



UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

## **Estudios sobre la toxocarosis humana en Barcelona: puesta a punto y ensayo de una técnica diagnóstica**

Ma. Cristina Riera Lizandra



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartigual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartigual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE FARMACIA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIOS SOBRE LA TOXOCAROSIS  
HUMANA EN BARCELONA.  
PUESTA A PUNTO Y ENSAYO DE UNA  
TECNICA DIAGNOSTICA**

Por

**M<sup>a</sup> Cristina Riera Lizandra**



**Directora:**

**Dra. Montserrat Portús Vinyeta**

**CATEDRATICA DE PARASITOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA  
DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA.**

**BARCELONA 1990.**



BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700081357

ARMAC  
R

**A mis padres y a Ricardo  
Por su cariño y comprensión**

Al finalizar este trabajo quiero hacer constar mi agradecimiento por la ayuda recibida de todas aquellas personas que de una forma directa o indirectamente han colaborado en su realización.

Mi especial agradecimiento a la Dra. Montserrat Portús Vinyeta, Catedrática del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la Facultad de Farmacia por haber aceptado la dirección de este trabajo, así como por sus consejos, orientaciones y amistad que han significado el estímulo necesario para llevar a cabo su realización.

Hago igualmente extensivo mi agradecimiento al Dr. Guillem Prats Pastor, Jefe del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, por haber accedido a su realización, mientras estuve trabajando en su Servicio, aportando en todo momento su ayuda incondicional y juicio crítico.

Al Dr. Jaime Gállego Berenguer, Catedrático Jubilado de Parasitología de la Facultad de Farmacia de Barcelona quien con su experiencia, saber y bien hacer tanto me ha ayudado y por la aportación iconográfica que me ha facilitado.

Las facilidades ofrecidas por Dr. Pedro Madoz Resano, Jefe de Sección de Transfusión del Banco de Sangre del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, en la obtención de sueros de donantes de sangre, determinación de isohemaglutininas y aportación de bibliografía especializada, sin olvidar sus consejos y orientaciones, han sido elementos decisivos en el desarrollo de algunas partes de este estudio.

A la Dra. Carme Muñoz, amiga y compañera de trabajo durante algunos años, por su incondicional apoyo y ayuda técnica durante la realización de este estudio.

La amistad y estímulo, ofrecido en momentos difíciles por los compañeros del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia, han supuesto para mí una ayuda importante. Quiero especialmente agradecer, en este sentido, el apoyo siempre brindado por: Dr. Carlos Feliu, Catedrático del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, Dra. Monserrat Gallego, Titular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, y a mis compañeros de trabajo durante tantos años, Roser Fisa, Mercè Herrero, Teresa Serra y Roser Solé.

También quiero hacer extensivo mi agradecimiento a todos aquellos que de forma desinteresada colaboraron en la obtención de material parasitario Dr. B. Valladares, Titular de la Cátedra de la Universidad de La Laguna; Dr. F. Simon, Titular de la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca; Dr. C. Nieto, Profesor ayudante de la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres; Dr. D. Reina, Titular de la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres; Dr. Murbach del Centre Recherche Agricoles Saint Aubain (Suiza); Dr. Montañes y Dra. P. Moreno del Centro Municipal de Zoonosis y Control Antirrábico del Ayuntamiento de Barcelona, así como a la Dra. M. Aranda, Dr. A. Buxó, Dra. C. Coll, Dr. A. Guilló y Dr. R. Mora.

Gracias a Rafaela Pérez, que ha colaborado en la mecanografía de esta memoria así como en la confección de las tablas que figuran en el texto.

También quiero hacer constar que este trabajo se vio beneficiado en 1987 por una Beca concedida por el Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social (FISS), con el número 86/1088.

Y como no, mi sincero y especial agradecimiento a mis padres, a Ricardo y demás familiares que han aportado su paciencia, apoyo moral y cariño en los momentos de mayor trabajo.

# Indice

I.	INTRODUCCION .....	1
I.1	SITUACION ACTUAL DEL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA TOXOCAROSIS HUMANA.....	2
I.2	MOTIVACION DEL TRABAJO. OBJETIVOS .....	3
II.	PARTE TEORICA .....	6
II.1	<u>Toxocara canis</u> . CARACTERIZACION BIOLOGICA .....	7
II.1.1.	Situación taxonómica del género Toxocara .....	7
II.1.2.	Descripción general del parásito .....	7
A.	Adulto .....	8
B.	Huevo .....	10
C.	Larva II estadio .....	10
II.2.	TOXOCAROSIS CANINA .....	15
II.2.1.	Ciclo biológico en el perro .....	15
II.2.2.	Prevalencia mundial de la Toxocarosis canina .....	17
II.2.3.	Prevalencia de la Toxocarosis canina en España .....	19
II.3.	DISEMINACION AMBIENTAL DE LOS HUEVOS DE TOXOCARA .....	23
II.4.	TOXOCAROSIS HUMANA .....	28
II.4.1.	Ciclo biológico de <u>Toxocara canis</u> en el hombre .....	28
II.4.2.	Patología .....	29
II.4.3.	Manifestaciones clínicas .....	32
II.4.3.1	Larva migrans visceral (LMV) .....	32
II.4.3.2	Larva migrans ocular (LMO) .....	36

II.4.4	Prevalencia de la Toxocarosis humana .....	42
A.	Prevalencia en España de Toxocarosis humana .....	43
B.	Prevalencia en el mundo de la Toxocarosis humana .....	43
II.5	DIAGNOSTICO DE LA TOXOCAROSIS .....	49
II.5.1.	Diagnóstico clínico .....	49
II.5.2.	Diagnóstico etiológico .....	51
II.5.3.	Diagnóstico inmunológico .....	51
II.5.3.1.	Mecanismos inmunes. Consideraciones generales .....	51
II.5.3.2.	Antígenos .....	53
II.5.3.3.	Respuesta inmune del hospedador .....	57
II.5.3.4.	Pruebas serológicas .....	59
II.5.3.5.	Detección de antígeno e inmunocomplejos circulantes en suero .....	60
II.6	TRATAMIENTO DE LA TOXOCAROSIS .....	63
II.6.1.	Toxocarosis humana .....	63
II.6.1.1.	Tratamiento en la larva migrans visceral (LMV) .....	63
II.6.1.2.	Tratamiento en la larva migrans ocular (LMO) .....	64
II.6.2.	Toxocarosis canina .....	64
III.	PARTE EXPERIMENTAL .....	66
III.1.	PUESTA A PUNTO DE UNA TECNICA EIA PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA TOXOCAROSIS .....	67

III.1.1.	Preparación del antígeno .....	67
III.1.1.1	Obtención de los huevos de <u>Toxocara canis</u> .....	67
III.1.1.2	Embrionamiento y desarrollo de las larvas II .....	68
III.1.1.3	Decorticación .....	70
III.1.1.4	Eclosión y aislamiento de larvas II	71
III.1.1.5	Obtención del antígeno de secreción - excreción (ASE). Cultivo larvario .....	74
III.1.1.6.	Preparación del antígeno .....	76
III.1.1.7.	Recuperación y reutilización del ASE en la sensibilización de placas para EIA .....	81
III.1.1.8.	Discusión .....	87
III.1.2.	Desarrollo de una técnica EIA para la determinación de IgG anti- <u>Toxocara</u> .....	88
III.1.2.1	Descripción de la técnica .....	88
III.1.2.2	Marcha de la reacción .....	91
III.1.2.3	Cálculo de la dilución sérica y de conjugado y cinética de la reacción enzimática .....	93
III.1.2.4.	Controles .....	102
III.1.2.5.	Criterios de positividad .....	103
III.1.2.6.	Reacciones cruzadas con otras parasitosis .....	107
III.1.2.6.1.	Material estudiado .....	107
III.1.2.6.2.	Resultados .....	107
III.1.2.7.	Discusión .....	107
III.1.3.	Determinación de otras inmunoglobulinas específicas (IgM, IgA e IgE) .....	118

III.1.3.1.	Cálculo de la dilución sérica y de conjugado .....	118
A.	IgM específica .....	118
B.	IgA e IgE específicas .....	119
III.1.3.2.	Controles .....	120
III.1.3.3.	Criterios de positividad .....	121
III.1.3.4.	Material estudiado .....	125
A.	Estudio de IgM específicas.....	125
B.	Estudio de IgA e IgE específicas .....	125
III.1.3.5.	Discusión .....	130
III.1.4.	Inespecificidad debida a la presencia de factor reumatoide .....	136
III.1.4.1.	Material estudiado .....	136
III.1.4.2.	Resultados .....	136
III.1.4.3.	Discusión .....	138
III.1.5.	Inespecificidad debida a la presencia de isohemaglutininas .....	141
III.1.5.1.	Sueros de pacientes IgG negativos .....	141
III.1.5.2.	Sueros de donantes de sangre .....	142
III.1.5.3.	Sueros de pacientes IgG positivos .....	146
III.1.5.4.	Discusión .....	147
III.2.	ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO.....	151
III.2.1.	Seroprevalencia en la población hospitalaria de Barcelona .....	151
III.2.1.1.	Material estudiado .....	151
III.2.1.2.	Resultados .....	154
III.2.1.3.	Discusión .....	157
III.3.	ESPECTRO PATOLOGICO DE LOS INDIVIDUOS SEROPOSITIVOS .....	162

IV. CONCLUSIONES .....	170
V. BIBLIOGRAFIA .....	175

## **I . INTRODUCCION**

## I.1 SITUACION ACTUAL DEL DIAGNOSTICO DE LA TOXOCAROSIS HUMANA

La Toxocarosis es una zoonosis helmintiana de distribución cosmopolita, frecuente principalmente en regiones de clima templado y tropical.

En los últimos años se han descrito relativamente poco casos de Toxocarosis humana, si tenemos en cuenta la frecuencia con la que el hombre suele hallarse expuesto a la infección. La gran diseminación de las formas metacíclicas en lugares frecuentados por el hombre, la resistencia que estas presentan frente a las condiciones climáticas adversas y agentes esterilizantes, y la elevada prevalencia de parasitación por T. canis en perros, facilitan la infestación humana (104).

La confirmación de la Toxocarosis mediante diagnóstico etiológico a partir de material procedente de biopsia de distintos tejidos o enucleación, en el caso de una Toxocarosis ocular (322,266), puede resultar dificultoso o inapropiado.

El hecho de que esta parasitosis curse la mayoría de las veces de forma asintomática, la inconstancia y variabilidad de las manifestaciones clínicas que presenta el paciente, junto con la falta de "kits" y antígenos comercializados para la detección de anticuerpos anti-Toxocara en sueros, dificulta el conocimiento de su prevalencia.

Diversos antígenos y técnicas han sido valorados y ensayados en los últimos años, siendo la técnica EIA, por su gran sensibilidad y especificidad (266), una de las más empleadas. La utilización de antígenos de secreción-excreción, obtenidos a partir de un cultivo "in vitro" de larva II de T. canis (261), y su aplicación a técnicas inmunoenzimáticas (264) han

hecho posible la realización de estudios seroepidemiológicos y de prevalencia.

