

ORIGINAL

Evaluación de un antígeno purificado para el diagnóstico de toxocariosis

Graciela Santillán^{a,*}, Vanesa Bastin^b, Graciela Céspedes^a y Adriana Monkiewicz^a

^aDepartamento de Parasitología, INEI-ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán». Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^bInstituto Nacional de Producción de Biológicos, ANLIS, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Recibido el 6 de noviembre de 2012; aceptado el 25 de febrero de 2013

PALABRAS CLAVE

Toxocariosis;
Diagnóstico;
Antígeno

Resumen

La toxocariosis es una zoonosis causada por la ingestión de huevos infectivos de *Toxocara* spp. El diagnóstico de la enfermedad se basa en la detección de anticuerpos en el suero u otros fluidos biológicos. La técnica serológica más utilizada es el ELISA, que usa como antígeno los productos de excreción-secreción de larvas de tercer estadio (ES/L₃). Estos productos antigénicos son glicoproteínas que se originan en los órganos secretorios del parásito y no son específicos de especie. Para evaluar la especificidad de la técnica de ELISA con el antígeno ES/L₃, se emplearon sueros de personas con otras helmintiasis y con patologías no parasitarias. Se observó que estos sueros presentaron reactividad entre el 11 y el 70 % de los casos. El *Western blot* con suero de los mismos pacientes reveló que la glicoproteína que corresponde al triplete de 120 kDa fue la más inespecífica. Teniendo en cuenta estos resultados y con el propósito de purificar el antígeno se realizó una cromatografía de intercambio iónico. Cuando se analizaron los sueros de los pacientes con diferentes enfermedades parasitarias y no parasitarias con el antígeno ES/L₃ purificado, solo fueron reactivos entre un 10 y un 20 % de ellos. La sensibilidad del test de ELISA determinada por el programa Epidat 3.0 para los dos antígenos fue del 100 %, pero se observaron diferencias en la especificidad: para el antígeno ES/L₃ total esta fue del 84 % y para el ES/L₃ purificado del 99 %. Empleando el antígeno ES/L₃ purificado se puede considerar que los sueros que son reactivos, en presencia de una sintomatología compatible, corresponden a pacientes que fueron o están parasitados con *Toxocara canis*.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: gsantillan@anlis.gov.ar (G. Santillán).

KEYWORDS

Toxocariosis;
Diagnosis;
Antigen

Evaluation of a purified antigen for the diagnosis of toxocariosis**Abstract**

Toxocariosis is a zoonotic disease caused by the ingestion of infective eggs of *Toxocara* spp. The diagnosis is based on the detection of antibodies in serum or other biological fluids. One of the current serological techniques for the diagnosis of toxocariosis is ELISA using excretory - secretory antigens of third stage larvae (ES/L₃). These antigens are glycoproteins, which originate in the secretory organs of the parasite and are non species-specific. Sera from patients with other helminthiasis and non-parasitic diseases were used to evaluate the specificity of ELISA using the excretory - secretory antigen (ES/L₃). The reactivity of these sera was between 11 and 70%. Western blot using patients' sera revealed that the glycoprotein triplet having a molecular weight of 120 kDa was responsible for cross-reactivity. With these results, and for the purpose of purifying the antigen, ion exchange chromatography was performed. When the sera from patients with various parasitic and non-parasitic diseases were analyzed with the purified antigen ES/L₃, they were only reactive between 10 to 20%. The sensitivity of the ELISA test determined by program Epidat 3.0 for the two antigens was 100%, but the following differences in specificity were observed: 84% for the total antigen ES/L₃ and 99% for purified ES/L₃. Using the ES/L₃ purified antigen, it can be considered that the reactive sera, with compatible symptoms correspond to patients who are or were parasitized with *Toxocara canis*.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

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 parasita a los gatos⁸.

Esta parasitosis afecta sobre todo a niños que están en contacto con cachorros no desparasitados o que juegan en las plazas, donde suelen defecar los animales⁸.

