Las larvas poseen en general una espina cefálica que usan para perforar la envoltura del huevo, y un fasmidio en forma de poro en la cola (Chabaud & Bain, 1994).

Las especies del género *Toxocara* pueden ser distinguidas entre sí teniendo como base la morfología de los labios, las aletas cervicales, la longitud de las espículas y las características del aparato reproductor femenino (Nestor et al, 2000). *T. canis* se caracteriza por su cuerpo cilíndrico, de color blanquecino, con estrías transversales

irregulares y alas cervicales estrechas y lanceoladas, que se extienden desde la extremidad anterior a lo largo de los márgenes laterales (Bush et al., 2001). El macho mide de 4 a 6 cm con un extremo caudal curvado digitiforme, con dos series de 20-30 papilas preanales y cinco papilas postanales a cada lado de la cloaca (Figura 1). La hembra es mayor llegando a alcanzar de 6 a 10 cm, con un extremo posterior romo. La vulva se encuentra situada entre la quinta y sexta partes anteriores del cuerpo del gusano (Figura 1) (Nestor et al, 2000; Sprent, 1999, Guillespie, 1988).

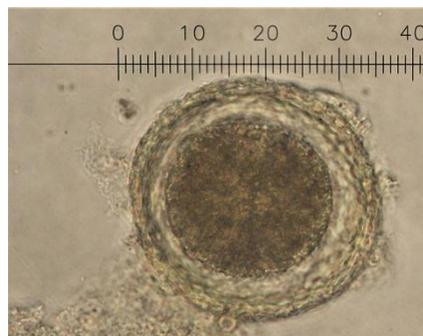


**Figura 1. Morfología de *T. canis*.** A: vista frontal de la región anterior; B: vista dorsal de la región anterior; C: corte lateral de la región anterior; D: corte lateral de la región terminal del macho; E: corte lateral de la región terminal de la hembra. 1 Labio dorsal, 2 labio lateroventral, 3 papila labial, 4 boca, 5 ala cervical, 6 papila pre-anal, 7 ano, 8 espículas, 9 papila pos-anal, 10 esofago, 11 ventrículo, 12 intestino, 13 ano, 14 poro excretor, 15 glándula excretora, 16 ganglio (Modificado de Olsen, 1974).

## 2.3 Desarrollo de los diferentes estadios de *T. canis*

### 2.3.1 Huevo

Los huevos de *T. canis* son semi-esféricos, miden de 75 a 90  $\mu\text{m}$  de diámetro, y tienen una cubierta gruesa, ornamentada y con un componente lipídico superficial adherente (Sievers et al., 2007). La fertilización estimula inmediatamente la formación de esta cubierta, de cuyas cuatro capas, tres las forma el propio huevo y una cuarta es añadida por las secreciones del útero. En su interior se encuentra el cigoto que ocupa prácticamente la totalidad de la cavidad interna con un color oscuro uniforme (Bouchet et al., 2003) (Figura 2). Una hembra fecundada pone cerca de 68,000 huevos al día (Rodríguez-Caballero et al., 2015).

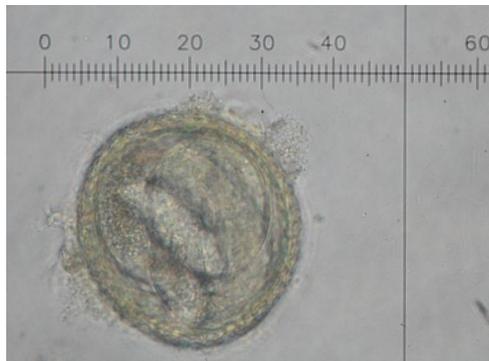


**Figura 2. Microfotografía del huevo de *T. canis*.** Se observa el blastómero en el interior del huevo y las capas que conforman la cubierta de huevo (400x).

### 2.3.2 Huevo larvado

Debido a que es un geohelminto los huevos deben estar depositados en el suelo para desarrollar la larva. El desarrollo del huevo larvado dependerá de las condiciones de temperatura y humedad del ambiente en donde se encuentre. Se estima que a una temperatura de 22-25°C la embriogénesis se lleva a cabo en aproximadamente tres semanas. Dentro del huevo se desarrolla la larva de primer estadio y posteriormente la larva de segundo estadio, fase en la cual el huevo ya es infectante. (Figura 3).

Se sabe que los huevos pueden llegar a sobrevivir en el ambiente durante meses e incluso años debido su capa externa, la cual brinda viabilidad y protección (Baneth et al., 2015). Se ha reportado que los huevos pueden sobrevivir al invierno, sobre la superficie del suelo y bajo una cubierta de nieve con una temperatura de -29° C y difícilmente sobreviven en condiciones de calor (40° C) (Azam et al., 2012). La exposición a la luz solar y la desecación causan la desintegración de los huevos por lo que la humedad es esencial, el porcentaje óptimo de humedad en el suelo para el desarrollo de *T. canis* es del 20% al 60%.



**Figura 3. Microfotografía de la fase infectante de *T. canis*.** La larva se encuentra dentro del huevo (400X).

### 2.3.3 Larva

Las larvas de *T. canis* miden aproximadamente 0,4 mm de longitud por 0,015-0,021 de diámetro. En el medio ambiente siempre se encuentran dentro de los huevos (Macchioni, 1971; Gibbons et al, 2001, Nadler & Hudspeth, 2000). Desarrollan cuatro etapas larvarias que, mediante mudas cuticulares adquieren un aspecto diferente en cada fase y aumentan de tamaño desarrollándose en tres fases larvarias más (L2, L3, L4) antes de alcanzar la madurez sexual completa (Guerrero et al., 1998; Dell et al., 1999).

La cutícula es estriada, la cavidad bucal en posición subterminal y dorsalmente inclinada, rodeada por tres labios desarrollados, presumiblemente implicados en la recolección de alimentos y el anclaje a los tejidos durante la migración. En la región anterior a los labios se sitúa una cápsula bucal superficial, cuyo margen ventral está formado por una cutícula fina, espinosa y afilada. En el extremo anterior de la larva se encuentran las papilas cefálicas. El esófago ocupa un tercio de la longitud total de la larva. A nivel del primer tercio del esófago se sitúa un anillo nervioso y en la posición subterminal se encuentra la célula excretora que desemboca en un poro excretor. La porción peri-esofágica tiene abundantes núcleos ganglionares. El intestino desemboca en el ano, situado en posición subterminal. El primordio genital se encuentra en el último tercio y adosado a la pared intestinal (Figura 4) (Nichols, 1956; Vegni et al., 1986).

La larva eclosionada migra por órganos y tejidos, sin embargo en el hospedero definitivo alcanza la madurez sexual o se queda en estado hipobiótico; en el hospedero paraténico migra por el torrente sanguíneo hasta llegar a un órgano en el que se queda en estado hipobiótico y se activa cuando llega al hospedero definitivo.



**Figura 4. Microfotografía de una larva de *T. canis* (200x).**

### 2.3.4 Adulto

Los gusanos adultos del género *Toxocara* viven en el intestino delgado de varios hospederos definitivos silvestres o domésticos. *T. canis* (Figura 5) infecta a los cánidos como coyotes, perros, zorros y lobos mientras que *T. cati* (anteriormente *T. mystax*) y *T. malaysiensis* infectan a los felinos (Macpherson, 2013; Gibbons et al 2001; Fisher, 2003; Schnieder et al 2011). Especies relacionadas, como *Toxocara vitulorum*, *Toxascaris leonina* y *Baylisascaris procyonis* infectan a varios hospederos carnívoros o rumiantes (Macpherson, 2013).



**Figura 5. Fotografía de los adultos de *T. canis*.** Se observa el dimorfismo sexual, el macho es de menor tamaño y con una curvatura caudal (abajo), mientras que la hembra es más grande y con terminación dorsal roma (arriba).

### **2.3.5 Hospedero definitivo**

El hospedero definitivo es el organismo en el cual el parásito alcanza la maduración sexual. La revisión de Gibbons et al. (2001) muestra la gran cantidad de cánidos que son hospederos definitivos de *T. canis* entre ellos los más importantes: perro doméstico (*Canis familiaris*), zorro fenec (*Fennecus zerda*), dingo (*Canis dingo*), perro mapache (*Nyctereutes procyonoides ussuriensis*), mapache (*Procyon lotor*), zorro gris californiano (*Urocyon cinereoargentatus scotti*), zorro de la india (*Vulpes bengalensis*), zorro amarillo (*Vulpes fulva pennsylvanicus* y *Vulpes fulva regalis*), zorro rojo (*Vulpes vulpes*) y zorro rojo de Japón (*Vulpes vulpes japonicus*).

### **2.3.6 Hospedero paraténico**

Son aquellos hospederos en los que el parásito no alcanza su madurez sexual, no es liberado y puede vivir por varios años (Page et al., 1992). Para completar el ciclo biológico de *T. canis*, el hospedero paraténico debe ser ingerido por el hospedero definitivo (Tay et al., 2003). Entre ellos podemos destacar pollos, ratones, conejos, ovejas y pequeños mamíferos silvestres e inclusive el ser humano (Nobuaki y Nobuo, 2007; Lee et al., 1976; Taira et al., 2003).

## 2.4 Ciclo de vida de *T. canis*

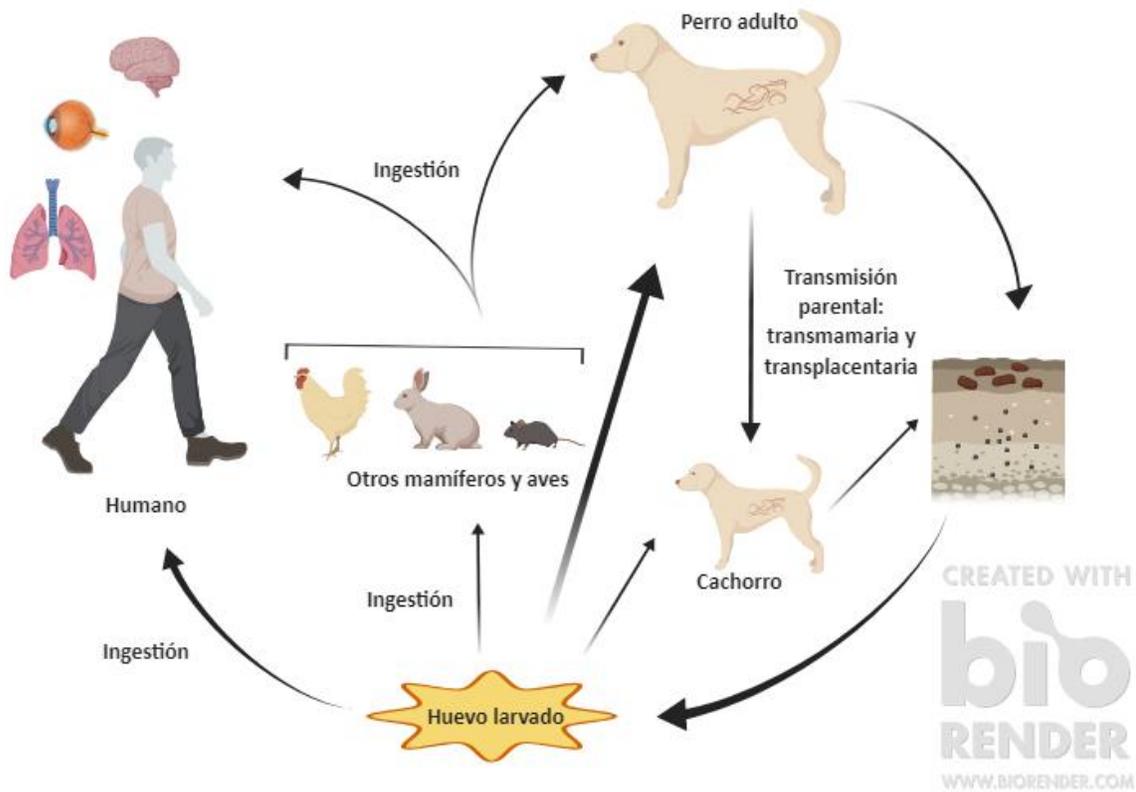
En los cánidos, la infección por *T. canis* ocurre, principalmente, por tres vías: ingesta de huevos larvados presentes en el medio ambiente, transmisión intrauterina y/o lactógena, e ingesta de larvas presentes en los hospederos paraténicos (Overgaauw, 1997a). Además, el hospedero definitivo puede infectarse al ingerir huevos embrionados transportados por fómites como lombrices de tierra, hormigas y otros invertebrados que viven en el suelo (Despommier, 2003).

En general, después de la ingesta de los huevos, las larvas eclosionan en un período de dos a cuatro horas en el duodeno, donde penetran en las paredes intestinales para ingresar al sistema circulatorio. Las larvas llegan al hígado en aproximadamente 24 horas post-infección, vía circulación portal a través de los capilares venosos (Webster, 1958b). Aproximadamente 12 horas después de llegar al hígado, las larvas continúan la migración al corazón de donde se desplazan al pulmón a través de la arteria pulmonar. A partir de ahí la ruta de migración depende en gran medida de varios factores, como la edad y el estado inmunitario del hospedero así como del inóculo ingerido. Las larvas pueden penetrar en la pared de los alvéolos y llegar a la faringe a través de los bronquiolos y la tráquea. Al ser deglutidas las larvas se desarrollan en gusanos adultos en el intestino, alrededor de siete a quince días después de la migración traqueal (Sprent, 1958). Otra posibilidad de migración es ingresar nuevamente al sistema circulatorio después de la penetración de las paredes de los alvéolos, en cuyo caso las larvas se distribuyen pasivamente al tejido somático (Sprent, 1956; Webster, 1958a, b).

La infección transplacentaria también es común en perros. Las larvas somáticas se acumulan gradualmente en los tejidos, persistiendo durante largos períodos de manera similar a la observada en los hospederos paraténicos. Las larvas de *T. canis* tienen más probabilidades de encontrarse en el sistema nervioso central de los perros (Sprent, 1958; Cardillo et al, 2009). Cuando las hembras quedan preñadas las larvas presentes en los tejidos se reactivan y migran. El 100% de los cachorros se infectan en el útero por larvas somáticas reactivadas desde el día 42 del período de gestación (Lloyd et al., 1983). Esta migración transplacentaria y la infección intrauterina es el modo más importante de infección a los cachorros, da como resultado la excreción de huevos después de un período mínimo de 16 días después del nacimiento (Lloyd, 1993). Los cachorros también pueden adquirir la infección por la ingesta de larvas presentes en la leche (Parsons, 1987), que puede transmitirse a los 38 días después del parto (Zimmerman et al., 1985), aunque esta ruta normalmente transmite menos larvas que la vía intrauterina (Coati et al., 2004).