Las técnicas de detección de antígeno y de inmunocomplejos circulantes ensayadas en animales de laboratorio, han demostrado ser sensibles y específicas (2,32,197). Su aplicación en el diagnóstico de la Toxocarosis humana sería especialmente interesantes en aquellos casos en que debido a la baja parasitación existente y a la débil respuesta inmune (caso de la Toxocarosis ocular) la tasa de anticuerpos circulantes fuera baja y difícil de detectar.

## I.2. MOTIVACION DEL TRABAJO. OBJETIVOS

Conscientes de que la Toxocarosis humana debía ser frecuente en nuestro entorno geográfico y la imposibilidad de realizar su diagnóstico en el laboratorio, dada la inexistencia de reactivos comerciales y de centros de referencia nacionales donde remitir muestras sospechosas, en 1983 iniciamos en el Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, la puesta a punto de técnicas serológicas para el diagnóstico de esta afección, con un doble objetivo:

- a) Tener una herramienta precisa y fiable, para el diagnóstico de laboratorio de esta afección, aplicable a la rutina hospitalaria.
- b) Con la misma poder realizar un estudio de prevalencia, dado que los casos conocidos de Toxocarosis en España eran aislados y casi anecdóticos y su diagnóstico realizado a veces por exclusión; un caso de una enferma de 60 años estudiado en Barcelona por Rozman et al (256), uno en

Zaragoza estudiado por Sin et al (272) y otro en Bilbao por Cuadrado et al (51).

El trabajo se vió beneficiado en 1987 por una beca del Fondo de Investigación de la Seguridad Social, cuya financiación permitió llevar a cabo el proyecto cuyo desarrollo, resultados y conclusiones se describe en esta memoria.

Para realizar los objetivos propuestos, el plan de trabajo seguido ha sido el siguiente:

1. Preparación de un antígeno de secreción - excreción obtenido a partir de un cultivo "in vitro" de larvas II de Toxocara canis.
2. Puesta a punto y ensayo de una técnica EIA para la determinación de anticuerpos IgG anti-Toxocara.
3. Estudio de diferentes inmunoglobulinas específicas (IgM, IgA e IgE) con el fin de determinar su importancia en el serodiagnóstico y seguimiento de la Toxocarosis humana.
4. Estudio de posibles reacciones cruzadas con otras parasitosis.
5. Estudio de interferencias debidas a la presencia en suero de factor reumatoide.
6. Estudio de interferencias debidas a tasas elevadas de isohemaglutininas en suero.
7. Seroprevalencia en la población hospitalaria de Barcelona y en un grupo de donantes de sangre.

8. Estudio del espectro patológico que presentaban los individuos seropositivos.

## **II. PARTE TEORICA**

## II.1. Toxocara canis. CARACTERIZACION BIOLOGICA

### II.1.1. Situación taxonómica del género Toxocara

Datos obtenidos de Gibbons L.M. (95) y Hartwich, G. (124).

Phylum	Nematoda
Clase	Secernentea
Orden	Ascaridida
Superfamilia	Ascaridoidea
Familia	Ascarididae (Baird, 1853)
Subfamilia	Toxocarinae (Hartwich, 1954, fam.) Osche, 1958
Género	Toxocara (Stiles, 1905)

### II.1.2. Descripción general del parásito

#### A) Adulto (15,44,93,171)

El género Toxocara incluye nematodos de cuerpo grueso y estriado. La cutícula de T. canis muestra estriaciones transversales a intervalos de 16-22 mcm. El color es blanco o blanco pardo y los adultos miden de 4 a 10 cm de largo. En el extremo anterior presenta alas cervicales mucho más largas que anchas (2,4mmx0,2 mm) que se van estrechando hacia atrás, lo que les da un aspecto de lanza (Fig. 1). En el extremo cefálico se hallan los labios que algunas veces tienen protuberancias dentiformes (Fig. 2); no hay interlabios. El esófago tiene un pequeño bulbo musculoso en el extremo posterior (Fig. 1). Los individuos inmaduros tienen un ventrículo intercalado entre el esófago y el intestino, sólo visible en ejemplares transparentados. Este ventrículo persiste en el adulto de Toxocara pero para su demostración se requiere la disección del parásito.

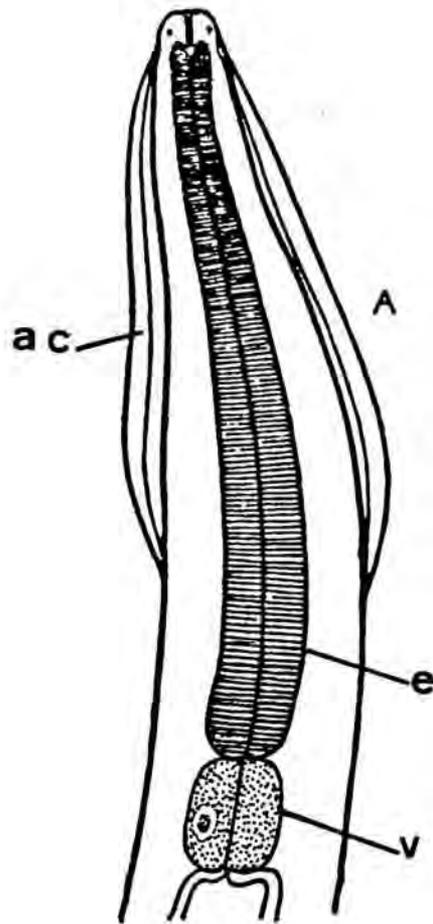


Figura 1. Vista lateral del extremo anterior mostrando las alas cervicales (a c) y el esófago (e), con su ventrículo (v). (Modificado de Yorke, W y Maplestone, P.A. 1926).

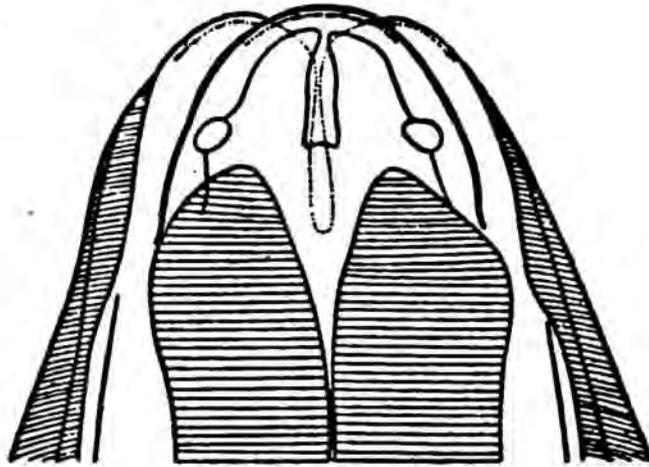


Figura 2. Vista dorsal del extremo cefálico mostrando los labios.  
(De Yorke, W. y Maplestone, P.A. 1926).

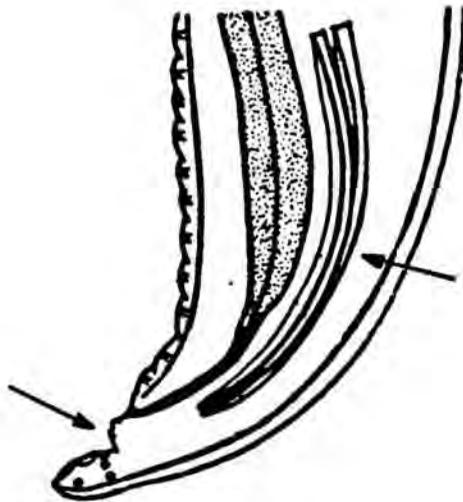


Figura 3. Vista lateral del extremo posterior del macho, en el cual se observa su forma característica y las espículas aladas y apéndice digitiforme (De Yorke, E y Maplestone, P.A., 1926).

Los machos suelen medir de 4 a 6 cm de largo por 2,0-2,5 mm de ancho. El extremo posterior del macho, generalmente enrollado en espiral, tiene una forma característica. Su calibre sufre una notable reducción de la parte final, inmediatamente por detrás del ano, formando un apéndice digitiforme. Presenta un par de espículas desiguales, aladas, de 20 a 30 pares de papilas preanales, 5 postanales y 2 perianales. (Fig. 3).

Las hembras miden de 6,5-10,0 cm de largo por 2,5-3,0 mm de ancho. Los conductos genitales se hallan extendidos por casi toda la longitud del cuerpo de un lado y otro de la vulva. Esta se halla situada en el cuarto anterior del cuerpo. A diferencia con el macho el extremo posterior es romo.

#### B) HUEVO (15)

Los huevos son subsféricos, miden 80-85 mcm de largo por 75 mcm de ancho. Tienen una cubierta lisa, envuelta por una membrana albuminosa finamente punteada, que les confiere un aspecto parecido a una pelota de golf.

#### C) LARVA II ESTADIO (210,211)

El primer estadio larvario se desarrolla en el interior del huevo que al eclosionar libera la segunda fase larvaria. Esta, que realiza la migración tisular, mide 290-350 mcm por 14-20 mcm de ancho. El cuarto anterior del cuerpo está afilado uniformemente terminado en 3 labios.

El extremo posterior de la larva está atenuado a partir del ano. A grandes rasgos la larva se puede dividir en 2 regiones:

a) Una región esofágica que ocupa más de 1/3 de la longitud total de la larva y b) una región intestinal. El poro excretor se halla situado en la mitad de la línea media ventral y cerca de la mitad del esófago. El poro anal se halla situado aproximadamente equidistante del extremo caudal.

y de la terminación del intestino. Las alas laterales, se observan como líneas refráctiles que se extienden a lo largo de ambos lados de la larva y terminan unas 20 mcm por delante de ambos extremos (Fig. 4).

Aparato bucal: La cápsula bucal, en forma de copa está, totalmente recubierta por la cutícula que continua con la pared corporal y con la línea cuticular del esófago. Su margen ventral presenta una prominencia como resultado de un engrosamiento cuticular.

