

Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico inmunológico de toxocariasis humana

Standardization of ELISA technique for the immunological diagnosis of human toxocariasis

Anirt Nieves^{1,2}, Benmary Ortega^{1,2}, María Martínez^{1,2}, Olivar Castejón³, María Lares¹ & Elizabeth Ferrer^{1,2*}

RESUMEN

La toxocariasis o síndrome de larva *migrans* visceral es causada por un nemátode del género *Toxocara*, parásito de animales domésticos (perros y gatos). El hombre es un hospedador accidental, al contaminarse con huevos embrionados del parásito. Las larvas invaden la pared intestinal y son transportadas a vísceras, musculatura o globo ocular, donde son atacadas por una reacción granulomatosa del hospedador. El diagnóstico de la enfermedad es complicado debido a la sintomatología inespecífica y que las larvas solo pueden ser evidenciadas por biopsias, que es un método invasivo. Los métodos inmunológicos son una alternativa, en tal sentido en esta investigación se planteó como objetivo estandarizar una técnica inmunológica para la determinación de anticuerpos anti-*T.canis* para el diagnóstico de toxocariasis humana. Los parásitos adultos expulsados por cachorros infectados se identificaron por microscopía óptica y electrónica, se obtuvieron los huevos, los cuales se hicieron embrionar para la liberación de las larvas, y éstas se mantuvieron en cultivo, para luego obtener y purificar los antígenos de excreción/secreción. Se estandarizaron las condiciones de reacción de la ELISA, obteniéndose como concentraciones óptimas 2 µg/mL de antígeno, dilución de suero y conjugado fueron de 1/400 y 1/20000 respectivamente. Los índices diagnósticos fueron: sensibilidad 100%, especificidad 98,9%, valor predictivo positivo 94,4% y valor predictivo negativo 100%. Con la técnica estandarizada se pudieron diferenciar los sueros de pacientes con Toxocariasis, con respecto a los de pacientes con otras helmintiasis y muestras de suero de individuos sanos, logrando el diagnóstico de Toxocariasis humana.

Palabras clave: Toxocariasis, ELISA, *Toxocara canis*, Inmunodiagnóstico, Antígeno de Excreción/Secreción.

SUMMARY

The toxocariasis or visceral larva *migrans* syndrome is caused by a nematode of the genus *Toxocara*, a parasite of domestic animals (dogs and cats). Man is an accidental host, by oral contamination with embryonated eggs of the parasite. The larvae invade the intestinal wall and are transported to the viscera, muscle or eyeball, where they are attacked by a granulomatous reaction of the host. The diagnosis of the disease is complicated by nonspecific symptoms and the larvae can only be demonstrated by biopsy which is an invasive method. Immunological methods are an alternative. The objective of this study was standardizing an immunological technique for the determination of anti-*T. canis* antibodies for diagnosis of human Toxocariasis. We identified by optical and electron microscopy, adult worms expelled by infected pups and we obtained eggs, which became embryos that released the larvae. These were maintained in culture. Excretion/secretion antigens (E/S) were purified from the culture. Subsequently, we standardized reaction conditions of the ELISA technique, obtaining as optimal concentrations 2 mg/mL of antigen, serum dilution and conjugate 1/400 and 1/20000 respectively. With the standard technique we evaluated 17 serum samples from patients with confirmed Toxocariasis, 50 patients with other helminth infections and 40 healthy individuals. The diagnostic indexes were sensitivity 100%, specificity 99%, 94% positive predictive value and negative predictive value 100%. The diagnostic indexes obtained show that the ELISA using excretion/secretion antigen of the parasite is suitable for immunodiagnosis of human Toxocariasis.

Key words: Toxocariasis, ELISA, *Toxocara canis*, Immunodiagnosis, Excreted/Secreted antigen

¹ Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, estado Aragua, Venezuela.

² Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco Triana-Alonso" (BIOMED) Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, estado Aragua, Venezuela.

³ Laboratorio de Microscopía Electrónica, Centro de Investigación y Análisis Docente Asistencial Núcleo Aragua (CIADANA), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, estado Aragua, Venezuela.

*Autor de correspondencia: elizabeth.ferrer@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La toxocarosis es una zoonosis parasitaria causada por un nemátodo ascarideo del género *Toxocara*, del cual se conocen dos especies predominantes, *Toxocara canis* y *Toxocara cati*, parásitos del perro y gato respectivamente (Botero & Restrepo, 2003; Manson *et al.*, 2003).

Toxocara canis desarrolla un ciclo de vida completo en el perro cachorro menor de 5 meses. La infección comienza con la ingesta de huevos embrionados que se encuentran en el suelo, los cuales eclosionan y liberan sus larvas, una vez que llegan al intestino delgado, éstas migran hasta los pulmones, pasando por el árbol bronquial donde son deglutidas, hasta llegar nuevamente al intestino, donde alcanzan el estadio adulto. Una vez ocurrida la fecundación, se liberan huevos no embrionados con las heces del perro y el desarrollo del embrión ocurre en el suelo (Noemi & Rügiero, 2001; Manson *et al.*, 2003).

El hombre es un hospedador accidental, siendo los niños los más afectados debido a sus hábitos de juegos en parques y patios de casa contaminados con huevos del parásito (Delgado & Rodríguez, 2009). En este caso, no se da el desarrollo completo de *T. canis*, sólo sobrevive el estadio larvario. La infección sobreviene cuando el humano ingiere los huevos embrionados del parásito. Las larvas libres invaden la pared intestinal, entran en las vénulas mesentéricas o por los vasos linfáticos y son transportadas principalmente a hígado, pulmón, cerebro, globo ocular, musculatura etc. Las larvas son atacadas por una reacción celular del hospedador, de naturaleza granulomatosa. De este modo se produce una patología conocida como Síndrome Larva *Migrans* Visceral (SLMV) o Síndrome Larva *Migrans* Oftálmica (SLMO) en el caso que afecte al globo ocular (Despommier, 2003; Delgado & Rodríguez, 2009).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2005), la toxocarosis se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, siendo endémica en la mayor parte de los países de América, África y Asia. La prevalencia de esta infección es difícil de establecer por la dificultad de un diagnóstico certero y a que esta enfermedad no es de notificación obligatoria. Sin embargo, en algunos países de América Latina, como Argentina, Colombia, Chile,

México y Perú se han desarrollado estudios sobre la seroprevalencia de la enfermedad. Reportándose cifras entre 31 y 47% en algunas zonas de países como Colombia, Argentina y Brasil (Agudelo *et al.* en 1990; Fillaux *et al.*, 2007; Musso *et al.*, 2007).

