

# Antígenos de excreción-secreción de las formas adultas de *Toxocara canis* detectados por Western Blot utilizando anticuerpos específicos producidos en conejo

*Excretory-secretory antigens of Toxocara canis adult parasites detected by Western blot using specific antibodies produced in rabbits*

Chuyo-Zavaleta, Mirtha; Jara-Campos, César

## RESUMEN

Se determinó a los antígenos de excreción-secreción (AE/S) de las formas adultas de *Toxocara canis* mediante la técnica de "Western blot" utilizando anticuerpos específicos producidos en conejo, *Oryctolagus cuniculus*, raza Neozelandesa inmunizado experimentalmente. Para ello, formas adultas vivas de *T. canis* fueron recolectadas del intestino delgado de cachorros de *Canis familiaris* infectados naturalmente, lavadas con PBS y cultivadas en medio mínimo esencial (Minium Essential Media –MEM Eagle- BioRad) durante 18, 20, 22 y 24 horas para obtener los productos de excreción-secreción que contengan a los antígenos. Los anticuerpos específicos, por su parte, fueron obtenidos en los conejos por inoculación, vía subcutánea, de 101.0 ug/mL de productos excretados-secretados obtenidos a las 18, 22 y 24 horas de cultivo, según esquemas previamente establecidos.

Mediante la técnica de "Western blot", se detectaron cinco bandas antigénicas inmunodominantes cuyos pesos moleculares, en Kilodaltons (kDa), fueron: 79.4, 70.8, 32.1, 31.6 y 28.2 kDa, de los cuales las tres últimas han sido también halladas en las larvas infectivas, por lo que podrían utilizarse en el diagnóstico de la toxocarosis humana.

**Palabras clave:** *Toxocara canis*, Western blot, antígenos de excreción-secreción, *Canis familiaris*

## ABSTRACT

Excretory-secretory antigens of adult specimen of *Toxocara canis* by an electroimmunoblotting Western blot technique using specific antibodies obtained in rabbit, *Oryctolagus cuniculus* Neozelandes strain, immunized experimentally were determined. For this, live specimens of *T. canis* were collected from gut of puppies naturally infected, washed with PBS and cultured in Essential Minimum Media (Eagle-BioRad) during 18, 20, 22, and 24 hours with the purpose to obtain excretory-secretory products. Specific antibodies, on the other hand, were obtained in rabbit specimens by inoculation, subcutaneously utilizing schemes previously proposed, of 101.0ug/mL excretory-secretory products. By a Western blot technique were detected five immunodominant immunoreactive bands: 79.4, 70.8, 32.1, 31.6 and 28.2 kDa. Of them, the three last ones were found previously in *T. canis*-infective larvae too and so should be employed in the human toxocarosis Western blot diagnosis

**Key words:** *Toxocara canis*, Western blot, excretory-secretory, *Canis familiaris*

<sup>1</sup>Exalumna de la Escuela AP de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

## INTRODUCCIÓN

La toxocarosis es una infección zoonótica causada por los nematodos ascáridos *Toxocara canis* y *T. cati* que rutinariamente infectan a perros y gatos en todo el mundo. En el humano, cuando los huevos infectivos de estos nematodos son accidentalmente ingeridos la larva eclosiona en el intestino y migra a través de órganos, de preferencia al hígado y a los ojos, y produce las dos clásicas formas de la enfermedad: la larva migrans visceral y la larva migrans ocular<sup>1,2</sup>.

La larva migrans visceral se caracteriza por la presencia de manifestaciones crónicas, con dolor abdominal, compromiso hepático, diversos signos de alergia e hipereosinofilia; la ocular, en cambio, se presenta clínicamente como una uveítis o una papilitis

óptica<sup>3</sup>. La toxocarosis humana es una zoonosis donde es frecuente la geofagia y la falta de prácticas de higiene; la severidad crónica depende del número de huevos infectivos ingeridos y de la frecuencia de reinfecciones<sup>4,5</sup>.

Más complejo que el de otros nemátodos, el ciclo de vida de *T. canis* incluye la parasitación del intestino de perros y gatos por las formas adultas, la contaminación del medio ambiente por los huevos y la migración y enquistamiento de las L2/L3 en los tejidos de diferentes especies de hospederos incluyendo el hombre, en quien produce los síndromes ya señalados<sup>6,7,8</sup>.