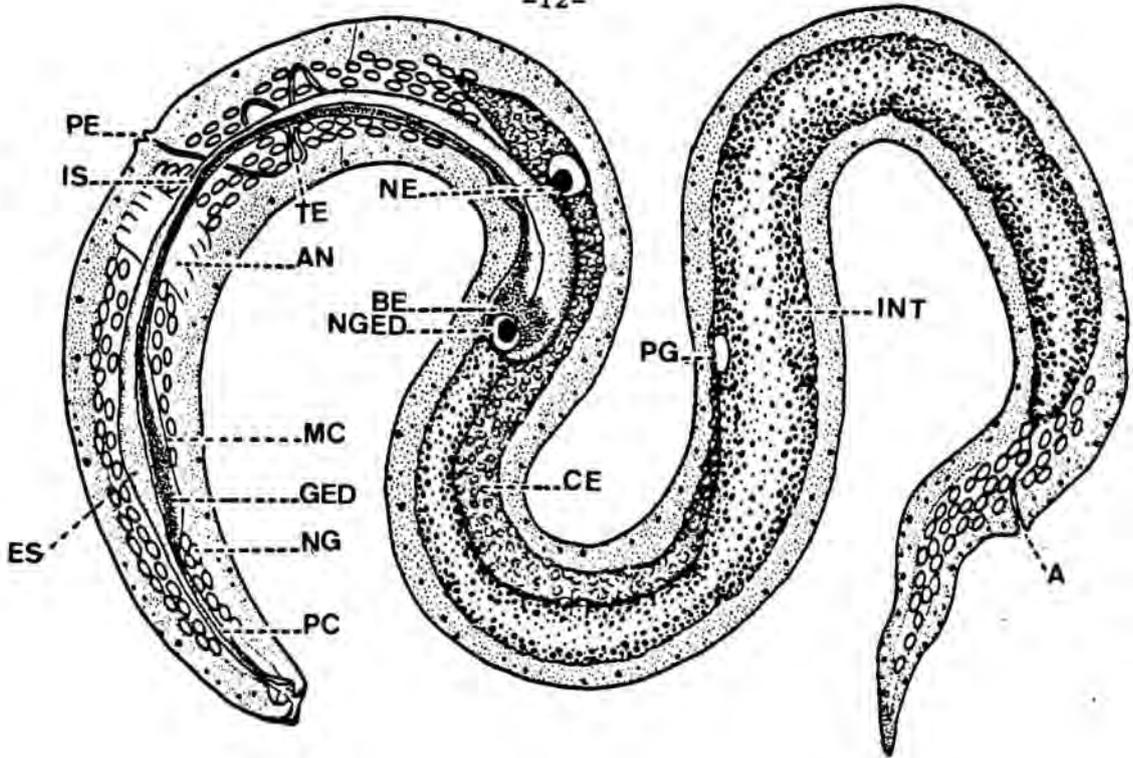
La cutícula del labio dorsal está íntimamente relacionada con la superficie externa. La de los labios subventrales está separada del borde exterior y se proyecta ligeramente hacia delante. (Figura 5).

Esófago: ocupa aproximadamente 1/3 de la longitud de la larva y se puede dividir en 4 regiones:

- 1) **procorpus**: zona delgada de unas 20 mcm de longitud.
- 2) **metacarpus**: zona más engrosada de 35 mcm de largo x 5 mcm de ancho.
- 3) **isthmus**: zona delgada cuya longitud equivale a la del procorpus y metacarpus juntos.
- 4) **bulbo terminal**: que mide 20-25 mcm de largo x 6-10 mcm de ancho.

El procorpus consiste en un tubo cuticular desnudo. El metacarpus presenta una única capa de células que rodean la línea cuticular del esófago y se extiende hacia el anillo nervioso, 5 a 7 mcm, por delante del poro excretor.

El isthmus presenta un diámetro menor y continúa hacia el centro del anillo nervioso para terminar en una pequeña formación globular o bulbo.



- A: ano  
GED: glándula esofágica dorsal  
NGED: núcleo glándula esofágica dorsal  
BE: bulbo esofágico  
CE: columna excretora  
NE: núcleo de las células excretoras  
PE: poro excretor  
TE: túbulo excretor  
NG: núcleo ganglionar  
PG: primordio genital  
INT: intestino  
IS: isthmus  
MC: metacarpus  
AN: anillo nervioso  
PC: procorpus  
ES: esófago

Figura 4. Larva II de *T. canis* ( De Nichols, R.L. 1956).

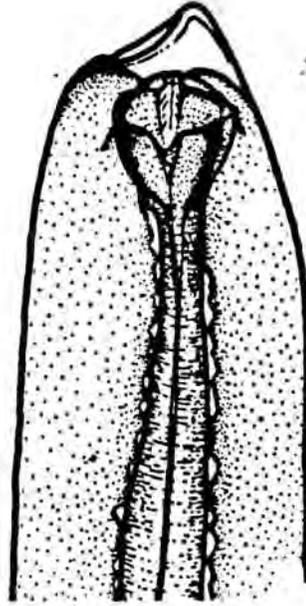


Figura 5. Larva II de T. canis. Aparato bucal en forma de copa. (De Nichols, R.L. 1956).

Anillo nervioso. Es una estructura clara y homogénea que se hace visible al interferir en la observación de los elementos celulares pertenecientes a la región esofágica media. Rodeando la mayor parte del esófago, existen un gran número de núcleos ganglionares que separan parte del procorpus, metacorpus e isthmus del resto del cuerpo.

Glándulas esofágicas. La glándula dorsal esofágica se observa bien definida mientras que las dos ventrales no son tan obvias. Se trata de una célula alargada que se extiende por el procorpus y tiene su núcleo localizado en el extremo posterior de la región dorsal del bulbo esofágico. Dicho núcleo, de 4-6 mcm de diámetro, se diferencia claramente de la región muscular del bulbo (Fig. 4).

Células excretoras. El aparato excretor unicelular es típico de este grupo de ascáridos. Está formado por dos columnas laterales extendidas posteriormente a ambos lados del intestino y anteriormente por delante el bulbo esofágico. (Fig. 4).

Intestino. Carece aparentemente de lumen y consiste de 7 células alargadas dispuestas de forma lineal. El citoplasma de estas células contiene gránulos opacos grasos. El intestino está fuertemente comprimido y forzado lateralmente por las columnas secretoras. La séptima célula intestinal termina 20 ó 25 mcm antes del poro anal al que conecta por un fino tubo cuticular (Fig. 4).

Primordio genital. Es una pequeña masa en forma de lente, situada entre el intestino y la pared ventral del cuerpo, ligeramente anterior a la región intestinal media, consiste en cuatro células individualmente indiferenciadas (Fig. 4).

## II.2 TOXOCAROSIS CANINA

### II.2.1 CICLO BIOLÓGICO EN EL PERRO

Los adultos de T. canis viven en el intestino delgado de perros y zorros. Los huevos, depositados por las hembras fecundadas contienen una sola célula huevo al ser eliminados junto con las heces, siendo extremadamente resistentes y duraderos. El desarrollo de la larva infestante, larva II, requiere de 9 a 11 días a 24°C, y 3-5 días a 30°C, una adecuada concentración de oxígeno y una humedad relativa de 75%.

Cuando los huevos infestantes son ingeridos por el hospedador eclosionan en el intestino delgado a las 2-4 horas y se liberan las larvas infestantes. Estas pueden utilizar tres vías de transporte para llegar a los pulmones.

- a) Por medio de los vasos sanguíneos y vena porta llegan al hígado. Allí un pequeño número son retenidas por el filtro capilar hepático, pero la mayoría atraviesan estos capilares y por las venas sub-hepáticas y luego la cava posterior llegan al corazón derecho, salen de él por la arteria pulmonar y llegan a los pulmones.
- b) A través de la cavidad peritoneal, donde la mayoría se extravían, aunque algunas consiguen llegar al hígado por la cápsula de Glisson. En el parénquima hepático migran y mediante los capilares sub-hepáticos llegan a la cava posterior y de allí al corazón derecho y pulmones.
- c) Transporte por vía linfática hasta el corazón derecho por medio de la vena cava anterior, y de allí a los pulmones por la arteria pulmonar.

A partir de este momento, la migración y desarrollo de las larvas depende de que el perro sea joven o adulto.

Cualquiera que sea la forma de migración todas las larvas llegan a los pulmones. Se detienen en los capilares pulmonares y sufren una muda pasando a larvas III, que tienen una longitud de aproximadamente 430 mcm, rompen los capilares pulmonares y pasan a los alveolos. Allí efectúan una nueva muda pasando a larvas IV (800-900 mcm de longitud), continúan su migración a través de bronquiolos, bronquios, tráquea y faringe donde son deglutidos. Una vez en el intestino delgado, en una forma evolutiva que les permite subsistir, alcanzan el estadio de larvas V (adulto joven inmaduro). Una vez lograda la madurez sexual, se inicia a los pocos días la puesta de un gran número de huevos que se eliminan con las heces. Este ciclo se presenta en hospedadores muy jóvenes, principalmente en cachorros menores de 3 meses.

Si el perro es mayor de 3 meses, y fundamentalmente si ha adquirido ya cierta inmunidad anterior, las larvas no son capaces de completar la migración pulmonar, pasando del intestino delgado a los pulmones pero allí, incapaces de alcanzar los alveolos pulmonares, atraviesan el lecho vascular y llegan al corazón izquierdo, de allí pasan a la circulación general distribuyéndose en diversos tejidos corporales. Estas larvas II se acumulan en las vísceras y músculos esqueléticos donde permanecen inactivas pero vivas durante largos períodos de tiempo.

•

En perras gestantes, las larvas quiescentes son reactivadas debido a los cambios hormonales que tienen lugar en el hospedador, penetran de nuevo al sistema circulatorio, atraviesan la placenta y alcanzan el sistema circulatorio del feto, localizándose primeramente en el hígado. Parece ser que, durante los últimos períodos de gestación, las larvas abandonan el hígado y, pasando por el corazón, llegan a los

pulmones donde realizan una muda de larvas II a larvas III. Después del nacimiento del cachorro y durante los días siguientes las larvas permanecen en los pulmones pero al cuarto día después del parto las larvas IV aparecen en el intestino. Transcurridas dos semanas tiene lugar la muda final y los gusanos alcanzan la madurez sexual. Esta es la vía por la que se infectan la mayoría de cachorros intrauterinamente (Fig. 6).