En Venezuela no se conoce la magnitud de la infección, no obstante, se han realizado algunos estudios en varias zonas del país. En Caracas, Pifano *et al.* (1988) reportan 66,6% de positividad, en niños de 2 a 7 años en la comunidad de El Valle, empleando un Ag de E/S de *T. canis*. De igual manera, un estudio realizado por Lynch *et al.* (1988) señala 34,9% de seroprevalencia en la población indígena de Amazonas. Los datos más recientes de seroprevalencia son los publicados por García-Pedrique *et al.* (2004) donde reportan una seroprevalencia de 9,7%, en niños de 4 a 6 años en la comunidad de El Mojan, Edo. Zulia.

El suelo juega un rol muy importante en la diseminación de esta zoonosis parasitaria. Cazorla *et al.* (2004) realizaron un estudio en los suelos de 38 parques públicos de la ciudad de Coro, para determinar la presencia de huevos de *Toxocara* sp. Los resultados revelaron la presencia de huevos de *Toxocara* sp. en 63,2% de los parques estudiados. En el mismo año, Ramírez-Barrios *et al.*, demuestran la presencia de *T. canis* en perros en Maracaibo. De igual manera, Devera *et al.* (2008) evaluaron 25 plazas y/o parques en Ciudad Bolívar y encontraron la presencia de huevos de *Toxocara* sp. tanto en tierra (55% de las plazas) como en heces de perros (16,7% de las plazas). Estos resultados muestran el riesgo potencial de transmisión de esta zoonosis en plazas y parques.

El diagnóstico de la toxocarosis humana resulta difícil porque la sintomatología es poco específica, el parásito adulto no se encuentra en las heces ni tampoco sus huevos y el hallazgo de las larvas en los tejidos mediante biopsias de los granulomas es un hecho excepcional (Delgado & Rodríguez, 2009). La demostración de los anticuerpos específicos es la herramienta más útil y confiable, pero las técnicas utilizadas varían en sensibilidad y especificidad ya que dependen del antígeno utilizado (Morales, 1999). En la actualidad se realiza la determinación de anticuerpos circulantes contra antígenos de excreción/ secreción de larvas de *T. canis*, utilizando la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked-Immuno-sorbent-Assay*), lo que le aporta mayor sensibilidad y especificidad

a la técnica (Delgado *et al.*, 1995). Los principales constituyentes de TES se han identificado como mucinas, lectinas y proteínas ligadoras de fosfatidiletanolamina, y se las designan como TES-32, TES-55, TES-70, entre otros, de acuerdo a su peso molecular (López *et al.*, 2005).

Otras investigaciones proponen que un ELISA positivo debería ser confirmado por Western Blot (WB), ya que pueden ocurrir reacciones cruzadas con infecciones por otros ascáridos. El WB se considera muy específico dado que muestra un patrón de bandas característico que permite diferenciar la toxocariasis de la infección producida por otros parásitos (López *et al.*, 2005; Chiodo & Basualdo, 2008).

El uso de antígenos recombinantes es una prometedora mejora para la especificidad en el diagnóstico de la toxocariasis, con este fin, Mohamad *et al.* (2009) elaboraron un ensayo de ELISA con 3 antígenos recombinantes TES-30USM, TES-26 y TES-120, los cuales mostraron 100% de sensibilidad. Aunque se han descrito técnicas moleculares como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para el diagnóstico de toxocariasis (Li *et al.*, 2007), las mismas al igual que los antígenos recombinantes no se encuentran disponibles en el país.

Actualmente el diagnóstico se fundamenta en la sospecha clínica, antecedentes de geofagia, contacto con caninos y las técnicas inmunológicas, pero en Venezuela generalmente no se realiza el diagnóstico inmunológico en los laboratorios de rutina, solo en pocos laboratorios de referencia, como el Instituto de Medicina Tropical de la UCV, y algunos laboratorios privados donde se utilizan kits comerciales muy costosos. Debido a lo anteriormente expuesto, el objetivo principal del presente trabajo fue la estandarización de una técnica inmunológica para el diagnóstico de dicha infección y que pueda ser utilizada en estudios epidemiológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras biológicas

Parásitos

Se obtuvieron 56 parásitos adultos, expulsados por 6 cachorros infectados (33 hembras y 23 machos). Se seleccionaron cachorros que

estuvieron expuestos a la infección de manera natural, a los cuales se les aplicó tratamiento desparasitante y se recogieron las heces con los parásitos expulsados.

Muestras de suero

Se utilizaron en el estudio: 17 muestras de suero de pacientes con toxocariasis provenientes de Ecuador (7) Venezuela (5), Colombia (3) y Bolivia (2), con poco tiempo de residencia en Madrid, España, con diagnóstico exhaustivo de toxocariasis como infección única, cedidos por las Dras. Teresa Gárate y Esperanza Rodríguez del Servicio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España. Además, se emplearon 40 muestras de suero de individuos sanos venezolanos y 48 muestras de suero de pacientes venezolanos con otras parasitosis producidas por helmintos (ascaridiasis, trichuriasis, enterobiasis, anquilostomiasis, estrongiloidiasis, esquistosomiasis, teniasis, cisticercosis, himenolepiasis, hidatidosis y oncocercosis) algunos cedidos por la Prof. Iris Dávila del Dpto. de Parasitología de la Universidad de Carabobo, Valencia y otros, al igual que las 40 muestras de suero de individuos sanos, fueron seleccionados del banco de sueros de la sección Parasitología Molecular del BIOMED.

Preparación del Antígeno de Excreción/Secreción de Toxocara canis

Se siguió el protocolo de Espinoza *et al.* (2003) para la preparación del antígeno de Excreción/Secreción, con modificaciones realizadas en el transcurso de la investigación, como se detalla a continuación.

Identificación de los parásitos mediante Microscopía Óptica y Microscopía Electrónica de Barrido

La observación de los parásitos adultos expulsados por los cachorros en el microscopio estereoscópico (NIKON) se realizó colocando los especímenes en un vidrio reloj y fueron observados directamente con un aumento de 40X para detallar las estructuras externas que permitieron su identificación.

