

**CARACTERIZACION DE PROTEINAS ESPECIFICAS
PARA EL DIAGNOSTICO
DE *TOXOCARA CANIS***



**Servicio de Inmunología Parasitaria
Departamento de Parasitología Sanitaria
Instituto Nacional de Parasitología
" Mario Fatała Chaben "**

2000



ANLIS- "CARLOS G. MALBRAN"
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTIN

Trabajo final de Maestría
Biología Molecular

GRACIELA INES SANTILLAN

DIRECTOR EDUARDO GUARNERA

INDICE

	Página
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	8
UBICACIÓN TAXONÓMICA	11
CICLO EVOLUTIVO	12
CICLO BIOLÓGICO	17
RELACIÓN HUÉSPED -PARÁSITO	19
DIAGNOSTICO EN HUMANOS	21
ANTÍGENO EXCRETOR –SECRETOR (ES/L₂)	23
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	
Obtención de larvas infectivas(L ₂)	27
Obtención de antígeno total excretor –secretor (ES/L ₂).....	27
Obtención de la fracción purificada del antígeno ES/L ₂	28
Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS –PAGE)del antígeno total y con antígeno purificado.....	28
Western blot con antígeno total y con antígeno purificado.....	29
Obtención de suero hiperinmune de conejo anti antígeno excretor-secretor de <i>T.canis</i>	30
Estudio con sueros de pacientes Humanos.....	30
ELISA con antígeno total y con antígeno purificado ES/L ₂	31
RESULTADOS	
Detección de proteínas específicas para el diagnóstico de <i>T.canis</i>	33
Determinación de la especificidad y la sensibilidad	
ELISA con antígeno ES/L ₂ total.....	34

Western blot con antígeno ES/L ₂ total.....	35
Purificación del antígeno ES/L ₂ de <i>T.canis</i>	37
Evaluación de glicoproteínas específicas para el diagnóstico de Toxocariosis.....	
39	
Cerdos Experimentalmente infectados.....
39	
Western blot con Suero de humanos.....	41
Detección de la especificidad y la sensibilidad del antígeno ES/L₂purificado	
ELISA con suero de humanos.....	41
ELISA con sueros de personas con sospecha clínica de Toxocariosis	
43	
DISCUSION	44
AGRADECIMIENTOS	50
BIBLIOGRAFÍA	51

RESUMEN

La Toxocariosis es una zoonosis causada por la ingestión de huevos infectivos de *Toxocara canis*. En el intestino delgado de los niños, estos huevos liberan larvas que atraviesan la pared intestinal y por vía linfática o venosa, migran hacia los distintos órganos de la economía.

El desplazamiento de las larvas en el interior del organismo da origen a dos grandes síndromes: Larva Migrans Visceral y Larva Migrans Ocular. En los últimos años se agregó una forma clínica menor, con muy pocos síntomas llamada Toxocariosis encubierta.

Dado que este nematode no completa su ciclo parasitario en el hombre, no es posible detectar el estadio de adulto, ni los huevos, en la materia fecal, por lo tanto el diagnóstico de la enfermedad es indirecto y se basa en la detección de anticuerpos en el suero u otros fluidos biológicos.

La técnica serológica más utilizada es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) que usa como antígeno los productos de excreción – secreción de larvas de segundo estadio (ES/L₂), que se obtiene manteniendo a las larvas en un medio de cultivo libre de proteínas.

Estos productos antigénicos se originan en los órganos secretorios del parásito (glándula esofágica y el poro secretorio), en su mayoría son glicoproteínas, por lo tanto no son específicas de especie y pueden reaccionar con el suero de personas que tienen Toxocariosis y otras patologías.

Como una aproximación al conocimiento de la reactividad del antígeno excretor -

secretor (ES/L₂) total en las personas , se compararon sueros de casos humanos

sospechosos , con los sueros de cerdo que se infectaron en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires

El método de Western blot reveló, que el suero hiperinmune anti E/SL₂ de *T.canis* obtenido en conejo y los sueros de pacientes con sospecha clínica de Toxocariosis, reconocen bandas de 120, 70, 55 y 32 kDa, mientras que los sueros de los animales infectados experimentalmente, reconocieron las bandas de 70 y 55 kDa.

Para evaluar la especificidad de la técnica de ELISA con el antígeno ES/L₂ total, se emplearon sueros de personas con otras Helminthiasis y con patologías no parasitarias, se observó que estos sueros presentaron títulos iguales o superiores a 1/64.

El Western blot con suero de los mismos pacientes, reveló que la glicoproteína que corresponde al triplete de 120 kDa fue la más reactiva.

Con estos resultados y sabiendo que las glicoproteínas del antígeno ES/L₂ tienen diferente punto isoelectrico (pI) se realizó una cromatografía de intercambio iónico con el fin de purificarlo.

Con este antígeno purificado se detectaron bandas de 70-55 kDa en el suero hiperinmune anti ES/L₂ de *T.canis* y los sueros de personas afectadas de Toxocariosis.

Cuando se realizó el test de ELISA con el ES/L₂ purificado, empleando los sueros con diferentes patologías, se observó uno con título de 1/64, en un paciente con Hidatidosis y otro con título de 1/32 en una persona con Sífilis.

En el Western blot con antígeno purificado, se observó que estos sueros reconocen bandas de 70,55 y 45.Kda.

Los sueros de pacientes con sospecha clínica de Toxocariosis analizados por el método

de ELISA presentaron títulos mayores a 1/32 con los dos antígenos: ES/L₂ total y ES/L₂ purificado.

La sensibilidad del test de ELISA para los dos antígenos, a la dilución 1/32 fue del 100 %, pero la especificidad para el antígeno ES/L₂ total fue del 84% y para el ES/L₂ purificado del 99%.

Empleando el antígeno ES/L₂ purificado se puede considerar, que los sueros que presentan títulos iguales o mayores a 1/32, con una sintomatología compatible, podrían ser considerados pacientes que fueron o están parasitados con *T.canis*, sin embargo no se puede diferenciar si se trata de una Toxocariosis reciente o antigua.

INTRODUCCION

La Toxocariosis es una zoonosis causada por la ingestión de huevos embrionados de *Toxocara canis*, que es un helminto propio de los perros y también probablemente por los huevos de *Toxocara cati*, que es el áscaris que parasita a los gatos.

Esta parasitosis afecta sobre todo a los niños quienes están en contacto con los cachorros y juegan en las plazas donde defecan los animales, por otra parte la transmisión se favorece porque los huevos tienen la característica de ser muy pegajosos y se adhieren a las manos, juguetes e incluso la comida, lo que permite que los niños ingieran los huevos con mayor facilidad

El ciclo de vida del *T.canis* es más complejo que el de otros nematodes, el parásito adulto vive en el intestino de los perros y gatos, los huevos en el medio ambiente y las larvas tienen un proceso de migración y enquistamiento hístico en las hembras adultas de esos animales. Durante la gestación se activan las larvas produciendo una migración transplacentaria, lo cual da lugar a que los cachorros nazcan infectados, provocándoles neumonías y trastornos intestinales con disminución del crecimiento, vómitos, diarreas y cuando la infección es muy alta puede ocurrir la muerte del animal. (1)

Como los cachorros nacen infectados, al cumplir un mes de vida, los parásitos ya adultos comienzan a eliminar huevos sin embrionar al medio ambiente, eliminando alrededor de 200.000 huevos por día (1). Los mismos son dispersados por las lluvias, los vientos y otros factores ambientales, permaneciendo infectivos por meses y en casos excepcionales durante años.

La acumulación de huevos en sitios de tierra y arena donde los perros depositan las heces produce la contaminación de plazas y jardines.

En condiciones favorables de temperatura y humedad (25°C a 35 °C y 85% de humedad) estos huevos desarrollan a larvas infectivas en 10 días. (2)

A pesar de ser una parasitosis cosmopolita, los estudios de la prevalencia de huevos en el suelo depende de los métodos de recolección y del área geográfica estudiada, ya que no se encontraron huevos en la región de la tundra y es baja la prevalencia en zonas semi desérticas y áridas, pero sí están presente a los 60 ° de latitud norte, como en Noruega y Suecia. (1)

En nuestro país se estudiaron 14 plazas de la Ciudad de Buenos Aires, donde se encontraron huevos de *T.canis* en el 78.6 % de los suelos y en el 45.5 % de los areneros, por otro lado en la ciudad de La Plata se analizaron 21 parques y plazas públicas y se encontró que el 71% estaban contaminadas con huevos de *Toxocara sp* (3)

Cuando el hombre ingiere estos huevos, las larvas que se liberan en el intestino delgado atraviesan la pared y se dispersan por los órganos, a través de la vía linfática y venosa, dando origen a dos síndromes, según lo descrito por Kayes et al (4): Larva Migrans Visceral (LMV) y Larva Migrans Ocular (LMO). En el año 1987 Glikman incluyó una forma clínica indiferenciada que observó en algunas personas adultas en Francia y que conoció con el nombre de Toxocariosis encubierta. (5)

En el caso de LMV los síntomas que se observan pueden confundir la enfermedad con otras que son frecuentes en la infancia. Estos pacientes presentan dolor abdominal, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatías, disminución del crecimiento, anemias, fiebre y disminución del apetito. (6)

En algunos casos pueden presentar tos y broncoespasmos producidos por la migración de las larvas en los pulmones.