La prevalencia de la toxocarosis es elevada en países tropicales y en vías de desarrollo y se asocian generalmente con poblaciones de niveles socioeconómicos bajos<sup>1,9</sup>. En el Perú existen pocos registros los cuales indican

frecuencias de 7.8 a 20% en poblaciones rurales y 40% en individuos con sospecha de toxocarosis ocular<sup>10,11,12,13,14,15,16</sup>.

El diagnóstico clínico de la infección humana por *T. canis* resulta dificultoso debido a que la sintomatología es inespecífica y similar a la de otras patologías y, asimismo, el diagnóstico coprológico directo rutinario resulta impracticable porque los huevos no se encuentran en las heces. Entonces, la detección de anticuerpos en sangre u otros fluidos biológicos adquiere gran importancia como herramienta diagnóstica. Para este caso la técnica de ELISA en sus diversas variantes ha sido la más utilizada<sup>17,18,19</sup>; sin embargo, la tendencia actual es el uso de técnicas más específicas, tales como, la de Electroinmunotransferencia o “Western blot”<sup>20,21</sup> y el PCR<sup>21</sup>.

La técnica de “Western Blot” es básicamente un proceso cualitativo que combina la selectividad de la electroforesis en gel de poliacrilamida con la sensibilidad del inmunoensayo, convirtiéndose en una prueba de alta sensibilidad y especificidad<sup>23</sup>. Es en las enfermedades causadas por cestodos en las que esta técnica ha tenido más éxito, probablemente porque en este grupo se hallan la cisticercosis y la hidatidosis, dos dolencias graves en el humano<sup>22,23</sup>; sin embargo, algunas enfermedades causadas por nematodos, como la ascariasis<sup>24</sup>, la ancilostomiasis<sup>25</sup>, la strongiloidiasis<sup>26</sup> y la toxocarosis también han sido estudiadas mediante la técnica de Western blot.

Respecto del diagnóstico de la toxocarosis utilizando la técnica de Western blot, se tiene referencia de trabajos ejecutados mayormente con antígenos obtenidos de la larva infectiva. En efecto, Jara<sup>27</sup> detectó cuatro bandas inmunodominantes (200, 48, 43 y 25 KDa) al enfrentar a los antígenos de excreción-secreción y somáticos con sueros de cachorros de perro positivos a la parasitación por las formas adultas de *T. canis*; posteriormente, Ramírez<sup>28</sup>, Castro-Sesquén<sup>29</sup> y Roldán y Espinoza<sup>20</sup> al utilizar a los antígenos de excreción-secreción, luego que se determinara que tienen mayor utilidad diagnóstica comparada con los antígenos somáticos, hallaron bandas inmureactivas de pesos semejantes, cuando los enfrentaron a sueros obtenidos en conejo inmunizado

experimentalmente y de humanos con serología positiva a *T. canis*

Sin embargo, la obtención de antígenos de las formas larvianas requiere de: (i) el aislamiento de las hembras grávidas, (ii) la separación de huevos de las últimas porciones de sus úteros, (iii) la embrionación por periodos no menores a un mes en soluciones de formol al 2% o de solución salina fisiológica con lavados diarios, (iv) el decorticado de los huevos con hipoclorito de sodio y posterior liberación de las larvas y (v) lavado repetido de las larvas a fin de que no hayan bacterias ni restos de cascarones que induzcan a la obtención de resultados erróneos. Entonces, teniendo en cuenta lo laborioso que resulta este proceso y que además tienen que obtenerse miles de larvas vivas para obtener productos de excreción-secreción suficientes como para ejecutar el Western blot o el ELISA, resulta necesario buscar nuevas fuentes de antígeno y en mayores cantidades, en menor tiempo y con menos esfuerzo. Una de esas fuentes son las formas adultas que se encuentran con frecuencia en cachorros y en grandes cantidades, como lo afirman Hassanain et al<sup>19</sup> quienes investigaron la utilidad de los antígenos somáticos.

En el presente trabajo se utiliza la técnica de Western blot utilizando anticuerpos específicos obtenidos en conejo, *Oryctolagus cuniculus*, para determinar los antígenos de excreción/secreción de las formas adultas de *Toxocara canis* y se compran con aquellos obtenidas de las larvas

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico:

- 50 ejemplares adultos de *T. canis* obtenidos de *Canis familiares* “perro” infectados de dos a tres meses de edad, para la obtención de antígenos de excreción/secreción.
- 02 ejemplares de *Oryctolagus cuniculus* “conejo” de raza Nueva Zelanda de tres semanas de edad y de un peso promedio de 1.5 kg obtenidos de la Universidad Nacional Agraria La Molina, para lograr la producción de anticuerpos como respuesta a la inmunización de los antígenos de excreción/secreción de *T. canis* adultos

### Antígenos

Del intestino delgado de cinco cachorros de perro obtenidos en el “Mercado Mayorista” de la ciudad de Trujillo, Perú, naturalmente infectados con *T. canis* se recolectaron 50 ejemplares adultos, de los cuales se utilizaron 40 los que fueron lavados cuatro veces con PBS pH 7.2 estéril adicionándose penicilina y gentamicina para su desinfección.