Para la observación e identificación de los parásitos por Microscopía Electrónica de Barrido, se escogieron 2 machos y 2 hembras, los cuales fueron segmentados. Seguidamente, fueron fijados en 4%

de formaldehído y 1% de glutaraldehído lavándose posteriormente por tres veces en buffer fosfato y agua destilada. Una post-fijación se realizó en 1% de tetraóxido de osmio con los respectivos lavados. Deshidratados y preparados para su observación en el Microscopio Electrónico de Barrido (Hitachi S2300) siguiendo el protocolo del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigaciones y Análisis Docente Asistencial de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua (CIADANA). Para la deshidratación de las muestras, las porciones de los adultos fueron sumergidas en Etanol a diferentes concentraciones: etanol 50% (5-10 minutos, 2 veces), etanol 70% (10-20 minutos, 2 veces), etanol 80% (10-20 minutos, 2 veces), etanol 95% (10-20 minutos, 2 veces), etanol 100% (10-20 minutos, 2 veces), etanol: amyl acetato (3:1, 15min), etanol: amyl acetato (1:1, 15min) en frío, etanol: amyl acetato (1:3, 15min) en frío. Cumplido este tiempo, las muestras se colocaron en amyl acetato y fueron conservadas en nevera (4°C) durante 15 minutos. Seguidamente, las muestras pasaron por un proceso de desecado de punto crítico en desecador (HCP2, Hitachi), lo que permitió desecar la muestra sin que su estructura colapsase, luego de dos horas, las muestras fueron colocados en porta especímenes del microscopio electrónico y se llevaron al respectivo cubrimiento metálico con platino paladio en cobertor (EIKO IB3, Hitachi) y luego se observaron en el microscopio electrónico de barrido (Hitachi S2300).

Obtención de huevos embrionados de T. canis

Se diseccionaron 23 vermes adultos hembras, para obtener el útero y colectar huevos, que fueron colocados en fiolas de vidrio con formalina al 2% con tapa de algodón, por 45 días a 28°C, agitándolos por lo menos 1 vez al día, para obtener los huevos embrionados.

Obtención de larvas de T. canis

Los huevos embrionados, se recolectaron en recipientes estériles y se lavaron por centrifugación 3 veces, con tampón fosfato salino, (PBS por sus siglas en inglés *Phosphate Buffer Saline*) estéril a 3000 rpm, 20°C, durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y para liberar las larvas, se resuspendieron los huevos en cloro al 5%, durante 2 horas en ligera agitación para reblandecer la cubierta. Seguidamente se centrifugó todo el material a 3000 rpm, 20°C por

5 min para descartar el cloro y luego se realizaron 3 lavados con PBS estéril para eliminar los residuos de cloro, a 4°C. Después de la última centrifugación, los huevos con la cubierta reblandecida fueron colocados en recipientes con perlas de vidrio, donde se mantuvieron en agitación lenta durante 2 horas para facilitar la ruptura y liberación de las larvas. Posteriormente, el contenido de las fiolas se centrifugó nuevamente a 3000 rpm, 4°C por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se hizo un último lavado, esta vez en medio líquido para cultivo celular RPMI (Sigma) con antibiótico Gentamicina (80mg/L).

Producción del Ag de Excreción/Secreción (E/S)

Las larvas obtenidas previamente se colocaron en recipientes para cultivos y se incubaron en estufa a 37°C, 5% CO₂. Estos cultivos fueron agitados y observados periódicamente al microscopio invertido (ZEISS, West Germany) para verificar el estado de las larvas y descartar una posible contaminación bacteriana y/o fúngica. Después de 7 días, se colectó el sobrenadante y el medio fue reemplazado en forma aséptica por otro volumen de composición similar al inicial y se repitió el proceso de incubación de la misma forma.

Concentración y purificación del antígeno de Excreción/Secreción (E/S)

Las diferentes fracciones del medio líquido, que contenían el antígeno de Excreción/Secreción (E/S) se colectaron y almacenaron a -20°C, hasta obtener un volumen de 80 mL, para posteriormente concentrar el material mediante liofilización. Para ello, el volumen total de medio líquido recuperado se congeló a -80°C y posteriormente se colocó en el liofilizador. El material liofilizado se disolvió en 8 mL de PBS con inhibidores de proteasas (TLCK, *Tosyl-L-Lysine-chloromethylketone* 62 µg/mL, TPCK, *Tosyl-L-Phenylalanine-chloromethylketone* 62 µg/mL y PMSF, *Phenylmethylsulfonyl fluoride* 219 µg/mL) para evitar la degradación de las proteínas. Posteriormente se realizó la diálisis, para ello, se colocó el antígeno dentro de una membrana de diálisis con poros cuyo punto de corte era de 6 kDa (Spectropore), seguidamente la membrana de diálisis se sumergió en PBS con cambios frecuentes del buffer, hasta retirar la mayor cantidad de otros componentes.

Determinación de la concentración proteica

La determinación de la concentración de proteínas del antígeno de E/S se realizó mediante el método de Bradford (1976).

Estandarización de la técnica de ELISA

Para la determinación de la concentración óptima del antígeno E/S de *T. canis* se probaron concentraciones desde 2 a 8 µg/mL (2, 4, 6, 8 µg/mL) diluidos en tampón carbonato–bicarbonato a pH 9,6. Para determinar la dilución óptima de los sueros se realizó la técnica de ELISA con el antígeno a la concentración óptima determinada previamente, empleando diferentes diluciones de suero desde 1/50 hasta 1/800 (1/50, 1/100, 1/200, 1/400 y 1/800). Para determinar la dilución óptima del conjugado anti-inmunoglobulina humana IgG acoplada a peroxidasa, se realizaron diferentes diluciones desde 1/10000 hasta 1/30000 (1/10000, 1/15000, 1/20000, 1/25000 y 1/30000). Para estas titulaciones se utilizaron sueros controles positivos y negativos para anticuerpos anti-*T. canis* en todos los casos. La concentración óptima de antígeno y las diluciones óptimas de sueros y conjugado fueron aquellas en las cuales se obtuvo mayor diferencia entre los sueros controles negativos y positivos.

Determinación del Punto de Corte (Cut off)

El punto de corte se realizó aplicando la técnica de ELISA utilizando las condiciones óptimas determinadas. Se utilizaron los sueros controles negativos y el punto de corte fue el valor de la media más 3 desviaciones estándar ($\bar{X} + 3 DS$). Todos aquellos valores que se encontraron por encima del punto de corte fueron considerados positivos (+) y los que se encontraron por debajo negativos (-). Todas las muestras que se ubicaron $\pm 10\%$ del punto de corte se estimaron como dudosas.