En el hombre, el diagnóstico de la enfermedad es problemático, ya que el estadio larval de *Toxocara* spp. no puede ser detectado directamente, salvo por estudios histológicos que se realizan *posmortem*. 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. Además, los signos y síntomas que presenta son comunes con otras enfermedades infecciosas. El único medio posible de diagnóstico es indirecto, recurriendo a la detección de anticuerpos en la sangre u otros fluidos biológicos⁸.

Los test serológicos adquirieron mayor confiabilidad al emplearse técnicas inmunoenzimáticas con antígeno excretor-secretor (ES/L₃), el cual se obtiene por cultivo de larvas de tercer estadio en un medio de cultivo libre de proteínas^{6,7,17}.

Sin embargo, este antígeno ES/L₃ no es específico de especie, está altamente glicosilado y tiene en su composición un 40 % de carbohidratos, lo que da lugar a reactividades cruzadas con otras patologías, como fasciolosis, esrongiloidosis, triquinosis y anisakiosis^{3,9-11,14-16,18}.

El antígeno ES/L₃ está compuesto por cinco moléculas antigénicas mayores, de peso molecular 32, 55, 70, 120 y 400 kDa, que se originan en las glándulas secretoras y esofágicas y salen al exterior por el conducto esofágico o por el

poro secretorio; estas sustancias cubren a la larva y la protegen de la acción de los anticuerpos^{2,12,19}.

El objetivo de este trabajo fue evaluar glicoproteínas específicas de los productos de excreción-secretión de larvas L₃ de *Toxocara canis* para el diagnóstico serológico de la toxocariosis humana.

Materiales y métodos**Obtención de larvas L₃ y del antígeno total excretor-secretor (ES/L₃)**

Se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por De Savigny⁷.

Obtención de la fracción purificada del antígeno excretor-secretor (ES/L₃)

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 NaCl, pH 6,4, este 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.

Estudio con sueros de pacientes

Se utilizaron 54 sueros de pacientes con datos de laboratorio y síntomas compatibles con toxocariosis (eosinofilia, leucocitosis, problemas respiratorios, hepatomegalia y fiebre). El estudio fue oportunamente aprobado por el Comité de Docencia e Investigación del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez¹.

Como controles negativos se emplearon 10 sueros de pacientes con examen parasitológico de materia fecal donde no se observaron elementos o formas parasitarias y presentaban eosinofilia normal.

Para determinar la inmunorreactividad cruzada se utilizaron sueros de personas que tenían serología positiva para triquinosis (n = 10), estrongiloidosis (n = 4), neurocisticercosis (n = 10) e hidatidosis (n = 10) y sueros de personas que eliminaron ascaris (n = 10). También se emplearon sueros de individuos que tenían serología positiva para sífilis (n = 5) o hepatitis A (n = 10) y sueros de personas con eosinofilia elevada de causa indeterminada (n = 9).

ELISA con antígeno total y antígeno purificado excretor-secretor

Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Coltorti *et al.*⁵, con modificaciones efectuadas en el Departamento de Parasitología del INEI. En policubetas de fondo plano inmulon II se colocaron 50 µl del antígeno ES/L₃ total, a una concentración de 7 µg/ml, durante 18 h en la heladera. Se lavó 3 veces con *buffer* P/T (PBS pH 7,2/0,1 % Tween 20) durante 5 min. Se bloqueó con *buffer* PBS pH 7,2/leche descremada 1,5 %, durante 1 h a 37 °C.

Se incubó con 50 µl de la dilución de los sueros de los pacientes y de los sueros controles durante 30 min a 37 °C, en cámara húmeda. Se lavaron las policubetas nuevamente y se incubaron con 50 µl de anti-IgG humana (Sigma A 8667) marcada con peroxidasa, a una concentración de 1/5000, diluida con P/T. Se repitieron los lavados y la reacción se reveló por el agregado de 100 µl de sustrato ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6) sulfónico (ABTS). Se incubaron las placas 10 min, la reacción se detuvo con 100 µl 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/L₃ purificado se realizó como se describió anteriormente, variando la concentración del antígeno para sensibilizar las policubetas a 5 µg/ml.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Los productos del antígeno ES/L₃ total se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en un Mini Protean III (Bio-Rad) 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).