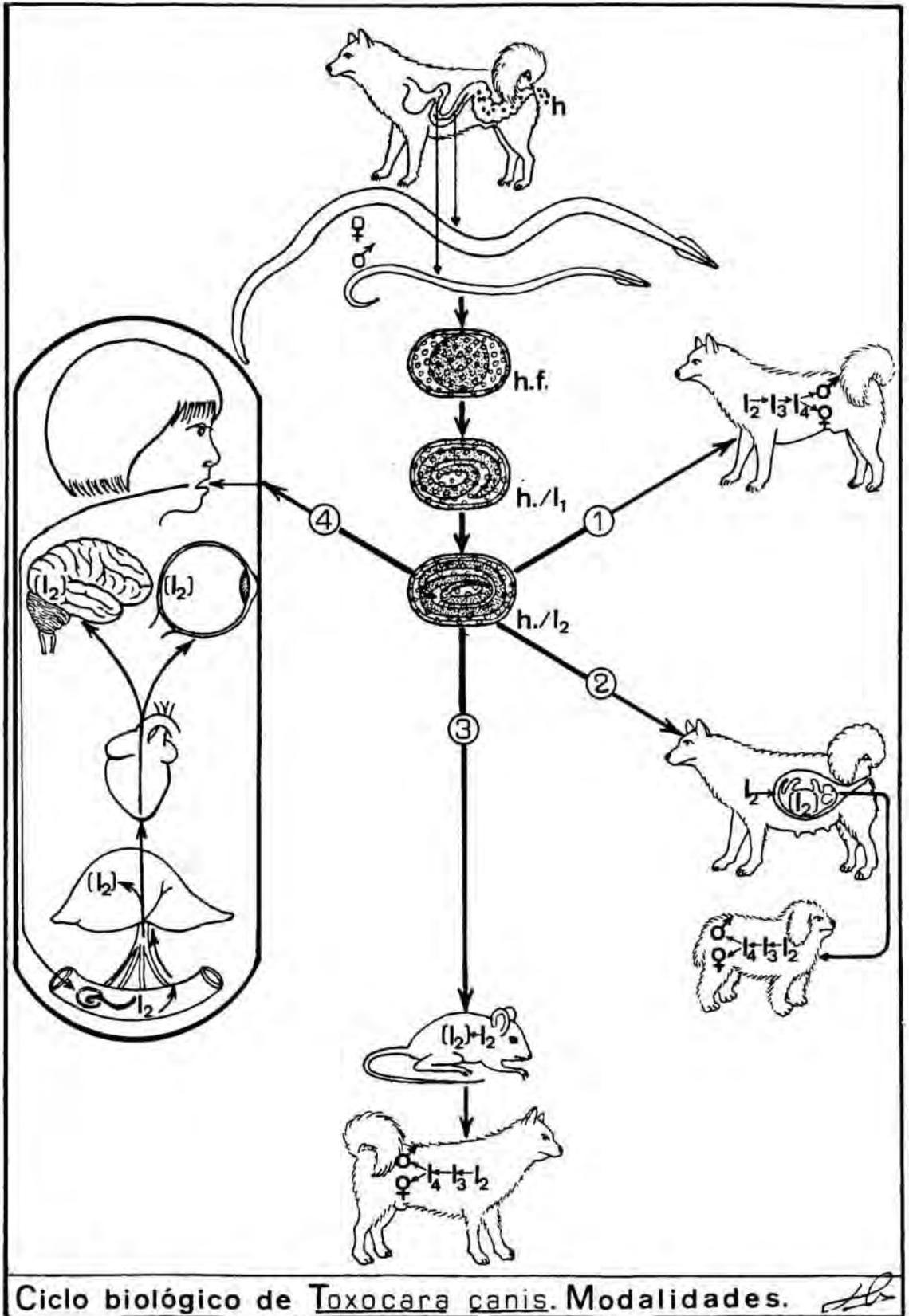
Esta comprobado que los perras pueden transmitir las larvas II a sus cachorros por medio de la leche. La transmisión se realiza rápidamente después del parto y alcanza la cima durante la segunda semana de lactancia (104).

Una tercera vía de infestación tiene lugar a través de los hospedadores paraténicos. En 1958 Sprent (293) demostró que huevos de Toxocara canis pueden eclosionar y sus larvas II permanecer viables en los tejidos de una amplia gama de animales.

#### II.2.2 PREVALENCIA MUNDIAL DE LA TOXOCAROSIS CANINA

Toxocara canis infecta preferentemente a perros de regiones de clima tropical y templado, los datos publicados en la bibliografía mundial respecto a la prevalencia de esta parasitosis en perros son variables. La edad de la población canina estudiada, la metodología empleada, la profilaxis mediante la administración adecuada de antihelmínticos así como las zonas estudiadas influyen de forma ostensible en la variabilidad de los datos aportados por diversos autores.

En Italia, país con características climáticas y socioeconómicas parecidas al nuestro, Armone et al (12) estiman que la prevalencia de infestación canina por T. canis oscila entre un 10-34%, aunque con valores extremos de un 54%



Ciclo biológico de *Toxocara canis*. Modalidades.

Figura 6.

en Mesina y casi un 80% en Palermo y más moderadas en Lombardia con un 16% (83).

Autores como Schantz y Glickman (266) y Randall (247) cifran la parasitación en Norte América en un 80-100% para cachorros de 2 a 6 meses, tanto por ciento que decrece hasta un 20% en perros mayores de un año. También en USA (Louisiana), la mayor prevalencia se halla en perros menores de un año con un 27.3%, en perros mayores de un año la positividad desciende hasta un 2% (279). Arnaud et al (13), en cifras generales tasan la infección entre un 5-20% en Europa y en un 80% en países tropicales, Girwood et al (99) citan un 20.9% hallando como otros autores la mayor prevalencia en perros jóvenes.

En Inglaterra entre el 12% y el 15.7% de los perros están parasitados (248,323,324); Savel (260) en Francia y Gerin et al (92) en Bélgica señalan que el parasitismo en perros se sitúa alrededor de un 10% y 17% respectivamente. Estudios realizados en Armenia por Davidyants et al (61) indican entre un 36.5%-42.8% la prevalencia en perros extraviados y un 27.3%-29.3% en perros con amo; la prevalencia hallada en perros menores de un año es alta (45-90%). Los datos hallados por Gross et al (116) en Israel, difieren de los anteriormente citados oscilando entre un 3% a un 7%. Más recientemente Christensson (46) en Suecia halla un 28% de zorros parasitados y un 7% de perros; datos que sorprenden por la situación geográfica de Suecia (por encima de los 60° latitud Norte). Gillespie (98) señala una prevalencia del 66-33% en zonas rurales de Alemania y Londres respectivamente, en perros menores de un año; en perros mayores esta prevalencia oscila entre un 6-22% (Tabla 1).

### II.2.3 PREVALENCIA DE LA TOXOCAROSIS CANINA EN ESPAÑA

España tiene, por su situación geográfica, el clima idóneo para la supervivencia y maduración de los huevos de T. canis

en el medio ambiente, lo que hace suponer en cifras globales una prevalencia de Toxocarosis canina alta.

Aún cuando se carezca de cifras actuales, Gallego (G1) en 1982 aporta los siguientes datos de porcentajes de parasitación canina en distintas ciudades españolas: en Granada 28%, Madrid 21%, Pamplona 32%, Zaragoza 13% y en Barcelona 36%, que por si solos son lo suficientemente demostrativos. Un estudio epidemiológico reciente llevado a cabo por Conde et al (49) indica que en Salamanca del 29.4% al 33.1% de los perros están parasitados.

En lo que se refiere a Barcelona un estudio, realizado en 1985 por Moreno et al (296), sobre la parasitación intestinal de 823 perros de Barcelona y provincia, indica que el 11.17% de estos son positivos y de estos el 67.3% lo son por Toxocara canis, según sean animales procedentes de Barcelona capital o de la provincia, la prevalencia es del 13,2% y 15,9% en cachorros menores de 1 año y del 8,3% y 8,7% respectivamente, en adultos (Tabla 1).

Datos proporcionados por el Centro de Zoonosis y Centro Antirrábico del Ayuntamiento de Barcelona indican que la población canina de la provincia de Barcelona en 1987 era de 200.000 perros, de los que entre 100.000 y 120.000 corresponden a Barcelona ciudad. Gallego en 1982 (81) señala que: "podemos estimar que la fauna canina de nuestra ciudad, junto a las 6-8Tm de deyecciones que diariamente esparcen por nuestras calles y escasos parques públicos, elimina en estas zonas una cifra no inferior a los dos o tres mil millones de huevos de Toxocara canis". La alta tasa de eliminación diaria de huevos por nuestra población canina junto a la alta longevidad que presentan los huevos de ascárido, sobre todo en ambientes húmedos (4-5 años según Cheng (44)), hace que el número de huevos de T. canis repartidos en los pocos metros cuadrados de zonas verdes del suelo urbano barcelonés puedan

LOCALIDAD	EDAD	PREVALENCIA	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	
ITALIA	mixta	10-34	Armone <u>et al</u>	
Mesina	mixta	54	Armone <u>et al</u>	12
Palermo	mixta	80	Armone <u>et al</u>	12
Lombardia	mixta	16	Genchi <u>et al</u>	83
FRANCIA	mixta	10	Savel	260
BELGICA	mixta	17	Gerin <u>et al</u>	92
INGLATERRA	mixta	15,7 12	Woodruff <u>et al</u> Rée <u>et al</u>	324 248
	< de 1 año	33	Gillespie	98
	> de 1 año	22	Gillespie	98
ALEMANIA	< de 1 año	66	Gillespie	98
	> de 1 año	6	Gillespie	98
SUECIA	mixta	7	Christensson	46
ARMENIA	< de 1 año	45-90	Davidyants	
	mixta <sup>a</sup>	36,5-42,8	y	61
	mixta <sup>b</sup>	27,3-29,3	Chobanyan	
ISRAEL	mixta	3-7	Gross <u>et al</u>	116
ESTADOS UNIDOS	< de 1 año	27,3	Smith <u>et al</u>	279
	> de 1 año	2	Smith <u>et al</u>	279
	> de 1 año <sup>a</sup>	11,96	Smith <u>et al</u>	279
ESPAÑA				
Barcelona	< de 1 año	13,2-15,9	Moreno <u>et al</u>	206
	> de 1 año	8,3-8,7	Moreno <u>et al</u>	206
Salamanca	mixta	29,4-33,1	Conde <u>et al</u>	49

Tabla 1: Prevalencia de la Toxocarosis canina. Resumen bibliográfico.

a: perros extraviados

b: perros con amo.

estimarse en varios billones, y que las posibilidades de contaminación, especialmente de niños que practiquen la geofagia, sea evidentemente alta.

### II.3 DISEMINACION AMBIENTAL DE LOS HUEVOS DE TOXOCARA

Los huevos de Toxocara canis tienen gran capacidad de resistencia a las condiciones ambientales. El ciclo del parásito nos indica la importancia que tiene el suelo, donde se efectúa obligatoriamente la maduración de los huevos hasta el desarrollo de la larva II infestante.

Bajo condiciones adecuadas los huevos de Toxocara pueden sobrevivir varios años, sin embargo se destruyen rápidamente cuando se hallan expuestos a las radiaciones solares directas o a la desecación (80,217,227). El desarrollo larvario se detiene a temperaturas inferiores a los 10°C (227) y la larva muere a temperaturas inferiores a los -15° (217). Sin embargo, en regiones donde la nieve es frecuente en invierno, se ha podido observar que los huevos sobreviven a bajas temperaturas, debido al microclima de tipo templado que se forma debajo de la capa de nieve (94,227, G12).

El factor que quizás tiene una mayor influencia en la prevalencia de helmintosis de transmisión telúrica es la composición de la capa superficial del suelo (22). La mayoría de los suelos de parques y jardines de las grandes urbes son de tipo arcilloso. En ellos los huevos de ascárido se agrupan y concentran por la acción de la lluvia, sedimentando en capa fina entre una delgada cubierta de arcilla coloidal y la capa más profunda de partículas gruesas. De esta forma los huevos de helminto quedan protegidos de la desecación y la acción solar directa. Los suelos arcillosos favorecen la concentración y supervivencia de los huevos de ascárido los cuales pueden ser ocasionalmente ingeridos (25).