Los seres humanos se infectan por la ingesta accidental de huevos de *T. canis* presentes en el suelo contaminado (geofagia), al no lavarse las manos o consumir vegetales crudos (Glickman y Shofer, 1987). Las personas también pueden infectarse al ingerir larvas presentes en la carne poco cocida de hospederos paraténicos infectados como pollos, rumiantes o cerdos (Nagakura y otros, 1989; Sturchler y otros, 1990; Baixench y otros, 1992; Salem y Schantz, 1992; Taira et al., 2004), sin embargo es un mecanismo de infección particularmente raro. Los seres humanos actúan como un hospedero paraténico en el que las larvas de *T. canis* migran y luego sobreviven durante meses o años enquistadas en diversos tejidos corporales. Varios estudios recientes han sugerido que el contacto directo con el pelaje de un perro infectado puede ser una importante fuente zoonótica de huevos de *T. canis* (Wolfe y Wright, 2003; Aydenizoz-Ozkayhan et al., 2008; Roddie et al., 2008). La transferencia de huevos provenientes del suelo contaminado a través de las patas de los perros y los zapatos de las personas se ha descrito como una posible ruta de transmisión para la infección por *T. canis* (Panova & Khrustalev, 2018).

En el intestino delgado, las larvas se liberan de los huevos, penetran en la pared intestinal y viajan a través del sistema circulatorio a varios órganos incluidos los pulmones, el hígado, los músculos y el SNC. Excepto en el hospedero cánido definitivo, las larvas de la tercera etapa no maduran pero pueden permanecer dentro de los tejidos durante muchos años. La infección tisular provoca una respuesta inmune inflamatoria que puede llevar a una fase inespecífica caracterizada por fiebre, dolores de cabeza, tos y dolor (Taylor et al., 1988; Rubinsky-Elefant et al., 2010; Pawlowski, 2001). Aunque las larvas nunca llegan a ser adultos en el intestino de los seres humanos u otros hospederos paraténicos, estas pueden permanecer en estado hipobiotico en los órganos (Salem y Schantz, 1992; Yoshikawa et al., 2008). El ciclo de vida completo se ilustra en la Figura 6.



**Figura 6. Ciclo de vida de *T. canis*.** Los huevos son expulsados en las heces de los perros y se vuelven infectantes al cabo de 3 semanas. Estos pueden ser ingeridos por otros perros y el ciclo continúa o por hospederos paraténicos tales como aves y pequeños mamíferos. El humano se infecta al ingerir huevos larvados por geofagia o presentes en alimentos y agua.

## **2.5 Manifestaciones clínicas**

### **2.5.1 En cánidos**

Es más frecuente en los cachorros y puede ser fatal, especialmente cuando hay una infección grave por vía transplacentaria de estos antes de nacer o después de nacer, por vía transmamaria (Deplazes et al., 2011). Los cachorros con una carga parasitaria alta pueden: quejarse, chillar y adoptar una postura en particular al superponer las extremidades traseras mientras están de pie o caminando. Los gusanos responden a estímulos irritantes como el pH ácido y se enredan en nudos, lo que puede ocasionar obstrucción y/o rotura intestinal, obstrucción del conducto biliar, convulsiones epileptiformes y, en última instancia, la muerte del cachorro (Bowman, 2009; Robertson & Thompson, 2002). Otros signos clínicos varían con la edad, el estado de salud del perro, y el estadio y la gravedad de la infección: la migración de las larvas a los pulmones puede provocar tos, secreción nasal, neumonía y edema pulmonar, mientras que la actividad de los gusanos adultos puede producir enteritis mucoide, vómitos, diarrea, ascitis, anorexia, anemia, emaciación, pelaje opaco y vientre abultado, si la carga parasitaria es alta (Traversa, 2012; Epe, 2009; Robertson y Thompson, 2002).

### **2.5.2 En humanos**

Las larvas de *T. canis* eclosionan del huevo después de la ingesta, penetrando en la mucosa intestinal y migrando por el sistema circulatorio hacia el hígado, los pulmones y otros órganos (p. ej., músculo esquelético, corazón, cerebro y ojos), por medios mecánicos y por acción química (Finsterer y Auer, 2007; Pivetti-Pezzi, 2009; Salem & Schantz, 1992). Las larvas son atacadas por la respuesta inmune del hospedero, en el cual se manifiesta con inflamación local asociada con eosinofilia y un aumento en la producción de citocinas y anticuerpos específicos. Si bien muchas infecciones por *T. canis* son de naturaleza subclínica, en otros casos se puede manifestar en síndromes conocidos como larva *migrans* visceral (VLM), larva *migrans* ocular (OLM), neurotoxocariasis (NT) y toxocariasis oculta (Taylor et al 1988; (Finsterer y Auer, 2007; Pivetti-Pezzi, 2009). El amplio espectro de consecuencias clínicas y patológicas de la toxocariasis, así como la frecuencia de infecciones no aparentes, pueden causar algunas dificultades para identificar y clasificar los casos clínicos. La gravedad y el rango de los síntomas dependen del tejido invadido, el número de larvas migratorias y la edad del hospedero. Se cree que la respuesta de hipersensibilidad inmediata a la muerte de las larvas es la causa principal de los síntomas de VLM (Despommier, 2003).

### **2.5.2.1 Larva *migrans* visceral (LMV)**

El síndrome más común en personas infectadas es la de larva *migrans* visceral, especialmente en niños con signos clínicos como: tos, sibilancias, mialgias o manifestaciones cutáneas (Despommier, 2003). Aunque la mayoría de los casos de larva *migrans* visceral son asintomáticos, en algunas personas se observan linfadenopatía, hepatitis granulomatosa, nódulos, miocarditis, nefritis y artritis (Pawlowski, 2001; Despommier, 2003; Kuenzli et al., 2016). Además, se sospecha que los efectos a largo plazo, como el desarrollo de asma y el avance de la fibrosis pulmonar, se asocia con la larva *migrans* visceral (Cooper, 2008).

### **2.5.2.2 Larva *migrans* ocular (LMO)**

La larva *migrans* ocular es común y se reporta principalmente en niños de tres a 16 años de edad (Pivetti-Pezzi, 2009; Despommier, 2003). Puede presentarse deterioro visual unocular, acompañado de endoftalmitis crónica, retinitis o granulomas (Despommier, 2003). El nivel de deterioro se asocia con las larvas migratorias o muertas y la reactividad inmunitaria resultante contra el gusano en el ojo (Pivetti-Pezzi, 2009). La ceguera puede deberse a una vitritis grave, edema macular cistoide o desprendimiento de retina traccional (Pivetti-Pezzi, 2009; Martínez-Pulgarin, et al. 2015).

### **2.5.2.3 Neurotoxocariasis (NT)**

La neurotoxocariasis es rara y ocurre principalmente en personas de mediana edad (Finsterer, 2007; Deshayes et al., 2016). Esta enfermedad se relaciona con la migración de larvas de *T. canis* en el SNC y la posterior inducción de meningitis, encefalitis, vasculitis cerebral o mielitis, generalmente asociada con síntomas clínicos relativamente inespecíficos como fiebre y cefalea (Finsterer, 2007; Deshayes et al., 2016; Caldera et al., 2013). Las posibles asociaciones entre toxocariasis cerebral y trastornos neurodegenerativos son: convulsiones, esquizofrenia, déficits cognitivos, enfermedad de Parkinson idiopática y demencia (Finsterer, 2007; Celik et al., 2013; Fan et al., 2015). El retraso cognitivo o de desarrollo entre los niños con desventajas socioeconómicas que se infectan es de particular preocupación (Walsh & Haseeb, 2012).

#### **2.5.2.4 Toxocariasis oculta (TO)**

La toxocariasis oculta en niños y la toxocariasis común en adultos son síndromes difíciles de diagnosticar clínicamente debido a la signología inespecífica (Taylor et al., 1988). En los niños ocurren síntomas como fiebre, anorexia, cefalea, sibilancias, náuseas, dolor abdominal, vómitos, letargo, somnolencia y trastornos de la conducta, síntomas pulmonares, dolor en las extremidades, linfadenitis cervical y hepatomegalia, mientras que debilidad, prurito, erupción, insuficiencia pulmonar y dolor abdominal pueden observarse principalmente en adultos (Walsh y Haseeb, 2014). También hay supuestos vínculos entre la toxocariasis común y el asma (Mendonca et al., 2012; Li et al., 2014). Estas características clínicas comúnmente se asocian con títulos de anticuerpos séricos anti-*T. canis* moderados a altos (Taylor et al., 1988; Rubinsky-Elefant et al., 2010; Pawlowski, 2001).

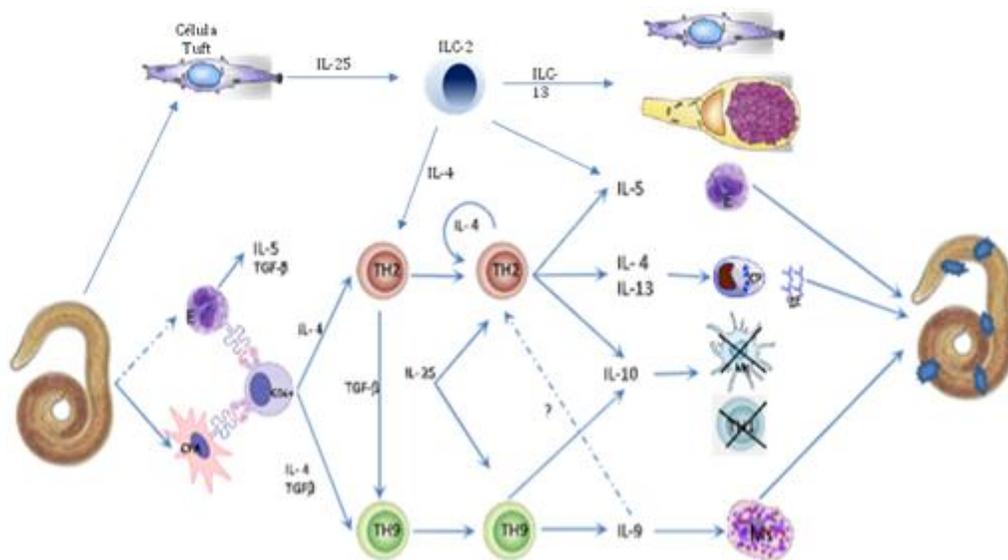
## 2.6 Respuesta inmune a *T. canis* en hospedero definitivo y paraténico

*T. canis* modula y evade la respuesta inmune del hospedero para evitar la expulsión del intestino, garantizar su supervivencia y continuar con su ciclo de vida. Las mucinas secretadas cubren temporalmente la superficie del nematodo y se desprenden en el hospedero periódicamente (Page et al., 1992). Se piensa que este comportamiento de desprendimiento representa un intento por parte del parásito de confundir al sistema inmunológico del hospedero, dejando atrás un rastro de limo, no muy diferente al de un caracol (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003). Actualmente se conocen numerosos grupos de investigación que relacionan el aumento de enfermedades autoinmunes y el desarrollo de alergias en países donde han disminuido las enfermedades infecciosas de ciertos microorganismos, en especial helmintos. Esta relación es debida a la modulación que producen los parásitos desde una respuesta primaria inflamatoria Th1 a una respuesta Th2 (Pinto y Licona-Limón 2017).

Los nematodos sintetizan diversas proteínas secretoras entre las que podemos nombrar a las cistatinas que tienen dos funciones, inhiben las cisteín proteasas y provocan la inmunosupresión de IL-10 (Dainich et al, 2001, Schönemeyer et al, 2001, Wang et al, 2017). Los estudios de la respuesta inmunológica por parte de los organismos vertebrados infectados con nematodos gastrointestinales han considerado que la capacidad para expulsar los nematodos está mediada por las células ThCD4+, las cuales regulan la respuesta inmune mediante citocinas. El descubrimiento de las células ThCD4+ llevó a pensar en una respuesta inmunitaria bipolarizada (Maizel y Nussey, 2013). Por lo que en un principio se pensó en dos subpoblaciones de células T cooperadoras (Th) según sus perfiles de citocinas, y se estableció así las células Th1 que producen Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) e interleucina 2 (IL-2), mientras que las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Pinto y Licona-Limón 2017). Sin embargo, existe también la respuesta Th9, la cual se caracteriza por la producción de IL-9 (Kaplan et al, 2015). A nivel intestinal están las células de Tuft las cuales expresan altos niveles de IL-25 esto ayuda a la modulación de la respuesta Th2 y hace una mayor liberación de IL-13 e IL-4, estas dan como resultado en las vellosidades del intestino un aumento a células de Tuft y células caliciformes, que ayudaran a desplazar al parasito fuera del intestino (Figura 7) (Steele et al, 2016).

Las características principales de la respuesta inmune del hospedero a la infección por *T. canis* incluyen una actividad dominante de las células Th2, la eosinofilia y la producción de anticuerpos específicos de la clase IgE (Figura 7) (Maizels, 2013; Del Prete et al., 1991). Los antígenos de excreción-secreción (TES) conducen a una producción de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) a partir de células T periféricas de individuos expuestos, lo que resulta en eosinofilia y aumento en la producción de citocinas y anticuerpos IgE (Figura 7)

(Maizels, 2013; Del Prete et al., 1991; Mazur et al., 2016). Todos estos factores pueden contribuir a la hipersensibilidad de las vías respiratorias, vinculando la infección crónica por *T. canis* con enfermedades alérgicas como el asma y la rinitis alérgica (Cooper, 2008; Yariktas et al., 2007). Las sibilancias en pacientes pueden asociarse con larva *migrans* visceral y toxocariasis encubierta debido a la migración pulmonar de las larvas (Cooper, 2009). Aunque muchos helmintos parásitos pueden inducir la generación de poblaciones de células inmunorreguladoras (p. Ej., Células T reguladoras y macrófagos activados alternativamente) (Hewitson et al., 2009), *T. canis* probablemente ha desarrollado mecanismos efectivos en el perro, pero no en los seres humanos, lo que explica su mayor inmunogenicidad en el hospedero paraténico. Sin embargo, algunos efectos antiinflamatorios pueden ser mediados por TES, resultando, por ejemplo, en la inhibición de la señalización del receptor tipo Toll y la producción de óxido nítrico (Hewitson et al., 2009).



**Figura 7. Respuestas TH2 y TH9 contra *T. canis*.** En la ruta superior se representa la respuesta inmune a nivel intestinal, en la que intervienen las células de Tuft y la IL-25. La ruta central se refiere a la respuesta inmune en el torrente sanguíneo y la inferior a la respuesta mediada por mastocitos. (E-eosinófilo, CPA-célula presentadora de antígeno, CP-célula plasmática, Mc-macrófago, Ms-mastocito).

## **2.7 Diagnóstico**

### **2.7.1 En cánidos**

El diagnóstico rutinario de una infección evidente por *T. canis* en los hospederos definitivos, se realiza a partir de la identificación de los huevos en las heces. Dryden et al. (2005) recomiendan una técnica de sedimentación y flotación porque la centrifugación recupera más huevos que otros métodos. Estas técnicas son sensibles para el diagnóstico en cachorros que arrojan grandes cantidades de huevos, pero carecen de sensibilidad en perros adultos que arrojan huevos de forma intermitente y/o en números bajos.