En algunos niños con asma se observó, que además de presentar niveles elevados de

IgE, tienen títulos elevados de anticuerpos de tipo IgG anti *Toxocara*. (1)

Las larvas también pueden acumularse en el sistema nervioso central donde producen convulsiones, parálisis y otros desórdenes neurológicos. (7)

Los datos de laboratorio que presentan estos pacientes, muestran aumento de eosinófilos, leucocitos e hipergamaglobulinemia.

La forma ocular (LMO) es una infección unilateral, que presenta disminución de la visión, estrabismo, leucocoria, endoftalmitis, granulomatosis, retinocoroiditis, papilitis óptica, uveítis y otras lesiones (8).

En este caso los datos de laboratorio no presentan aumento de eosinófilos, leucocitos y tampoco se observa aumento de gammaglobulinas. (1)

En el caso de la Toxocariosis encubierta se trata de pacientes con síntomas no específicos como fiebre, dolor abdominal, dolor de cabeza, anorexia adenitis cervical, y tos, que se acompaña con niveles elevados de anticuerpos anti *T.canis* en circulación. (1)

En el hombre el diagnóstico de la enfermedad es problemático, ya que el estadio larval de *T.canis* no puede ser detectado directamente, salvo por estudios histológicos que se realizan post mortem. Por otra parte las larvas no completan su evolución, lo cual les impide la postura de huevos, esto hace que el diagnóstico parasitológico tampoco sea posible. El único medio posible es indirecto recurriendo a la detección de anticuerpos en la sangre u otros fluidos biológicos.

UBICACIÓN TAXONÓMICA

REINO : ANIMALIA
PHILUM : NEMATODA
SUBCLASE : SECERNENTEA
ORDEN : ASCARIDIA
GENERO : TOXOCARA
ESPECIE : CANIS
CATTI

CICLO EVOLUTIVO

El perro cuando defeca, elimina al exterior los huevos embrionados del parásito (Fig. 1), en el medio ambiente se produce el desarrollo a larva L₁, posteriormente pasa a larva infectiva L₂, que mide 400 μm de largo y 20 μm de ancho (Fig. 2 y 3), el tercer estadio mide 1000 μm se halla en los pulmones, la tráquea y esófago del perro. El cuarto estadio se encuentra en el estómago e intestino delgado del huésped definitivo, finalmente el adulto tiene las características de los nematodos y se diferencia en machos que tienen 4 a 8 cm y hembras de 8 a 14 cm (Fig. 4).

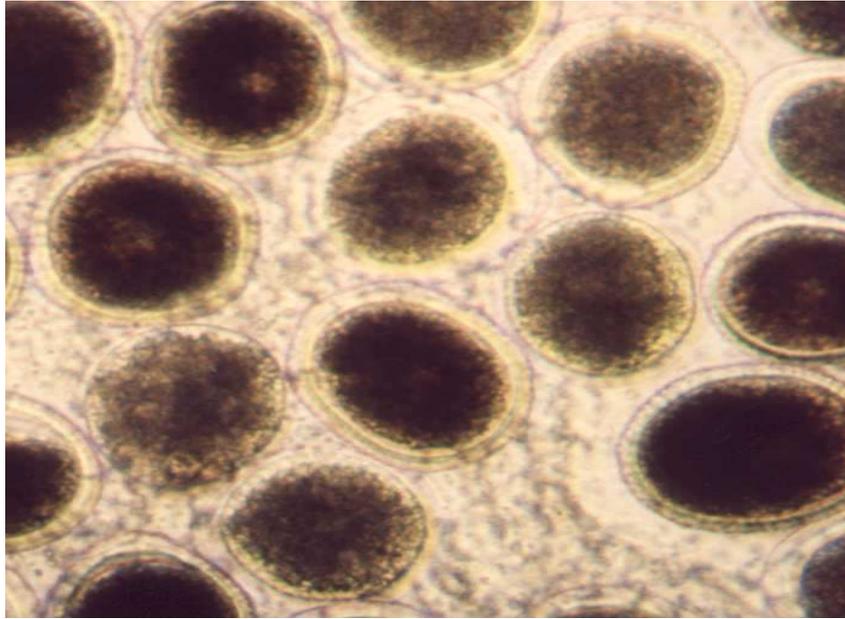


Figura 1: Huevos no larvado de *Toxocara canis* (Foto Departamento de Parasitología Sanitaria, Instituto Nacional de Parasitología, 1999)



Figura 2: Huevo de *Toxocara canis* con larva infectiva (Foto Departamento de Parasitología Sanitaria Instituto Nacional de Parasitología 1999)



Figura 3: Larva infectiva L₂ de *T. canis* (Foto Departamento de Parasitología Sanitaria Instituto Nacional de Parasitología 1999)

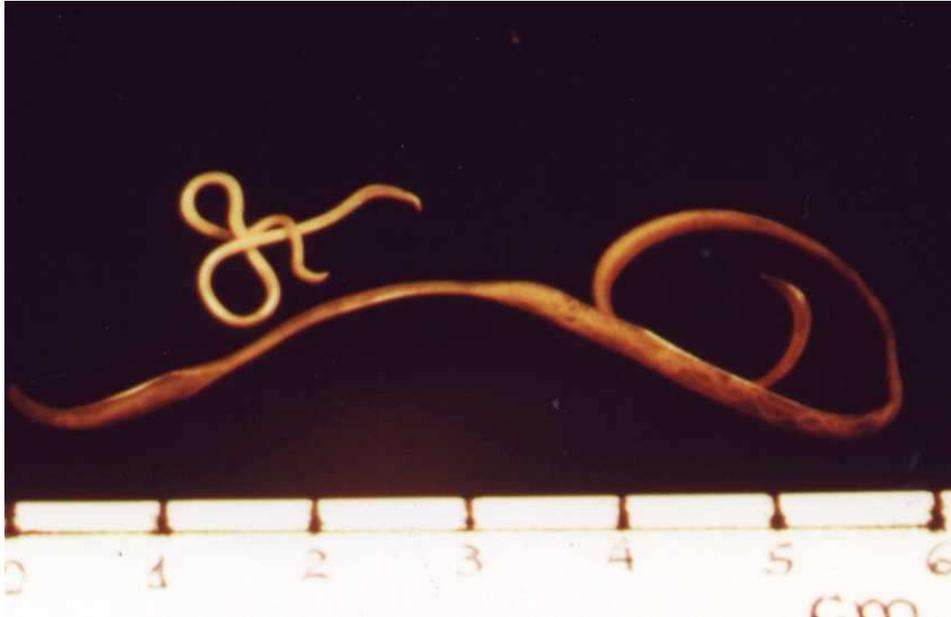


Figura 4:Parásito adulto de *T.canis* (Foto Departamento de Parasitología Sanitaria Instituto Nacional de Parasitología 1999)

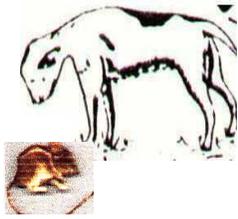
CICLO BIOLÓGICO

El perro y otros cánidos son los huéspedes definitivos de *T.canis* se infectan por la ingestión de huevos larvados, por migración transplacentaria, migración transmamaria de larvas o por ingestión de huéspedes paraténicos infectados

Cuando el perro ingiere los huevos infectivos, las larvas se liberan en la mucosa intestinal y entran en la linfa y vasos sanguíneos, llegan al hígado, luego se dirigen al corazón y los pulmones, algunas larvas continúan una migración traqueal, llegando finalmente al intestino delgado donde completan su ciclo de parásito adulto y eliminan huevos en la materia fecal, a las cuatro semanas de producida la infección. Otras larvas en cambio desde los pulmones se distribuyen por el sistema circulatorio a todo el cuerpo, principalmente hígado, pulmones, riñones y músculos.

En este ciclo pueden intervenir huéspedes paraténicos como ratones, pollos, ovejas, cerdos, palomas, lombriz de tierra y el hombre. En este último caso, la infección comienza cuando se ingieren huevos infectivos. En el intestino delgado, se liberan las larvas que atraviesan la pared intestinal y por los vasos sanguíneos se distribuyen en todo el cuerpo, alojándose sobre todo en hígado, pulmón, corazón, ojo y cerebro.

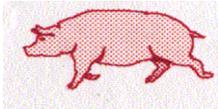
**INFECCION
EN EL PERRO**



**INFECCION
EN EL PERRO**



**HUESPEDES
PARATENICOS**



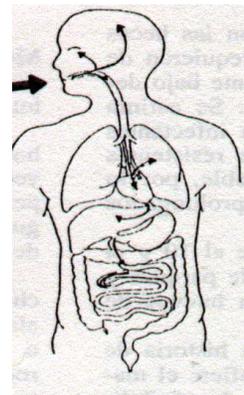
**HUEVO
ELIMINADO**



**INFECCION EN
EL HOMBRE**



HUEVO LARVADO



RELACIÓN HUÉSPED – PARÁSITO

Si bien no se conoce como es la migración de las larvas de segundo estadio de *T. canis* en los huéspedes paraténicos, se sabe que durante su desplazamiento dejan caminos hemorrágicos y áreas de necrosis. El movimiento de las larvas no es continuo hay periodos en que se detienen y luego continúan su traslado.