Otro reservorio telúrico a tener en cuenta son los fangos de las estaciones de depuración ya que los huevos de helminto no se destruyen por el tratamiento que habitualmente se practica en las aguas residuales. Estas estaciones depuradoras recogen

no sólo las aguas de uso doméstico sino las de vertederos de distinta procedencia. En EE.UU se ha encontrado huevos de Toxocara viables en los lodos procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales de 27 municipios del Sur del país (249). La utilización como abono de estos lodos puede favorecer su diseminación.

La presencia de huevos de Toxocara en el suelo de parques, jardines y otros lugares públicos ha sido demostrado por diversos autores. Los índices de contaminación hallados por unos y otros es tanto un reflejo del grado de prevalencia de la infección en el perro como de la densidad de la población canina presente y de la efectividad de las técnicas utilizadas para la recogida de muestras y procesos subsiguientes para la recuperación de los huevos (104).

Los datos aportados por la bibliografía sobre la diseminación ambiental de los huevos de T. canis en parques, jardines, plazas públicas y otras áreas de recreo de distintas ciudades son muy variables. Las prevalencias halladas oscilan entre unos valores mínimos de hasta un 0.4% en Louisiana (279) y máximos como es el caso de Londres donde en 1970 el 35% de los suelos de los parques eran positivos y en un estudio realizado 14 años después, sobre un total de 503 muestras, 323 fueron positivas (64%) (285) (Tabla 2).

Algunos autores en sus estudios hacen mención de la viabilidad de los huevos hallados. Pegg (230) indica que del 5.2% de muestras positivas solamente entre un 0.5%-1.2% contenían huevos fértiles con capacidad infestante. Duweld (70) estudia un total de 31 hoyos de arena pertenecientes a áreas de juegos infantiles de Frankfurt, consiguiendo aislar huevos de T. canis en 27 de ellas, de estas el 42.3% presentaron capacidad infestante después de 4 semanas en el laboratorio.

LOCALIDAD	N° MUESTRAS	PREVALENCIA	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	
INGLATERRA	800	24.4	Borg y Woodruff	31
Londres	503	64	Snow <u>et al</u>	285
	5200	5.2	Pegg	230
ESTADOS UNIDOS	-	10.3	Schantz y Glickman	266
	114	9	Ludlam y Platt	177
Kansas	282	20.6	Dada	59
Louisiana	1529	0.4	Smith <u>et al</u>	279
Baltimore	146	11	Childs	45
Michigan	-	10.20	Randall	247
ITALIA				
Milan	-	21	Genchi y Locatelli	84
EGIPTO	1060	2.5-15	Khalil <u>et al</u>	157
ESCOCIA	234	11.1	Quinn <u>et al</u>	245
CHECOSLOVAQUIA				
Praga	975	13.6	Bozděch	35
ARMENIA	427	36.2	Davidyants <u>et al</u>	61
IRAQ				
Mosul	55	25	Woodruff <u>et al</u>	325
ALEMANIA				
Frankfurt	31	87	Düwel	67

.../...

...../.....

LOCALIDAD	N°MUESTRAS	PREVALENCIA	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	
USSR				
Kishinov	440	18.2-57.1	Gorash <u>et al</u>	113
CARIBE				
Sta Lucia	14	19.5	Thompson <u>et al</u>	306
CHILE	-	10.7	Salinas <u>et al</u>	258
CANADA				
Montreal	-	32.5	Gillespie	98
ESPAÑA				
Madrid	175	9.7	Angulo <u>et al</u>	10
Salamanca	262	6.6-13.3	Simon y Conde	271

Tabla 2. Contaminación telúrica por huevos de Toxocara. Resumen bibliográfico.

Angulo et al (10), tasa en un 9.7% la positividad en las muestras estudiadas en Madrid, hallando en ellas todas las fases del desarrollo embrionario, aunque solamente un 5% de los huevos eran infestantes.

En Salamanca Simon y Conde (271) en 262 muestras estudiadas hallan prevalencias que oscilan entre un 6.6% a un 13.3%.

## II.4 TOXOCAROSIS HUMANA

Tanto las larvas de Toxocara canis como las de Toxocara cati son capaces de producir en el hombre el síndrome de la "larva migrans" sin embargo, la mayoría de los casos descritos de este síndrome se refieren a Toxocara canis. Diversos estudios llevados a cabo en hospedadores paraténicos muestran la mayor habilidad que T. canis posee para sobrevivir en hospedadores aberrantes, así como su mayor agresividad en la diseminación por los diferentes tejidos del huésped. Por el contrario, las larvas de T. cati suelen ser poco invasivas, especialmente en órganos como cerebro y ojos (S27, O6). A las variaciones de comportamiento seguido por las larvas en el hospedador, descritas anteriormente, hay que añadir un mayor riesgo de infección por T. canis que por T. cati debido, probablemente, a la gran dispersión de sus huevos en parques y jardines públicos (Capítulo II.3), y a la diferencia poblacional entre gatos y perros. También influye el hecho de que la infección prenatal por T. cati no se produce y los gatos suelen infectarse mediante la ingestión de larvas II, que se hallan en los tejidos del ratón u otros hospedadores paraténicos.

### II.4.1 CICLO BIOLÓGICO DE Toxocara canis EN EL HOMBRE

El hombre adquiere la Toxocarosis al ingerir de forma accidental huevos embrionados de T. canis a través de tierra polucionada, agua, alimentos y objetos contaminados. La geofagia y la pica, frecuente en niños de 1 a 4 años, contribuye a que la población infantil sea una de las más afectadas por tener sus habituales lugares de recreo y juego en parques y jardines públicos, donde suele haber una gran dispersión de los huevos de T. canis. (Capítulo II.3).

Una vez ingeridos los huevos de T. canis, las larvas, por acción de los jugos gástricos, eclosionan en el intestino delgado, penetran en la mucosa, traspasan la pared

intestinal, llegan al hígado a través de la vena porta y de allí al corazón y pulmones. Luego penetran en la circulación mayor donde son empujadas hacia los distintos tejidos periféricos. Las larvas continúan diseminándose y se detienen cuando su tamaño excede al diámetro del vaso sanguíneo por el que viajan. Cuando esto ocurre, traspasan activamente la pared vascular y migran hacia los tejidos circundantes (Figura 6). La migración larvaria va acompañada de hemorragia, necrosis y reacciones inflamatorias. Puede continuar durante un periodo indeterminado, que acostumbra a ser de varios meses de duración, y permanecer durante años en estado quiescente para luego reanudar su migración. Finalmente algunas permanecen encapsuladas y rodeadas de un tejido inflamatorio que paradójicamente las protege, mientras otras son destruidas por distintos mecanismos de defensa del hospedador (23).

Debido a a que las larvas nunca llegan a completar su ciclo, alcanzando la madurez sexual, no se hallan huevos de T. canis en las heces humanas. Excepcionalmente se ha conocido algún caso de gusanos adultos localizados en el intestino humano (29).

#### II.4.2 PATOLOGIA

La patogénesis de la Toxocarosis ha sido ampliamente revisada por Glickman y Schantz (104).

La dificultad que supone realizar el estudio de dicha patología en el hombre ha obligado a recurrir a modelos experimentales utilizando animales de laboratorio. La infección experimental en ratón ha demostrado ser un buen modelo para el estudio de la "larva migrans". En ratón infectado se detecta hipereosinofilia, infiltrados pulmonares, hipergammaglobulinemia, y granulomas

eosinofílicos en biopsias de diversos órganos (hígado y cerebro) (24,151,152,155,162,191,294,299).

Otros animales de laboratorio que se han utilizado para el estudio de la Toxocarosis han sido primates y cerdos (105, 253).

Las manifestaciones patológicas de esta parasitosis son consecuencia de las lesiones de tipo mecánico producidas por la larva durante su migración, y de la reacción inflamatoria que se desarrolla por parte del hospedador.

La formación de granulomas eosinofílicos es uno de los principales sistemas de defensa del hospedador para evitar la migración larvaria.

La histopatología de estos granulomas puede variar según la toxocarosis se halle en fase aguda o crónica (228).

En fase aguda, estudios realizados con secciones de hígado de ratones infestados, muestran áreas irregulares de necrosis hepatocelular y moderado infiltrado neutrófilo, hipertrofia generalizada de los núcleos de las células de Kupffer y vacuolización de los hepatocitos. Focos de neutrófilos, con eosinófilos ocasionales, se observan adyacentes y alrededor de las secciones larvarias, pero también en lugares distantes.

El hallazgo de granulomas vacíos adyacentes a otros granulomas que aparentemente contienen larva II, hace suponer que la larva se hallaba en la formación inicial del granuloma, escapando posteriormente para establecerse en otro lugar (151).

En fase crónica las secciones del hígado muestran muchos granulomas, formados por una densa cápsula de colágeno, en

cuyo interior se halla la larva de T. canis, o sus restos, rodeada por eosinófilos, células epiteliales y macrófagos. En la parte externa de esta cápsula de colágeno, se observa un infiltrado formado por linfocitos y células plasmáticas.

La formación del granuloma no sólo va encaminado al secuestro de la larva, la localización de antígeno de secreción-excreción (ASE) dentro de los granulomas sugiere que las larvas en su interior continúan secretando ASE. La detección de ASE circulante en ratones durante una infección crónica (32) hace pensar que es posible que alguno o todos los componentes solubles del ASE puedan salir mediante difusión fuera del granuloma y provocar una fuerte respuesta inmune.

La predilección de las larvas de Toxocara por diferentes órganos puede variar según la especie del hospedador. En el hombre, las larvas tienen especial predilección por el hígado, donde la mayoría de ellas suelen quedar retenidas, pero pueden invadir otros órganos. La respuesta inmune del hospedador también juega un papel importante en esta distribución.

En animales de laboratorio sometidos a reinfecciones (296), la mayoría de las larvas quedan retenidas en el hígado evitando así su acceso a pulmones, cerebro y ojos (6). No ocurre así con los animales que sufren una primoinfección en los que la diseminación larvaria por los distintos órganos es mayor, con marcada predilección por el cerebro y musculatura esquelética.

La respuesta inflamatoria provocada por larvas muertas o restos larvarios parece ser mayor que la provocada por larvas vivas (41). Observaciones clínicas sugieren que factores similares a los descritos están relacionados con la patogénesis de la "larva migrans" en el hombre (266).

### II.4.3. MANIFESTACIONES CLINICAS

La importancia del cuadro clínico en el hombre depende del número de larvas ingeridas, la frecuencia de las reinfecciones, la distribución de las larvas y otros factores relacionados con el hospedador y su estado inmune. Las infecciones ligeras, que son probablemente las más frecuentes, acostumbran a ser asintomáticas. En todos los casos, sin embargo, la infección por T. canis es potencialmente capaz de causar graves patologías.