Los ejemplares adultos, una vez desinfectados, fueron colocados en cada placa petri (ocho parásitos en cinco placas) conteniendo medio mínimo esencial -Minium Essential Media-Eagle, (Sigma, MEM) e incubados durante 18, 22 y 24 horas, a fin de obtener los productos de excreción-secreción<sup>24</sup>.

Transcurridos los tiempos de incubación, los parásitos fueron descartados y el medio fue centrifugado a 1500 rpm, por 5 minutos, del cual fue separado en viales el sobrenadante que contenía a los productos excretados secretados del parásito, los que fueron conservados a -20 °C, hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó por el método colorimétrico de Bradford<sup>30</sup>

### Anticuerpos

Con los productos excretados-secretados se inmunizó, por vía subcutánea, a cada conejo en cada una de las caras internas de las patas posteriores utilizando 1 mL mezclado (v/v) con 1 mL de adyuvante completo de Freund en la primera inmunización y con Adyuvante incompleto en las tres restantes inmunizaciones, a intervalos de una semana entre cada inmunización. A los siete días posteriores a la última inmunización se obtuvo por punción cardiaca 20mL de sangre de los conejos, la cual se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos para obtener el suero, que también fue conservado a -20°C hasta el momento de su procesamiento<sup>24,25,26</sup>.

### La técnica de Western Blot:

La preparación de los antígenos, su separación e identificación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Escalante et al<sup>24</sup>, cuyas particularidades fueron las siguientes:

- Los antígenos de excreción-secreción fueron tratados con 0.01 M de Tris- HCl a pH 8.0; 0.1% de azul de bromofenol; 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS), de glicerol, para luego ser calentado a 65°C por 20 minutos, siendo la concentración

final del antígeno a preparar de 0.025 ug/ul y 0.05 ug/ul.

- El gel de poliacrilamida fue preparado en placa, entre dos láminas de vidrio separadas por espaciadores de plástico. Cada gel estuvo formado en la primera porción por el gel de apilamiento con una concentración de 5 % de acrilamida, en este se elaboró los pocillos donde se colocaron los patrones moleculares y la mezcla de antígenos preparados en una cantidad equivalente a 1 uL por mm de ancho de gel y la segunda porción por el gel separador con una concentración de 12 % de acrilamida.
- Los corridos fueron hechos en minigeles de 8 x 7 x 0.05 cm a la concentración de 12% de acrilamida. La electroforesis se llevó acabo a 20 mA (corriente constante) en el gel de apilamiento y a 60 mA en el gel separador a un voltaje de 200 V por 30 minutos aproximadamente hasta que el colorante trazador alcanzó el extremo inferior del gel. En el corrido se incluyó el marcador de bajo peso molecular (Low Range Weigh Standard; Bio Rad).
- Los componentes proteicos separados en los geles de poliacrilamida fueron transferidos al papel de nitrocelulosa en una cámara de electroforesis horizontal (Trans-Blot Cell, BioRad) utilizando un buffer de transferencia constituido por 0.2 M Tris-HCl pH 8, 20% de metanol y agua destilada.
- Para realizar la electroforesis, el gel se unió con el papel de nitrocelulosa, se cubrió con papeles de filtro y esponjas que fueron colocadas en un cassette especial, los cuales fueron colocados en la cámara de transferencia, de tal modo que el gel se encuentre cercano al polo negativo y el papel de nitrocelulosa cerca al polo positivo. La transferencia se realizó a 2 A por espacio de 1.5 horas y a 4 °C.
- El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas, se lavaron (4 veces) con PBS/Twen-20 (0.1 M NaCl; 0.05 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2 y 0.35 Twen-20) y dos veces con PBS.
- Se colocó 500 ul de solución bloqueadora (leche descremada) y 10 ul de los dos sueros respectivos a cada tira
- Las tiras de nitrocelulosa fueron enumeradas en orden progresivo y colocado en placas y tubos de ensayo