### **2.7.2 En humanos**

El diagnóstico de infección por *T. canis* en humanos se ha basado en el uso de técnicas serológicas (Magnaval et al., 1991; Noordin et al., 2005; Watthanakulpanich et al., 2008; Mohamad et al., 2009; Peixoto et al., 2011; Jin et al., 2013; Roldan et al., 2015; Boldiš et al., 2015; Elefant et al., 2016). Los ensayos de ELISA se han utilizado para detectar anticuerpos contra los antígenos de excretorios o secretorios de *T. canis* (TES) (de Savigny et al., 1979). Se han utilizado ampliamente para el diagnóstico serológico y los estudios epidemiológicos de la infección y exposición de *T. canis* en seres humanos (Boldiš et al., 2015; Moreira et al., 2014). Los hallazgos serológicos iniciales deben confirmarse mediante inmunotransferencia para evitar resultados falsos positivos y para evaluar la reactividad cruzada con otros agentes infecciosos (Moreira et al., 2014). Por lo tanto, es preferible el uso combinado de ELISA e inmunotransferencia (Moreira et al., 2014), aunque ningún criterio serológico inequívoco distingue la infección por *T. canis* activo de la exposición pasada, un área de mucha discusión en este campo de investigación (Smith et al., 2009).

La especificidad y la sensibilidad de los ensayos serológicos e inmunológicos para el diagnóstico de toxocariasis dependen de los antígenos (por ejemplo, productos crudos de larvas de *T. canis*, antígenos TES nativos o recombinantes, o bien antígenos de glucanos o antígenos TES desglicosilados) y el tipo de anticuerpos (por ejemplo, IgG total, subclase IgG, o IgM) que se están midiendo (Roldan et al., 2015; Elefant et al., 2016). Se han desarrollado y evaluado TES-ELISA modificados, como IgG2-TES-ELISA e IgG4-rTES-ELISA (Noordin et al., 2005; Watthanakulpanich et al., 2008). Los ensayos para la detección específica de anticuerpos anti-*T. canis* IgG2 e IgG3 parecen tener mayor sensibilidad y especificidad (Magnaval et al., 1991). Por el contrario, se informó que un ELISA que detecta IgG4, pero que usa TES-120 recombinante (rTES-120) y rTES-30 tiene una sensibilidad del 93% y que el ELISA que detecta IgG, y usa un TES desglicosilado aumentó tanto la sensibilidad como la especificidad al 100% (Mohamad et al. al., 2009; Roldan et

al., 2015). También se están evaluando otras proteínas recombinantes de *T. canis* como posibles antígenos de diagnóstico (Anderson et al., 2015; Zhan et al., 2015). Además, las mediciones de las concentraciones de proteínas catiónicas de eosinófilos o la avidéz del anticuerpo IgG se pueden usar para sugerir una infección por *T. canis* existente o pasada (Boldiš et al., 2015; Hubner et al., 2001; Magnaval et al., 2001; Dziemian et al., 2008). Sin embargo, el rendimiento de cada uno de estos ensayos debe validarse exhaustivamente en varios países en diferentes condiciones. En la Tabla 1 se muestran las diferentes técnicas serológicas utilizadas en diagnóstico de la toxocariasis.

**Tabla 1.** Técnicas serológicas para la detección de anticuerpos anti-*T. canis* en humanos.

Técnica	Tipo de Ac detectado en suero	S/E %	Referencia
IgG-TES-WB	IgG total específica	Especificidad alta y reacción cruzada menor	Magnaval et al., 1991
IgG-TES-ELISA	IgG total específica	97/36	Noordin et al., 2005
IgG1-TES-ELISA	Subclase IgG1	60/76	Watthanakulpanich et al., 2008
IgG2-TES-ELISA	Subclase IgG2	98/71	
IgG3-TES-ELISA	Subclase IgG3	78/81	
IgG4-TES-ELISA	Subclase IgG4	64/71	
IgG4-rTES-ELISA (rTES-30USM, rTES-120)	Subclase IgG1 total específica	93/Especificidad aumentada	Mohamad et al., 2009
IgM/G-TES ELISA (TES-58 y TES-68)	IgG e IgM totales específicas	100/100	Peixoto et al., 2011
IgG-TCLA-ELISA	IgG total específica	92/87	Jin et al., 2013
IgG-dTES-ELISA	IgG total específica	100/100	Roldán et al., 2015
IgG-dTES-WB	IgG total específica	Sin reacción cruzada con las fracciones de 32 kDa, 55 kDa y 70 kDa de dTES.	
Avidez de la IgG	Índice de avidéz de la IgG	44/83%	Boldiš et al., 2015
IgG-DiM-BSA-ELISA	IgG total específica	92/95	Elefant et al., 2016

Ac: anticuerpo; S/E: sensibilidad/especificidad; TES=Antígenos de excreción y secreción de *T. canis*; dTES=Antígenos TES deglicosilados; rTES=Antígenos TES recombinantes; WB=western blot; TCLA=Antígenos de larvas de *T. canis*; DIM-BSA=Albúmina de suero bovino acoplada di-O-metilada.

## **2.8 EPIDEMIOLOGÍA**

### **2.8.1 Epidemiología de la toxocariasis en cánidos**

*T. canis* tiene una distribución mundial en perros, con prevalencias del 1 al 65 % (Chen et al., 2012), la prevalencia en perros adultos es muy variante en los diferentes países, sin embargo, prevalencias menores al 6% son registrados frecuentemente en países desarrollados, por ejemplo, 2% para Australia, 4% en los Países Bajos (Overgaauw et al., 2009) y 6% en Alemania (Barutzki y Schaper, 2011), 2.2% en los Estados Unidos (Little et al., 2009) y 2.9% en Calgary, Canadá (Joffe et al., 2011). No obstante, las prevalencias más altas se han registrado en países en vías de desarrollo pero también depende de la edad de los cánidos. Por ejemplo, para Nigeria, Portugal, India y China, la prevalencia registrada para cachorros varía entre el 51 al 100% en cachorros y de 1 a 45% en perros adultos (Lee et al., 2010; Traub et al., 2005; Sowemimo, 2007; Dai, 2009).

En México, *T. canis* es uno de los nematodos intestinales más frecuentes e importantes que afectan a los perros; su prevalencia en el sureste de México fluctúa del 37 al 74 % (Rodríguez-Vivas et al., 2011; Rodríguez Vivas et al., 2001). Se ha reportado su presencia en suelos de parques públicos, con frecuencias de infección de 10,9 a 62,5 % (Tinoco-Gracia et al., 2007; Vásquez-Tsuji, et al., 1996), su prevalencia en el sureste de México es del 37 al 74 % (Rodríguez-Vivas et al., 2011; Rodríguez Vivas et al., 2001).

### **2.8.2 Epidemiología de larva *migrans* en humanos**

A pesar del reconocimiento clínico de éste síndrome y la creciente conciencia de que la toxocariasis humana representa una carga creciente para la salud pública, en particular en las regiones tropicales y subtropicales y en las comunidades desfavorecidas de algunos países, la toxocariasis humana se descuida seriamente porque se ha prestado poca atención a su prevención, tratamiento y vigilancia, y porque no es una enfermedad de notificación obligatoria (Hayashi et al, 2005; Won et al, 2008; Fu et al, 2014).

*T. canis* tiene una distribución global (Joy et al., 20017). La seroprevalencia humana en países europeos como: Francia, República Checa y Austria, varía de 2% a 44% con valores más altos en áreas rurales (Magnaval et al., 1994a; Uhlíková y Hübner, 1998; Deutz et al., 2005). En los países tropicales, la seroprevalencia varía de 63% en Bali, Indonesia (Chomel et al., 1993) a casi 93% en La Réunion, Francia (Magnaval et al., 1994b). En México se han registrado seroprevalencias de 10.6 % en Mexicali y Baja California (Tinoco-Gracia et al., 2008), principalmente en niños y de 12 % en el Estado de México (Nava-Cortés et al., 2015).

### 2.8.3 Factores de riesgo

La prevalencia global de *T. canis* en los seres humanos es influida por un amplio y complejo número de variables que están vinculadas a nivel poblacional por factores ambientales, geográficos, culturales y socioeconómicos, y a nivel individual por la heterogeneidad de la susceptibilidad a la infección influenciada por la inmunidad, la coinfección, la genética, edad, género, nutrición y comportamiento de los hospederos, tanto humanos como definitivos (Macpherson, 2013; Viney & Graham, 2013).

La transmisión y los factores de riesgo variarán considerablemente en diferentes partes del mundo. La pobreza, la falta de educación y los problemas con las poblaciones de hospederos definitivos no controladas y no tratadas darán lugar a entornos muy contaminados que, en condiciones climáticas cálidas, proporcionarán oportunidades de transmisión ideales, especialmente si se combinan con una higiene deficiente y geofagia o pica. Estos factores de riesgo son ampliamente apreciados y documentados en muchas partes del mundo (Dunsmore et al., 1984; Overgaauw, 1997; Won et al., 2008; Lee et al., 2010).

La defecación de los perros en áreas públicas es uno de los principales riesgos de transmisión de parasitosis a los seres humanos. Las dos causas que inciden en ello son la presencia de perros itinerantes y la de perros con dueños que no recolectan el excremento de sus mascotas al sacarlos a la vía pública. Estudios de todo el mundo han demostrado altas tasas (10–30%) de contaminación del suelo con huevos de *T. canis* en patios traseros, arenales, parques públicos, parques infantiles, playas y otros lugares (Mizgajska-Wiktor y Uga, 2006), especialmente, los huevos de *T. canis* son los más comunes en los parques públicos. La tabla 2 muestra la seroprevalencia registrada en humanos en diferentes partes del mundo.

**Tabla 2.** Seroprevalencia a *T. canis* en poblaciones humanas en distintas partes del mundo.

Año	País	Tipo de Población (n)	P (%)	Técnica diagnóstica	Referencia
2007-2010	Brasil	252 niños entre 1-2 años	15.5	ELISA	Cassenote et al., 2014
2008	Paraguay	68 niños sanos	78	ELISA	Rivarola, et al., 2009
2011	Eslovaquia	429 gitanos 394 no gitanos	22.1 1	ELISA	Antolova et al., 2015
2011-2013	China	2866 mayores de 16 años 1431 sanos 990 embarazadas 445 pacientes psiquiátricos	12.25 13.07 9.09 16.4	ELISA	Cong, et al., 2015
2011-2014 1988-1994	EEUU	13509 mayores de 6 años 20395 mayores de 6 años	5 13.9	ELISA	Liu et al., 2017 Won, et al., 2008
2012-2013	Corea del Sur	633 población sana 49-58 años	51.2	ELISA	Lee et al., 2015
2012	Ghana	566 niños de 1 a 15 años	53.5	ELISA	Kyei et al., 2015
2013-2014	Nigeria	366 niños	86.1	ELISA y WB	Gyang et al., 2015
2014	Grecia	250 residentes 200 adultos de 16 a 56 años 50 niños menores de 14 años	16 8 48	ELISA	Papavasiliopoulos et al., 2018
2014	República de las Islas Marshall	166 niños entre 7 y 12 años	86.75	ELISA y WB	Fu et al., 2014
2015	Serbia	338 298 adultos 40 niños de 2 a 14 años	13 13.4 10	ELISA y WB	Gabrielli et al., 2017
2015	Bulgaria	125 pacientes con alergia que presentan IgE 136 pacientes con síntoma de alergia 50 donadores de banco de sangre	2.2 0.8 4	ELISA y WB	Kaneva et al., 2015
2016-2017	Irán	316 niños de 6 y 12 años	4.4	ELISA	Mahmoudvand et al., 2018
2018 2015	Venezuela	224 niños entre 1-6 años 259 niños entre 6 y 12 años	14.3	ELISA	Martínez et al., 2018 Martínez et al., 2015

n: número de personas analizadas; WB: Western Blot; P: prevalencia.

## 2.9 Prevención

La educación es esencial para mejorar la comprensión del público sobre la toxocariasis prevención, tratamiento y control (Holand, 2017). La Asociación Americana de Parasitólogos Veterinarios y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE. UU. han creado sitios web educativos que brindan información detallada sobre *T. canis* y la toxocariasis. Los veterinarios también pueden educar a los dueños de mascotas sobre esta parasitosis y cómo minimizar los riesgos de transmisión zoonótica (Smith et al., 2009). La higiene básica, evitar que los niños ingieran tierra o heces y evitar la ingesta de carne o hígado crudos, es fundamental para prevenir la transmisión en países endémicos (Moreira et al., 2014; Fan et al., 2013).

Dado que no existen métodos prácticos para reducir los niveles ambientales de huevos, la prevención de la contaminación inicial del medio ambiente es el enfoque más importante. Esto se puede lograr tomando varias medidas, como eliminar las infecciones patentes en perros y prevenir la defecación de mascotas en áreas públicas (Glickman y Shofer, 1987). Los métodos para disminuir la contaminación incluyen: la restricción de perros que vagan libremente y la limpieza de las heces del suelo y las aceras por parte de los dueños de perros, impidiendo el acceso de los perros a lugares públicos (especialmente en los parques infantiles). Priorizar el control de las infecciones por *T. canis* en hospederos definitivos podría reducir sustancialmente la cantidad de huevos infectivos en el entorno público (Palmer et al., 2008). Los perros, especialmente los cachorros menores de 12 semanas (Morgan et al., 2013; Nijse et al., 2014), los perros de trabajo y, cuando sea posible, los perros callejeros deben ser desparasitados con antihelmínticos eficaces (Roddie et al. al., 2008; El-Tras et al., 2011).

### **3. Justificación**

Debido a que múltiples estudios han registrado una alta prevalencia de *T. canis* en cánidos cachorros, existe un problema de contaminación ambiental con heces de cánidos parasitados lo que favorece la infección a los humanos. La seroprevalencia nacional puede alcanzar hasta el 30.8% y existen pocos estudios epidemiológicos de esta helmintiasis en la población adulta. La inmunodetección de larva *migrans* se realiza con kits comerciales que detectan anti-*T. canis* pero pueden dar reacciones cruzadas con otras helmintiasis, no detectan el estatus de la infección y son costosos. Por estas razones resulta fundamental realizar estudios para la detección de antígenos de larvas de *T. canis* e IgG anti- *T. canis* en poblaciones de adultos. Dado que en el Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría se cuenta con un kit dual casero para la detección de antígenos de larvas de *T. canis* e IgG anti- *T. canis*, que ha sido utilizado con anterioridad en otra población de estudio, es posible realizar un estudio en dicha población, generando conocimiento en el ámbito epidemiológico de esta parasitosis.

### **4. Pregunta de Investigación**

¿Cuál prueba es confiable para valorar la prevalencia de *T. canis* en una población adulta abierta?