#### II.4.3.1 Larva migrans visceral (LMV)

En 1952 Beaver et al (22), identifican larvas de T. canis en biopsias de hígado de pacientes sospechosos de padecer una Toxocarosis, e introducen el término de "larva migrans visceral" (LMV). Se observó que las lesiones granulomatosos en hígado eran frecuentes en casos de niños con una LMV confirmada, así como la existencia de una eosinofilia crónica.

La LMV es un síndrome que afecta principalmente a niños de edades comprendidas entre 1 y 4 años con historia de pica, geofagia y contacto con perros.

Los signos generales de la LMV son: pérdida de peso, astenia, anorexia, fiebre moderada prolongada e irregular, sudoración, palidez, irritabilidad y cambios en el comportamiento. A veces suele presentarse anemia (102, 202). En otras ocasiones se pueden presentar erupciones pruriginosas en tronco y extremidades inferiores.

La leucocitosis alcanza valores de 30.000 a 100.000 leucocitos por mm<sup>3</sup>, debido fundamentalmente a un incremento en el número de eosinófilos que puede alcanzar entre un 50-90% (101.202,266). Es normal que esta eosinofilia persista

durante meses e incluso años (174), después de que las otras manifestaciones han remitido.

La concentración de albúmina sérica es normal o ligeramente disminuida. Las gammaglobulinas, especialmente IgG e IgE, se hallan incrementadas. Ciertos autores relacionan la hipereosinofilia con la hipergammaglobulinemia (7,24). Los títulos de hemaglutininas anti A y anti B están significativamente elevados en la mayoría de los niños sospechosos de una LMV, debido a la presencia en la superficie de las larvas de antígenos que estimulan la producción de isohemaglutininas (100,138).

Otro dato de laboratorio que puede ser orientativo en el diagnóstico de la Toxocarosis es el aumento en suero del título de  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa (GGT), su incremento sugiere una complicación hepática en el 31% de los pacientes (111,187).

La hepatomegalia se considera un síntoma constante que va asociado en el 45% de los casos a una esplenomegalia (13). El hígado se presenta agrandado, liso e incoloro. Su aumento de volumen es debido a la inflamación producida alrededor de la larva durante la formación del granuloma eosinófilico. La hepatomegalia asociada a una esplenomegalia, en modelo experimental murino, viene relacionada con el incremento del número de larvas inoculadas (153).

Las complicaciones pulmonares, debidas a la migración larvaria por el parénquima pulmonar, son frecuentes pero raras veces llegan a ser graves. Normalmente cursan como una bronquitis aguda, asma o neumonía, acompañada de otros síntomas presentes en el síndrome de Loeffler. La placa radiográfica muestra un infiltrado pulmonar que en la mitad de los pacientes suele ser transitorio.

Estudios realizados en ratón, tras la infestación oral, muestran importantes cambios en las paredes alveolares, parénquima pulmonar y pleura, así como la presencia de grandes áreas granulomatosas confluentes, constituidas por polimorfos, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Todos estos signos tardan en remitir más de 13 semanas después de la infestación (191).

Los infiltrados pulmonares pueden persistir durante largo tiempo en ausencia de la larva, debido a que los antígenos circulantes, que quedan atrapados en los pulmones, continúan produciendo reacción inflamatoria. No ocurre así con la ascarirosis, en que el infiltrado pulmonar remite una vez que la larva abandona los pulmones (154).

Los casos de invasión del miocardio por las larvas de T. canis son escasos (322). Algunos han sido fatales para el enfermo, debido a una respuesta inmunológica exagerada. En animales de laboratorio, el corazón no suele estar afectado (191).

La afectación del SNC, principalmente cerebro, es una de las complicaciones graves de la Toxocarosis. Siendo como es el cerebro un lugar privilegiado inmunológicamente (20), las larvas acumuladas allí gozan de poca inmunoreactividad por parte del hospedador. En animales de experimentación, concretamente en el ratón, las larvas de T. canis tienen una especial predilección por el cerebro y cerebelo. Estas migran por diferentes órganos y tejidos acumulándose a las pocas semanas en esta parte del encéfalo, de forma que hay un incremento en el número de larvas en cerebro mientras se reduce en las demás partes del cuerpo (68,173,191,200,231,290).

Una vez en el cerebro las larvas no sufren ninguna reacción celular por parte del hospedador, permaneciendo viables

durante largos periodos de tiempo. En estudios histopatológicos no se observa respuesta inflamatoria en íntimo contacto con las larvas y en muchas ocasiones las lesiones halladas carecen de foco larvario. En más de la mitad de los casos el cuerpo calloso se halla afectado resultando totalmente destruído (304).

Los casos de Toxocarosis cerebral humana descritos hasta el momento son escasos, no llegando a la decena. El diagnóstico de todos ellos se realizó post-mortem mediante autopsia y la muerte de estos pacientes fue debida a causas de diversa índole: polio (26), problemas transfusionales (64), envenenamiento (205), malos tratos (131). Solamente en un caso se atribuyó a la infección cerebral por T. canis, en un niño que murió después de un ataque epiléptico (268).

Las manifestaciones clínicas descritas en la Toxocarosis cerebral incluyen: encefalitis y focos epilépticos. En ocasiones el examen del líquido cefalorraquídeo puede presentar eosinófilos (115,149).

La predisposición a la infección por T. canis en niños con problemas neurológicos es dudosa. Woodruff et al (321) y Glickman et al (G20) hallan que los niños epilépticos están más frecuentemente infectados por Toxocara que los sanos. Sin embargo no se ha hallado diferencia entre la frecuencia de la infección por Toxocara que presentaban niños epilépticos de causa desconocida y epilépticos de causa conocida (104), como tumores cerebrales, traumatismos e infecciones víricas cerebrales. La hiperactividad, signo característico de los niños epilépticos, acompañada de pica, se asocia según algunos autores a una mayor predisposición a la infección por T. canis.

Ensayos con animales de laboratorio discrepan de tal hipótesis aportando evidencias de que las larvas de T. canis

hacen volver al huésped paraténico hiperactivo (126,127). Sin embargo no se conoce si la hiperactividad está relacionada con la existencia de lesiones en el cerebro, o si son dos hechos independientes.

El suponer que las larvas de Toxocara canis produzcan en cerebro lesiones responsables de la hiperactividad en niños es discutible. No se sabe con seguridad si la infección por Toxocara crea un estado de hiperactividad en el niño, que además la hará aumentar sus probabilidades de reinfectarse, o si la hiperactividad, debido a múltiples causas, es un factor predisponente a adquirir esta zoonosis. Si la asociación entre LMV y alteraciones del comportamiento en niños quedara demostrada podría tener importantes implicaciones clínicas.

Algunos autores atribuyen a la migración larvaria cerebral capacidad para transportar hasta el SNC los virus causantes de encefalitis y poliomielitis u otros microorganismos. Sprent (291,292), Lapierre y Holler (172) y Mochizuki (201) demostraron experimentalmente que las larvas, durante su migración por el cerebro, pueden transportar el virus de la encefalitis B Japonesa. Gupta y Pauri (122) mediante infección doble por virus de la encefalitis japonesa y Toxocara canis muestran que dicha relación es factible al hallar un mayor índice de enfermedad y muerte en animales sometidos a la doble infección.

Otros tipos de afectaciones, menos importantes clínicamente pero que pueden ser orientativas en el diagnóstico clínico de la Toxocarosis, son la miositis (312) y artritis y artralgias (82,318).

#### II.4.3.2 Larva migrans ocular (LMO)

La invasión ocular es una de las complicaciones más frecuentes e importantes de la Toxocarosis. La reacción

inflamatoria que se produce puede causar necrosis y desprendimiento de retina, provocando ceguera permanente en el paciente. La lesión producida por las larvas o su restos larvarios puede confundirse con un retinoblastoma, llevandose a cabo, en muchas ocasiones, la enucleación innecesaria del ojo afectado.

En 1950 Wilder (316) descubre larvas y restos larvarios de nematodos en 24 de 42 pseudogliomas de ojos enucleados, con diagnóstico todos ellos de endoftalmitis o posibles retinoblastomas. Posteriormente Nichols en 1956 (210,211), reexaminando muestras de ojos enucleados, identifica a estas larvas de nematodos como de T. canis.

En los últimos años se han realizado numerosas publicaciones que hacen referencia a la afectación de diferentes partes del ojo debido a la infección por T. canis. En cámara anterior (76,89,102,269), en cámara posterior (27,28,123), afectación del nervio óptico (203), retina (50,96,102,134,144,135, 158,163,182,186,240,241,267,271,310,317) y obstrucción de la arteria retinal (37,224).

La afectación ocular es típicamente unilateral y se presenta con mayor frecuencia en niños mayores de 7 años, jóvenes y adultos, cuyos antecedentes epidemiológicos, convivencia con perros, geofagia y pica, suelen ser escasos o nulos. Probablemente la infección tuvo lugar en la infancia y el daño ocular aparece como una complicación tardía.

La hipereosinofilia que suele estar presente en la LMV así como otras manifestaciones clínicas orientativas como leucocitosis, hepatomegalia, gammaglobulinemia, aumento del título de isohemaglutininas e hiper IgE suelen estar ausentes en la LMO.

El examen funduscópico puede mostrar varios tipos de lesión.

- a) granuloma retiniano eosinofílico, situado generalmente en el polo posterior o periferia (67).
- b) endoftalmitis exudativa crónica, que suele conducir a necrosis de la zona afectada con desprendimiento de retina (66). El cristalino puede estar más o menos alterado. En conjunto el cuadro clínico puede evocar la imagen de un retinoblastoma cuyo diagnóstico solo se evidencia mediante el examen anatomopatológico de la pieza previa enucleación.
- c) la úvea y mácula pueden también presentar lesiones inflamatorias.

En algunos casos la arteria retinal y el nervio óptico pueden hallarse afectados.

Estrabismos, leucocoria y dolor ocular son manifestaciones clínicas que pueden darse aunque con menor frecuencia.

Una hipótesis sobre el desarrollo de LMO es la descrita por Glickman y Schantz (104) (Cuadro 1), en que se supone que cuando la dosis larvaria es baja la cantidad de antígeno es insuficiente para estimular una buena reacción inmune y un incremento del número de eosinófilos. En consecuencia, las larvas migran sin impedimento logrando salvar el filtro de hígado y pulmón, no provocando ningún signo clínico en estos órganos. Las larvas penetran en la circulación sistémica hasta los pequeños capilares y se reparten por todo el organismo. Pueden permanecer en los tejidos durante periodos de hasta 10 años y periódicamente reanudar su migración; en una de estas reactivaciones pueden alcanzar la retina y vasos coroidales. Esto explica que la LMO tenga una larga

Toxocariosis	Edad paciente	Dosis infestante	Período incubación	Tasa de anticuerpos
Visceral	Niños (10 años)	Moderada. Alta	Corto (días, meses)	Alta
Ocular	Niños y adultos	Baja	Largo (meses, años)	Baja
Visceral y ocular	Niños (5 años)	Muy alta	Muy corto (días)	Muy alto

Cuadro 1. Relación entre los síndromes de larva migrans visceral y ocular. Modelo hipotético basado en observaciones en humanos y animales infestados experimentalmente (Tomado de Glickman y Schantz, 1981 (104)).

incubación y que por ello sea una parasitosis que se halla con mayor frecuencia en jóvenes y adultos.