Técnica de ELISA

Se sensibilizaron placas de 96 pozos de fondo plano (Immulon® 2 HB, Thermo) con 100 µL de antígeno (E/S) de *T. canis* (2µg/mL) diluidos en tampón carbonato–bicarbonato a pH 9,6 las cuales fueron incubadas a 4 °C durante toda una noche. Se lavaron tres veces con 100 µL de una solución de PBS y Tween 20 (0,05%) con la

ayuda de un lavador de placas (Wellwash 4MK2). Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con 100 µL de solución tampón fosfato salino y albúmina al 1% (PBS-BSA por sus siglas en inglés *Phosphate Buffer Saline-Bovine Serum Albumin*), y fueron incubadas a 37°C durante 45 minutos. Se lavó siguiendo el procedimiento ya descrito. Se colocaron en los pocillos 100 µL de cada suero, a las diluciones que se establecieron experimentalmente, y se incubaron a 37°C durante 45 minutos. Se lavó de igual forma y se agregaron 100 µL del conjugado anti-IgG humana acoplado a peroxidasa (Pierce) a la dilución óptima establecida e incubó a 37 °C durante una hora. Se lavaron las placas de la forma antes descrita y se añadió 100 µL del sustrato ABTS (por sus siglas en inglés *Azino-bis 2.2 ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-Sulphonic*) en tampón citrato-fosfato-perborato a pH 7,0 y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos aproximadamente. Posteriormente se efectuó la lectura de absorbancias a 405 nm, utilizando el lector de ELISA (Multiskan Ascent).

Análisis de resultados

Se determinaron los índices diagnósticos de sensibilidad (S), especificidad (E) y valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN), según las siguientes fórmulas: $S = VP/VP+FN \times 100$, $E = VN/VN+FP \times 100$, $VPP = VP/VP+FP \times 100$ y $VPN = VN/VN+FN \times 100$ (VP= verdaderos positivos FN= falsos negativos VN= verdaderos negativos FP= falsos positivos) (Greenberg *et al.*, 2002).

Consideraciones éticas

Todas las muestras utilizadas fueron colectadas para otros proyectos de investigación, con aval del respectivo Comité de Bioética y provenientes de individuos que mediante consentimiento informado aceptaron que sus muestras fuesen empleadas para otros fines, siempre y cuando fuesen de investigación.

RESULTADOS

Identificación de los parásitos adultos

Los parásitos adultos expulsados por los cachorros infectados se identificaron mediante microscopía óptica y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Mediante microscopía óptica se observaron vermes de un tamaño aproximado de 5 a 10 cm de longitud, de color blanco marfil y cutícula anillada, a través del microscopio estereoscópico se pudo observar en la región cefálica dos expansiones laterales de la misma cutícula en forma de aletas. La diferencia entre macho y hembra se aprecia por el tamaño, siendo la hembra más grande, alcanzando una longitud de 10 cm en algunos especímenes y el extremo caudal ligeramente más fino terminando en una punta roma. Los machos se diferencian por ser más pequeños y delgados, midiendo entre 5 a 7 cm de longitud y en el extremo caudal se observa una espícula (Fig. 1).

También se realizó la identificación del parásito a través de microscopía electrónica de barrido. Como se aprecia en la Fig. 2, se pudo observar un nematode de gran tamaño, con aletas cervicales (Fig. 2a y 2c) y prominentes labios (Fig. 2b y 2c). El parásito está recubierto por una cutícula que presenta pequeñas depresiones, en forma de anillo (Fig. 2d). Machos y hembras se distinguen por su variable tamaño entre ambos, siendo la hembra más grande y su extremo caudal en forma de fino apéndice (Fig. 2e). El macho se observa de textura más fina, más pequeño y en su extremo caudal se aprecia una espícula bien definida (Fig. 2f).

Todas las características descritas nos permitieron identificar como *Toxocara canis* a los parásitos recuperados.

Obtención de huevos embrionados y larvas de *T. canis*

Después de 45 días de incubación de los huevos liberados a partir de la disección de los úteros de los parásitos adultos, se obtuvo 70% de huevos embrionados en todos los lotes. (Fig. 3 a-d). Luego

Fig. 1. Adultos de *Toxocara canis* a: Adultos de *T. canis* recolectados y lavados: b: Diferencia de tamaño entre dos hembras y un macho de *T. canis*.

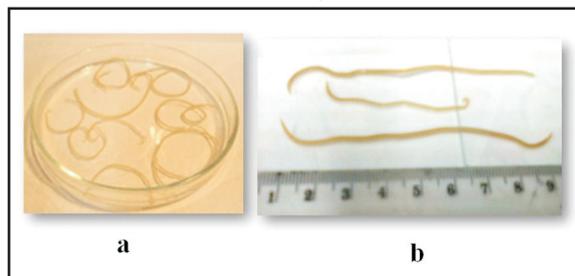
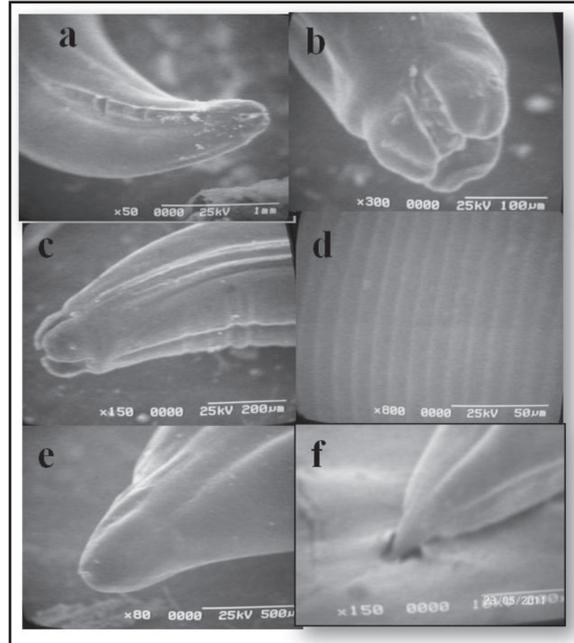


Fig. 2. Microscopía Electrónica de Barrido de *Toxocara canis*. a: Extremo cervical, se aprecian aletas laterales. b Se observan los 3 labios prominentes. c: Extremo Cervical, se observa con mejor detalle ampliación de la cutícula para formar las aletas y los tres labios. d: Cutícula anillada. e: Hembra, extremo caudal. f: Macho, extremo caudal.



de la ruptura de las cubiertas de los huevos, se obtuvo la liberación de las larvas, las cuales se lavaron y se mantuvieron en medio líquido para cultivo (Fig. 3e).