### **5. Objetivo Principal**

Determinar la seroreactividad a larvas de *T. canis* en individuos que asisten al Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría.

### **6. Objetivos Específicos**

- Evaluar la seropositividad a *T. canis* mediante un kit comercial y un kit casero estandarizado.
- Determinar si la infección es aguda o crónica mediante índice de avidéz y captura de Antígeno.
- Descartar reacciones cruzadas mediante la adsorción con antígeno de *Ascaris suum*, ya que el mecanismo de infección entre *T. canis* y *A. suum* es similar al estar emparentados filogenéticamente.

## **7. Diseño del estudio**

El presente estudio fue de tipo experimental, analítico, transversal y descriptivo.

## **8. Población objetivo**

Adultos sanos que acudan al Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría.

### **8.1 Criterios de selección**

#### **8.1.1 Criterios de inclusión**

Adultos sanos que sean seleccionados como donadores seguros por el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría.

#### **8.1.2 Criterios de exclusión**

Adultos que presenten seroreactividad a VIH, Hepatitis B y Enfermedad de Chagas, que se detecte en banco de sangre. Que su información este incompleta o que no acepten participar en la investigación.

## **9. Material y Método**

### **9.1 Obtención de material biológico**

#### **9.1.1 Obtención de sueros**

Las cartas de Consentimiento Informado y la toma de muestras de sangre para la biometría hemática y para los ELISA fueron obtenidas en colaboración con la Pasante de Medicina Alma Leticia Chávez Zea (Servicio Social) y el Servicio de Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría, previa aprobación del Comité de Ética del Instituto Nacional de Pediatría.

Posterior a la firma del Consentimiento Informado (Anexo I) se solicitó la donación de 3.0 mL de sangre, el cual se obtuvo durante el mismo procedimiento de donación. De cada muestra de sangre se obtuvieron dos alícuotas de sueros: una para la detección de anticuerpos y la otra fue tratada con glicerol para la captura de antígeno, ambas fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

Se recabó la siguiente información de cada disponente: la biometría hemática de la que se obtuvo el recuento de eosinófilos que son las células presentes en una infección por nematodos, sexo, lugar de procedencia y nivel máximo de estudios (Figura 8).

#### **9.1.2 Obtención de adultos de *T. canis* y huevos larvados**

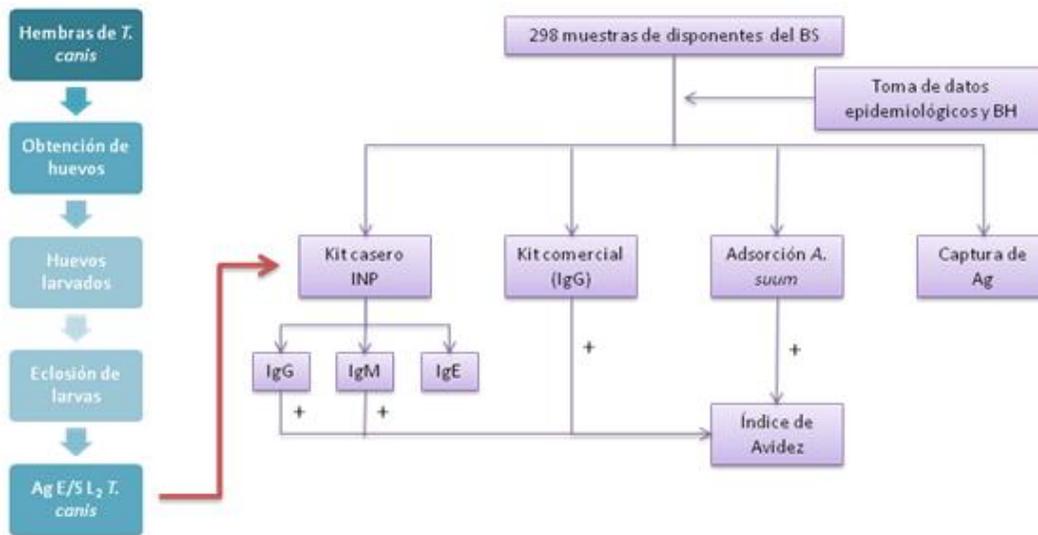
Los parásitos adultos fueron donados por el Dr. Camilo Romero Núñez de la Universidad del Estado de México, campus Amecameca. Para la obtención de huevos fecundados, las hembras adultas de *T. canis* se mantuvieron en el medio de cultivo SGPH durante varios días. Posteriormente, los huevos se recolectaron, concentraron e incubaron a temperatura ambiente durante tres semanas, para obtener la fase infectante (Rodríguez-Caballero, et al., 2007).

#### **9.1.3 Obtención de larvas de 2° estadio**

Para la eclosión de las larvas, inicialmente los huevos larvados se decortican con hipoclorito de sodio (NaHCl al 2%), durante 10 minutos, con agitación. Se lavaron con PBS y se pusieron en solución salina balanceada de Hanks (SSBH) pH 2.0 a 37 °C/30 min. La muestra se amortiguó con SSBH pH 7.8, se lavó dos veces con PBS, se les agregó el medio RPMI y se incubaron a 37°C (5% de CO<sup>2</sup>) durante toda la noche. Mediante un gradiente con limfopred (3:4) las larvas vivas se separaron del resto de los huevos y de las larvas muertas (Ponce-Macotela et al., 2011) (Figura 8).

### 9.1.4 Antígenos de excreción-secreción (E/S) de larvas

Las larvas vivas se mantuvieron en medio de cultivo RPMI en condiciones estériles. El medio se recolectó semanalmente, se le adicionó EDTA 3mM y se almacenó a -70°C hasta su uso. Posteriormente fue precipitado agregando acetona a -20°C, se centrifugó a 12,000 rpm/4°C durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se agregó PBS estéril e inhibidores de proteasas. Fue almacenado en alícuotas a -70°C hasta su uso. Antes de utilizar el antígeno en los ensayos, se determinó la concentración de cada alícuota obtenida mediante el método de Bradford para la cuantificación de proteínas (Bradford, 1976).



**Figura 8. Diagrama de flujo del procedimiento experimental.** Los cuadros de color azul resumen el proceso de obtención del Ag E/S L<sub>2</sub> a partir de las hembras de *T. canis*, el cual fue utilizado para realizar los ensayos con los distintos anticuerpos del Kit Casero (flecha roja). Los cuadros de color morado indican las pruebas que se les realizaron a los sueros, a los positivos a IgG tanto del Kit comercial como del casero, a IgM, IgE y a la Adsorción con Ag de *A. suum* se les determinó el índice de avidez. A los 298 sueros se les realizó captura de antígeno. (Ag E/S L<sub>2</sub> *T. canis*: Antígenos de excreción-secreción de la larva de estadio 2 de *T. canis*, BH: Biometría Hemática, BS: Banco de Sangre, Ag: Antígeno).

## 9.2 Pruebas serológicas

### 9.2.1 ELISA con kit comercial

Los sueros de los 298 donadores adultos se probaron con el ELISA del Kit comercial (AccuDiag™ *T. canis* IgG), que detecta IgG contra antígenos de larvas de *T. canis*. Se siguió el procedimiento descrito por el Kit, el cual consiste en colocar 100 µl de suero en cada uno de los pozos de la placa de poliestireno, que ya esta sensibilizada y bloqueada de fábrica. Se dejó incubando durante 30 minutos, se lavó 3 veces con la solución de lavado incluida en el kit y se secó. Se agregaron 100 µl de la IgG conjugada, se incubó durante 5 minutos y la reacción se detuvo con la solución de parado, ambas incluidas en el kit, finalmente las placas se leyeron a 490 nm. Este kit comercial tiene una especificidad del 93.3%, sensibilidad del 87.5% y su valor de corte predefinido es de 0.3 (Figura 9).

### 9.2.2 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG

Los pozos de las placas de poliestireno (3590 Corning®) se sensibilizaron con 0.5µg/ml del AgE/S *T. canis*, diluido en amortiguador de carbonatos pH 9.6, las placas se incubaron a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavó tres veces con la solución de lavado I (SL-I), los sitios inespecíficos se bloquearon agregando a cada pozo 200µl de la solución de bloqueo I (SB-I) y se dejó incubando a 37°C durante una hora, se lavó, se agregaron 100 µl/pozo de cada uno de los 300 sueros de los donadores adultos sanos, previamente diluidos 1:64 en PBS Tween 20 al 0.05% y se incubó durante una hora a 37°C. Se lavó (SL-I), se adicionaron 100µl del anticuerpo conjugado diluido 1:1000 en PBS Tween 20, se incubó durante una hora a 37°C, se lavó (SL-I), se agregaron 100 µl/pozo de solución de cromógeno I y se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 5 minutos. La reacción fue detenida con 100µl/pozo de ácido sulfúrico 2N. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro para microplacas 51119300 Thermo Scientific™ Multiskan™ GO) a 490nm (Figura 9).

### 9.2.3 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgM

Los pozos de las placas de poliestireno (3590 Corning®) se sensibilizaron con 0.5µg/ml del AgE/S *T. canis*, diluido en amortiguador de carbonatos pH 9.6, las placas se incubaron a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavó tres veces (SL-I), los sitios inespecíficos se bloquearon (SB-I), se dejó incubando a 37°C durante una hora y se lavó. En el caso de este ensayo a partir de las diluciones 1:64 se realizó una segunda dilución 1:320 en PBS Tween 20 al 0.05% y se agregaron 100 µl/pozo de cada uno de los 300 sueros de los

donadores adultos sanos, y se incubaron durante una hora a 37°C. Se lavó (SL-I), se adicionaron 100µl del anticuerpo conjugado diluido 1:1000 en PBS Tween 20, se incubó durante una hora a 37°C, se lavó, se agregaron 100 µl/pozo de solución de cromógeno y se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 15 minutos. La reacción fue detenida con 100µl/pozo de ácido sulfúrico 2N. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro para microplacas 51119300 Thermo Scientific™ Multiskan™ GO) a 490nm (Figura 9).

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

Los pozos de las placas de poliestireno (3590 Corning®) se sensibilizaron con 0.5µg/ml del AgE/S *T. canis*, diluido en amortiguador de carbonatos pH 9.6, las placas se incubaron a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavó 3 veces (SL-I), los sitios inespecíficos se bloquearon (SB-I), se dejó incubando a 37°C durante una hora y se lavó (SL-I).

Simultáneamente, los sueros diluidos 1:64 de los donadores se adsorbieron con 3µl de antígeno somático de *Ascaris suum* con la finalidad de que los anticuerpos afines se unieran y los anticuerpos específicos al Ag E/S *T. canis* quedarán disponibles. Estos sueros se dejaron incubando durante una noche a 4°C.

Se agregaron 100 µl/pozo de cada uno de los 300 sueros tratados y se incubaron durante una hora a 37°C. Se lavó (SL-I), se adicionaron 100µl del anticuerpo conjugado diluido 1:1000 en PBS Tween 20, se incubó durante una hora a 37°C, se lavó, se agregaron 100 µl/pozo de solución de cromógeno I y se incubó a temperatura ambiente y oscuridad durante 20 minutos. La reacción fue detenida con 100µl/pozo de ácido sulfúrico 2N. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro para microplacas 51119300 Thermo Scientific™ Multiskan™ GO) a 490nm (Figura 9).

#### **9.2.5 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgE**

Los pozos de las placas de poliestireno (3590 Corning®) se sensibilizaron con 0.5µg/ml del AgE/S *T. canis*, diluido en amortiguador de carbonatos pH 9.6, las placas se incubaron a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavó tres veces (SL-I), los sitios inespecíficos se bloquearon (SB-I), se dejó incubando a 37°C durante una hora y se lavó. En el caso de este ensayo a partir de las diluciones 1:64 se realizó una segunda dilución 1:346 en PBS Tween 20 al 0.05% y se agregaron 100 µl/pozo de cada uno de los 300 sueros de los donadores adultos sanos, y se incubaron durante una hora a 37°C. Se lavó (SL-I), se

adicionaron 100µl del anticuerpo conjugado diluido 1:1000 en PBS Tween 20, se incubó durante una hora a 37°C, se lavó, se agregaron 100 µl/pozo de solución de cromógeno y se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 15 minutos. La reacción fue detenida con 100µl/pozo de ácido sulfúrico 2N. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro para microplacas 51119300 Thermo Scientific™ Multiskan™ GO) a 490nm (Figura 9).

### **9.2.6 ELISA para determinar el índice de avidéz**

El índice de avidéz se determinó a los sueros de los donadores cuyo valor de IgG fue positivo. Los pozos de una placa de poliestireno (3590 Corning®) se sensibilizaron con 0.5µg/ml del AgE/S *T. canis*, diluido en amortiguador de carbonatos pH 9.6, la placa se incubó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavó tres veces (SL-I), los sitios inespecíficos se bloquearon (SB-I), se dejó incubando a 37°C durante una hora y se lavó (SL-I), la placa fue dividida en dos partes y a cada una se les agregó 100 µl/pozo de cada uno de los sueros de los donadores adultos con IgG positiva, previamente diluidos 1:64 en PBS-Tween 20 al 0.05% y se incubaron durante una hora a 37°C. La primera mitad de la placa se lavó 3 veces con SL-III durante 5 minutos cada lavado y la segunda mitad de la placa se lavó con SL-I, posteriormente se adicionaron 100µl del anticuerpo conjugado diluido 1:1000 en PBS Tween 20, se incubaron durante una hora a 37°C, se lavó (SL-I), se agregaron 100 µl/pozo de solución de cromógeno I y se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 20 minutos. La reacción fue detenida con 100µl/pozo de ácido sulfúrico 2N. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro para microplacas 51119300 Thermo Scientific™ Multiskan™ GO) a 490nm (Figura 9).

### **9.2.7 ELISA directo para la detección de Ag E/S *T. canis* (Captura de Antígeno)**

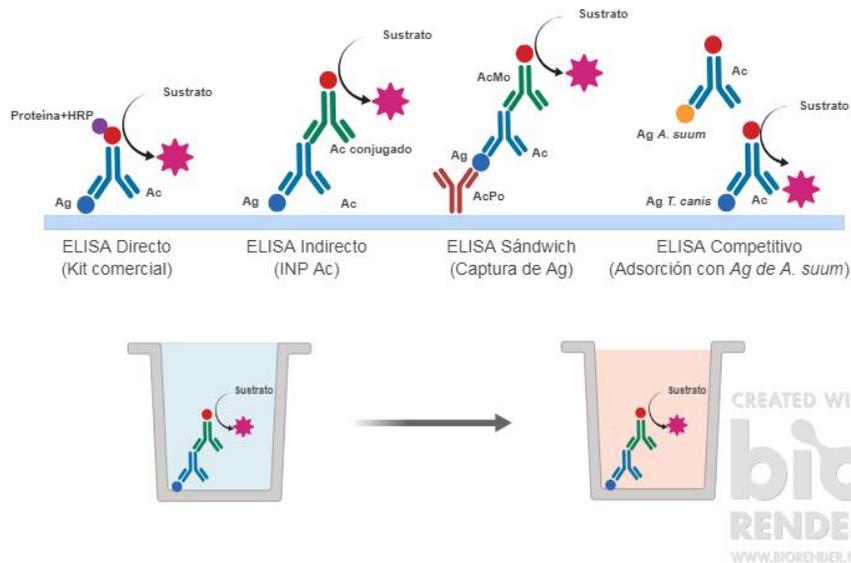
Los pozos de la placa de poliestireno (3590 Corning®) se sensibilizaron con 100 µl/pozo (5 µg/ml) de AcPo diluido en amortiguador de boratos pH 8 y la placa se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó 3 veces (SL-II), los sitios inespecíficos se bloquearon con 200 ml de leche descremada, se incubó durante 1 hora y se lavó (SL-II).