Cuando la dosis larvaria es alta hay un rápido incremento del título de anticuerpos y de eosinófilos. Las larvas penetran en el hígado y pulmones en donde son atrapadas por la reacción inflamatoria mediada por la misma respuesta inmune. Este periodo de incubación suele ser corto y suele ir relacionado con el número de larvas ingeridas y si el huésped estaba inmunizado frente al parásito. Aunque el hígado ejerce una importante acción como filtro, un pequeño número de larvas pueden escapar del hígado y pulmones, quedando retenidas en otros órganos, como corazón, sistema nervioso central y ojos, produciendo en algunas ocasiones importantes trastornos.

Inoculaciones de dosis altas de T. canis en primates provocan una LMV, sin detección de anticuerpos específicos en humor acuoso o vítreo ni observación de lesiones intraoculares relacionadas con una migración larvaria, pero si se hacen patentes diversos signos neurológicos entre ellos la encefalomiелitis (105).

Infecciones intravítreas provocadas en cerdos por larvas II de T. canis indican la producción de IgG específicas y un denso infiltrado eosinofílico en cámara anterior y úvea; también se observan larvas rodeadas por granulomas formados fundamentalmente por eosinófilos (253).

En el hombre a menudo se detecta la presencia de eosinófilos en humor acuoso y vítreo, así como de una mayor tasa de anticuerpos IgG e IgE. Parece ser que hay una mayor respuesta inmune "in situ".

Trabajos experimentales en modelos murinos muestran que las larvas pueden alcanzar el ojo rápidamente y permanecer viables durante largos periodos de tiempo (223).

El 90% de las larvas que invaden el ojo se hallan situadas parcial o completamente en retina y solamente el 20% de estas lesiones, están asociadas con reacciones inflamatorias. La presencia en vítreo y retina de lesiones, en ausencia de larvas, tanto vivas como muertas, o de algunos de sus restos, sugiere que las larvas, después de inducir la lesión, pueden migrar fuera de ellas. Este hecho ha sido puesto de manifiesto posteriormente por Kayes et al (151,155) y Parson (228), que descubren granulomas vacíos adyacentes a otros en cuyo interior se hallan larvas II de T. canis viables.

Usando como modelo experimental primates Watzke et al (313) demuestran que el granuloma inflamatorio característico es debido a los productos de secreción-excreción de las larvas. Estas aparentemente tienen una habilidad especial para moverse por el tejido y abandonar el lugar de la reacción tisular por el nervio óptico.

El ojo como parte del SNC se halla relativamente aislado del sistema inmune gozando de la protección de la barrera hematoencefálica. Las larvas pueden vivir en el ojo más de 15 meses (313) y las lesiones pueden persistir más de 6 años (16).

Hasta el momento no se conoce si las reacciones inflamatorias producidas por T. canis en el interior del ojo son más o menos importantes que las que pueden darse en otras parte del cuerpo, y si pueden tener el mismo grado de reactividad inmunológica.

#### II.4.4 Prevalencia de la toxocarosis humana

El conocimiento de la prevalencia de la Toxocarosis en el hombre suele presentar dificultades. La falta de manifestaciones clínicas orientativas, así como la dificultad en realizar un diagnóstico etiológico, hacen que los datos en que nos basamos se refieran siempre a estudios seroepidemiológicos realizados en poblaciones muy concretas y con diferentes técnicas diagnósticas.

Como ya se ha indicado (Capítulo II.2) la prevalencia de la infección por T. canis en perros menores de 3 meses es de un 80-100%. Los valores aportados por la bibliografía en perros mayores de 3 meses fluctúan entre un 3% a un 29%. En cuanto a la contaminación de los suelos las prevalencias halladas oscilan entre 0.4 - 87%.

Todos estos datos junto con otros de índole epidemiológico, como pueden ser: ubicación, clima, ambiente urbano o rural y condiciones socioeconómicas, van a jugar un papel importante en las posibilidades de contaminación para el hombre. Sin embargo la exposición a ambientes contaminados no es suficiente para adquirir la enfermedad. Estudios seroepidemiológicos realizados entre veterinarios y cuidadores de perros muestran que no hay una mayor prevalencia entre este grupo de riesgo y la población normal (11,328). Por el contrario pica y geofagia, común entre el 10-30% de los niños, son hábitos que constan en la historia de muchos pacientes seropositivos.

En una revisión realizada por Ehrhard y Kernbaum (71) sobre una serie de publicaciones, que en su conjunto incluye a 9.000 individuos estudiados, y de acuerdo con los datos clínicos y serológicos aportados en los mismos, se señala entre un total de 1.920 casos de Toxocarosis diagnosticados 520 correspondían a afectación asintomática o infestación antigua y 1.400 a Toxocarosis con patología manifiesta. De

estos, solamente 780 estaban bien documentados; 350 fueron casos viscerales y 430 oculares (16).

#### **A. Prevalencia en España de la Toxocarosis humana**

En España los estudios seroepidemiológicos existentes son escasos. Guillen et al (120) halla en un total de 317 sueros, pertenecientes a población adulta, 22 casos con serología positiva (6,9%) y de 334 pertenecientes a niños 7 casos positivos (2%). Esta prevalencia se ve aumentada cuando la población estudiada es una población sospechosa de padecer una Toxocarosis: de 88 sueros sospechosos, 34 fueron positivos (38,6%).

En un estudio reciente realizado por Conde et al (49) al estudiar la población infantil en Salamanca halla una seroprevalencia del 4.6% en zona rural y del 8.5% en zona urbana. Las prevalencias en población adulta y rural son inferiores a los de la población pediátrica, oscilando entre 1,5 y 2,3 respectivamente.

Jimenez et al (145), al estudiar un total de 8.145 sueros pertenecientes a enfermos de diversos hospitales de la isla de Tenerife halla una seropositividad de un 3,3%.

#### **B. Prevalencia en el mundo de la Toxocarosis humana**

La prevalencia de la Toxocarosis, queda expresado de forma esquemática en el (Tabla 3). Se observa una mayor prevalencia de la infección en población infantil que en adulta, llamando especialmente la atención los datos aportados por Thompson et al (306) quienes cifran en un 86% la seropositividad hallada en niños en Santa Lucía. Se observa marcadas diferencias

LOCALIDAD	N° MUESTRAS	EDAD	CLINICA	PROCEDENCIA	PREVALENCIA %	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA
USA	333	Ped <5 años	Asintomática	Rural	23	Worley <u>et al</u>
	1409	Ped 1 a 11 años	Asintomática	Diversa	4.6-7.3	Herrmann <u>et al</u>
AUSTRALIA	660	Adulta	Asintomática	No consta	7	Nicholas <u>et al</u>
HOLANDA	112	Ped	Asintomática	No consta	7	Van Knapen <u>et al</u>
INGLATERRA	133	Ped	Asintomática	No consta	14.3	Josephs <u>et al</u>
	922	Adulta	Asintomática	No consta	2.6	Savigny <u>et al</u>
	302	Ped	Asintomática	No consta	19	Gill <u>et al</u>
	570	Ped <14 años	Asintomática	No consta	27	Rée <u>et al</u>
	835	Adulta >14 años	Asintomática	No consta	14	Rée <u>et al</u>
		203	Ped <6 años	Asintomática	Rural	86
CHILE	227	Adulta	Asintomática	Diversa	8.8	Heorskovic y Astorga
CANADA	524	Ped	Asintomática	Rural	19.5	Embril <u>et al</u>
	449	Ped	Asintomática	Urbana	14.0	Embril <u>et al</u>

Toronto	113	Adulta <sup>a</sup>	Asintomática	No consta	8.8	Yang <u>et al</u>	328
	114	Adulta	Asintomática	No consta	9.6	Yang <u>et al</u>	328
FRANCIA	166	Adulta	Asintomática	Urbana	4.8	Glickman <u>et al</u>	108
	89	Adulta	Asintomática	Rural	15	Glickman <u>et al</u>	108
ALEMANIA	9072	Mixta	Asintomática	No consta	7	Hertkorn y Lamina	130
	15514	Mixta	Asintomática	No consta	2.53	Lamina	170
	2864	Mixta	Sintomática	Diversa	8.6	Preissshogen y Lamina	242
IRAQ	219	Adulta	Asintomática	Diversa	7.3	Woodruff <u>et al</u>	315 <sup>4</sup> / <sub>5</sub>
HUNGRIA	2371	Mixta	Asintomática	No consta	19.8	Lengyel	175
	400	Ped. 3-5 años	Asintomática	No consta	47.2	Lengyel	175
ITALIA	250	Adulta	Asintomática	No consta	7.2	Scaglia <u>et al</u>	265
	91	Ped	Epilepsia	No consta	22	Arpino y Curatolo	14
	214	Ped	Asintomática	No consta	12.1	Arpino y Curatolo	14

VENEZUELA	281	Mixta	Asintomática	Urbana a	1.8	Lynch <u>et al</u>	181
	60	Mixta	Asintomática	Urbana b	20.0	Lynch <u>et al</u>	181
	86	Mixta	Asintomática	Rural	25.6	Lynch <u>et al</u>	181
	49	Mixta	No consta	No consta c	34.9		
JAPON	83	Ped	Asintomática	No consta	3.6	Matsumura y Endo	193
	88	Adulta	Asintomática	Urbana	5.7	Matsumura y Endo	193
	341	Adulta	Asintomática	Rural	3.9	Matsumura y Endo	193
	101	Adulta	Asintomática	Costera	1.9	Matsumura y Endo	193
SUECIA	323	Adulta	Asintomática	Diversa	5	Ljungstrom y Van Knapen	176
	175	Adulta	Sintomatica	Diversa	25	Ljungstrom y Van Knapen	176
RUSIA	12945	Adulta	Asintomática	Diversa	0.5-8.2	Lysenko <u>et al</u>	183
EGIPTO	1444	Adulta	Asintomática	Diversa	1.5	Khail <u>et al</u>	156
LITUANIA	2531	Mixta	Asintomática	Diversa	13.6	Podsedlovskis <u>et al</u>	238

ESPAÑA

Galicia	60	Infantil	No consta	No consta	33.3	Ares <u>et al</u>	11
	60	No consta	Leucocitosis	No consta	45	Ares <u>et al</u>	11
	20	No consta	No consta	No consta <sup>d</sup>	15	Ares <u>et al</u>	11
Madrid	317	Adulta	Asintomática	No consta	6.9	Guillen <u>et al</u>	120
	334	Ped <10 años	Asintomática	No consta	2	Guillen <u>et al</u>	120
	88	Mixta	Sintomática	No consta	38.6	Guillen <u>et al</u>	120
	22	Mixta	No consta	Rural	68.7	Guillen <u>et al</u>	120
Salamanca	47	Ped <10 años	Asintomática	Urbana	8.5	Conde <u>et al</u>	49
	43	Ped <10 años	Asintomática	Rural	4.6	Conde <u>et al</u>	49
	344	Adulta >10 años	Asintomática	Urbana	1.5	Conde <u>et al</u>	49
	216	Adulta >10 años	Asintomática	Rural	2.3	Conde <u>et al</u>	49
Tenerife	8145	Mixta	Diversa	No consta	3.3	Jimenez <u>et al</u>	145

Tabla 3. Seroepidemiología de la Toxocarosis humana. Resumen bibliográfico.

a: clase media alta; b: clase baja; c: indios del Amazonas; d: contactos con animales, sintomática: sintomatología variable compatible con Toxocarosis.

entre población rural y urbana, siendo la primera la que aporta mayor prevalencia, salvo algunas excepciones (49,193,271). Cuando la población estudiada, independientemente de que sea pediátrica o adulta, es sospechosa de padecer una Toxocarosis las prevalencias que se observan sufren un incremento (120,176). Hay que resaltar también los datos aportados por Arpiño y Curatoco (14) que al estudiar comparativamente una población pediátrica sana y otra con problemas de ataques epilépticos, halla en esta última una prevalencia de casi el doble (22%), con respecto al grupo control (12,1%). Otros estudios realizados con una población especial, como es la de personal veterinario, no muestra una mayor prevalencia que la hallada en la población adulta normal (328).