Western blot

La transferencia a membranas de nitrocelulosa del ES/L₃ se realizó de acuerdo a la técnica de Towbin *et al.*²⁰, empleando un equipo Mini Trans Blot Cell (Bio-Rad), durante 1 h a 250 mA. Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con *buffer* PBS pH 7,4/0,5 % de Tween 20, leche descremada 5 %, durante 1 h, luego se lavaron 3 veces durante 5 min con *buffer* PBS pH 7,2/0,5 % Tween 20. Se guardaron en el freezer a -20 °C hasta el momento de usar. Las tiras de nitrocelulosa se incubaron con suero de personas que tenían otras enfermedades parasitarias y no parasitarias, con sueros

controles de personas con toxocarosis y con sueros de personas con examen parasitológico donde no se observaron formas parasitarias. Los sueros se diluyeron 1/100 en el *buffer* P/T/L (PBS pH 7,2/0,1 % Tween 20/0,5 % leche descremada) y se incubaron 1 h con agitación a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron como antes, se incubaron con anti-IgG humana (Sigma A: 8667) marcada con peroxidasa y diluida en el *buffer* P/T/L 1/1000, 1 h a temperatura ambiente, con agitación permanente; la reacción se reveló con diaminobencidina.

Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos en las técnicas de ELISA fueron analizados por el programa de análisis epidemiológico de datos tabulados Epidat 3.0.

Resultados

ELISA con antígeno excretor-secretor

Los resultados obtenidos empleando el antígeno ES/L₃ total de *T. canis* con los sueros de pacientes con otras patologías parasitarias y no parasitarias se observan en la tabla 1.

Fueron positivos 20 sueros de pacientes con enfermedades parasitarias y 6 sueros de pacientes con enfermedades no parasitarias.

La sensibilidad de la técnica de ELISA ES/L₃ utilizando el programa Epidat 3.0 fue del 100 % (99,55-100,00), mientras que la especificidad fue del 84 %.

Western blot antígeno excretor-secretor

La glicoproteína más reactiva con los sueros de los pacientes de las diferentes patologías parasitarias y no parasitarias fue el triplete de 120 kDa, como se observa en la figura 1.

De los sueros provenientes de individuos con diferentes parasitosis, 8 reconocieron el triplete de 120 kDa. Al considerar patologías no parasitarias, el triplete fue reconocido

Tabla 1 ELISA con antígeno excretor-secretor total con sueros de individuos con distintas enfermedades parasitarias y no parasitarias

Enfermedades	Negativo	Positivo	Total
Hidatidosis	3	7	10
Triquinosis	7	3	10
Ascaridiosis	4	6	10
Estrongiloidosis	0	4	4
Neurocisticercosis	10	0	10
Hepatitis A	7	3	10
Serología + para sífilis	3	2	5
Eosinofilia de origen desconocido	8	1	9
Total	42	26	68