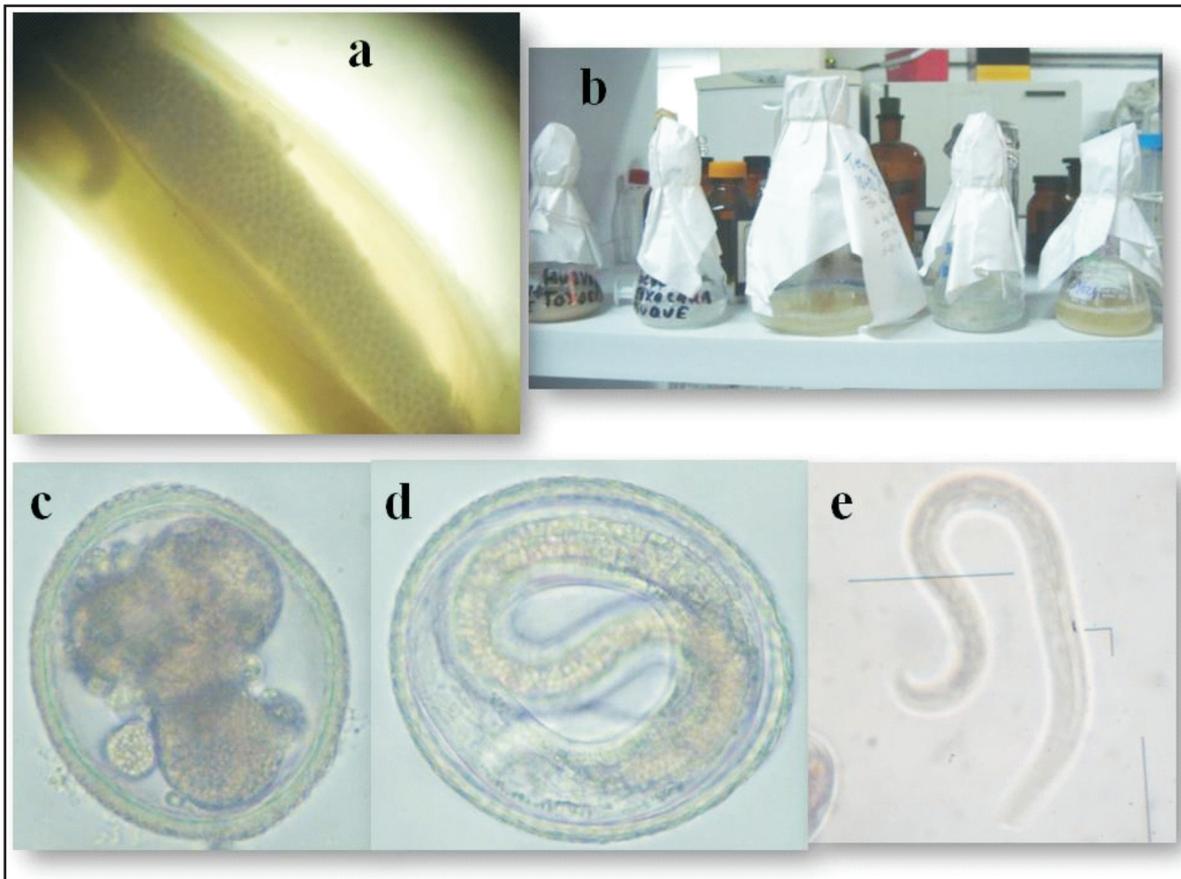
Producción del antígeno de Excreción/Secreción (E/S)

Después de 7 días de cultivo de las larvas, se colectó el sobrenadante, obteniéndose 8 lotes de cultivo con 10 mL cada uno (80 mL). Este volumen se concentró 10 veces mediante liofilización y se purificó por diálisis. Se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (micrométodo), obteniéndose 1,64 mg/mL.

Estandarización de la técnica de ELISA

Luego de obtenido el Antígeno E/S se procedió a determinar las condiciones óptimas para el desarrollo de la técnica. La concentración óptima de Ag E/S fue de 2 µg/mL donde se obtuvo mayor diferencia entre los sueros controles negativos y positivos. La dilución óptima de sueros utilizando el Ag de E/S de

Fig. 3. Representación del proceso de obtención de larvas de *Toxocara canis*: a: Útero de *T. canis* con huevos en su interior, aumento de 40X. b: Huevos embrionando en fiolas con formalina 2%. c: Huevo embrionado de *T. canis* d: huevo larvado e: Larva de *T. canis* liberada.



T. canis fue de 1/400, mientras que la dilución óptima del conjugado anti-Inmunoglobulina Humana IgG acoplada a peroxidasa, fue de 1/20000. Estas fueron las condiciones donde se apreció mayor diferencia entre los sueros controles positivos y negativos. Por otro lado, se realizaron lecturas cada 5 minutos durante una hora, observando el tiempo de reacción óptimo a los 20 minutos. Una vez obtenidas las condiciones óptimas de trabajo se procedió a determinar el punto de corte, el cual fue de 0,200 (valor de $\bar{x} + 3 DS$).