Con la finalidad de romper los complejos inmunes, los sueros de los donadores se trataron con EDTA 1M pH 7.5 (1:1), se calentaron en baño maría durante 5 minutos y se centrifugaron durante 10 min/13000 rpm. En cada pozo de la placa se agregaron 100 µl del sobrenadante de cada suero tratado y la placa se incubó durante 2 h/23°C. Se lavó (SL-II), se adicionaron 100µl del anticuerpo monoclonal diluido en PBS Tween 20 y se incubó durante 2 h/23°C. Se lavó 3 veces (SL-II), se adicionaron 100µl del anticuerpo conjugado

diluido en PBS Tween 20 y se incubó durante 2 h/23°C. Se lavó (SL-I), se agregaron 100 µl/pozo de solución de cromógeno I y se incubó a temperatura ambiente y oscuridad durante 15 minutos. La reacción fue detenida con 100µl/pozo de ácido sulfúrico 2N. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro para microplacas 51119300 Thermo Scientific™ Multiskan™ GO) a 490nm (Figura 9).

### 9.3 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa R Studio. Para la determinación del nivel de asociación entre las variables epidemiológicas se empleó la prueba de Ji cuadrada (chisq.test) donde el valor de  $p = \leq 0.05$  se consideró significativo. Las variables evaluadas fueron género, educación y eosinofilia. Además, en el caso de la Ciudad de México se analizó el nivel de asociación entre las variables anteriores por zona de procedencia (zona rural o zona urbana).



**Figura 9. Procedimiento general de las pruebas ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay).** Se muestran los 4 tipos de ensayos que se utilizaron para la detección de *T. canis*, de izquierda a derecha: ELISA directo correspondiente al Kit comercial, ELISA indirecto correspondiente al Kit casero de los 3 anticuerpos (IgG, IgM e IgE), ELISA Sándwich y ELISA Competitivo. (Ag=Antígeno, Ac=Anticuerpo)

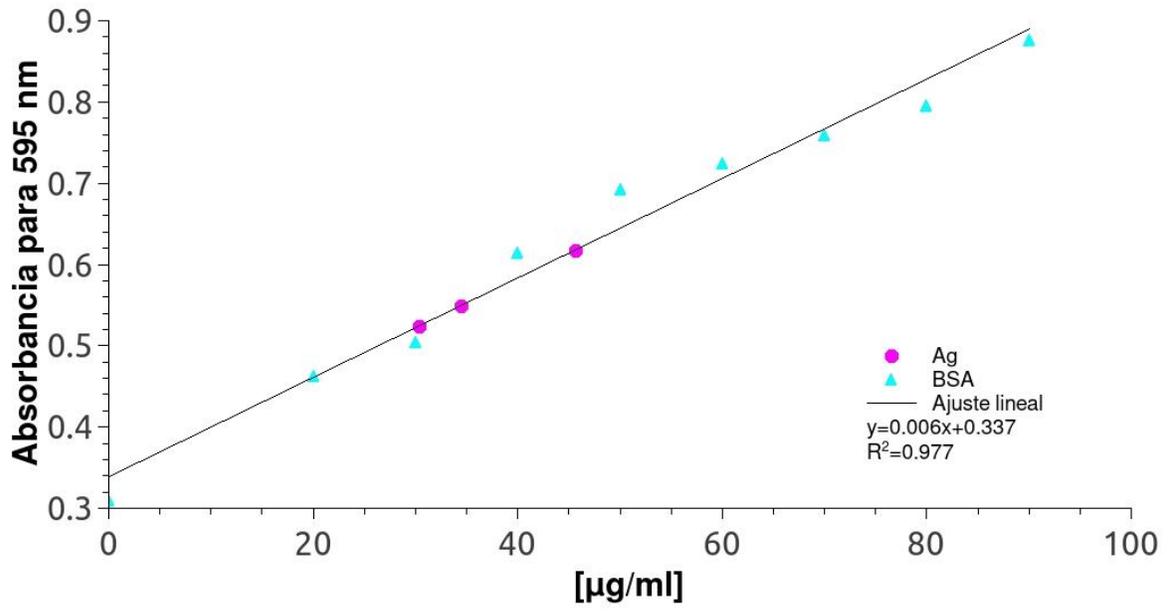
## 10. Resultados

### 10.1 Obtención de Antígeno

Los huevos larvaron al cabo de tres semanas y estos fueron eclosionados por la técnica descrita de Ponce-Macotela et al., 2011. Se obtuvieron tres alícuotas de antígeno a partir de las larvas viables (Figura 9) y al momento de su uso, la concentración de cada alícuota de antígeno fue determinada con el método de cuantificación de proteínas de Bradford (1976), utilizando el kit de Bio-Rad Protein Assay, en el cual se obtuvo un coeficiente de correlación, representado por el valor R, de 0.997 lo que quiere decir que los datos se ajustan a la línea de tendencia (Gráfica 1). Mediante la sustitución de valores en la ecuación de la recta obtenida, la concentración de antígeno para cada alícuota se registró entre los rangos de 141.6  $\mu\text{g/ml}$  para la alícuota 1, 124.9  $\mu\text{g/ml}$  para la 2 y 187.1  $\mu\text{g/ml}$  para la 3.



**Figura 10. Microfotografía de larvas viables en un cultivo de RPMI-1640, vistas desde un invertoscopio (100x).** Muestra de cultivo en la que se aprecian las larvas eclosionadas.



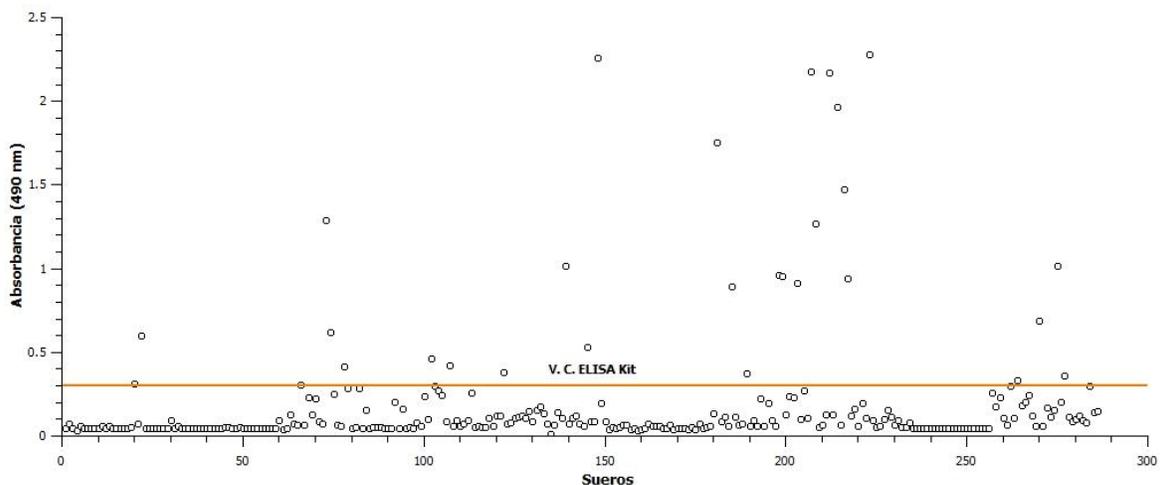
**Gráfica 1. Curva estándar construida a partir de los valores medidos de BSA (abs 595 nm), en función de las 3 alícuotas de Ag. Se muestra la gráfica de la ecuación de la recta ( $y=mx+b$ ) donde  $y=Abs$ ,  $m=pendiente$ ,  $x=concentración$  de la muestra problema y  $b=ordenada$  al origen.**

## 10.2 Obtención de sueros y procesamiento de los datos

Se obtuvieron un total de 286 sueros, se calculó el promedio de las absorbancias obtenidas en los ensayos por triplicado de cada prueba, utilizando el programa Microsoft Office Excel y los resultados obtenidos están ilustrados en gráficas de dispersión que fueron realizadas con el programa QtiPlot.

## 10.3 ELISA para detección de anticuerpos IgG anti-*T. canis* con un kit comercial

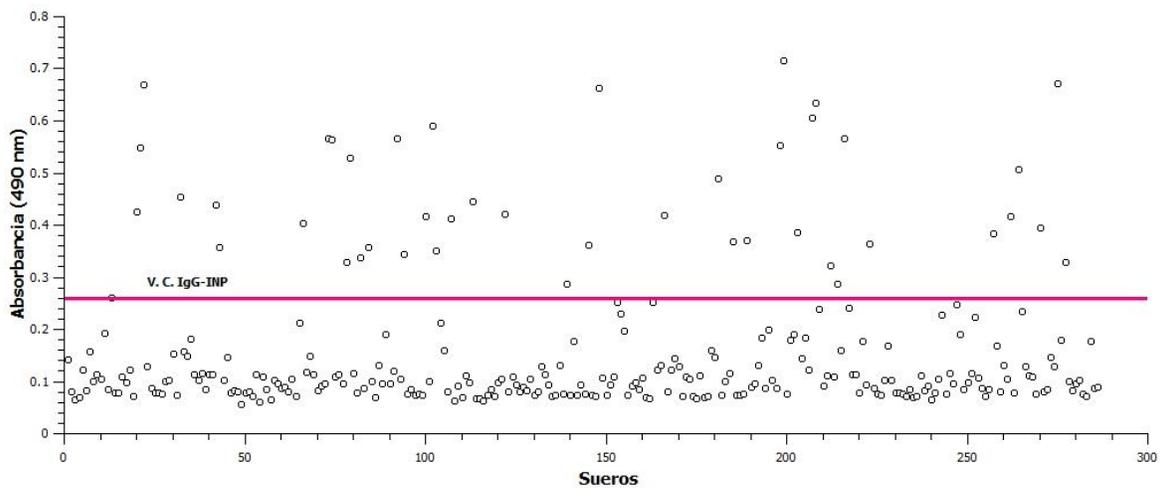
En relación a la evaluación de las muestras con el ELISA del kit comercial (AccuDiag™ *T. canis* IgG), de los 286 sueros el kit detectó 30 sueros positivos, lo cual quiere decir que la seropositividad a anticuerpos anti-*T. canis* en la población adulta evaluada fue del 10.49%, con un valor de corte predefinido por el Kit de 0.3 (Gráfica 2).



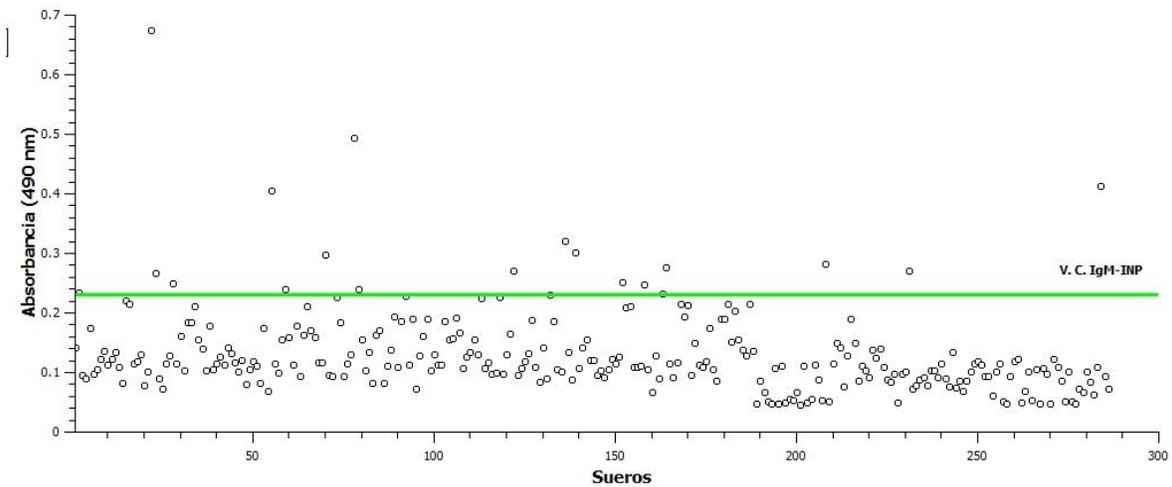
**Gráfica 2. Distribución de las absorbancias promedio de los donadores del Banco de Sangre para IgG-Kit.** La línea naranja representa el valor de corte (V. C.ELISA Kit=0.3), los puntos por debajo de la línea son resultados negativos y los puntos por encima son resultados positivos para IgG anti-*T. canis*.

#### 10.4 ELISA INP estandarizado para la detección de anticuerpos IgG, IgM e IgE anti-*T. canis* y Captura de Ag

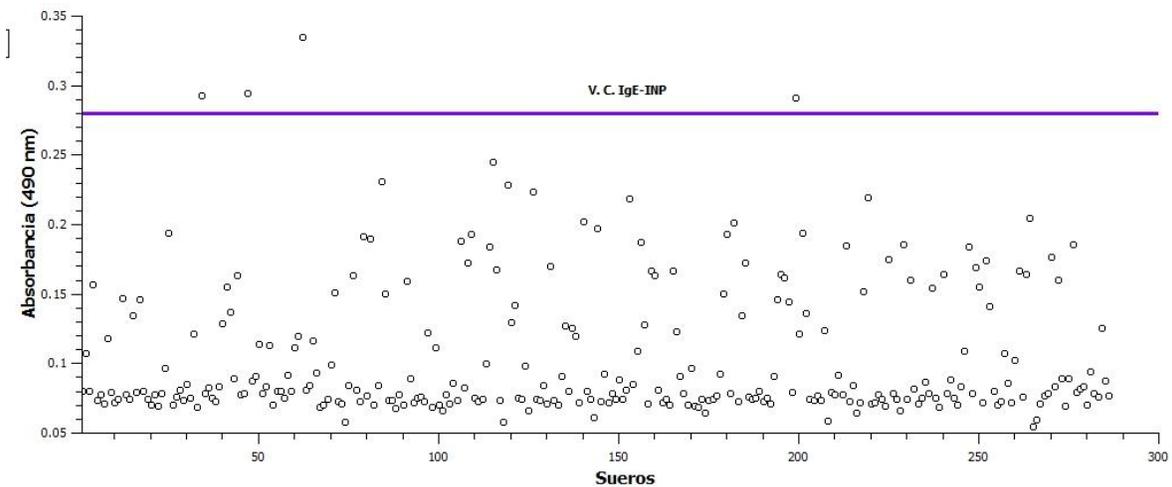
Con respecto a la evaluación de las muestras con la técnica ELISA estandarizada se detectaron 27 sueros positivos, lo que representa una seropositividad a anticuerpos IgG anti-*T. canis* del 9.44%, con un valor de corte de 0.26 (Gráfica 3). En el caso del ELISA que detecta anticuerpos IgM el valor de corte fue de 0.23 y de los 286 sueros sólo 20 fueron positivos, es decir el 6.99%; y de estos, 7 fueron positivos tanto para IgG como para IgM (Gráfica 4). En relación a la detección de anticuerpos IgE, el valor de corte fue de 0.28 y sólo 4 sueros fueron positivos sin embargo ninguno de estos sueros coincide positivamente con las demás pruebas realizadas (Gráfica 5). Finalmente, con respecto a la captura de antígeno ninguna muestra fue positiva.