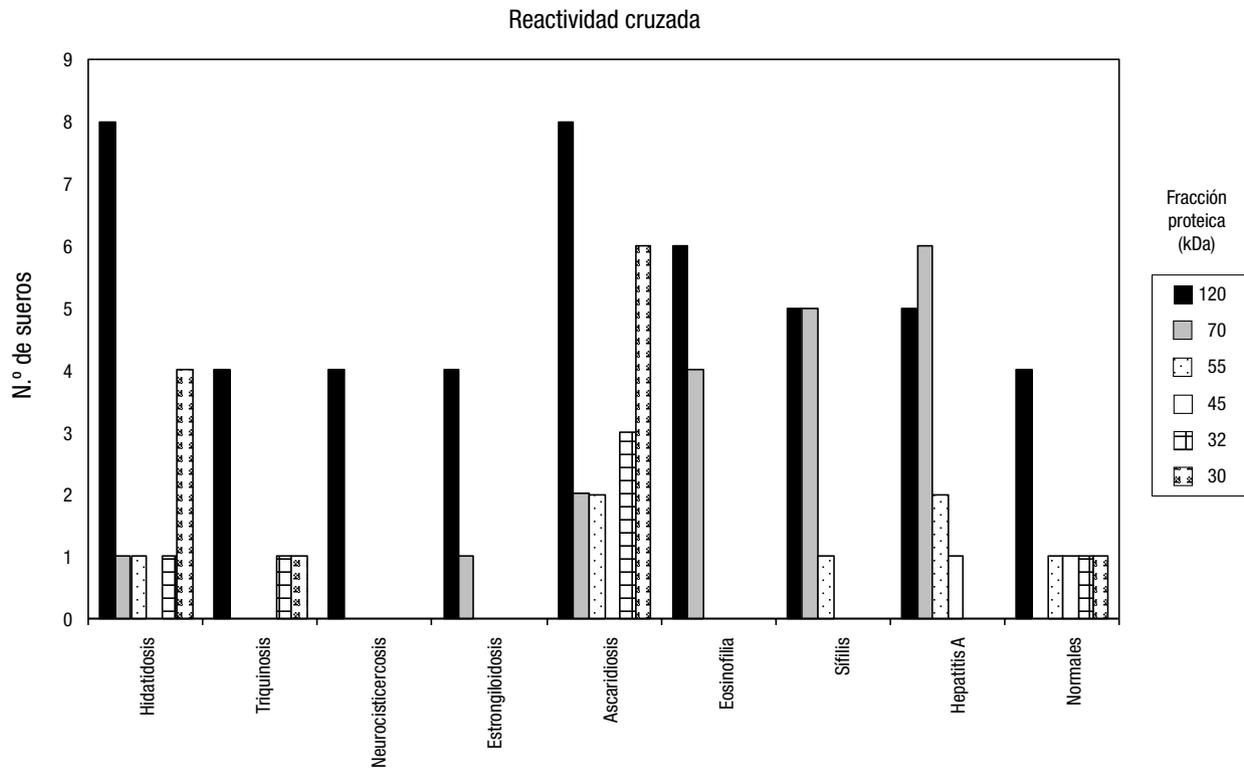


Figura 1 Western blot con antígeno ES/L₃ de *Toxocara canis* frente a sueros de pacientes con enfermedades parasitarias y no parasitarias.

por 6 sueros de pacientes con eosinofilia de origen desconocido y 5 de los sueros de pacientes que tenían serología positiva para sífilis.

De los sueros controles negativos pertenecientes a personas con examen parasitológico de materia fecal donde no se observaron formas parasitarias, 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 (*Ascaris*) o con cestodos (hidatidosis), y la de 70 kDa, que fue reactiva con sueros de patologías no parasitarias, como el caso de hepatitis y eosinofilia de origen desconocido.

Purificación del antígeno excretor-secretor de *T. canis*

Para eliminar el triplete de 120 kDa, que fue el responsable de la mayoría de las reacciones cruzadas, se realizó una cromatografía de intercambio iónico que presentó 11 picos diferentes, cada uno de los cuales se recolectó en fracciones de 0,7 ml. Cuando los picos tenían más de un tubo estos se unificaron.

Con los tubos correspondientes a cada pico se realizó un SDS-PAGE, coloración de plata y Western blot, y se reveló con sueros controles positivos y negativos (fig. 2). Se seleccionaron los tubos que no tenían la fracción de 120 kDa (antígeno ES/L₃ purificado), con los que se realizó la técnica de ELISA, como se describió anteriormente (tabla 2).