- respectivamente, los cuales fueron incubados por una hora en agitación constante y a temperatura ambiente.
- Se realizaron tres lavados con PBS Tween 20 cada 5 minutos cada uno en agitación constante.
- Se colocó 500 uL de conjugado enzimático (Puried Goat Anti Rabbit IgG Horseradish Conjugate BioRad) por cada tira en PBS – Tween 20, los cuales fueron mantenidos en agitación constante por una hora.
- Se realizaron nuevos lavados con PBS Tween 20 de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente. Para revelar las bandas antigénicas se agregó 500 uL de la solución de sustrato, se detuvo la reacción al lavarlos con agua destilada.
- Para la determinación de los pesos moleculares se utilizó como patrón un marcador de bajo peso molecular conocido (SDS- PAGE Molecular Weight Standards Low Range). Se determinó el peso molecular relativo de las bandas antigénicas observadas de los antígenos de excreción–secreción de la larva de *T. canis*, para ello se encontró la movilidad relativa (RF) del marcador y de los antígenos en estudio.

## RESULTADOS

Las lecturas de las concentraciones de los productos excretados-secretados de *T. canis* usando el método de Bradford a las 18, 22 y 24 horas fue de: 67.5, 101.0, 68.0, 43.0 y de 64.0 ug/mL (Tabla 1), de los cuales el de mayor concentración fue usado en la inmunización de los conejos

Luego de ejecutada la técnica de Western blot se observaron bandas inmunoreactivas en mayor número y nitidez cuando se usaron los productos obtenidos a las 24 horas de incubación, los cuales tenían una concentración óptima de de 101.0 ug/mL (Fig. 1)

La detección de anticuerpos producidos en los conejos inmunizados con antígenos de excreción / secreción de *Toxocara canis* a la concentración de 101.0 ug/mL realizados mediante la técnica de “Western blot”, evidenció la presencia de cinco bandas antigénicas inmunodominantes cuyos pesos moleculares fueron: 79.4 kDa, 70.8 kDa, 32.1 kDa, 31.6 kDa y 28.2 kDa (Fig. 1)

Cuando se comparó con trabajos previos se encontró coincidencias y diferencias, como se muestra en la Tabla 2.

Código	Tiempo (Horas)	N° parásitos	Temp (°C)	Humedad	[ ] ug/mL
A	18	8	32	62	67.5
B	24	8	32	48	101.0
C	22	8	35	56	68.0
D	18	8	37	62	43.0
E	24	8	37	50	64.0

**Tabla 1.-** Valores de las concentraciones de proteínas obtenidas de cinco cultivos de de formas adultas de *T. canis*\*  
\*Las determinaciones se hicieron mediante la técnica de Bradford.

Forma evolutiva	Medio cultivo	% SDS-PAGE	Fuente de IgG	Bandas reactivas detectadas (kDa)	Referencia
Larva 3	RPMI-1640	2 - 10	Suero humano	24, 28, 30, 35, 132, 147, 200	Mag
Larva 3	RPMI-1640	2 – 5.5	Suero humano	29-35, 50-55, 97-116, 205	Nun
Larva 3	RPMI-1640	4-- - 16	Suero humano	24, 28, 30, 35, 48-56, 67, 117, 136, 152	Rol
Larva 3	MEM-Eage	3 – 12	Suero perro	25, 27, 34, 43, 48, 80, 200	Jar
Larva 3	RPMI-1640	3 - 10	Suero conejo	57	Id
Adulto	RPMI-1640	4 - 12	Suero humano	19.3, 21.9, 30.5, 35.7, 40.7, 47.4, 47.4, 80, 85, 88	Hus
<b>Adulto</b>	<b>MEM-Eagle</b>	<b>3 - 12</b>	<b>Suero conejo</b>	<b>28.2, 31.6, 32.1, 70.8, 79.4</b>	

**Tabla 2.** Comparación de las bandas reactivas de los antígenos de *T. canis* halladas con anterioridad con las halladas en la presente investigación

## DISCUSIÓN

El desarrollo de pruebas de diagnóstico sensibles y específicas para demostrar la presencia de anticuerpos en suero de pacientes con sospecha de presentar toxocarosis es un importante paso hacia el mejoramiento del diagnóstico<sup>4, 12, 31</sup>.