Cuando las larvas se desplazan, el huésped responde con una reacción inflamatoria inespecífica, posteriormente se desarrolla la respuesta inmune específica, ambas reacciones detienen la larva y en algunos casos la destruyen, pero la mayoría logra evadir la respuesta del huésped

El sistema inmune la neutraliza, debido a que las sustancias derivadas del metabolismo del parásito son muy antigénicas y producen la estimulación de los linfocitos del subgrupo Th2 y sus citoquinas, originando tanto un aumento de eosinófilos como de IgE. (1)

Alrededor de las larvas se forman agregados de eosinófilos, monocitos y neutrófilos, produciendo una cápsula de colágeno rudimentaria (9,10,11), que no libera al organismo del parásito, ya que las sustancias producidas por el metabolismo, lo protegen de la acción de las citoquinas de los eosinófilos y de la acción de los anticuerpos que se adhieren a estas glicoproteínas que se desprenden de las larvas. Por otro lado la producción constante de antígenos hace que en la infección crónica las larvas sean encapsuladas por granulomas compuestos por células multinucleadas y tejido conectivo fibroso, granulocitos y leucocitos (12), donde las larvas pueden estar intactas o alteradas con o sin residuo hialino.

Las alteraciones que se producen en los distintos órganos son consecuencia de la respuesta inmune y de las proteasas liberadas por las larvas. Algunos de los

trastornos derivan de la formación de abscesos hepáticos y alteraciones cardiopulmonares. Una de las sustancias que produce estas anomalías es la peroxidasa que liberan los eosinófilos, este componente es citotóxico cuando está en alta concentración. (13)

La respuesta inmune es ineficaz para liberar al huésped de la invasión, pero logra alterar el comportamiento del parásito.

DIAGNOSTICO EN HUMANOS

El diagnóstico médico clínico de la Toxocariosis en el hombre es incierto, los signos y síntomas que presenta son comunes con otras enfermedades infecciosas, además como ya se ha dicho, en el hombre no alcanza el estadio adulto en el intestino, por lo tanto no es posible realizar el diagnóstico parasitológico directo, la detección se realiza por métodos indirectos.

Muchas técnicas serológicas se utilizaron para el inmunodiagnóstico de la Toxocariosis, como la Fijación de Complemento, la Inmunofluorescencia Indirecta y las técnicas Inmunoenzimáticas

En los últimos años estos tests serológicos adquirieron mayor confiabilidad al emplearse la técnica de ELISA con el antígeno excretor – secretor, el cual se obtiene por cultivo de larvas de segundo estadio en un medio de cultivo libre de proteínas (14).

Sin embargo la especificidad de este test serológico es discutida, el antígeno excretor – secretor no es específico de especie, ya que se observan reactividades cruzadas con otras patologías. En cuanto a la sensibilidad hay que tener en cuenta la respuesta inmune del huésped. En los casos de LMO los niveles de anticuerpos son bajos mientras que para LMV son generalmente elevados. (1)

La sensibilidad y especificidad del test de ELISA, para detectar anticuerpos de tipo IgG, en la dilución 1\32 fue del 73% y 92 % respectivamente (15,16).

Actualmente para mejorar el diagnóstico de esta parasitosis, se han desarrollado técnicas serológicas que detectan isotipos de IgG, el tipo predominante en pacientes con sintomatología clínica de Toxocariosis es IgG1.

Los tests serológicos para detectar IgE específica producen títulos más altos en pacientes con sospecha clínica de Toxocariosis, pero la detección de esta inmunoglobulina demostró ser más útil para evaluar el tratamiento de esta afección que para el diagnóstico.

De todas formas, la detección conjunta de IgE o de isotipos de IgG, pueden ser una ayuda para la confirmación de la parasitosis. (17,18)

Otra técnica que se utiliza para diagnóstico de la Toxocariosis es el Western blot donde se observan siete bandas polipeptídicas que se dividen en bandas de elevado peso molecular (200,147,132 kDa) y de bajo peso molecular (24,28,30,35 kDa). Los autores consideran a las bandas polipeptídicas de bajo peso molecular específicas para el diagnóstico de la Toxocariosis y las de elevado peso molecular como responsables de la reactividad cruzada con otras enfermedades parasitarias (19).

En estudios posteriores realizados en un área rural de Francia y zonas tropicales, se observó que el 35% de los pacientes con otras Helminthiasis reconocen las bandas de bajo peso molecular (24,28,30,35 kDa) y pacientes con sospecha clínica de Toxocariosis las bandas de 200,147,132 70,50,35,30,28,24 kDa (20).

A pesar de todas las técnicas serológicas empleadas el diagnóstico de esta enfermedad como ya se dijo es problemático, el mismo se puede mejorar empleando antígenos purificados que aumenten la sensibilidad y especificidad de las reacciones serológicas.

ANTÍGENO EXCRETOR SECRETOR

Las larvas de *T.canis* tanto en medio de cultivo como dentro del huevo, están recubiertas por una sustancia semejante a la mucina, que esta constituida en su mayor parte por glicoproteínas y proteasas. Estos productos del metabolismo del parásito se originan en las glándulas secretorias y esofágicas y también en la cutícula del parásito (21), formando una capa electro-densa, que les permite a las larvas invadir los tejidos y las ayudan a evadir la respuesta inmune del huésped.

Estas glicoproteínas constituyen el antígeno excretor - secretor que es un mosaico antigénico contra el que se dirigen los anticuerpos. Esta compuesto por cinco moléculas antigénicas mayores de peso molecular 32,55,70,120,400 kDa que son altamente glicosiladas ya que tienen en su composición un 40% de carbohidratos.

Cuando los productos del metabolismo de *T.canis* se analizan por geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), se ven variaciones en el material obtenido, en cuanto al número de componentes y al peso molecular. Estas diferencias se observaron aún en dos lotes obtenidos con el mismo protocolo.

Se desconoce la base de tales variaciones, que según algunos autores se originan en diferentes cepas, la edad de las larvas en el medio de cultivo y a los medios utilizados, pero sin embargo a pesar de tantas variantes, el diagnóstico no se afecta. (22)

En nuestra experiencia, el análisis del antígeno excretor – secretor (ES/L₂) por SDS-PAGE, empleando geles de poliacrilamida de diferentes concentraciones (20%, 12% y 7,5%) y realizando las corridas electroforéticas en un equipo Phasystem LKB Pharmacia, reveló en todos los casos bandas de 32, 70, 55 y 120 kDa.

Estas bandas fueron reconocidas por sueros de pacientes con sospecha clínica de Toxocariosis y con suero hiperinmune anti antígeno excretor - secretor de *T.canis*

obtenido en conejo.

Se observó que no hay diferencia en el número de componentes del antígeno ES/L₂, cuando las larvas permanecen en el medio de cultivo de uno a siete días, en cambio si permanecen más de diez días, desaparecen las bandas de bajo peso molecular, posiblemente sean degradadas por acción de las proteasas. (23)

Por otro lado la concentración de proteínas medidas por el método de Bradford (24) fue mayor en el medio de cultivo de 7 días. (23)

Otros autores estudiaron el comportamiento de estas glicoproteínas empleando anticuerpos monoclonales y demostraron que la glicoproteína de 32 kDa se origina en la cutícula, se trata de proteínas de anclaje que en algunas preparaciones fueron positivas, para la coloración de hidratos de carbono, mientras que en otras no fueron reactivas. (25,26).

Las glicoproteínas de 120,70 y 55 kDa se originan en las glándulas secretoras y esofágicas y salen al exterior por el conducto esofágico o por el poro secretorio, este ultimo, esta ubicado en la cutícula del parásito. Estas sustancias cubren a la larva y la protegen de la acción de los anticuerpos.

Estos productos de excreción – secreción no son específicos de especie, por lo tanto el suero de pacientes con otras enfermedades parasitarias como Fascioliosis, Strongilodiosis y Triquinosis o enfermedades no parasitarias como Sífilis y Hepatitis, reaccionan con ellas y originan reactividad cruzada (27, 28). Hay autores que describen reactividad cruzada con *Ascaris suum* incriminando para ello a las bandas de 55 y 66 kDa (29).

Por estudios realizados previamente en el Departamento de Parasitología Sanitaria del Instituto Nacional de Parasitología, los componentes antigenicos del metabolismo

de la larva de *T.canis* presentan diferentes puntos isoeléctricos(pI): un triplete de aproximadamente 6.85 y bandas de 5.20, 5 y 4.55. Tal como se observa en la Fig. N° 7. Por otro lado en una electroforesis bidimensional se observo que la glicoproteina de 120 kDa tiene un pI de 5.20, las de 55 y 70 kDa un pI de 6.85, la de 32 kDa es de 5 y la de 30 kDa tiene un pI de 4.55.

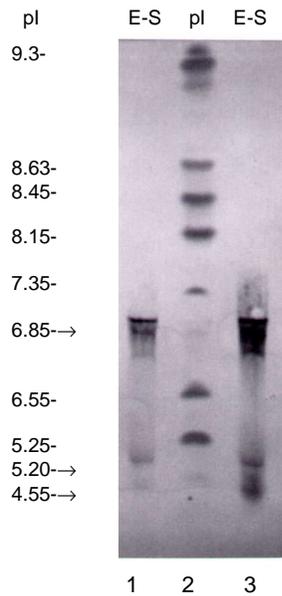


Fig. 7: Determinación del pI del antígeno excretor - secretor de *T. canis*.
 Línea :1 y 3 antígeno excretor - secretor de *T. canis*(ES/L₂), línea 2:patrones de PI

OBJETIVOS

- ❖ Evaluar glicoproteínas específicas de los productos de excreción - secreción de larvas L₂ de *Toxocara canis* para el diagnóstico serológico de la Toxocariosis humana.
- ❖ Evaluar el antígeno rico en glicoproteínas específicas para el diagnóstico de personas con sospecha clínica de Toxocariosis, comparando su eficacia con suero de cerdos experimentalmente infectados con larvas de *Toxocara canis* *

* Se agradece a la Dra. Irma Sommerfelt la cesión de los sueros de cerdos infectados experimentalmente para utilizar los como suero de control

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de larvas L₂

Se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por De Savigny (14).