Técnica de ELISA

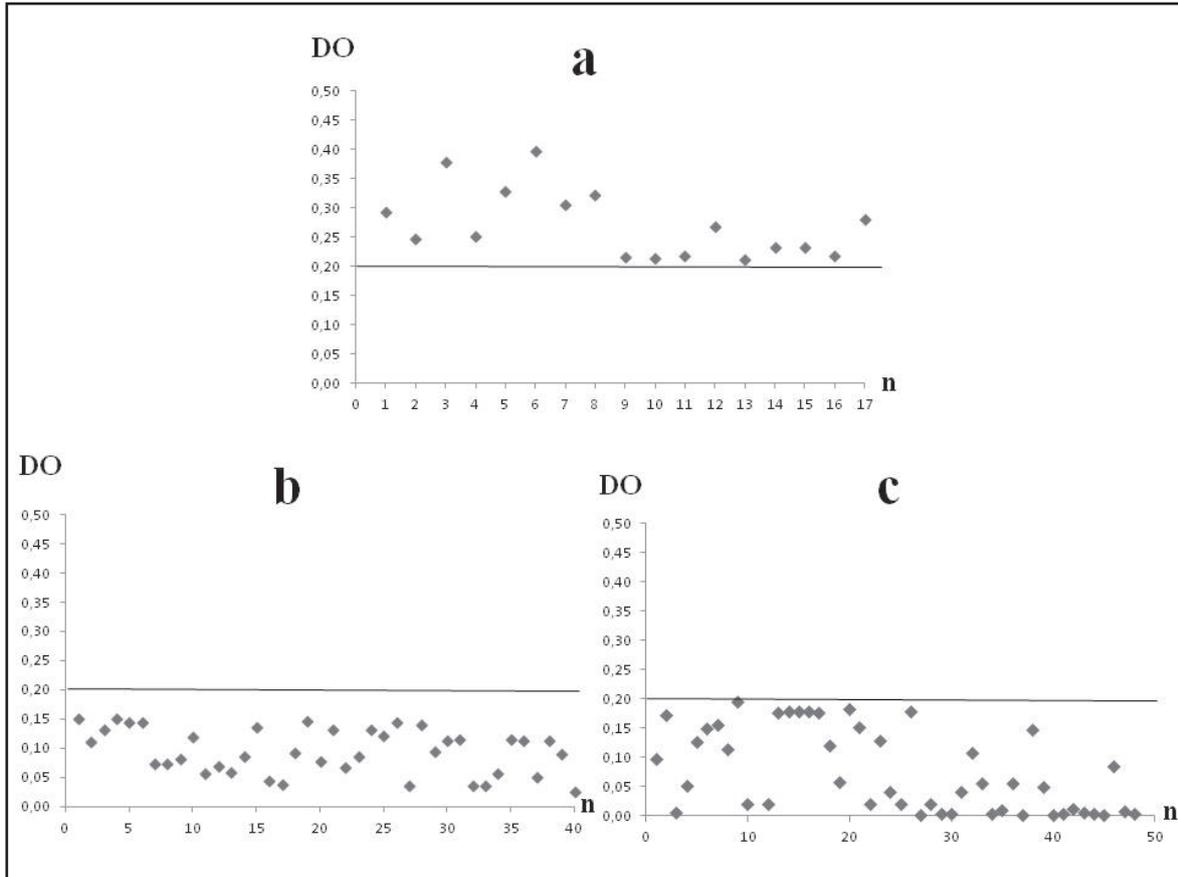
Una vez determinadas las condiciones óptimas de reacción, así como también el punto de corte, se evaluaron las propiedades diagnósticas del antígeno de E/S de *T. canis*. Aplicando la técnica de ELISA con las condiciones determinadas experimentalmente a las muestras descritas anteriormente. De los 17 sueros positivos, todos

mostraron valores de densidad óptica por encima del punto de corte, por lo que la sensibilidad de la técnica fue de 100%. En la evaluación de los 48 sueros positivos para otras parasitosis, solo se evidenció una posible ligera reacción cruzada (falso positivo) en un caso de infección con esquistosomiasis, estimado como dudoso, y no se observaron valores positivos en los 40 sueros controles negativos, por lo que la técnica estandarizada presentó una especificidad de 98,9%. Los resultados revelaron un valor predictivo negativo de 100% y el valor predictivo positivo fue de 94,4% ya que en todos los sueros positivos evaluados se obtuvieron D.O por encima del punto de corte, con una sola muestra que dio un resultado dudoso, la cual consideramos como falso positivo (Fig. 4).

DISCUSIÓN

La toxocariasis humana es una zoonosis parasitaria de amplia distribución y poco reconocida,

Fig. 4 Resultados de la técnica de ELISA con los diferentes sueros evaluados. a: Distribución de los sueros de individuos con toxocariasis confirmada, ensayados con el Ag de E/S de *T. canis*. b: Distribución de los sueros de individuos sanos, ensayados con el Ag de E/S de *T. canis*. c: Distribución de los sueros de individuos con otras enfermedades parasitarias, ensayados con el Ag de E/S de *T. canis*. La línea continua representa el punto de corte en todos los casos. La Densidad Óptica (DO) a 405 nm se representa en el eje de las ordenadas, mientras que en el eje de las abscisas se representa el número asignado a las muestras (n).



aunque no se encuentra dentro de las enfermedades desatendidas, podría ser considerada como tal (Delgado & Rodríguez, 2009). El diagnóstico resulta complicado dada la sintomatología inespecífica, el ciclo biológico incompleto en el humano, donde no es posible el diagnóstico coproparasitológico y la demostración de las larvas en los tejidos mediante biopsias, es un procedimiento muy invasivo para el paciente. Es por ello, que la búsqueda de anticuerpos específicos anti-*Toxocara canis* en humanos mediante la técnica de ELISA es la alternativa diagnóstica de la enfermedad. Se han empleado múltiples pruebas que incluyen Fijación de Complemento (FC), Hemaglutinación Indirecta (HAI), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el Inmunoensayo enzimático (ELISA). Estas pruebas

varían en sensibilidad y especificidad ya que dependen del antígeno utilizado (Morales, 1999). Los antígenos que han demostrado mayor sensibilidad y especificidad son los antígenos de excreción/secreción del parásito (Delgado & Rodríguez, 2009).

En Venezuela, actualmente el diagnóstico de esta parasitosis se realiza a través de datos clínico-epidemiológicos; por sospechas clínicas, antecedentes de geofagia, contacto con caninos y las técnicas inmunológicas que no siempre están a la disposición, ya que se realizan en muy pocos laboratorios, principalmente de investigación. Por tal motivo, este trabajo se planteó la estandarización de la técnica ELISA con antígenos de Excreción/Secreción de *T. canis*, con el fin de proporcionar el diagnóstico

inmunológico oportuno y poder desarrollar estudios epidemiológicos.

Para la estandarización de la técnica de ELISA en primer lugar, se preparó el antígeno de Excreción/Secreción de *T. canis* tomando en cuenta el protocolo de Espinoza *et al.* (2003) con varias modificaciones. La obtención de los parásitos adultos se realizó mediante la administración de desparasitante a cachorros infectados naturalmente y recolectando sus heces, de esta manera se beneficia al canino sin necesidad de la necropsia y se puede establecer el control sanitario. A diferencia de los estudios realizados por Morales (1999) y Espinoza *et al.* (2003) donde obtuvieron a los adultos de *T. canis* a través de la infección experimental de los caninos y posterior eutanasia, con el fin de obtener mayor número de especímenes.