**Gráfica 3. Distribución de las absorbancias promedio de los donadores del Banco de Sangre para IgG-INP.** Valor de corte para IgG-INP de 0.26 (línea rosa). La línea rosa representa el valor de corte (V. C. IgG-INP=0.26), los puntos por debajo de la línea son resultados negativos y los puntos por encima son resultados positivos para IgG-INP anti-*T. canis*.



**Gráfica 4. Distribución de las absorbancias promedio de los donadores del Banco de Sangre para IgM-INP.** La línea VERDE representa el valor de corte (V. C. IgM-INP=0.23), los puntos por debajo de la línea son resultados negativos y los puntos por encima son resultados positivos para IgM-INP anti-*T. canis*.

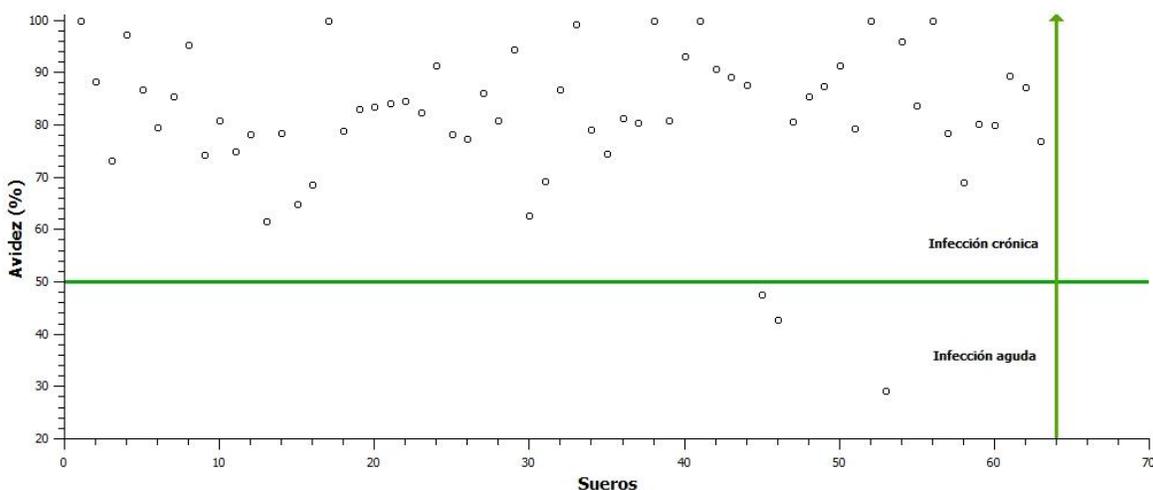


**Gráfica 5. Distribución de las absorbancias promedio de los donadores del Banco de Sangre para IgE-INP.** La línea morada representa el valor de corte (V. C. IgE-INP=0.28), los puntos por debajo de la línea son resultados negativos y los puntos por encima son resultados positivos para IgE-INP anti-*T. canis*.

### 10.5 ELISA para determinar el índice de avidez

Se realizaron tres ensayos por duplicado de los sueros que fueron positivos con el ELISA INP (IgG e IgM) y los positivos después de la adsorción con Ag somático de *A. suum*. Para determinar el índice de avidez se dividió la absorbancia media de los pozos tratados con la solución de urea entre la absorbancia media de los pozos sin tratamiento, multiplicado por 100. Los índices de hasta 50% se consideraron como indicadores de la presencia de IgG de baja avidez (infección reciente) y por arriba del 50%, IgG de alta avidez (infección antigua).

A las 63 muestras se les realizó el índice de avidez. A excepción de tres muestras (217, 219 y 251), en las demás se encontró un índice de avidez mayor al 50%, lo que indica infección crónica. La muestra 217 fue positiva tanto con el ELISA del kit comercial como con el ELISA INP y no fue positiva para la adsorción con Ag de *A. suum*. En el caso de la muestra 219 no fue positiva ni para el ELISA del kit comercial ni para el ELISA-INP pero el valor de la IgM fue mayor a su valor de corte. Finalmente, la muestra 251 fue positiva únicamente a la adsorción con Ag de *A. suum*. El índice de avidez bajo en estas tres muestras indica que son infecciones recientes (Gráfica 6).



**Gráfica 6. Distribución de las absorbancias promedio de los donadores del Banco de Sangre para índice de avidez.** La línea horizontal representa el 50% de porcentaje de avidéz, los puntos por debajo de la línea son sueros avidéz baja a la IgG y los puntos por encima son sueros con avidéz alta a la IgG.

### **10.6 ELISA competitivo, adsorción de los sueros con antígeno de *A. suum* (reacción cruzada)**

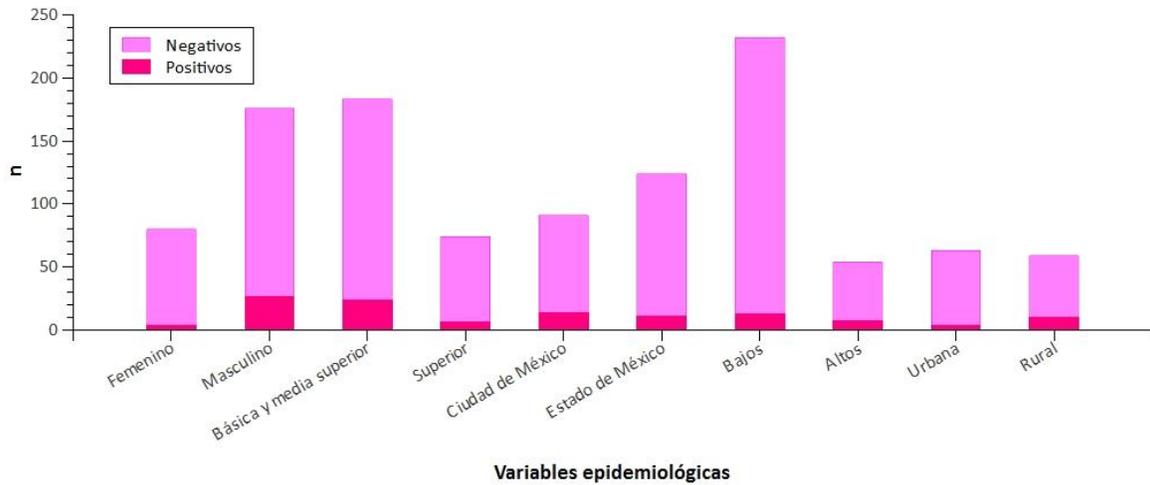
En el caso del ELISA competitivo, antes de la adsorción se encontraron 30 sueros positivos lo que representa el 10% del total de muestras; después de la adsorción de los sueros con el Ag de *A. suum* 45 fueron positivos, es decir el 15% del total de muestras, lo cual quiere decir que 15 sueros habían sido negativos.

### **10.7 Evaluación de variables epidemiológicas**

Respecto a la asociación de variables epidemiológicas con la seropositividad a *T. canis* se empleó la prueba de Ji cuadrada, donde el valor de  $p = \leq 0.05$  se consideró significativo para delimitar diferencias de seropositividad entre las zonas de la ciudad. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la zona rural y la zona urbana de la Ciudad de México, y tampoco entre la Ciudad de México y el Estado de México, así como entre género, nivel educativo y eosinofilia (Tabla 4). Sin embargo, al realizar una gráfica de barras entre todas las variables, se aprecia un mayor número de donadores masculinos que son positivos, así como en los que tienen un nivel educativo básico y en los habitantes de zonas rurales de la CDMX (Gráfica 7).

**Tabla 3. Comparación de variables epidemiológicas de los disponentes con seropositividad a *T. canis*.**

Variable		Positivo (n)	Negativo (n)	<i>p</i>
Sexo	Femenino	4	80	0.6776
	Masculino	26	176	
Educación	Básica y media superior	24	183	0.4229
	Superior	6	74	
Entidad	Ciudad de México	14	91	0.9999
	Estado de México	11	124	
Eosinófilos	Bajos	13	232	0.1457
	Altos	7	54	
Zona de la Ciudad de México	Urbana	4	63	0.1761
	Rural	10	59	



**Gráfica 7. Comparación entre las cinco variables epidemiológicas: sexo, nivel educativo, lugar de procedencia, recuento de eosinófilos y zona de la CDMX. Se representa el número de individuos positivos y negativos para cada variable.**

## 11. Discusión

Actualmente, el diagnóstico de larva *migrans* causada por *T. canis* se realiza sólo a partir de la detección de IgG, lo que puede ser indicativo de varios escenarios diferentes: las larvas todavía pueden estar vivas en los tejidos del hospedero, el hospedero puede haberse reinfestado o incluso el parásito pudo desaparecer mientras la memoria inmunológica del hospedero permanece, esta afirmación es importante porque un hospedero curado de parásitos aún puede tener anticuerpos circulando por el torrente sanguíneo. Además, la detección de IgG-*T. canis* puede implicar una reacción cruzada con otros parásitos emparentados como *A. suum* (Muñoz-Guzmán et al., 2010).

En este estudio se evaluó la seroreactividad a antígeno de larvas de *T. canis* e IgG-anti *T. canis* de 286 muestras de disponentes del banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría, por medio de 7 pruebas inmunológicas distintas. En primer lugar se tomó en cuenta el diagnóstico con un kit comercial y un kit casero, ambos para detectar IgG-anti *T. canis*. El kit comercial detectó 30 casos positivos pero al realizar el ensayo con el kit casero el número de estos disminuyó a 27. Suponemos que este fenómeno se debe a la alta reacción cruzada con antígenos de otros nematodos no intestinales, reportada para algunos kits comerciales (Muñoz et al., 2010), debido a la existencia de variantes antigénicas del estadio larvario L<sub>2</sub> de *T. canis* (Dlugosz et al., 2015). El anticuerpo monoclonal específico usado en el ELISA del kit casero (Rodríguez et al., 2015), tiene una especificidad del 100% por lo que no reacciona de forma cruzada con antígenos de otros parásitos, además después de la adsorción con antígeno de *A. suum* 15 sueros fueron positivos. Sin embargo, el hallazgo de individuos seropositivos a IgG en esta población sugiere que pueden estar infectados o que ya solo es la memoria inmunológica, por lo que no puede conocerse su estado, y esto hace que sea necesario comprobarlo con otras pruebas inmunológicas.

En el laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría se desarrolló un modelo *in vivo* con *T. canis*, proponiendo que existe una infección reciente cuando sólo están presentes los antígenos, hay larva *migrans* activa cuando se detectan tanto antígenos como IgG o si se encuentra IgG sin antígeno indica la presencia de memoria inmunológica en ausencia de enfermedad. La combinación de pruebas, incluida la captura de antígeno de larvas y la detección de anticuerpos anti-*T. canis*, es fundamental para determinar la presencia de larvas vivas (Rodríguez-Caballero et al., 2017).

En este estudio no se encontraron muestras positivas para la captura de antígeno por lo tanto suponemos que existe memoria inmune en los donadores, lo cual quiere decir que en algún momento estuvieron expuestos al antígeno o incluso, pudieron haberse infectado con el parásito. A su vez, esto puede ser corroborado con el porcentaje de

avidez, ya que encontramos valores por arriba del 50%, incluso algunos del 100%, indicando que podría tratarse de una infección crónica por estos valores tan altos. La prueba de avidez está basada en la intensidad con que los anticuerpos IgG específicos permanecen ligados al antígeno. La alta avidez es característica de infección pasada, la baja avidez es característica de una infección aguda o reciente.

El conocimiento sobre la reactividad de la IgM en las infecciones por *T. canis* en humanos es escaso (Roldán, Elefant & Ferreira, 2017). En nuestros resultados encontramos solo 20 sueros positivos a IgM y de estos, 7 fueron positivos simultáneamente a IgG pero ninguno fue positivo a captura de antígeno ni tienen un porcentaje bajo de avidez, lo que confirma una infección antigua. El sistema inmune del hospedero se activa por la presencia de patógenos y sus antígenos durante una infección, conduciendo a una respuesta tanto celular como humoral, lo que implica un aumento de anticuerpos IgM, seguido de cambios de isotipo (IgG, IgA o IgE) y de la maduración en la afinidad de los anticuerpos (Boes, 2000). En muchas enfermedades infecciosas la IgM se considera un marcador de fase aguda (Kaveri, Silverman & Bayry, 2012), sin embargo este no es el caso en la toxocariasis humana ya que se puede encontrar la fase crónica de la enfermedad (Smith et al., 2009). Roldán, Elefant & Ferreira (2017) encontraron que la IgM tiene sensibilidad pero no especificidad para el diagnóstico de la toxocariasis humana.

La citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) es el mecanismo principal para matar parásitos, en los que la IgE desempeña un papel esencial (Capron y Capron, 1994). Se ha reportado que los niveles altos de IgE junto a la presencia de eosinofilia se asocian frecuentemente con enfermedades alérgicas en los países desarrollados, mientras que en los países en vías de desarrollo dichos niveles están altamente asociados con infecciones parasitarias (Cooper et al. 2008), especialmente las causadas por helmintos intestinales (Kayaba et al. 2001). Por otro lado la eosinofilia ha sido documentada en humanos infectados por *T. canis*, incluso en sujetos asintomáticos (Jacob et al. 1994) y con frecuencia se acompaña de altos niveles de IgE total (Alonso et al. 2000). Con respecto a la IgE solo encontramos cuatro sueros positivos y ninguno de estos coincide con la positividad a la IgG o la IgM ni con las pruebas de adsorción, avidez y captura de antígeno, además de que aunque se encontraron sueros con eosinofilia, ninguno de ellos coincide con la positividad en este anticuerpo.