- ❖ Los parásitos adultos fueron obtenidos del intestino de perros naturalmente infectados.
- ❖ Se extrajeron los úteros de 50 hembras.
- ❖ Se colocaron en solución de cloruro de sodio 0.15 M.
- ❖ Luego se digirió la pared uterina con hidróxido de sodio 0.15 M.
- ❖ Finalmente los huevos se colocaron en frascos de cultivo con 1 % de formol a 25 °C hasta que los embriones desarrollaron a larvas L₂.

Obtención de antígeno total excretor secretor (ES/L₂)

- ❖ Los huevos lavados se lavaron 3 veces con agua destilada para remover el formol.
- ❖ Al sedimento se le se agregaron 20 ml del líquido de digestión (20ml de agua destilada, 0.15 mg de pepsina 1:2500, 0.2 ml de ácido clorhídrico), granallas de metal, una barra magnética y 2 mg de bicarbonato de sodio, se agitó a 37 °C durante 7 minutos.
- ❖ Luego se efectuaron dos lavados con cloruro de sodio 0.15 M, para eliminar el líquido de digestión.
- ❖ Por otro lado se preparó un recipiente conteniendo agua / ácido clorhídrico y 2 mg de bicarbonato de sodio, el recipiente se colocó dentro de un desecador junto con el sedimento que contiene los huevos lavados y se agitó a 37 °C durante 15 minutos.
- ❖ Las larvas se transfirieron al medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 100 unidades de penicilina / ml y 250 µg / ml de estreptomina.

- ❖ La suspensión larval se colocó en tubos Oaks y Kayes y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.
- ❖ Se chequeó en el microscopio la viabilidad de las larvas y se transfirió el líquido a tubos de cultivo ajustando el sistema a una concentración de 500 larvas/10 ml de medio.
- ❖ Este conjunto se mantuvo en estufa de cultivo a 37°C.
- ❖ El antígeno ES/L₂ se recolectó semanalmente, conservándolo a -20°C.
- ❖ Para usarlo se dializó contra agua destilada y se concentró 10 veces por liofilización. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (24).

Obtención de la fracción purificada del antígeno ES/L₂

- ❖ Se empleó un equipo FPLC LKB Pharmacia con una columna de intercambio iónico mono Q.
- ❖ Como buffer de comienzo se empleó buffer Tris 20 mM, pH: 8.4 y para el gradiente buffer Tris 20 mM con cloruro de sodio pH: 6.4, el mismo se efectuó entre los 10 y 25 ml,
- ❖ Se mantuvo un flujo constante de 0.5 ml/min. y se recolectaron fracciones de 0.7 ml

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) del antígeno ES/L₂

Los productos del antígeno ES/L₂ total y purificado se analizaron por SDS/PAGE en una Mini Protean II (Biorad) usando un gel de empaquetamiento de 4 % y un gel de corrida de 10%, las muestras se diluyeron en buffer disociante, la electroforesis se realizó a 60 mA durante aproximadamente 1 hora. El peso molecular se calculó usando patrones

preteñidos Biorad(161-0309), las bandas proteicas se revelaron por coloración de plata(30).

Western blot con antígeno total y purificado

La transferencia a membranas de nitrocelulosa del ES/L₂ total y purificado se realizó de acuerdo a la técnica de Towbin (31), empleando un equipo Mini Trans Blot Cell (Bio Rad), durante 1 hora a 250 mA.

- ❖ Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con buffer PBS/ leche (PBS pH 7.4 /0.5 % de Tween 20, leche descremada 5 %) durante 1 hora,
- ❖ Luego se lavaron 3 veces durante 5 minutos con buffer P/T/L (PBS pH 7.2 / 0.5% Tween 20)
- ❖ Se guardaron en el freezer a –20 °C hasta el momento de usar.
- ❖ Para continuar la técnica, las tiras de nitrocelulosa se incubaron con suero de personas que tenían sospecha clínica de Toxocariosis, ♦ con sueros controles de personas, con suero hiperinmune anti E/S L₂ de *T. canis* obtenido en conejo, ♦♦♦ con el suero de cerdos experimentalmente infectados, como sueros controles.
- ❖ Los sueros se diluyeron 1/100 en el buffer P/T/L y se incubaron 1 hora con agitación a temperatura ambiente.
- ❖ Las membranas se lavaron como antes
- ❖ Se incubaron con anti IgG humana (Sigma A: 8667) o anti IgG de cerdo (Sigma A: 9417) o anti IgG de conejo (Sigma A: 6154) marcadas con peroxidasa y diluidas en el buffer P/T/L 1/1000, 1500 y 1/600 respectivamente, 1 hora a temperatura ambiente , con agitación permanente, La reacción se reveló con diaminobencidina.

♦ Los sueros humanos controles fueron enviados por Dr. Prof. J-F. Magnaval, MD, DSC Service de Parasitologie, CHU Rangueil Toulouse, France

♦ ♦ Para emplear los sueros de los cerdos infectados como controles , se adopto en el Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbran" la técnica de Towbin a las condiciones que presenta el suero de los cerdos

Obtención de suero hiperinmune de conejo anti antígeno excretor-secretor de

T.canis

- ❖ Se mezcló 1ml (200ug/ml) de antígeno excretor – secretor de *T.canis*, con el mismo volumen de adjuvante completo de Freund's.
- ❖ Se inocularon intradermicamente dos conejos de 1.8 kg., se realizaron refuerzos durante 4 semanas, preparando las suspensiones con adjuvante incompleto de Freund`s .
- ❖ Se realizaron sangrías de prueba, titulando el suero por ELISA indirecto empleando antígeno ES/L₂ total.
- ❖ Finalmente se sangraron los conejos por punción cardíaca, y se obtuvo un suero de título 1/512.

Estudio con sueros de pacientes

Para evaluar la reactividad del antígeno ES/L₂ total y purificado se utilizaron 54 sueros de pacientes con datos de laboratorio y síntomas indicativos de Toxocariosis (eosinofilia, leucocitosis, problemas respiratorios, hepatomegalia, fiebre).

Como controles negativos se emplearon 10 sueros de pacientes con examen parasitológico negativo y eosinofilia normal

Para determinar la inmunoreactividad cruzada se utilizaron sueros de personas

que tenían otras enfermedades incluyendo patologías parasitarias.

Se analizaron sueros de pacientes con Triquinosis (10), con Strongilodiosis (4), con Neurocisticercosis (10), con Hidatidosis (10), de personas que eliminaron áscaris (10), Sífilis(5), Hepatitis A (10) y sueros de personas con eosinofilia elevada de causa indeterminada (9).

ELISA con antígeno total y antígeno purificado ES/L₂

- ❖ Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Coltorti et al (32), con modificaciones efectuadas en el Departamento de Parasitología Sanitaria del Instituto Nacional de Parasitología:
- ❖ Se colocó en policubetas de fondo plano Immunolon II, 50 ul del antígeno ES/L₂ total a una concentración de 7 ug /ml, durante 18 horas en la heladera.
- ❖ Se lavó 3 veces con buffer P/T (PBS pH:7.2 / 0.1 % Tween 20) durante 5 minutos.
- ❖ Se bloqueó con buffer PBS pH: 7.2 / leche descremada 1.5 % durante 1 hora a 37 °C.
- ❖ Se incubó con 50 ul de las diluciones seriadas de los sueros de los pacientes, desde 1/8 a 1/1024 y con los sueros controles , durante 30 minutos a 37°C, en cámara húmeda ,
- ❖ Se lavaron las policubetas nuevamente y se incubaron con 50 ul de anti IgG humana (Sigma A 8667) marcada con peroxidasa a una concentración de 1/5000 , diluidas con P/T .
- ❖ Se repitieron los lavados y la reacción se reveló por el agregado de 100 ul de sustrato(♦ ABTS + 12 ul de ácido cítrico pH:3.5 0.1M + 50 ul de agua oxigenada diluida 1/16).

❖ Se incubaron las placas 10 minutos, la reacción se detuvo con 100 ul de ácido fluorhídrico 0.1 N, pH 3.2 y se leyó a 410 nm en un equipo Dynatech MR 4100.

La técnica de ELISA con ES/L₂ purificado se realizó como se describió anteriormente aún cuando se varió la concentración del antígeno para sensibilizar las policubetas a 5 ug/ml.

♣ A diluciones menores de 1/8 no se pudo diferenciar entre resultados positivos y negativos empleando los sueros controles.

*La concentración óptima de trabajo de cada conjugado se determinó previamente realizando diluciones de los mismos desde 1/200 hasta 1/10000 y empleando sueros controles positivos y negativos. Las diluciones de los conjugados seleccionadas fueron las que permitieron diferenciar a los sueros negativos de los positivos.

◆ ABTS: 2,2' azinodi (3ethylbencilthiazoline sulfonic acid)

RESULTADOS

Detección de glicoproteínas inmunogénicas para el diagnóstico de *T.canis*

La Figura 8 muestra que las bandas reconocidas por el suero hiperinmune anti ES/L₂ total obtenido en conejo, son similares a las bandas que reconocen los sueros de pacientes con sospecha clínica de Toxocariosis.