*Toxocara canis*, es un parásito excepcional entre los nemátodos por su capacidad para sobrevivir *in vitro* por mucho tiempo en las formas adulta y larvaria. En efecto, se verificó en la presente investigación lo registrado en comunicaciones anteriores<sup>27, 28, 29</sup> que en el medio de cultivo, el parásito secreta abundantes cantidades de glicoproteínas antigénicas, las cuales, como se ha podido comprobar, tienen gran valor para el inmunodiagnóstico. Esta estabilidad *in vitro*, ha permitido coleccionar los antígenos secretados (E/S) en cantidades apreciables

Se sabe que los antígenos de excreción-secreción de las larvas son enzimas o productos metabólicos eliminados por el parásito: entre ellos, (i) la aminopeptidasa, cuya actividad está implicada en el proceso de muda y en la desintegración de inmunoglobinas del huésped localizadas alrededor del cuerpo del parásito, (ii) las fosfatasa, que permiten el desarrollo embrionario (clavaje y gastrulación) teniendo una elevada demanda energética y tomando esta energía de las reservas de glicógeno, (iii) la proteasa, que posee un factor de invasividad necesaria para la penetración y migración en el huésped, esto de debería a que esta enzima ayuda a que la larva se libere del cascaron y proceda invadir los tejidos en el huésped<sup>3, 7, 17, 29</sup>. Probablemente, algunas de estas enzimas sean compartidas por los adultos, por ello la similitud de las bandas en ambas formas evolutivas, mediante la técnica de Western blot, siguiendo un protocolo similar.

Al igual que en trabajos previos<sup>25, 28, 29</sup> el cultivo de parásitos en medio mínimo esencial (MEM) resultó exitoso y se pudo obtener proteínas que son, en definitiva los productos excretados-secretados cuando se cultivó por 24 horas (101.0 mg/mL) suficiente como para ejecutar en buena forma la técnica de Western blot. Sin embargo, tales trabajos han sido ejecutados con las larvas infectivas obtenidas directamente de los huevos embrionados y esta es la primera

para análisis inmunológicos y bioquímicos y el empleo de *T. canis* como modelo de expresión antigénica en parásitos nemátodos

Se ha demostrado que el parásito utiliza sus propias reservas endógenas para mantener sus procesos metabólicos esenciales, bajo estas circunstancias, si el periodo de sobrevivencia del parásito se prolonga, sus productos de excreción disminuyen paulatinamente y pueden en algún momento diferir de aquellos que resulten de un proceso metabólico *in vitro*, por eso resulta importante determinar el tiempo apropiado de cultivo de modo tal, que en pocas horas no se producen suficiente cantidad como para ejecutar una prueba de Western blot exitosa y, por el contrario, si se prolonga demasiado los parásitos mueren y las sustancias extraídas no son necesariamente antígenos de excreción-secreción<sup>17, 23, 32</sup>

investigación en la que se emplean formas adultas. Lógicamente, por el gran tamaño respecto de las larvas, se emplean menor cantidad (ocho ejemplares por placa), pero suficiente como para obtener los productos requeridos para ejecutar la técnica.

En un trabajo inicial, utilizando suero de cachorros de perro positivos al parasitismo por las formas adultas de *T. canis*, comprobado mediante análisis coprológicos, Jara<sup>27</sup> halló 12 bandas reactivas de alto y bajo peso molecular, dentro de las cuales estuvieron las bandas de 80 KDa, que bien puede ser la correspondiente a la de 79.4 detectado en el presente estudio, la de 33 KDa semejante a la de 32.1, la de 31 de casi el mismo peso que la de 31.6 y la de 27 concordante con la banda de 28.2 de las formas adultas. Es de esperar que con el uso de suero de perro la técnica de Western blot permita el hallazgo de mayor número de bandas que con suero de mamíferos diferentes, aunque la concentración de proteínas usadas para los corridos y las concentraciones algo diferentes del gel concentrador y gel difusor empleados para el SDS-PAGE podrían estar influyendo en el número de bandas y en los correspondientes pesos de las bandas.

Ramírez-Zapata<sup>28</sup> obtuvo productos de excreción-secreción de las larvas 3 de *T. canis* y anticuerpos contra esos productos en conejo neocelandés, siguiendo la metodología utilizada en otros helmintos