Con respecto al análisis de las variables epidemiológicas, las pruebas de Ji cuadrada no arrojaron diferencias significativas entre los distintos pares de datos. Sin embargo puede notarse que en el caso de los donadores de sexo masculino hay un mayor número de individuos seropositivos, así como en el caso de los que habitan en las zonas rurales de la Ciudad de México y los que tienen una escolaridad de nivel básico, por otro lado no hay diferencias entre la cantidad de positivos y negativos provenientes de la Ciudad de México

y el Estado de México, ni entre los eosinófilos bajos o altos. Estos resultados concuerdan con los reportados en la bibliografía ya que los factores de riesgo más comúnmente citados para la toxocariasis incluyen el sexo masculino, la posesión de mascotas caninas que viven al aire libre y comen animales que son hospederos paraténicos, bajo nivel educativo y realizar actividades recreativas en lugares donde es común que los perros defecuen (Lee, Moore, Bottazzi & Hotez, 2014). Existen estudios realizados en Estados Unidos que informan la prevalencia de anti-*T. canis* por género (Clinton, Carabin, & Little, 2010; Jones, Won, Kruszon-Moran, Wilson, & Schantz, 2008; Walsh & Haseeb, 2012; Kruszon-Moran, Jones, Won, & Schantz, 2008; Stevens, Haas, & Haileyesus, 2011; Congdon & Lloyd, 2011; Walsh, 2011; Woodhall et al., 2012). El 73% de estos estudios encontraron una prevalencia significativamente mayor en los hombres en comparación con las mujeres, mientras que el 27% de los estudios no encontraron diferencias significativas entre los géneros. Ningún estudio encontró que las mujeres tienen una prevalencia significativamente mayor de infección por *Toxocara canis* que los hombres. Tres estudios de Canadá informaron prevalencia por género, dos de estos estudios no informaron diferencias significativas en la prevalencia entre géneros y un estudio informó una mayor prevalencia en hombres (Sampasa-Kanyinga et al., 2013; (Schurer et al., 2013; Levesque et al., 2007). Finalmente, solo un estudio de México informó la prevalencia por género en el que se encontró una prevalencia significativamente mayor en hombres que en mujeres (Romero Núñez et al., 2013). Cabe resaltar que un estudio realizado en un banco de sangre brasileño muestra proporciones del 20 al 37% de donadores del sexo femenino, una proporción más baja a comparación de los donadores del sexo masculino (Gonçalez, Sabino, & Chamone, 2003), esto puede suponerse a que los hombres donan sangre más veces al año a comparación de las mujeres, que deben dejar un intervalo de tiempo entre cada donación debido al ciclo menstrual.

Los datos de prevalencias de seropositividad a *T. canis* varían a nivel mundial, esto incluye 1% en España, (Portus et al, 1989) 7% en Australia, (Nicholas et al., 1986) 13.6% en la República Eslovaca, (Havasiova et al., 1993) 34% en Bolivia, (Cancrini et al, 1998) 81% en Nepal (Rai et al, 1996) y 92.8% en la isla La Reunión (Magnaval et al, 1994). En Nueva Zelanda se reporta una tasa de seropositividad del 0.7% (Zarkovic et al., 2007). Se considera que *T. canis* es un organismo que tiende a causar infección mayoritariamente en niños y es probable que las tasas de seropositividad disminuyan con la edad (Radman et al, 2000; Chieffi et al, 1990), por lo que es poco probable encontrar individuos con infección aguda en poblaciones adultas. Un estudio de Bulgaria mostró una seroprevalencia de alrededor del 4% entre personas clínicamente sanas y dedujeron que es un signo de presencia de infección asintomática entre la población (Kaneva et al., 2015). En nuestros resultados hayamos una seroprevalencia del 9.44% en la población de estudio, que coincide con los valores reportados en los estudios anteriormente citados. De

acuerdo a todas las pruebas realizadas, podemos considerar que la población del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría presenta una infección asintomática, crónica o que presenta memoria inmunológica ante antígenos de *T. canis*, se necesitan otros datos epidemiológicos como la edad, el estilo de vivienda y la presencia de mascotas para poder relacionar estos porcentajes a distintos factores de riesgo, así como para realizar un análisis en retrospectiva de la infección crónica.

## 12. Conclusiones

Se encontró seroreactividad positiva a *T. canis* en sueros de disponentes del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría, sin embargo la combinación de varias pruebas, sobre todo la detección de anticuerpos anti-*T. canis* y la captura de antígeno, es fundamental para determinar si la infección es antigua o reciente. Los anticuerpos monoclonales anti-*T. canis* del kit casero utilizados en el inmunodiagnóstico tienen una alta sensibilidad y especificidad a los antígenos circulantes, en comparación con los anticuerpos del kit comercial que presentaron reacción cruzada con antígenos de *A. suum*. La positividad a IgG pero no IgM ni a IgE indica la presencia de infección asintomática, de infección crónica o de memoria inmunológica en esta población, confirmado por el índice de avidéz mayor al 50 % y los resultados negativos a captura de antígeno.

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre los pares de variables epidemiológicas, el género masculino presentó mayor número de individuos con seropositividad a anti-*T. canis*, además de que los individuos con nivel educativo básico y aquellos que viven en las zonas rurales de la Ciudad de México también presentaron mayor seropositividad, por lo que la toxocariasis está ligada a condiciones ambientales desfavorables y riesgo ocupacional.

### **13. Perspectivas**

El presente trabajo funciona como referencia para futuros estudios de fines epidemiológicos en una población adulta, y sobre todo para aquellos que se realicen en bancos de sangre al tratarse del primer estudio que se realiza en esta población en la Ciudad de México.

Se sugiere realizar un cuestionario más extenso de datos de importancia epidemiológica tales como la edad, la ocupación, la presencia de mascotas y el tipo de vivienda tanto en el presente como en el pasado, con la finalidad de realizar un análisis retrospectivo que complemente el diagnóstico inmunológico. La delimitación de la población por conglomerados y el establecimiento de un muestreo más extenso o de múltiples Bancos de sangre que no sean centralizados puede servir para comparar los datos y dar un mejor panorama acerca de la toxocariasis en las poblaciones adultas.

## Índice de Figuras

Figura 1. Morfología de <i>T.canis</i> .....	11
Figura 2. Microfotografía del huevo de <i>T. canis</i> .....	12
Figura 3. Microfotografía de la fase infectante de <i>T. canis</i> .....	13
Figura 4. Microfotografía de una larva de <i>T. canis</i> .....	14
Figura 5. Fotografía de los adultos de <i>T. canis</i> .....	15
Figura 6. Ciclo de vida de <i>T. canis</i> .....	19
Figura 7. Respuestas Th2 y Th9 contra <i>T. canis</i> .....	24
Figura 8. Diagrama de flujo del procedimiento experimental .....	35
Figura 9. Procedimiento general de las pruebas ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay).....	39
Figura 10. Microfotografía de larvas viables en un cultivo de RPMI-1640, vistas desde un invertoscopio (100x).....	12

## Índice de Tablas

Tabla 1. Técnicas serológicas para la detección de anticuerpos anti- <i>T. canis</i> en humanos	27
Tabla 2. Seroprevalencia a <i>T. canis</i> en poblaciones humanas en distintas partes del mundo .....	30
Tabla 3. Comparación de variables epidemiológicas de los disponentes con seropositividad a <i>T. canis</i> . .....	47

## Índice de Gráficas

Gráfica 1. Curva estándar construida a partir de los valores medidos de BSA (abs 595 nm), en función de las 3 alícuotas de Ag .....	41
Gráfica 2. Distribución de las absorbancias promedio de los donadores del Banco de Sangre para IgG-Kit .....	42
Gráfica 3. Distribución de las absorbancias promedio de los donadores del Banco de Sangre para IgG-INP .....	43
Gráfica 4. Distribución de las absorbancias promedio de los donadores del Banco de Sangre para IgM-INP .....	44
Gráfica 5. Distribución de las absorbancias promedio de los donadores del Banco de Sangre para IgE-INP .....	44
Gráfica 6. Distribución de las absorbancias promedio de los donadores del Banco de Sangre para índice de avidéz .....	45
Gráfica 7. Comparación entre las cinco variables epidemiológicas: sexo, nivel educativo, lugar de procedencia, recuento de eosinófilos y zona de la Ciudad de México. ....	48

## 14. Anexos

### 14.1 Anexo I. Carta de consentimiento informado para sujetos sanos

**TITULO:** “Búsqueda de la asociación entre la concentración de antígenos circulantes de la fase larvaria de *Toxocara canis* con los diferentes niveles de gravedad del asma en pacientes pediátricos”

**Investigadores Responsables:**

**Dra. Martha Ponce Macotela**

**Dr. Álvaro Pedroza Meléndez**

Se le invita a usted a participar en un estudio de investigación. Es necesario que usted decida si participará o no en el estudio. Lea cuidadosamente este formato y pregunte al médico del estudio cualquier duda al respecto.

#### **¿Para qué se efectúa este estudio?**

Se ha observado que las larvas del parásito *Toxocara canis* pueden producir manifestaciones clínicas que afectan el aparato respiratorio, tales como: fiebre, tos, y ruidos pulmonares anormales. Por tal motivo, es necesario demostrar si este parásito es el que está produciendo los síntomas.

#### **¿En qué consiste el estudio?**

En este estudio se incluirán 137 personas que acudan al Servicio del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría, a quienes se les detectará antígenos de larvas de *T.canis* y anticuerpos anti-*T.canis* en el suero de sangre periférica.

#### **¿Quiénes pueden participar en el estudio?**

Adultos sanos que sean seleccionados como donadores seguros por el Servicio de Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría

#### **¿Quiénes no deben participar en el estudio?**

No aplica

#### **¿Qué me pedirán que haga?**

El estudio se llevará a cabo en un periodo de 2 años.

Al momento de ingreso al Servicio de Banco de Sangre se le pedirá una muestra de sangre (3.0 mL/) para las pruebas de detección de antígenos de larvas de *T. canis* y anticuerpos anti-*T. canis*.

### **¿Quién sufragará los gastos del estudio?**

La detección de *T.canis* será absorbida por la Institución y los investigadores. Los costos derivados de estudios o medicamentos no relacionados con el protocolo son cubiertos por el sujeto donador de sangre.

### **¿Qué efectos indeseables pueden pasarme al participar en el estudio?**

Ninguno. La muestra de sangre se obtendrá durante el mismo procedimiento de donación

### **¿Qué beneficio puedo esperar?**

Se le dará el resultado de las pruebas inmunológicas para la detección de la parasitosis y no tendrá costo.

### **¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?**

Dra. Martha Ponce Macotela (investigador responsable) 10840900-1454

Dr. Álvaro Pedrosa Meléndez, Sandra G. Bautista García (Servicio de Alergia) 10840900-1267 y Dra. Matilde Ruiz García Presidente del Comité de Ética Teléfono 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

### **¿Puedo negarme a participar en este estudio?**

La participación es voluntaria y usted puede negarse a participar desde un inicio y no perderá ninguno de los derechos que adquiere como donante del Instituto.

### **¿Quiénes van tener información de los datos de mi estudio?**

Los datos personales serán disociados, de tal forma que sólo los investigadores principales podrán saber a quién corresponde la información generada. Los datos serán confidenciales y la información generada para su divulgación no incluirá el nombre del participante.

### **¿Qué se va a hacer con las muestras biológicas?**

De las muestras de sangre que se obtengan, sólo se utilizará una parte de ella. Las células serán destruidas de acuerdo a los procedimientos internos del Instituto Nacional de Pediatría. La parte que analizaremos será el suero, parte líquida de la sangre. Los sueros que resulten positivos al parásito que estudiamos, se almacenarán en congelación, por un lapso de 5 años, en el Laboratorio de Parasitología Experimental de la Torre de Investigación "Joaquín Cravioto" del Instituto Nacional de Pediatría, posteriormente serán destruidos bajo los procedimientos internos del Instituto Nacional de Pediatría. Los sueros negativos al parásito, serán destruidos una vez que se tenga el resultado. El uso que tendrán los sueros positivos, será para proyectos de investigación sobre la misma línea de este proyecto: "Parásitos Emergentes y Reemergentes". Usted podrá solicitar la muestra almacenada en cualquier momento que lo solicite, durante el periodo de

almacenamiento. En caso de que usted decida que las muestras de suero sean conservadas por favor, marque en la siguiente línea:

Si acepto que sean almacenadas  No acepto que sean almacenadas

**¿Puedo conocer los resultados del estudio?**

Sí.

**Al firmar a continuación, acepto que:**

Leí este formato de consentimiento.

Tuve la oportunidad de formular preguntas y éstas fueron contestadas.

Entiendo que mi participación es voluntaria.

Acepto participar en el estudio

Doy permiso para que se use y comparta la información generada, como se describe en este formato.

<b>Nombre</b>	<b>Firma</b>	<b>Fecha</b>
<b>Persona que conduce la revisión del consentimiento</b>		
<b>Testigo I.</b> <b>Dirección</b> <b>Relación que tiene con el voluntario</b>		
<b>Testigo II.</b> <b>Dirección</b> <b>Relación que tiene con el voluntario</b>		
<b>Recibí copia de este consentimiento</b>		

## 14.2 Anexo II. Reactivos

- **Amortiguador de boratos (pH 8.2)**

Reactivos	Cantidad (g)
Ac. Bórico	6.18
Tetraborato de sodio	9.54
NaCl	4.38

Los reactivos se mezclaron en 800 mL de H<sub>2</sub>O, se ajustaron a pH 8.2, se aforó a 1.0 L y se mantuvieron a 4°C.

- **Amortiguador de carbonatos (0.1M, pH 9.6)**

Reactivos	Cantidad (g)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3.18
NaHCO <sub>3</sub>	5.86

Los reactivos se mezclaron en 800 mL de H<sub>2</sub>O, se ajustaron a pH 9.6, se aforó a 1.0 L y se mantuvieron a 4°C.

- **Solución salina fosfatos (PBS)**

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad (g)</b>
NaCl	10.11
KCl	0.362
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.362
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.449

Los reactivos se mezclaron en 800 mL de H<sub>2</sub>O, se ajustaron a pH 7.2, se aforó a 1.0 L y se mantuvieron a 4°C.

- **Solución de lavado, PBS Tween 20 al 0.05%**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (mL)</b>
Tween 20	0.5
PBS pH 7.2	1000

El Tween se mezcló en 800 mL de PBS, se aforó a 1.0 L y se mantuvieron a 4°C.

- **Solución de lavado, NaCl 0.9% - Tween 20 al 0.05%**

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad (g)</b>
NaCl	10.11
Tween 20	0.5 µL

Los reactivos se mezclaron en 800 mL de H<sub>2</sub>O, se aforó a 1.0 L y se mantuvieron a 4°C.

- **Solución de bloqueo**

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Leche descremada	1g
PBS (pH 7.2)-Tween 20 (0.5%)	20mL

La leche descremada en PBS-Tween 20 se mezcló y aforó a 20 mL. La solución se preparó en el momento que se utilizó (para una placa de ELISA).