Se detectaron cuatro componentes antigénicos: un triplete de aproximadamente 120 kDa y bandas de 70,55 y 32 kDa. ♦ El suero control negativo no reveló bandas.

Los sueros de los animales control infectados experimentalmente con huevos de *T.canis* reconocieron bandas de 70 y 55 kDa.

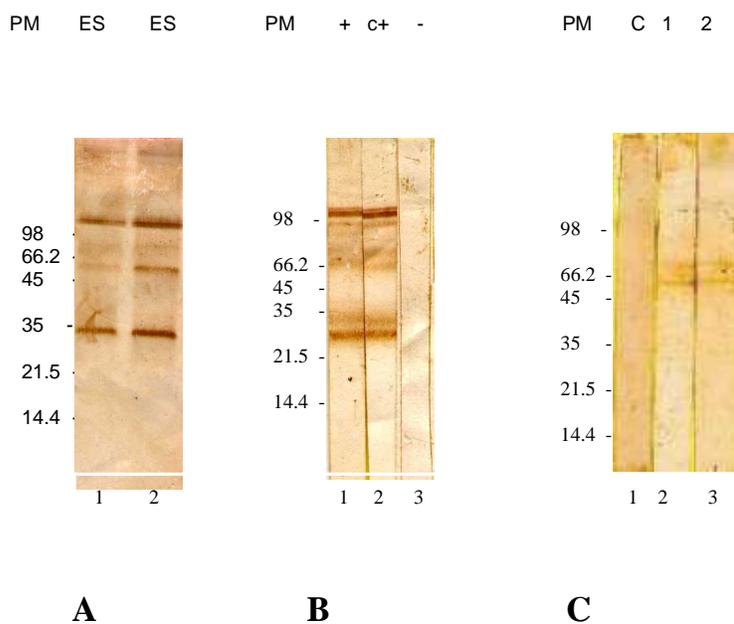


Fig. 8: **A:** Western blot con suero hiperinmune anti antígeno ES total obtenido en conejo. Fila 1 y 2 antígeno ES/L₂ total. **B** Western blot con suero de pacientes Fila 1 con sintomatología compatible con Toxocariosis, Fila 2 Suero control positivo, Fila 3 suero control Negativo. **C** Western blot con suero de animal de control . Fila 1 Control negativo, Fila 2 y 3 sueros de animales infectados con huevos de *T.canis*

Determinación de la especificidad y la sensibilidad

ELISA con antígeno ES/L₂ total

Los resultados obtenidos empleando el antígeno ES/L₂ total de *T.canis* con los sueros de pacientes con otras patologías parasitarias y no parasitarias se observa en las Tablas 1 y 2:

Tabla N°1 ELISA con antígeno ES/L₂ con suero de distintas enfermedades parasitarias

ELISA (TITULOS) ANTIGENO TOTAL							
ENFERMEDADES PARASITARIAS	NEG	1/8	1/16	1/32	1/64	>1/128	TOTAL
HIDATIDOSIS	3	1	1	1	2	2	10
TRIQUINOSIS	7	1	1	1			10
ASCARIDIOSIS	4			2	1	3	10
STRONGILOIDIOSIS		2	1	1			4
NEUROCISTICERCOSIS	5	5					10
TOTAL	19	9	3	5	3	5	44

Tabla 2 ELISA con antígeno ES/L₂ con suero de distintas enfermedades no parasitarias

ELISA (TITULOS) ANTIGENO TOTAL							
ENFERMEDADES NO PARASITARIAS	NEG	1/8	1/16	1/32	1/64	>1/128	TOTAL
HEPATITIS		4	3	3			10
SIFILIS	1	2		1	1		5
EOSINOFILIA DE ORIGEN DESCONOCIDO	7	1		1			9
TOTAL	8	7	3	5	1		24

Se observaron títulos superiores a 1/64 en los sueros de dos pacientes con Hidatidosis, los sueros de algunas personas que consultaron por Triquinosis y

Strongiloidosis presentaron títulos de hasta 1/32, mientras que los sueros de tres personas que portaban *Ascaris lumbricoides* tuvieron títulos superiores a 1/64, los sueros de pacientes con Neurocisticercosis fueron positivos hasta la dilución 1/8.

En el caso de las enfermedades no parasitarias, las eosinofias de origen desconocido y los sueros de Hepatitis A, presentaron títulos hasta 1/32, mientras que los sueros de pacientes con Sífilis alcanzaron a 1/64.

Western Blot con antígeno ES/L₂ total

La glicoproteína más reactiva con los sueros de las diferentes patologías parasitarias y no parasitarias fue el triplete de 120 kDa como se observa el Gráfico 1

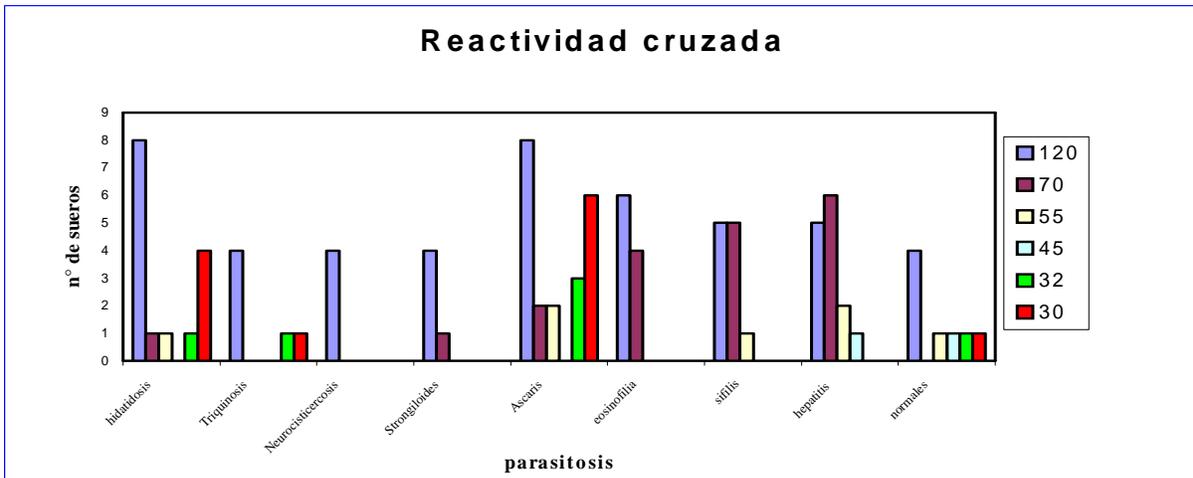


Gráfico N°1: Western blot con antígeno ES/L₂ de *T.canis* con sueros de enfermedades parasitarias y no parasitarias

De los 10 sueros evaluados, para conocer la especificidad ocho eran de pacientes con Hidatidosis y Ascaridiosis, y 4 de personas que tenían diagnóstico de Triquinosis, Cisticercosis y Strongiloidiasis. Estos sueros reconocieron el triplete de 120 kDa. En patologías no parasitarias, el triplete fue reconocido por 6 sueros de pacientes con eosinofilia de origen desconocido y 5 con Sífilis.

De los sueros controles negativos, 4 reconocieron el triplete de 120 kDa.

Otras bandas polipeptídicas que presentaron reactividad y que se encontraron junto con la de 120 kDa fueron la de 30 kDa que se reconoció en pacientes con nematodos (Áscaris) o con cestodes (Hidatidosis) y la de 70 kDa que fue reactiva con sueros de patología no parasitaria como el caso de Hepatitis y eosinofilia de origen desconocido.

La sensibilidad de la técnica de ELISA a diferentes diluciones con el antígeno ES/L₂ total se obtuvo con los resultados de los sueros de pacientes con sospecha clínica de Toxocariosis y la especificidad con los resultados que se observan en las tablas 1 y 2 (Tabla 3).

Tabla 3 Sensibilidad y especificidad del ELISA con antígeno ES/ L₂ de *T.canis*

ELISA CON ANTÍGENO ES/L₂TOTAL		
DILUCION	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
1/8	100%	70%
1/16	100%	77%
1/32	100%	84%
1/64	75%	91%

La sensibilidad para la dilución 1/32 es del 100% pero la especificidad es del 84 %

Purificación del antígeno ES/L₂ de *T.canis*

Como las glicoproteínas del Antígeno ES/L₂ tienen diferentes pI y el triplete de 120 kDa fue el responsable de la mayoría de las reacciones cruzadas, se realizó una cromatografía de intercambio iónico cuyos resultados se observan en la Figura 9

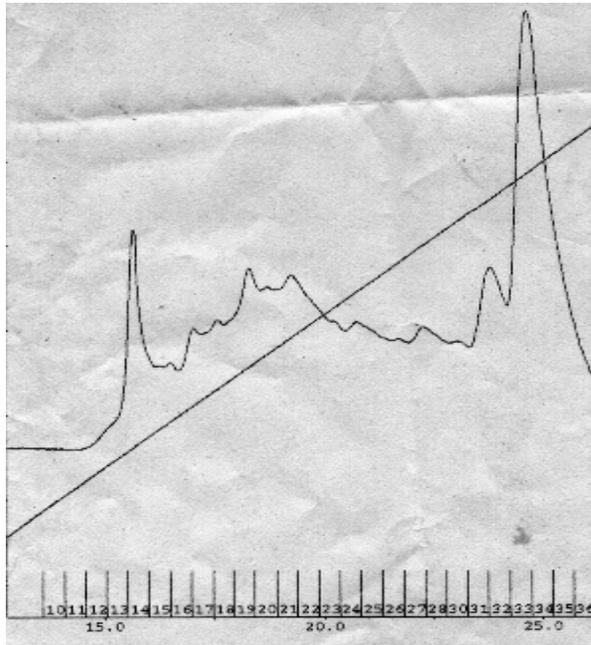


Fig. 9: Cromatograma correspondiente a la purificación del antígeno Es/L₂ de *T.canis* obtenido de un equipo FPLC Pharmacia.