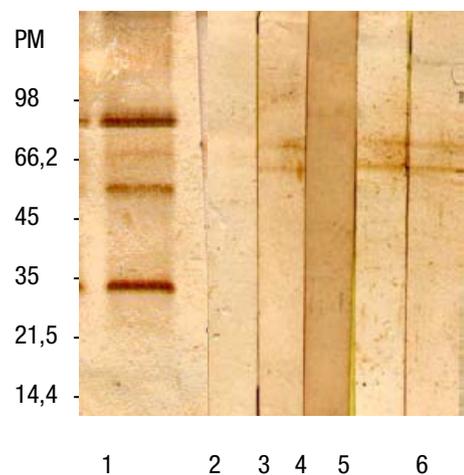


Figura 2 Western blot de sueros de pacientes. Línea 1: suero control positivo con antígeno total, línea 2: suero control negativo con antígeno total, línea 3: suero control positivo con antígeno purificado, línea 4: suero control negativo con antígeno purificado, líneas 5 y 6: sueros de pacientes con sospecha clínica de toxocariosis con antígeno purificado. PM: peso molecular.

La sensibilidad de la técnica del ELISA con el ES/L₃ purificado fue del 100 %, igual que con el antígeno total, pero la especificidad fue del 99 %.

Tabla 2 ELISA con antígeno excretor-secretor purificado frente a sueros de pacientes con distintas enfermedades parasitarias y no parasitarias

ELISA (títulos)			
Enfermedades	Negativo	Positivo	Total
Hidatidosis	9	1	10
Triquinosis	10	0	10
Ascariidosis	10	0	10
Estrongiloidosis	4	0	4
Neurocisticercosis	10	0	10
Hepatitis A	10	0	10
Serología pos. para sífilis	5	0	5
Eosinofilia de origen desconocido	8	1	9
Total	66	2	68

Discusión

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 helmintos y responsable de numerosas reacciones cruzadas⁶.

Las técnicas serológicas adquirieron mayor confiabilidad al mejorar la especificidad, cuando se emplearon antígenos de excreción-secretión, que tienen la ventaja de no poseer fosforilcolina. Sin embargo, son glicoproteínas, por SDS-PAGE y *Western blot* revelan que están compuestos por una mezcla compleja, donde la fracción reconocida por los sueros de los pacientes no siempre corresponde a *T. canis*, por lo tanto es común observar reacciones cruzadas con otras enfermedades¹⁴.

En este trabajo se observó en el *Western blot* que el triplete de aproximadamente 120 kDa es el 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 helmintiasis^{4,13}. Por esta razón, para purificar el antígeno ES/L₃ y separar esta glicoproteína, se realizó una cromatografía de intercambio iónico.

Se analizaron sueros de pacientes con sospecha clínica de toxocarosis por ELISA, utilizando el antígeno total y el purificado, y se observó que eran reactivos con los dos antígenos (ES/L₃ total y purificado), la sensibilidad del test de ELISA no mostró diferencias en el comportamiento de los dos antígenos, pero la especificidad para el ELISA con antígeno purificado fue del 99 %.

De acuerdo a estas observaciones, se puede considerar que los sueros que son positivos empleando el antígeno ES/L₃ purificado podrían ser considerados reaccionantes, e indicarían que las personas fueron o están parasitadas con *T. canis*. El empleo del antígeno ES/L₃ purificado en la técnica de ELISA aumenta la especificidad de dicha técnica al disminuir las reacciones cruzadas, sobre todo con otras hel-

mintiasis, por lo tanto, se puede tener un mejor diagnóstico de toxocarosis.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A los Dres. Jaime Altchet y Hector Freilij del Hospital de Niños «Ricardo Gutiérrez», por la provisión de los sueros de pacientes con sospecha clínica de toxocarosis. Al Dr. Prof. J-F. Magnaval, MD, DSC Service de Parasitologie, CHU Rangueil Toulouse, Francia, por los sueros controles humanos.