- **Solución de dilución leche 1%**

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Leche descremada	0.2g
PBS (pH 7.2)-Tween 20 (0.5%)	20mL

La leche descremada en PBS- Tween 20 se mezcló y aforó a 20 mL. La solución se prepara en el momento de su uso.

- **Solución para detener la reacción.**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (mL)</b>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	55.17
H <sub>2</sub> O (aforar)	1000

La solución se preparó y almacenó a 4 °C hasta su uso.

- **Solución Cromógeno**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (mL)</b>
Citrato de sodio 0.1M	5.0
Ácido cítrico 0.1M	5.0

Se preparó la solución y se le adiciona 0.004g de Ortofenildiamina y 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%. Esta solución se prepara inmediatamente antes de usar y se mantiene en la oscuridad antes y durante su uso.

- Medio de cultivo SGPH (500ml)

Reactivo	Cantidad
PBS estéril	500 mL
Plasma humano	5.0 mL
Sacarosa (azúcar comercial)	10 g
Antibióticos y antimicótico	
Gentamicina	20mg,
Penicilina	200mg
Estreptomina	20mg
Ampicilina	10mg,
Ceftazidina	10 mg,
Anfoterizina B	1mg.

Se mezcla el PBS (30 mL) con antibióticos y sacarosa. Se esterilizó por filtración (membrana 0.2  $\mu$ m) y se agregó el resto de PBS estéril y el plasma. Para control de esterilidad, una alícuota se sembró en medio de gelosa sangre. El medio se almacenó a 4°C hasta su uso.

## 15. Referencias

- Anderson, J. P., Rascoe, L. N., Levert, K., Chastain, H. M., Reed, M. S., Rivera, H. N., ... Handali, S. (2015). Development of a Luminex Bead Based Assay for Diagnosis of Toxocariasis Using Recombinant Antigens Tc-CTL-1 and Tc-TES-26. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(10).
- Badley, J. E., Grieve, R. B., Rockey, J. H., & Glickman, L. T. (1987). Immune-mediated adherence of eosinophils to *Toxocara canis* infective larvae: the role of excretory-secretory antigens. *Parasite Immunology*, 9(1), 133-143.
- Barisani-Asenbauer, T., Maca, S. M., Hauff, W., Kaminski, S. L., Domanovits, H., Theyer, I., & Auer, H. (2001). Treatment of Ocular Toxocariasis with Albendazole. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 17(3), 287-294.
- Barutzki, D., & Schaper, R. (2011). Results of Parasitological Examinations of Faecal Samples from Cats and Dogs in Germany between 2003 and 2010. *Parasitology Research*, 109(S1), 45-60.
- Boes, M. (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular Immunology*, 37(18), 1141-1149.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, 7.
- Caldera, F., Burlone, M. E., Genchi, C., Pirisi, M., & Bartoli, E. (2013). *Toxocara* encephalitis presenting with autonomous nervous system involvement. *Infection*, 41(3), 691-694.
- Caumes, E. (2003). Treatment of cutaneous larva *migrans* and *Toxocara* infection. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 17(2), 213-216.
- Chabaud A.G., Bain O. (1994). The evolutionary expansion of the Spirurida. *International Journal for Parasitology*, 24(8),1179-1201.
- Çelik, T., Kaplan, Y., Ataş, E., Öztuna, D., & Berilgen, S. (2013). *Toxocara* Seroprevalence in Patients with Idiopathic Parkinson's Disease: Chance Association or Coincidence? *BioMed Research International*, 2013, 1-4.
- Clinton, R. M., Carabin, H., & Little, S. E. (2010). Emerging Zoonoses in the Southern United States: Toxocariasis, Bovine Tuberculosis and Southern Tick-Associated Rash Illness. *The American Journal of the Medical Sciences*, 340(3), 187-193.
- Cooper, P. J. (2008). *Toxocara canis* infection: an important and neglected environmental risk factor for asthma? *Clinical & Experimental Allergy*, 38(4), 551-553.

- Corrêa, C. R. S., & Fialho, P. M. M. (2016). A Systematic Review of Toxocariasis: A Neglected But High-Prevalence Disease in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(6), 1193-1199.
- Dai, R. S., Li, Z. Y., Li, F., Liu, D. X., Liu, W., Liu, G. H.,... Zhu, X. Q. (2009). Severe infection of adult dogs with helminths in Hunan Province, China poses significant public health concerns. *Veterinary Parasitology*, 160(3-4), 348-350.
- Dattoli, V. C. C., Freire, S. M., Mendonça, L. R., Santos, P. C., Meyer, R., & Alcantara-Neves, N. M. (2011). *Toxocara canis* infection is associated with eosinophilia and total IgE in blood donors from a large Brazilian centre: *Toxocara canis* infection in blood donors. *Tropical Medicine & International Health*, 16(4), 514-517.
- de Savigny, D. H., Voller, A., & Woodruff, A. W. (1979). Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Pathology*, 32(3), 284-288.
- Del Prete, G. F., De Carli, M., Mastromauro, C., Biagiotti, R., Macchia, D., Falagiani, P.,... Romagnani, S. (1991). Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T-helper or type 2 T-helper) profile of cytokine production. *Journal of Clinical Investigation*, 88(1), 346-350.
- Deplazes, P., van Knapen, F., Schweiger, A., & Overgaauw, P. A. M. (2011). Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocariasis. *Veterinary Parasitology*, 182(1), 41-53.
- Deshayes, S., Bonhomme, J., & de La Blanchardière, A. (2016). Neurotoxocariasis: a systematic literature review. *Infection*, 44(5), 565-574.
- Despommier, D. (2003). Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 265-272.
- Dunsmore, J. D., Thompson, R. C. A., & Bates, I. A. (1984). Prevalence and survival of *Toxocara canis* eggs in the urban environment of Perth, Australia. *Veterinary Parasitology*, 16(3-4), 303-311.
- Dziemian, E., Żarnowska, H., Kołodziej-Sobocińska, M., & Machnicka, B. (2008). Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in human toxocariasis. *Parasite Immunology*, 30(3), 187-190.
- Elefant, G. R., Roldán, W. H., Seeböck, A., & Kosma, P. (2016). Evaluation of a di- O - methylated glycan as a potential antigenic target for the serodiagnosis of human toxocariasis. *Parasite Immunology*, 38(4), 236-243.

- El-Tras, W. F., Holt, H. R., & Tayel, A. A. (2011). Risk of *Toxocara canis* eggs in stray and domestic dog hair in Egypt. *Veterinary Parasitology*, 178(3-4), 319-323.
- Epe, C. (2009). Intestinal Nematodes: Biology and Control. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 39(6), 1091-1107.
- Fan, C.-K., Holland, C. V., Loxton, K., & Barghouth, U. (2015). Cerebral Toxocariasis: Silent Progression to Neurodegenerative Disorders? *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 663-686.
- Fan, C.-K., Liao, C.-W., & Cheng, Y.-C. (2013). Factors affecting disease manifestation of toxocariasis in humans: Genetics and environment. *Veterinary Parasitology*, 193(4), 342-352.
- Fattah, D. I., Maizels, R. M., McLaren, D. J., & Spry, C. J. F. (1986). *Toxocara canis*: Interaction of human blood eosinophils with the infective larvae. *Experimental Parasitology*, 61(3), 421-431.
- Fisher, M. (2003). *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends in Parasitology*, 19(4), 167-170.
- Fu, C.-J., Chuang, T.-W., Lin, H.-S., Wu, C.-H., Liu, Y.-C., Langinlur, M. K.,... Fan, C.-K. (2014). Seroepidemiology of *Toxocara cati* infection among primary schoolchildren in the capital area of the Republic of the Marshall Islands. *BMC Infectious Diseases*, 14(1).
- Gonçalez, T., Sabino, E. C., & Chamone, D. F. (2003). Trends in the profile of blood donors at a large blood center in the city of São Paulo, Brazil. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 13(2-3), 144-148.
- Hewitson, J. P., Grainger, J. R., & Maizels, R. M. (2009). Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(1), 1-11.
- Holland, C. V. (2017). Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara*: the enigma remains. *Parasitology*, 144(01), 81-94.
- Hotez, P. J., & Wilkins, P. P. (2009). Toxocariasis: America's Most Common Neglected Infection of Poverty and a Helminthiasis of Global Importance? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(3), e400.
- Jin, Y., Shen, C., Huh, S., Sohn, W.-M., Choi, M.-H., & Hong, S.-T. (2013). Serodiagnosis of Toxocariasis by ELISA Using Crude Antigen of *Toxocara canis* Larvae. *The Korean Journal of Parasitology*, 51(4), 433-439.

- Joffe, D., Van Niekerk, D., Gagné, F., Gilleard, J., Kutz, S., & Lobingier, R. (2011). The prevalence of intestinal parasites in dogs and cats in Calgary, Alberta. *The Canadian Veterinary Journal*, 52(12), 1323-1328.
- Joy, A.T., Chris, O.I., Godwin, N.C. (2017) Toxocariasis and Public Health: An Epidemiological Review. *Global Journal of Infectious Diseases and Clinical Research*, 3(1), 028-039.
- Kaneva, E., Rainova, I., Harizanov, R., Nikolov, G., Kaftandjiev, I., & Mineva, I. (2015). Study of *Toxocara* seroprevalence among patients with allergy and healthy individuals in Bulgaria. *Parasite Immunology*, 37(10), 505-509.
- Kaveri, S. V., Silverman, G. J., & Bayry, J. (2012). Natural IgM in Immune Equilibrium and Harnessing Their Therapeutic Potential. *The Journal of Immunology*, 188(3), 939-945.
- Kruszon-Moran, D., Jones, J. L., Won, K. Y., & Schantz, P. M. (2008). National Seroprevalence and Risk Factors for Zoonotic *Toxocara* spp. Infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(4), 552-557.
- Kuenzli, E., Neumayr, A., Chaney, M., & Blum, J. (2016). Toxocariasis-associated cardiac diseases—A systematic review of the literature. *Acta Tropica*, 154, 107-120.
- Le, T. H., Anh, N. T. L., Nguyen, K. T., Nguyen, N. T. B., Thuy, D. T. T., & Gasser, R. B. (2016). *Toxocara malaysiensis* infection in domestic cats in Vietnam — An emerging zoonotic issue? *Infection, Genetics and Evolution*, 37, 94-98.
- Lee, A. C. Y., Schantz, P. M., Kazacos, K. R., Montgomery, S. P., & Bowman, D. D. (2010). Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. *Trends in Parasitology*, 26(4), 155-161.
- Lee, R. M., Moore, L. B., Bottazzi, M. E., & Hotez, P. J. (2014). Toxocariasis in North America: A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(8), e3116.
- Levesque, B., Messier, V., Bonnier-Viger, Y., Couillard, M., Cote, S. (2007) Seroprevalence of zoonoses in a Cree community (Canada). *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 59, 283–286.
- Li, L., Gao, W., Yang, X., Wu, D., Bi, H., Zhang, S.,... Yao, X. (2014). Asthma and toxocariasis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 113(2), 187-192.
- Little, S. E., Johnson, E. M., Lewis, D., Jaklitsch, R. P., Payton, M. E., Blagburn, B. L., ... Aucoin, D. (2009). Prevalence of intestinal parasites in pet dogs in the United States. *Veterinary Parasitology*, 166(1-2), 144-152.

- Lloyd, S., Amerasinghe, P. H., & Soulsby, E. J. L. (1983). Periparturient immunosuppression in the bitch and its influence on infection with *Toxocara canis*. *Journal of Small Animal Practice*, 24(4), 237-247.
- Ma, G., Holland, C. V., Wang, T., Hofmann, A., Fan, C.-K., Maizels, R. M.,... Gasser, R. B. (2018). Human toxocariasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(1), e14-e24.
- Macpherson, C. N. L. (2013). The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. *International Journal for Parasitology*, 43(12-13), 999-1008.
- Teresa Kłapeć, A. B. (2015). Epidemiology of human toxocariasis in Poland – A review of cases 1978–2009. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(1), 28-31.
- Roldán, W. H., Elefant, G. R., & Ferreira, A. W. (2017). Immunoglobulin M antibodies are not specific for serodiagnosis of human toxocariasis. *Parasite Immunology*, 39(8), e12447.
- Romero Núñez, C., Mendoza Martínez, G. D., Yañez Arteaga, S., Ponce Macotela, M., Bustamante Montes, P., & Ramírez Durán, N. (2013). Prevalence and Risk Factors Associated with *Toxocara canis* Infection in Children. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-4.
- Ruggiero M.A., Gordon D.P., Orrell T.M., Bailly N., Bourgoin T., Brusca R.C., Cavalier-Smith T., Guiry M.D. y Kirk P.M. 2015. Correction: A higher level classification of all living organisms. *Plosone*, 10(6): e0130114.
- Sampasa-Kanyinga, H., Frcpc, B. L., Anassour-Laouan-Sidi, E., Côté, S., Serhir, B., Frcpc, B. J. W., ... Dewailly, É. (2013). *Zoonotic infections in communities of the James Bay Cree territory: An overview of seroprevalence*. 24(2), 6.
- Schurer, J. M., Ndao, M., Skinner, S., Irvine, J., Elmore, S. A., Epp, T., & Jenkins, E. J. (2013). Parasitic Zoonoses: One Health Surveillance in Northern Saskatchewan. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3), e2141.
- Smith, H., Holland, C., Taylor, M., Magnaval, J.-F., Schantz, P., & Maizels, R. (2009). How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends in Parasitology*, 25(4), 182-188.
- Stevens, J. A., Haas, E. N., & Haileyesus, T. (2011). Nonfatal bathroom injuries among persons aged ≥15years—United States, 2008. *Journal of Safety Research*, 42(4), 311-315. Ocular toxocariasis—United States, 2009–2010. MMWR Morbidity and mortality weekly report 60: 734–736.

- Walsh, M. G. (2011). Toxocara infection and diminished lung function in a nationally representative sample from the United States population. *International Journal for Parasitology*, 41(2), 243-247.
- Walsh, M. G., & Haseeb, M. A. (2012). Reduced cognitive function in children with toxocariasis in a nationally representative sample of the United States. *International Journal for Parasitology*, 42(13-14), 1159-1163.
- Wijova, M., Moravec, F., Horak, A., Lukes J. (2006). Evolutionary relationships of Spirurina (Nematoda: Chromadorea: Rhabditida) with special emphasis on dracunculoid nematodes inferred from SSU rRNA gene sequences. *International Journal for Parasitology*, 36(9), 1067-1075.
- Woodhall, D., Starr, M. C., Montgomery, S. P., Jones, J. L., Lum, F., Read, R. W., & Moorthy, R. S. (2012). Ocular Toxocariasis: Epidemiologic, Anatomic, and Therapeutic Variations Based on a Survey of Ophthalmic Subspecialists. *Ophthalmology*, 119(6), 1211-1217.