En el mismo se observan 11 picos diferentes cada uno de los cuales fueron recolectados en fracciones de 0,7 ml.

Cuando los picos tenían mas de un tubo se unificaron formando la fracción "A" con los tubos 28 y 29 y la fracción "B" con los tubos 30,31y 32.

Con los tubos correspondientes a cada pico, se realizo un SDS-PAGE y coloración de plata. Los resultados se observan en la Figura 10.

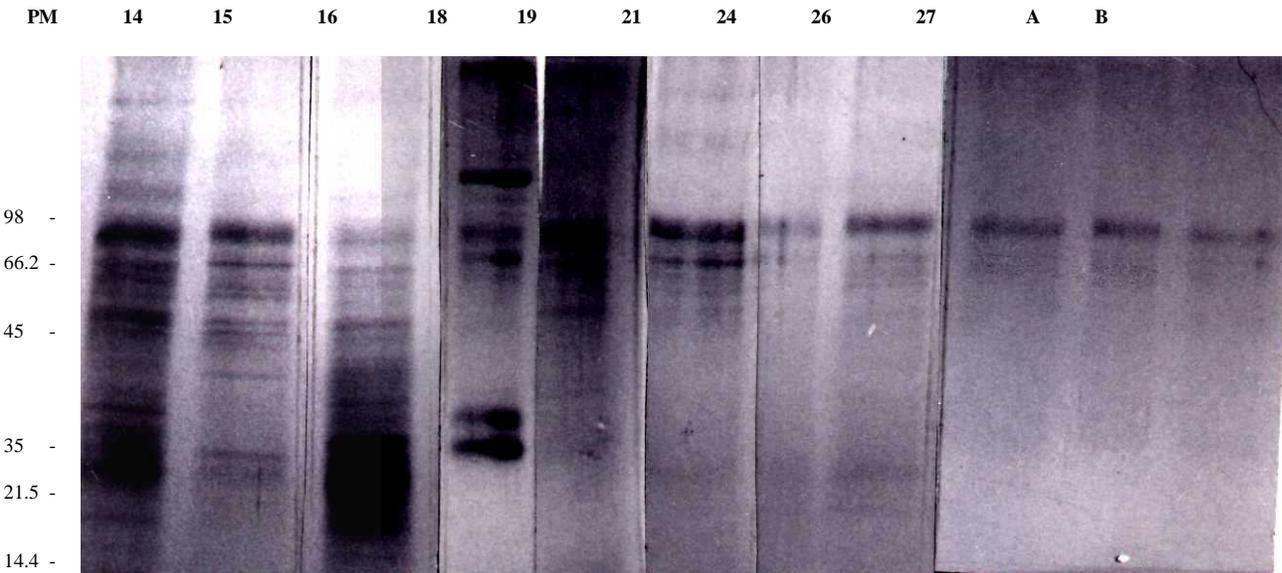


Fig. 10: SDS-PAGE y coloración de plata de los tubos 14,15,16,18,19,21,24,26,27,A:28-29,B:30-31-32, obtenidos del Cromatograma.

Al contenido de los tubos 24,26, 27, A y B, que no presentaron el triplete de 120 kDa y el contenido del 18 que si lo tenia, se les realizo un Western blot, que se revelo con suero hiperimmune anti excretor – secretor obtenido en conejo, los resultados se observan en la Figura 11.

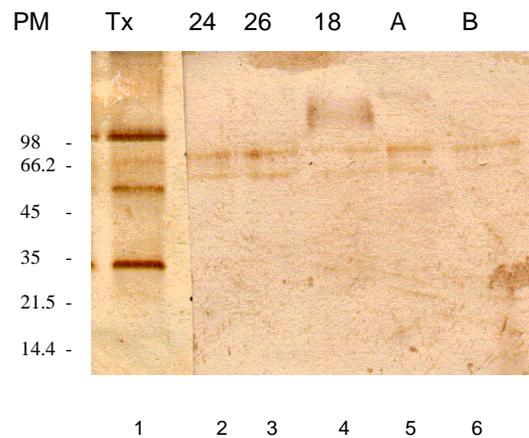


FIG N°11: Western -blot de los tubos seleccionados, revelado con suero hiperinmune. Línea 1 Antígeno ES/L2 total de *T.canis*, línea 2 tubo 24, línea 3 tubo 26, línea 4 tubo 18, línea 5 tubo 27, línea 5 tubos 28-29(A), línea 6 tubos 30-31-32(B)

Evaluación de glicoproteínas específicas para el diagnóstico de Toxocariosis

Se unificaron los tubos 24, 26,27 y las fracciones A y B, obteniéndose el antígeno ES/L₂ purificado, con el que se realizó la técnica de ELISA y Western blot.

Los sueros de cerdos revelaron en el Western blot empleando el antígeno ES/L₂ purificado bandas de 70 y 55 kDa(Fig. 12)

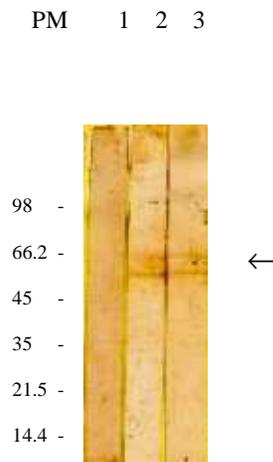


Fig. 12:Western blot con sueros de cerdos. Fila 1 grupo control, fila 2 y fila 3 grupo infectado

Western blot con suero de Humanos

Los sueros de pacientes con sospecha clínica de Toxocariosis reconocen las bandas de 70 y 55 kDa del antígeno ES/L₂ purificado de *T.canis* (Fig. N°13)

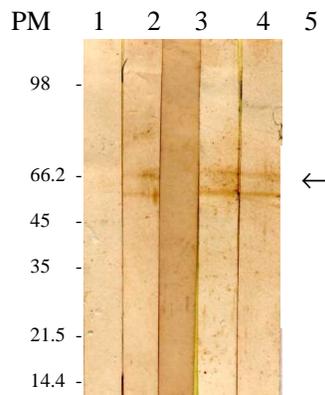


Fig.13:Western blot de suero de pacientes. Línea 3 suero sin sospecha clínica de Toxocariosis. línea 4 suero de pacientes con sospecha clínica de Toxocariosis. Línea 1 suero control negativo, Línea 2 suero control positivo

Detección de la especificidad y sensibilidad del antígeno ES/L₂ purificado

ELISA con suero de humanos

Cuando se analizaron con el antígeno ES/L₂ purificado los sueros de las diferentes enfermedades parasitarias y no parasitarias se obtuvieron los resultados de las Tablas 5 y 6

Tabla N°5 ELISA con antígeno ES/L₂ purificado con suero de distintas enfermedades parasitarias

ELISA (TITULOS)							
ENFERMEDADES PARASITARIA	NEG	1/8	1/16	1/32	1/64	>1/64	TOTAL
HIDATIDOSIS	5	3	1		1		10
TRIQUELOSIS	7	3					10
ASCARIDIOSIS	5	3	2				10
STRONGILOIDIOSIS	3		1				4
NEUROCISTICERCOSIS	9	1					10
TOTAL	29	10	4		1		44

Tabla N°6 ELISA con antígeno ES/L₂ purificado con suero de distintas enfermedades no parasitarias

ELISA (TITULOS)							
ENFERMEDADES NO PARASITARIA	NEG	1/8	1/16	1/32	1/64	>1/64	TOTAL
HEPATITIS	5	4	1				10
SIFILIS REACTIVA	4			1			5
EOSINOFILIA DE ORIGEN DESCONOCIDO	8		1				9
TOTAL	17	4	2	1			24

Utilizando antígeno purificado, el suero de un paciente con Hidatidosis presento un titulo de 1/64, pacientes con Triquinosis tuvieron títulos de 1/8, con Ascaridiosis dos sueros dieron títulos de 1/16 y con Strongilodiosis un suero tuvo titulo de 1/16, con Neurocisticercosis alcanzo a 1/8.

En patologías no parasitarias el ensayo inmunoenzimatico con antígeno purificado mostró que de los 24 sueros analizados 17 fueron negativos, un suero con Sífilis resulto positivo a la dilución 1/32, un suero con hepatitis y otro con eosinofilia positivo 1/16.

La sensibilidad de la técnica del ELISA con el ES/L₂ purificado utilizando los resultados de la tabla 8 se observa en la Tabla 7.

Tabla N°7. Sensibilidad y Especificidad del ELISA con antígeno ES/L₂ purificado de *T.canis*

ELISA CON ANTIGENO ES/L₂ PURIFICADO		
DILUCION	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
1/8	100%	82%
1/16	100%	94%
1/32	100%	99%
1/64	58%	99%

La sensibilidad para la dilución 1/32, es del 100%, igual que con el antígeno total, pero la especificidad para la misma dilución es del 99%.