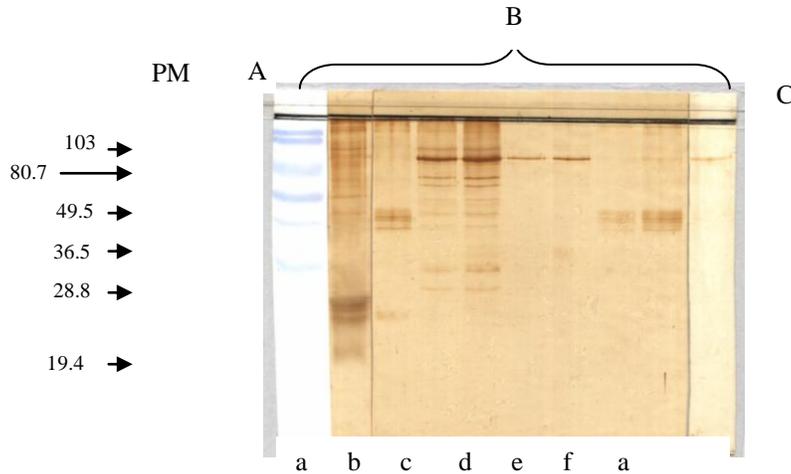
parásitos del hombre<sup>24</sup>. Luego de ejecutada la técnica de Western blot, y usando dichos productos sin tratar con dithiotreitol (DTT), obtuvo cinco bandas de complejos ag-ac: 38.1, 31.6, 28.9, 14.1 y 12.6 KDa, de las cuales dos son semejantes a las encontradas en la presente investigación la de 31.6 y la de 28.9, que bien puede ser la correspondiente a la de 28.2 encontrada con las formas adultas.

Para acercar las investigaciones anteriores a lo que podría ser el hallazgo de bandas útiles en el diagnóstico de la toxocarosis humana que, en definitiva, es lo que importa, Castro-Sesquén<sup>29</sup> utilizó los antígenos de excreción-secreción de las larvas y los enfrentó a suero de humanos con serología positiva a *T. canis*, y detectó nueve bandas, con pesos muy semejantes a los detectados por Jara et al<sup>26</sup> y con algunas bandas, como la de 28 KDa, de gran similitud con las halladas en el presente estudio que, como se ha señalado, pueden servir para el diagnóstico de la toxocarosis humana, luego de afinar las pruebas de especificidad.

Así fue, recientemente Roldán et al<sup>12</sup> señalan, luego de usar los antígenos de

excreción-secreción de las larvas infectantes de *T. canis* y sueros de humanos con seroprevalencia positiva a esta especie, que dos son las bandas diagnósticas: la de 28 y la de 35 KDa. Si se compara con los hallado en el presente trabajo, se puede notar que aquí también se halló la banda de 28.2 KDa y también la banda de 32.1 KDa, que bien podría tratarse de la de 35, si se tiene en cuenta que los autores mencionados usaron la poliacrilamida para el SDS-PAGE de 4% en la parte de la concentración y 16% en la parte del corrido, algo diferente al 12% de concentración del gel de corrida usada en este trabajo. Esta leve diferencia podría estar influyendo en leve diferencia hallada, ya que otras bandas también son bastante cercanas en peso, como la de 67 KDa que econtraran Roldán et al., que podría tratarse de la de 70.8 registrada en la presente investigación.

Como puede apreciarse en la Tabla 2 los diferentes trabajos efectuados revelan la existencia de bandas similares y si se compara con las obtenidas en los adultos, al menos tres bandas son coincidentes: las de 28, 31-32 y 79-



**Fig. 1.** Bandas inmunoreactivas, obtenidas mediante la técnica de Western Blot, de antígenos de excreción/secreción de *Toxocara canis* y anticuerpos específicos obtenidos en conejos inmunizados experimentalmente

PM=Peso molecular en Kilodaltons

A= Pool de sueros

B= Sueros hiper-inmunes

C=Suero pre-inmune

- a. Cultivo de 24 horas, 0.025 ug/uL de productos excretados-secretados
- b. Cultivo de 24 horas, 0.05 ug/uL de productos excretados-secretados
- c. Cultivo de 18 horas, 0.025 ug/uL de productos excretados-secretados
- d. Cultivo de 18 horas, 0.05 ug/uL de productos excretados-secretados
- e. Cultivo de 22 horas, 0.025 ug/uL de productos excretados-secretados
- f. Cultivo de 22 horas, 0.05 ug/uL de productos excretados-secretados

80Kda que podrían utilizarse en el diagnóstico. Con ello se verifica la utilidad de