Los vermes adultos recolectados fueron clasificados por sexo obteniendo un grupo de 33 hembras y 23 machos, identificándose a través de un microscopio estereoscópico y microscopía electrónica de barrido, tomando en cuenta características tales como: tamaño, color, presencia de aletas y ventosas, las cuales fueron compatibles con *T. canis*. Una vez realizada la identificación de los parásitos adultos, se obtuvieron los huevos de *T. canis* de la misma forma que lo hicieron Espinoza *et al.* (2003) mediante la disección de hembras adultas y extracción de sus úteros, a partir de allí se colectaron los huevos que fueron incubados para embrionar. El porcentaje de huevos embrionados fue de 70% luego de 45 días de incubación, a diferencia de Morales (1999) que bajo las mismas condiciones logró un 95% de huevos embrionados en 28 días de incubación. Esta diferencia podría deberse a distintas condiciones medio ambientales o a que se tenían mayor cantidad de huevos infértiles. Sin embargo, esto no afectó la obtención de los antígenos de excreción/secreción del parásito.

Para lograr la liberación de las larvas, los huevos embrionados fueron lavados, pasados por cloro y colocados en recipientes con perlas de vidrio para romper las cáscaras. Una vez liberadas las larvas fueron colocadas en medio líquido para cultivo, sin retirar previamente las cáscaras, hecho que no afectó el óptimo desarrollo del cultivo. El medio RPMI solo contenía aminoácidos, lo que permitió obtener exclusivamente proteínas del parásito.

A partir de los cultivos se recuperaron 80 mL de sobrenadante, menor cantidad que la obtenida por Espinoza *et al.* (2003), los cuales obtuvieron 200 mL, ya que partieron de mayor número de larvas. Posteriormente el sobrenadante fue liofilizado para concentrarlo y luego dializado para purificarlo, obteniendo una concentración de Ag de E/S de 1,64 mg/mL, a diferencia del proceso realizado por Morales (1999) donde se mantuvo el cultivo por seis meses, no se dializó y se obtuvo una concentración proteica de Ag E/S de 1 mg/mL, aunque por supuesto con mayor volumen de antígeno.

Robertson *et al.* en 1989 realizaron un estudio sobre las enzimas proteolíticas secretadas por las larvas de *T. canis* cultivadas *in vitro* y afirman que varias especies de nemátodos incluyendo *Toxocara* presentan actividad proteasa en los productos de excreción/secreción. Estas proteasas secretadas *in vitro* son capaces de degradar componentes del antígeno, perdiendo este la capacidad de reacción en las pruebas inmunológicas, por lo que se agregó inhibidores de proteasas al antígeno E/S de *T. canis* ya purificado para poder conservarlo.

En la estandarización del ELISA, la concentración óptima de antígeno fue 2 µg/mL, una cantidad mínima en comparación con la utilizada por Espinoza *et al.* (2003) de 50 µg/mL, lo que demuestra la elevada reactividad del antígeno obtenido. La dilución del suero fue 1/400, una dilución favorable dado que se necesita muy poca cantidad de muestra para aplicar la técnica, tomando en consideración que la mayoría de los pacientes afectados por esta parasitosis son niños en edad preescolar cuya obtención de muestra es más complicada.

Los resultados de la técnica con los sueros controles positivos demostraron una alta sensibilidad. Aunque las muestras eran de pacientes residentes en España, estos eran todos inmigrantes latinoamericanos, con poco tiempo de residencia en España, donde recientemente se ha observado la detección de toxocariasis en inmigrantes (Turrientes *et al.*, 2011). Es importante resaltar que aunque es común en Latinoamérica el poliparasitismo y las infecciones con diferentes tipos de helmintos que pudiesen dar reactividad cruzada, en este caso, podemos afirmar que se trata de infección solo por *Toxocara* sp., debido al exhaustivo diagnóstico de los pacientes. Se utilizaron esas muestras precisamente por ese diagnóstico

certero, para poderlas utilizar como verdaderos controles positivos y no incurrir en el uso de falsos positivos para la valoración de la técnica. En este primer trabajo se demuestra que los sueros de los pacientes con toxocariasis son capaces de reconocer los antígenos de *T. canis* preparados, de manera que la técnica podría ser usada para trabajos posteriores, analizando previamente la reactividad en muestras no tan controladas, donde quizás sería necesaria una previa absorción de los sueros con antígenos de *Ascaris* sp. como ha sido sugerido por varios autores (Roldán *et al.*, 2006; Manson *et al.*, 2003).

Se aplicó la técnica de ELISA con sueros de individuos con otras parasitosis evaluando la capacidad discriminadora del antígeno, los resultados demostraron que solamente se observó un caso estimado como sospechoso con el suero de un paciente infectado con esquistosomiasis, obteniéndose un ELISA altamente específico. Por supuesto, aunque en los sueros heterólogos evaluados, no se observó casi reactividad cruzada, para estudios posteriores es necesaria la evaluación de mayor cantidad y diversidad de muestras de individuos con otras helmintiasis. Es importante resaltar, que aunque se trabajó con antígeno de *T. canis*, la toxocariasis puede ser también producida por *T. cati*s y dada la similitud antigénica de estos parásitos (Nunes *et al.*, 1999), se podría esperar que la técnica podría ser de utilidad en los casos de toxocariasis por *T. cati*s.

Los índices diagnósticos obtenidos en la prueba estandarizada son elevados y adecuados, comparados con los que han sido reportados en términos generales; sensibilidad 78% y especificidad 93% (Manson *et al.*, 2003), incluso mejores que los reportados por los kits de ELISA comerciales que señalan una sensibilidad de 91% a 95% y especificidad entre 84% y 95%. Los índices diagnósticos obtenidos sugieren que la técnica diseñada y estandarizada en esta investigación podría ser utilizada para estudios posteriores, evaluando sus índices diagnósticos con mayor cantidad y diversidad de muestras para poder determinar su utilidad en el inmunodiagnóstico de toxocariasis humana y en estudios epidemiológicos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses de ninguna índole con respecto al presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las Dras. Teresa Gárate y Esperanza Rodríguez del Servicio de Parasitología del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España, por las muestras de suero de pacientes con toxocariasis. De igual manera, a la Prof. Iris Dávila del Departamento de Parasitología de la Universidad de Carabobo, Valencia, por algunas muestras de suero de pacientes con otras parasitosis. También se agradece la colaboración de la Dra. María Elena García del laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV, por su ayuda en la colecta del material parasitario y al Prof. Gilberto González del Laboratorio de Microscopía Electrónica del CIADANA, Universidad de Carabobo Sede Aragua, por su colaboración en el desecado de las muestras para microscopía electrónica.