ELISA con suero de personas con sospecha clínica de Toxocariasis

La técnica de ELISA con antígeno ES/L₂ total y purificado, mostró que los sueros de pacientes con sospecha clínica de Toxocariasis reaccionaron con títulos iguales o superiores a 1/32. (Tabla 8).

Tabla N° 8 ELISA realizado con antígeno ES/L₂ purificado en 54 sueros de pacientes con sospecha clínica

TITULOS	ELISA antígeno ES/L₂ total	ELISA antígeno ES/L₂ purificado
Neg	0 /54	0 /54
1/32	12 /54	20 /54
1/64	7/54	10 /54
1/128	6 /54	10 /54
1/256	20 /54	14 /54
>1/256	9 /54	0 /54
TOTAL	54	54

DISCUSION

Los primeros antígenos utilizados para el diagnóstico de la Toxocariosis fueron homogeneizados del parásito adulto que entre otros componentes son ricos en fosforilcolina, hapteno común de los Helminetos y responsable de numerosas reacciones cruzadas. En los últimos años las técnicas serológicas adquirieron mayor confiabilidad dado que mejoró la especificidad al emplear antígenos de excreción secreción, que tienen la ventaja de no poseer fosforilcolina, Sin embargo como son glicoproteínas, por SDS-PAGE y Western blot revelan que se trata de una mezcla compleja ,donde la fracción reconocida por los sueros de los pacientes no siempre corresponda al *T.canis* .Por lo tanto es común observar que se producen reacciones cruzadas con otras patologías.

En este trabajo se observó que en el Western blot con los sueros de personas con sospecha clínica de Toxocariosis, se observaron bandas de 120, 70, 55 32, 30 kDa, cuando se utiliza el antígeno ES/L₂ total y, que el triplete de aproximadamente 120 kDa es responsable de la reactividad cruzada con las distintas patologías. Esto ya fue observado por otros autores, quienes encontraron que el triplete de 120 kDa, era reconocido por el suero de pacientes con otras Helmintiosis. (19)

Por esta razón para purificar el antígeno ES/L₂ y separar esta glicoproteína, se realizó una cromatografía de intercambio iónico

La reactividad del antígeno ES/L₂ purificado, se comparó con suero de personas con sospecha clínica de Toxocariosis y con el suero de cerdos, infectados con huevos larvados de *T.canis*, observando en ambos casos en el Western blot bandas de 70-55 kDa .

Con respecto al respecto al Western blot , en animales de experimentación se

encuentran pocos datos , Se ha descrito que en el suero de conejos infectados con huevos de *T.canis* se observaron bandas de 66,48,32 y 28 kDa, con antígeno E/S /L₂total, mientras que en el suero de cerdos se detectan bandas de 70-55 kDa con el mismo antígeno , por otro lado en el caso del huésped definitivo; en perros infectados naturalmente; se observaron bandas de 200, 120, 86, 74, 66, 47, 38, 32, 23, 24, 25, 20 y 16 kDa utilizando el antígeno ES/L₂ total (33,34,35).

Con respecto al Western blot cuando se emplean suero de personas con Toxocariosis se observan algunas discrepancias. En estudios realizados en Francia, se consideran específicas las bandas de 30,32, y 23 kDa. Sin embargo en investigaciones posteriores encontraron que en la población rural de Francia y el trópico, el 30 % de los sueros con otras Helminiosis reconoce estas bandas y un 35 % de los sueros de pacientes con Toxocariosis reconocen las bandas de 150, 120, 70, 50, 37, 30, 26, 25, 24 kDa. Estos autores consideran que, cuando solo se reconocen bandas de elevado peso molecular (50, 70, 120, 150 kDa) puede ser debido a una Toxocariosis reciente o también a causa de reactividad cruzada con otras Helminiosis.(19,20)

Es posible que los anticuerpos contra las otras glicoproteínas se formen después, dado que las glicoproteínas de 32 kDa son proteínas de anclaje en la membrana del parásito, mientras que las de 120 kDa son secretadas por las glándulas secretorias y las glicoproteínas de 70 y 55 kDa son producidas por el poro secretor y cubren la superficie del parásito. (1)

Por lo tanto es posible que los primeros polipéptidos en estimular el sistema inmune sean de 70 y 55 kDa dado que por su distribución espacial están en contacto primero con el sistema inmune del huésped antes que los de 32 kDa, por consiguiente las bandas de menor peso molecular no se observan en todos los estadios de la enfermedad o también es posible que no sean visibles por el sistema inmune de los cerdos infectados

experimentalmente.

Otra causa como ya se dijo sería que hay diferentes cepas, dado que en estudios realizados por otros autores la glicoproteína de 32 kDa en algunos casos es positivo a la coloración para hidratos de carbono y en otros no.(25,26)

Otra razón para justificar las diferencias en el peso molecular de las bandas es que en este trabajo se realizó la experiencia con el suero de niños menores de 15 años mientras que los estudios realizados en zonas rurales de Francia y el trópico fueron realizados en su mayoría en personas adultas.

Por otro lado cuando se realizó la técnica de ELISA empleando los sueros de personas con otras patologías parasitarias y algunas no parasitarias, se observó que empleando el antígeno ES/L₂ purificado hay reactividad a títulos bajos (Tabla 5 y 6) lo cual indica una ventaja con respecto al antígeno ES/L₂ total donde se observan títulos mayores a 1/64 (Tabla 1 y 2)

Sin embargo este antígeno al tratarse de una glicoproteína no es específico de especie y es posible observar reacciones cruzadas, por esa razón se realizó el Western blot, empleando el antígeno ES/L₂ purificado, se observó que los sueros de otras enfermedades parasitarias y no parasitarias, que presentaron títulos bajos con ELISA pueden reconocer bandas de 70, 55, y 45 kDa,. (Fig. 15).

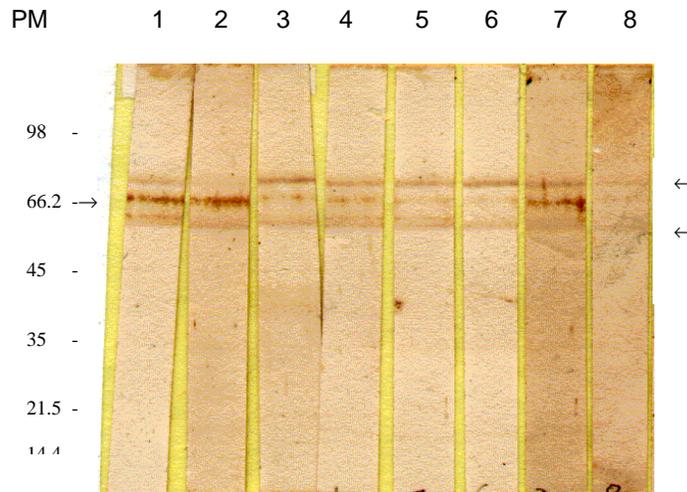


Fig. N°15: Western blot con suero de distintas enfermedades parasitarias y no parasitarias que presentaron en el ELISA con el antígeno ES/L₂ purificado titulo superior a 1/16. Línea 1 y 2 suero de paciente con Hidatidosis, línea 3 y 4 pacientes que eliminaron Ascaris, línea 5 suero de pacientes con eosinofilia de origen desconocido, línea 6 pacientes con Strongilodiosis línea 7 suero de pacientes con Sífilis reactiva línea 8 sueros con Hepatitis

Sin embargo en el gráfico 2 se observa que al comparar la reactividad de los sueros con las distintas enfermedades parasitarias y no parasitarias, el antígeno ES/L₂ purificado presenta menor reactivada cruzada ya que, son muy pocos los sueros que reconocen las bandas de 70, 55, 45 kDa, mientras que con el antígeno ES/L₂ total la mayoría de los sueros reconocen mayor numero de bandas polipeptidicas.

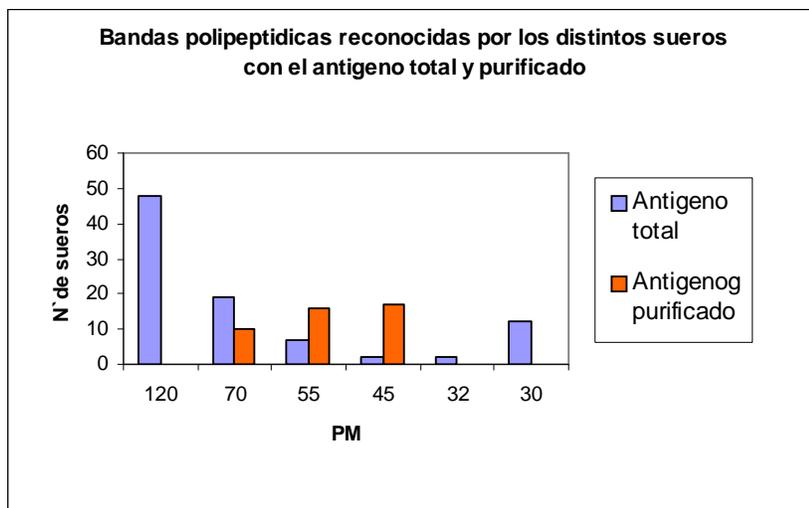


Gráfico N°2: Sueros de distintas enfermedades parasitarias y no parasitarias que reaccionan con antígeno ES/L₂ de *T. canis* total y purificado

El antígeno ES/L₂ también mostró que puede discriminar a pacientes sin Toxocariosis ya que en el grupo control negativo los sueros analizados en el ELISA / antígeno purificado, fueron no reactivos o de título 1/8, mientras que con ELISA / antígeno total presentaron títulos de hasta 1/128 (Tabla 1, 2, 4 y , 5).