los antígenos obtenidos de las formas adultas que, como se ha señalado, son más fáciles de obtener que los de las formas larvianas. Sin embargo, queda por determinar la especificidad de los antígenos de las formas adultas y finalmente proponer su uso en el diagnóstico de la toxocarosis humana, que si bien es producida por la larva, hay antígenos comparables en las formas adultas que bien podría ser de utilidad diagnóstica si se tiene en cuenta que su obtención se hace con mucho menor esfuerzo, costo económico y de tiempo que los antígenos de las larvas. Anteriormente, esta búsqueda de antígenos más accesibles para ser usados en el diagnóstico de enfermedades humanas ha sido verificado en la cisticercosis cerebral<sup>34</sup> pues, se utiliza antígenos obtenidos en los cisticercos de *Taenia crassiceps* (que puede mantenerse el ciclo en el laboratorio debido a que los hospederos intermediarios son los roedores y los definitivos los perros) en lugar de los de *Cysticercus cellulosae*, cada vez más difícil de encontrar porque el hospedero definitivo es solamente el hombre que, por razones de bioética no pueden ser usados como instrumentos de obtención de parásitos aunque se trate para el diagnóstico de una enfermedad de mal pronóstico, como es la neurocisticercosis.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Archelli, S. & L. Kozubsky. 2008. Toxocara y Toxocarosis. Acta bioquím. clín. latinoam., 42(3), 379-384.
2. Schaller, LG; FS Cuba; J Breña-Chávez; D Toorejon & C Maguiña. 2007. Relación entre toxocarosis y asma: estudio prospectivo en niños del Hospital Nacional Cayetano Heredia, Lima, Perú. Acta Med Per 24(2):81-90
3. Lee, S-U; J-R Yu & S Huh. 2009. Ultrastructural localization of *Toxocara canis* larval antigen reacted with seropositive human serum. Korean J Parasitol, 47(1):65-68
4. Despommier, D. 2003. Toxocaríasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. Clin Microbiol Rev, 16(2):265-272
5. Ugbomoiko, US; L Ariza & J Heukelbach. 2008. Parasites of importance for human health in Nigerian dogs: high prevalence and limit knowledge of pet owners. BMC Vet Res, 4:49
6. Terrones-Campos C, Andrade T, Lachira A, Valladolid O, Lanata CF. Toxocarosis atípica: reporte de un caso en la costa norte del Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2010; 27(1):138-141
7. Chung, L-Y; B-H Fang; J-H Chang; S-M Chye & C-M Yen. 2004. The infectivity and antigenicity of *Toxocara canis* eggs can be retained after long-term preservation. Ann Trop Med & Parasit, 98(3):251-260
8. Sowemimo, OA. 2007. Prevalence and intensity of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in dogs and its potential public health significance in Ile-Ife, Nigeria. J Helminthol., 81:433-438
9. Mgnaval JF, Glikman LT, Dorchiis P, Morassin B, Highlights of human toxocarosis. Korean J Parasit 2001; 39:1-11
10. Espinoza, Y; P Huapaya; R Suárez; V Chávez; C Sevilla; E Dávila & et al. 2003. Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico de la toxocarosis humana. Ann Fac Med, 64(1):7-12
11. Espinoza, Y; P Huapaya; C Sevilla; A Huiza S Jiménez & C Náquira. 2003. Toxocarosis humana: seroprevalencia en población de Lima mediante la técnica de ELISA. Ann Fac Med, 64(4):228-232
12. Roldán, W; Y Espinoza; A Atúnkar; E Ortega; A Martínez & M Saravia. 2008. Frequency of eosinophilia and risk factors and their association with *Toxocara* infection in schoolchildren during a health survey in the North of Lima. Rev Inst Med trop S Paulo, 50(5):273-278
13. Espinoza, Y; P Huapaya; W Roldán; S Jiménez; Z Arce & E López. 2008. Clinical and serological evidence of *Toxocara* infection in school children from Morrope District, Lambayeque, Peru. Rev Inst Med trop S Paulo, 50(2):101-105
14. Roldán, W; Y Espinoza; P Huapaya; A Huiza; C Sevilla & S Jiménez. 2009. Frequency of human toxocaríasis in a rural population from Cajamarca, Peru determined by Dot-ELISA Test. Rev Inst Med trop S Paulo, 51(2):67-71
15. Espinoza YA, Huapaya PE, Roldán WR, Jiménez S, Abanto EP, Rojas CA et al. Seroprevalence of human toxocaríasis in andean communities from the northeast of Lima, Peru. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 2010; 52(1):31-36
16. Roldán WH, Cavero YA, Espinoza YA, Jiménez S, Gutiérrez CA. Human toxocaríasis: a seroepidemiological survey in the Amazonian City of Yurimaguas, Peru. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 2010; 52(1):37-42