REFERENCIAS

- Agudelo C., Villareal E., Cáceres E., López C., Eljach I., Ramírez N., Hernández C. & Corredor A. (1990). Human and dog *Toxocara canis* infection a poor neighborhood in Bogotá. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **85**: 75-78.
- Botero D. & Restrepo M. (2003). Parasitosis Tisulares por larvas de Helminthos pp. 349-352. En: *Parasitosis Humanas*. Corporación para la Investigación (4^{ta} ed.). Bogotá, Colombia.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* **72**: 248-254.
- Cazorla D., Morales P. & Acosta M. (2004). Contaminación de suelos con huevos de *Toxocara* spp. (nematoda, ascaridida) en parques públicos de la ciudad de Coro, estado Falcón, Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ*. **17**: 117-122.
- Chiodo P. & Basualdo J. (2008). Toxocariosis. *Red de Helminología para América Latina y el Caribe*. [Revista en Línea]. Disponible: <http://www.cnia.inta.gov.ar/helminto>. [Consulta: septiembre 28, 2010].
- Delgado O. & Rodríguez A. (2009). Aspectos clínicos-epidemiológicos de la toxocariasis: una

- enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 1-33.
- Delgado O., Coraspe V., Fuenmayor J., Simonovic E., Silva S. & Payares G. (1995). Detección de anticuerpos específicos en pacientes con sospecha de infección por *Toxocara canis*. *Acta Cient. Venez.* **46 (Suppl. 1)**: 163-164.
- Despommier D. (2003). Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**: 265-272.
- Devera R., Blanco Y., Hernández H. & Simoes D. (2008). *Toxocara* y otros helmintos en plazas y parques de Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **26**: 23-26.
- Espinoza Y., Huapaya P., Suárez R., Chávez V., Sevilla C. & Dávila E. (2003). Estandarización de la Técnica de ELISA para el diagnóstico de Toxocariasis humana. *An. Fac. Med. Univ. Nac. Mayor de San Marcos.* **64**: 7-12.
- Fillaux J. Santillan G. Magnaval J. Jensen O. Larrieu E. & Sobrino-Becaria C. (2007). Epidemiology of Toxocariasis in steppe environment: The Patagonia study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 1144-1147.
- García-Pedrique M., Díaz-Suarez O., Estévez J. Cheng-Ng R., Araujo M. & Castellano J. (2004). Prevalencia de infección por *Toxocara* en preescolares de una comunidad educativa de El Moján. Estado Zulia, Venezuela. Resultados preliminares. *Inv. Clin.* **45**: 347- 354.
- Greenberg R., Flanders D., Eley J., Daniels S. & Boring J. (2002). Estudios diagnósticos pp. 81-95. En, *Epidemiología médica*. Manual Moderno. (3^{ra} ed.). México DF, México.
- Li M., Chen H., Sani R., Song H. & Zhu X. (2007). PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats. *Mol. Cel. Probes.* **21**: 349-354.
- Lynch N., Eddy K., Hogden A., Lopez R. & Turner K. (1988). Seroprevalence of *Toxocara canis* in tropical Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**: 275-281.
- López M., Bojanchi M., Alonso M. & Alonso J. (2005). Immunoblotting para diagnóstico de Toxocariasis humana en un área subtropical. *Parasitol. Latinoam.* **62**: 127-131.
- Manson P., Cook G. & Zumla A. (2003). *Manson's Tropical Diseases* (21 Ed.) Saunders, London, U.K.
- Mohamad, S., Che Azmi, N. & Noordin, R. (2009). Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human Toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). *J. Clin. Microbiol.* **47**: 1-6.
- Morales O. (1999). *Identificación de antígenos de Toxocara canis mediante la técnica de Western Blot en conejos infectados experimentalmente*. Tesis para optar al título de Magister en Infecciones y Salud en el Trópico, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Disponible: <http://www.bdigital.unal.edu.co> [Consulta: Septiembre, 30, 2010].
- Musso C., Castelo J., Tesanaclis A. & Pereira F. (2007). Prevalence of *Toxocara*-induced liver granulomas, detected by immunohistochemistry, in a series of autopsies at a Children's Reference Hospital in Vitoria, ES, Brazil. *Virchows Archives.* **450**: 411-417.
- Nunes C. M., Tundisi R. N., Heinemann M. B., Ogassawara S. & Richtzenhain L. J. (1999). Toxocariasis: serological diagnosis by indirect antibody competition ELISA. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **41**: 95-100.
- Noemi I. & Rugiero E. (2001). Larvas Migrantes pp. 333-337. En, *Parasitología Médica*. Atias, A. Ed. Mediterráneo. 2^{da} Edición. Santiago, Chile.
- OMS (2005). *14.a Reunión Interamericana a Nivel Ministerial en Salud y Agricultura*. Organización Mundial de la Salud [Documento]. México.
- Pifano F., Orihuela R., Delgado O., Cortez R., Abdul-Hadi S., Dale M., et al. (1988). La Toxocariasis Humana en Venezuela, especialmente en el Valle de Caracas. *Gac. Med. Caracas.* **96**: 31- 42.
- Ramirez-Barrios R. A., Barboza-Mena G., Muñoz J., Angulo-Cubillan F., Hernandez E., Gonzalez

- F. & Escalona F. (2004). Prevalence of intestinal parasites in dogs under veterinary care in Maracaibo, Venezuela. *Vet. Parasitol.* **121**: 11-20.
- Robertson B., Bianco A., Mckerrow J. & Maizels R. (1989). *Toxocara canis* proteolytic enzymes secreted by the infective larvae *in vitro*. *Parasitol. Exp.* **69**: 6-30.
- Roldan W., Cornejo W. & Espinoza Y. (2006). Evaluation of the dot enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with standard ELISA for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **101**: 71-74
- Turrientes M. C., Perez de Ayala A., Norman F., Navarro M., Perez-Molina J. A., Rodriguez-Ferrer M., *et al.* (2011). Visceral larva migrans in immigrants from latinamerica. *Emerg. Infect. Dis.* **17**: 1263-1265.

Recibido el 28/11/2011
Aceptado el 11/03/2012