Finalmente Cuando se analizaron por ELISA los sueros de pacientes con sospecha clínica de Toxocariosis se observó que presentaban títulos mayores a 1/32 con los dos antígenos ES/L₂ total y purificado y la sensibilidad del test de ELISA, para la dilución 1/32 no mostró diferencias en el comportamiento de los dos antígenos, pero la especificidad para el ELISA / antígeno purificado fue del 99%.

De acuerdo a estas observaciones empleando el antígeno ES/L₂ purificado se puede considerar que los sueros que presentan títulos iguales o mayores a 1/32 podrían

ser considerados reaccionantes e indicarían que las personas fueron o están parasitados con *T.canis*.

Sin embargo no es fácil saber si se trata de una Toxocariasis reciente o es una enfermedad antigua, ya que es muy difícil saber si las personas estuvieron en contacto con huevos de *T.canis* o existe otra parasitosis al mismo tiempo.

Con el empleo del antígeno ES/L2 purificado en la técnica de ELISA se aumenta la especificidad de la misma, al disminuir las reacciones cruzadas sobre todo con otras Helmintiosis , por lo tanto se puede tener un mejor diagnostico de Toxocariosis

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eduardo Guarnera su asesoramiento y paciencia en la en la realización de este trabajo

A la Dra. Irma Sommerfelt de la Cátedra de Salud Publica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires , por la provisión de los sueros de cerdos infectados con huevos de *Toxocara canis*.

A los Dres Jaime Altchet y Hector Freilij del Hospital de niños Ricardo Gutierrez por la provisión de los sueros de pacientes con sospecha clínica de Toxocariasis.

Al Dr. Manuel Alvarez por la lectura y correcciones del trabajo

A , Vanesa Bastin ,Graciela Céspedes y Adriana Monkiewicz por su colaboración y apoyo técnico

A Mirían Yabo por el cuidado de los conejos en el bioterio

BIBLIOGRAFÍA

- 1- J.W.Lewis and R.M. Maizels.1993.TOXOCARA and TOXOCARIASIS.Clinical, epidemiological and molecular perspectives. British Parasitological Society with the Institute of Biology
- 2- Beaver, P.C. 1975. Biology of soil transmitted helminth: The massive infection. Health Lab. Sci. 12:116-125.
- 3- Archelli, S; Kozubsky L .1999.Boletin Mensual. Programa de Evaluación Externa de Calidad. Fundación Bioquímica. Diciembre1999
- 4- Kayes, S.G; Omholt, P.E; Grieve, R.B .1985. Immune response of CBA/J mice to graded infection with *Toxocara canis*. Infect. Immun. 48: 697-703.
- 5- Glikman, L.T; Magnaval, J.F; Domasili, L.M; Shafer, F.S; Lauria, S; Gottstein, B; Brodiers B. 1987. Visceral Larva Migrans in French Adults: A New Disease Syndrome. Am, J, Epidemiology 125:1019-1034.
- 6- Nichols, R.L .1956. The ethiology an of Visceral Larva Migrans. The diagnostic morphology of infective second -stage *Toxocara* larvae. J. Parasitol. 42: 349-362.
- 7- Huntley, C.C; Costas, M.C; Lyerly, A. 1965. Visceral Larval Migrans syndrome: clinical characteristics and immunology studies in 51 patients. Paediatrics. 36: 523-536.
- 8- Shields, J.A .1984. Ocular Toxocariasis. A review. Sur. Ophthalmol. 28:361-381.
- 9- Beaver, P.C; Snyder, M.D; Carrera, G.M; Dent, J.H; Laffererty, J.W. 1952. Chronic eosinophilia due to Visceral Larva Migrans. Paediatrics. 9:7-19.
- 10- Smith, M.H.D; Beaver, P.C.1953. Persistence and distribution of *Toxocara* larvae in tissue of children and mice. Trans. Soc. Trop. Med. Hyg. 66: 937-942.

- 11-Fattah, D.I; Maizel, R.M; McLaren, D.J; Spry, C.J. 1986. *Toxocara canis* interaction of human blood eosinophils with the infective larvae. Exp. Parasitol. 61:421-431
- 12-Lombardi, S; Vegni-Talluri, M; Banchieri, L; Esposito, F .1990.The in vitro adherence of murine eosinophils, neutrophils and non -induced and induced macrophages to infective larvae of *Toxocara canis* (nematode, ascaridae). J. Parasitol: Aug: 20 (5) P 603-13.
- 13-De Cock C, Lemaitre J, Deuvaert FE.1998. Loeffler endomyocarditis: a clinical presentation as right ventricular tumor. J. Heart Valve Dis. 7:668-71).
- 14-Savigny, D.H .1975." In Vitro" maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic test for Visceral Larva Migrans. J. Parasitol 61: 781-782.
- 15-De Savigny, D.H; Voller. A; Woodruff, A.W. 1979. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immuno -assay. J. Clin. Pathol. 32:284-288.
- 16-Glikman, L.T; Schantz, P.M; Dombroske, E.R; Cypess, R. 1978. Evaluation of serodiagnostic test for Visceral Larva Migrans. Am. J. Trop Med. Hyg. 27: 492 -498.
- 17-Obwaller, A.; Jensen-Jarolim, E.; Auer, H.; Huber, A.; Kraft, D.; Aspöck, H.1998.Toxocara infestations in humans: symptomatic course of Toxocariasis correlates significantly with levels of IgE / anti -IgE immune complexes. Parasite Immunol. Jul. 20 (7): 311-7.
- 18-Unlikaba, M. Hubner J.Kolarova I. Polackova M.1996. Immunological studies on human larval toxocariosis. Cent. Eur. Public. Health. Dec. 4: 242-5

- 19-MagnaVal, J.F; Fabre, R; Maurieres, J.P; Charlet, J.P; Larrad De B. 1991. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human Toxocariasis. Parasitol Res. .77:697-702.
- 20-Courtade, H.; Recco, P.; Magnaval J. F.; Charlet J.P.; Seguela J.P.1995.Etude comparative de deux test ELISA *Toxocara* vis a vis du western –blot. Bulletin de la Societe Francaise de Parasitologie 13,38-53.
- 21-Maizel, R.M; De Savigny, D; Ogilvie, B.M.1984. Characterisation of surface and excretory -secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. Parasite Immunol. 6:23-37.
- 22-Speiser, F; Gottstein, B. 1984. A collaborative study on larval secretory -excretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human Toxocariasis with Elisa. Acta Trop (Basel). 41: 361-372.
- 23-Santillan, Graciela I. ,Molina, Viviana E. 1994.Revelación de bandas antigenicas en tres lotes de antígeno excretor -secretor de *Toxocara canis*.Libro de resúmenes IV Jornadas de la Asociación Argentina de Zoonosis y I Jornadas de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias. La Plata
- 24-Bradford, M.M.1976.A rapid a sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein –dye-binding. Anal.Biochem. 72:248-254
- 25-Page, A.P; Hamilton, A.J; Maizel, R.M .1992a.*Toxocara canis*: monoclonal antibodies to carbohydrate epitopes of secreted antigens localise to different secretion -related structures in infective larvae. Experimental Parasitology.

- 26-Menghji, M and Maizel, R.M.1986. Biochemical properties of larval excretory-secretory (ES) glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. Molecular and biochemical Parasitology 18,155-170
- 27- Badley, J; Grieve, R; Bowman, D; Glikman, L; Rocky, J.1987. Analysis of *Toxocara canis* larval excretory -secretory antigens: physicochemical characterisation and antibody recognition. J. Parasite. 73(3) 593-600
- 28-Bowman, D.D; Mika -Grieve, M; Grieve, R.B. 1987. *Toxocara canis*: monoclonal antibodies to larval excretory - secretory antigens that bind with genus and species specificity to the cuticular surface of infective larvae. Exp. Parasitol. 64:458 -465
- 29-Nunes, C.M.Tundisi R.N. Garcia, J.F. Heinemann M.B, Ogassawara S. Richtzenhain IJ.1997.cross reaction between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by western blot technique. Rev.Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 39:253-6
- 30-Merril,C.R.;Golman,D.;Sedman,S.A.;and Ebert,M.H.1981.Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variations in cerebrospinal fluid proteins . Science 211:1437-1438
- 31-Towbin, H.; Stachlin, T.; Gordon, J.1979.Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, 72: 4350-4354.
- 32-Coltorti, E.A.; Fernandez, E.; Marguet, R.; Scozzina, J.D.y Guarnera, E.A. 1990. Detection de portadores asintomaticos de quistes hidatidicos: aumento de la especificidad del ensayo inmuno enzimatico.Rev.Instituto Medicina Tropical Sao Paula, 32(4) 275-284 Julio - Agosto.

33- Muñoz G.M.A.; Rincón, M.R.; Romero, S.G.A.; Martínez L.J.P.; Valdivia, A.G. y Alba Hurtado F.1999. Evaluación de los antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *Toxocara canis* reconocidas por suero de conejos infectados experimentalmente con el parásito. Libro de resumen. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Acapulco. México

34- Muñoz Guzmán, M.A.; Martínez Rodríguez H.A.; Valdivia- Anda G.; Tortora-Perez JL. ; y Alba Hurtado F.1999. Antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *Toxocara canis* reconocidos por sueros de cachorros infectados naturalmente. Libro de resumen. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Acapulco. México

▪