17. Espinoza, Y; P Huapaya; C Ayllón; C Sevilla; A Huiza & S Jiménez. 2003. Toxocariosis humana en pacientes con lesión ocular. *Ann Fac Med*, 64(4):247-251
18. Iddawela, RD; RPVJ Rajapakse; NAND Perera & T Agatsuma. 2007. Characterization of a *Toxocara canis* specie-specific excretory-secretory antigen (TcES-57) and development of a double sandwich ELISA for diagnosis of visceral larva migrans. *Korean J Parasit*, 45(1):19-26
19. Hassanain NA, Mahmoud MS. Serodiagnosis of human toxocariasis using adult somatic antigens of *Toxocara canis*. *Res J Parasitol* 2008; 3(3):85-91
20. Roldán WH, Espinoza YA. Evaluation of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for the confirmatory serodiagnosis of human toxocarosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(3):411-418
21. Fogt-Wyrwas, R; W Jaosz & H Mizgajska-Wiktor. 2007. Utilizing a polymerase chain reaction method for the detection of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs in soil. *J Helminthol*, 81:75-78
22. Escalante, H; E Miranda; M Lorca; M Verástegui & P Torres. 1995. La técnica de "Western blot" con antígenos de fluido vesicular de *Cysticercus celluloseae* para el diagnóstico de la cisticercosis. *Boletín Peruano de Parasitología* 11:26-31
23. Escalante, H; K Davelois & P Torres. 1999. Antígenos específicos de *Taenia solium* detectados por "Western Blot" usando sueros de pacientes con parasitosis confirmada. *SCIENDO*, 2(1-2):33-39
24. Ramírez, LA. 2002. Antígenos de excreción/secreción de *Ascaris lumbricoides* var *suum* detectados por "Western blot" usando suero de *Oryctolagus cuniculus* "conejo" inmunizado experimentalmente. Tesis Bachiller Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
25. Jara, CA; H Escalante; E Díaz-Limay & W Reyes-Vega. 2003. Antígenos de excreción/secreción de geohelminthos parásitos del hombre productores de anticuerpos policlonales IgG. *SCIENDO*, 6(1-2):81-87
26. Vilela-Alburqueque, M. 2007. Sensibilidad y especificidad de la técnica de "Western blot" para el diagnóstico de la strongyloidiasis humana usando antígenos de excreción/secreción de larvas filariformes de *Strongyloides stercoralis*. Tesis Bachiller Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
27. Jara CA. La técnica de Western blot con antígeno larvario de *Toxocara canis* para el diagnóstico de la toxocariosis. Tesis Maestría. Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
28. Ramírez-Zapata. MR. 2004. Antígenos de excreción/secreción de la larva 3 de *Toxocara canis* detectados mediante la técnica de "Western blot" usando suero de *Oryctolagus cuniculus* "conejo" inmunizado experimentalmente. Tesis Bachiller Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
29. Castro-Sesquen, YE. 2006. Antígenos de larvas infectivas y titulares de *Toxocara canis* evaluados mediante electroinmunotransferencia con anticuerpos de *Oryctolagus cuniculus* y de humanos. Tesis Bachiller Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
30. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254
31. Magnaval, J; R Fabre; P Maurieres; J Charlet & B de Larrard. 1991. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocarosis. *Parasitol Res*, 77(8):697-702.
32. Chávez, F; O Vásquez & H Escalante. 2007. Evaluación de la técnica Western blot para la detección de antígenos de *Hymenolepis nana*. *Rev peru biol*, 14(2): 283-286
33. Suzuki, LA; GC Arruda, EMAB Quagliato & CL Rossi. 2004. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for immunodiagnosis of neurocisticercosis using ELISA on cerebrospinal fluid samples. *Rev Soc Bras Med Trop*, 40(2):152-155
34. Trillo-Altamirano, M; JA Carrasco & R Cabrera. 2003. Prevalencia de helmintos enteroparásitos zoonóticos y factores asociados en *Canis familiaris* en una zona urbana de la ciudad de Ica, Perú. *Parasitol Latinoam*, 58:136-141
35. Vidal, S & U Vergara. 1995. Diagnóstico serológico de toxocariasis humana: comparación de los antígenos de excreción/secreción y antígeno larval somático de *Toxocara canis*. *Immunol*, 14(4):166-172.

36. Zevallos-Lescano, S; PP Chieffi; BA Peres; E O de Mello; C Náquira-Velarde, A Apaza-Salinas; et al. 1998. Soil contamination and human infection by *Toxocara* sp. in the Urban Area of Lima, Peru. Mem Inst Oswaldo Cruz, 93(6):733-734

**Correspondencia:** César Jara Campos

**Dirección:** Los Tréboles 275-201, Palmeras del Golf, Víctor Larco. Trujillo

**Teléfono:** 280071

**E-mail:** cesarj75@hotmail.com