Bibliografía

- Altchet J, Nallar M, Conca M, Biancardi M, Freilij H. Toxocarosis: aspectos clínicos y de laboratorio en 54 pacientes. *An Pediatr*. 2003;58:425-31.
- Amer H, Hofinger A, Kosma P. Synthesis of neoglycoproteins containing O-methylated trisaccharides related to excretory/secretory antigens of *Toxocara larvae*. *J Parasitol*. 2003;89:709-14.
- Badley J, Grieve R, Bowman D, Glikman L, Rocky J. Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: physicochemical characterisation and antibody recognition. *J Parasite*. 1987;73:593-600.
- Bellanger AP, Humbert P, Gavignet B, Deschaseaux AD, Barisien C, Roussel S, Millon L, Aubin F, Piarroux R. Comparative assessment of enzyme-linked immunosorbent assay and Western blot for the diagnosis of toxocarosis in patients with skin disorders. *Br J Dermatol*. 2010;162:80-2.
- Coltorti EA, Fernández E, Marguet R, Scozzina JD, Guarnera EA. Detección de portadores asintomáticos de quistes hidatídicos: aumento de la especificidad del ensayo inmuno enzimático. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1990;32:275-84.
- De Savigny DH. *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*. 1975;61:781-2.
- De Savigny DH, Voller A, Woodruff AW. Toxocarosis: serological diagnosis by enzyme immuno-assay. *J Clin Pathol*. 1979;32:284-8.
- Despommier D. Toxocarosis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:265-72.
- Fan CK, Su KE. Cross-reactions with *Ascaris suum* antigens of sera from mice infected with *A. suum*, *Toxocara canis*, and *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Int*. 2004;53: 263-71.
- Iddawela RD, Rajapakse RP, Perera NA, Agatsuma T. Characterization of a *Toxocara canis* species-specific excretory-secretory antigen (TcES-57) and development of a double sandwich ELISA for diagnosis of visceral larva migrans. *Korean J Parasitol*. 2007;45:19-26.
- Ishida MM, Rubinsky-Elefant G, Ferreira AW, Hoshino-Shimizu S, Vaz AJ. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Trop*. 2003;89:73-84.
- Lee SU, Yu JR, Huh S. Ultrastructural localization of *Toxocara canis* larval antigen reacted with a seropositive human serum. *Korean J Parasitol*. 2009; 47:65-8.

13. Magnaval JF, Fabre R, Maurieres JP, Charlet JP, Larrade B. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol Res.* 1991;77:697-702.
14. Peixoto PL, Nascimento E, Cançado GG, Rodrigues Cambraia de Miranda RR, Lunardi Rocha R, Araújo RN, Fujiwara RT. Identification of candidate antigens from adult stages of *Toxocara canis* for the serodiagnosis of human toxocariasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106:200-6.
15. Perteguer MJ, Aguila C, Fenoy S, Guillen JL, Cuellar C. Cross-reactivity induced by *Anisakis simplex* and *Toxocara canis* in mice. *J Helminthol.* 2003;77:331-4.
16. Perteguer MJ, Cuellar C, Guillen JL, Aguila C, Fenoy S, Chivato T, Laguna R. Cross-reactivity between *Anisakis simplex* sensitization and visceral larva migrans by *Toxocara canis*. *Acta Trop.* 2003;89:85-9.
17. Roldán W, Espinoza YA. Evaluation of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for the confirmatory serodiagnosis of human toxocariasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:411-8.
18. Romasanta A, Romero JL, Arias M, Sánchez-Andrade R, López C, Suárez JL, Díaz P, Díez-Baños P, Morrondo P, Paz-Silva A. Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays--analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. *Immunol Invest.* 2003;32:131-42.
19. Schabussova I, Amer H, Van Die J, Kosma P, Maizels RM. O-methylated glycans from *Toxocara* are specific targets for antibody binding in human and animal infections. *Int J Parasitol.* 2007;37:97-109.
20. Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;72:4350-4.