## II.5. DIAGNOSTICO DE LA TOXOCAROSIS

### II.5.1 DIAGNOSTICO CLINICO

Como se ha descrito en el apartado II.4.3 las manifestaciones clínicas que presenta la Toxocarosis son muy variables, en función del número de larvas ingeridas, de su localización y de la respuesta inmune del huésped. Todo ello conlleva que muchas veces esta parasitosis curse de forma asintomática. Según Woodruff (322) pacientes con hepatomegalia, epilepsia, neumonitis temporales, corioretinitis con afectación unilateral y eosinofilia, son sospechosos de sufrir una Toxocarosis, particularmente si son niños.

Basándose en la información obtenida a partir de cuestionarios y datos de laboratorio, Glickman *et al* (100) establecen unos criterios para el diagnóstico de la LMV.

Estos criterios incluyen: a) leucocitosis ( $>10.000$  células por  $\text{mm}^3$ ); b) eosinofilia ( $>10\%$ ); c) alteración del título de isohemaglutininas anti A  $\geq 1/400$  o anti B  $\geq 1/200$ ; d y e) incremento de las IgM e IgG (superior a la media más dos veces la desviación estándar de la población normal); f) hepatomegalia. Asignando a cada variable un punto se establecen los siguientes criterios de positividad:

LMV	PUNTUACION
Positivo	5-6
Dudoso	3-4
Negativo	$< 3$

Un diagnóstico clínico correcto sólo sería factible en aquellos casos en que existiera una Toxocarosis sistémica, que suele ir acompañado de una leucocitosis eosinofílica e historia de pica.

Sin embargo no hay que olvidar que algunas veces triquinelosis, estrongiloidosis, esquistosomosis y otras enfermedades parasitarias pueden también producir una elevada eosinofilia.

En la Toxocarosis ocular, debe tenerse en cuenta especialmente la afectación unilateral, así como la observación de lesiones blancas o grisáceas mediante el examen funduscópico. Este tipo de patología debe diferenciarse de un retinoblastoma, de otros tumores congénitos, retinitis exudativa o traumática y de otras formas de uveítis. Pero el diagnóstico definitivo en la mayoría de los casos es difícil y solamente el diagnóstico etiológico a partir del material de biopsia u ojos enucleados será confirmatorio.

En una Toxocarosis ocular el análisis del humor acuoso puede mostrar un gran número de eosinofilos.

Actualmente la tomografía computerizada y la resonancia magnética pueden ser de utilidad en el diagnóstico de una "larva migrans" (69), especialmente en aquellos casos en que se cuestiona el diagnóstico de retinoblastoma o LMO (186). La biopsia guiada por ecografía y tomodensitometría ha mostrado su utilidad en la diferenciación de la infección por parásitos de otras patologías (19).



## II.5.2 DIAGNOSTICO ETIOLOGICO

El diagnóstico definitivo de la Toxocarosis sólo puede establecerse mediante el examen de material de biopsia, ojos enucleados o tejidos post-mortem. En todos los casos es necesario realizar cientos de cortes histológicos para localizar una sola larva que deberá diferenciarse de otras especies parásitas como Ascaris lumbricoides, Necator americanus, Strongyloides stercoralis y Ancylostoma caninum (210,211). El material obtenido por biopsia percutánea no siempre permite hallar la larva y los resultados que se obtienen acostumbran a ser pobres (247,266). Es preferible la biopsia hepática bajo control laparoscópico a nivel de manchas blanquecinas o grisáceas, de 3 a 5 mm de diámetro, que suelen hallarse salpicando la superficie del hígado (13). Aunque el hallazgo de la larva en los tejidos afectados es el único método que confirma una Toxocarosis, la poca eficacia y agresividad de este método lo hace impracticable como método de rutina, por lo que el diagnóstico de laboratorio se realiza habitualmente mediante técnicas serológicas.

## II.5.3. DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO

### II.5.3.1. Mecanismos inmunes. Consideraciones generales

Los parásitos escapan a la respuesta inmune del hospedador por múltiples mecanismos. Las variaciones antigénicas que tienen lugar en todos los parásitos a lo largo de su ciclo biológico hacen posible que, a pesar de la presencia de anticuerpos específicos, puedan llegar a establecerse en el hospedador gracias a los antígenos característicos de cada estadio (9).

La superficie de los nemátodos sufre en el transcurso de su ciclo biológico numerosos cambios y modificaciones que serán especialmente importantes en la intrincada relación existente entre el hospedador y parásito. Esta superficie es el primer

lugar de actuación de los componentes tanto de la respuesta inmune celular como humoral; los antígenos presentes en la superficie actúan como tarjeta de presentación para el sistema inmune. La cutícula es una estructura no celular secretada por células de la hipodermis que recubre toda la superficie del nemátodo, cavidad bucal, esófago, recto, porción terminal de la vagina y el poro excretor. La mayoría de los componentes de la cutícula son proteínas parecidas al colágeno y sus moléculas se hallan unidas por puentes disulfuro. La parte externa, constituida por la epicutícula es una estructura dinámica que en ocasiones se ha comparado a una membrana celular clásica. Las propiedades biofísicas de esta epicutícula muestran que es extraordinariamente selectiva, propiedad que le confiere su capacidad para excluir ciertas moléculas lipofílicas, lo que podría ser una forma de defensa frente al ataque inmune del hospedador (159).

La respuesta inmune del hospedador actúa mediante la adhesión en la superficie del parásito de leucocitos, anticuerpos y complemento (184,234). Como defensa a este ataque la superficie de los nemátodos puede sufrir durante la infección cambios, provocando alteraciones en la susceptibilidad de ciertos nemátodos a la acción inmune (284).

Algunos parásitos utilizan un verdadero sistema de "camuflaje" incorporando en su mosaico antigénico parasitario, fracciones proteicas del huésped. Una gran variedad de helmintos parásitos, entre ellos Toxocara canis, tienen en su superficie antígenos semejantes a los de los grupos A y B sanguíneos. En el caso de la Toxocarosis es conocido que estos antígenos son capaces de estimular la producción de isohemaglutininas por parte del hospedador (109,138,276).

Estos antígenos comunes son el resultado de una larga adaptación y permiten a los parásitos escapar de la reacción inmune bloqueando, mediante neutralización, los anticuerpos específicos (9,287).

En otras ocasiones los parásitos logran escapar a la reacción inmune debido a su localización en el organismo, desarrollándose en tejidos inmunológicamente privilegiados, donde la tasa de anticuerpos suele ser baja, como es el caso del tejido nervioso (20).

La activación del complemento por la vía alternativa es otra forma de evadir la respuesta inmune celular utilizada por la mayoría de helmintos. La activación de esta vía no requiere la presencia de anticuerpos. Al utilizar los parásitos esta vía y unirse al C3b, los eosinófilos que se adhieren en su superficie no están preparados para actuar como células Killer ya que para que adquieran esta función es necesario la presencia de IgG o IgE específicas (42).

#### II.5.3.2. Antígenos

Durante los últimos años se han realizado importantes progresos en el diagnóstico serológico de las enfermedades parasitarias, especialmente en aquellas que resulta dificultoso demostrar la presencia del parásito por métodos convencionales de laboratorio; en este sentido el inmunodiagnóstico ha aportado grandes ventajas.

La calidad del antígeno empleado tiene un papel importante en cuanto a la especificidad de los resultados obtenidos. Para el diagnóstico de la LMV se han empleado diversas preparaciones antigénicas, fundamentalmente extractos solubles a partir de adultos (48,100), o huevos (58,100,267,326); larvas II (7,58) o sus productos de secreción-excreción (74,214,283), obtenidos tras un cultivo "in vitro" y

posterior eclosión de Toxocara canis (74, 214, 283) o Ascaris suum (7, 48, 58, 158, 229, 326).

El principal problema que se plantea en la elección de antígeno es la existencia de reacciones cruzadas con otros ascáridos (P10). Sin embargo se ha demostrado que la especificidad del antígeno es siempre mayor cuando se emplean antígenos larvarios o bien sus productos de secreción-excreción, ya que son estos los que provocan la respuesta inmune por parte del hospedador. Los antígenos somáticos producen con mayor frecuencia reacciones inespecíficas, mientras que los exoantígenos han mostrado una mayor especificidad (108, S11).

No obstante para incrementar la especificidad se pueden absorber los sueros con extractos antigénicos de especies heterólogas (67, 180, 181).

La especificidad de las secreciones excretadas por T. canis ha sido demostrada mediante el uso de técnicas de inmunofluorescencia directa, al identificar los precipitados que aparecen en los poros oral y excretor de larvas al enfrentarlas "in vitro" a suero de animales infectados (132).

Cuando las larvas infestantes de T. canis se mantienen en cultivo producen un antígeno secretor-excretor (ASE), constituido por una mezcla de glicoproteínas (18, 199) que se hallan en la superficie y orificios de las larvas infestantes. Estos antígenos han sido identificados en los tejidos y suero de ratones infectados (32, 228), en perros (197) y en el hombre (119, 252).

Se calcula que la cantidad de ASE secretado por estas larvas "in vitro" es de 200 pg/larva/día (160). El ASE es el más usado para el diagnóstico serológico de la LMV, debido a la elevada respuesta inmune que produce en el hospedador

infectado (216), a la menor frecuencia con que produce reacciones cruzadas, al compararlo con antígenos somáticos (216), y a la producción de elevadas cantidades de antígeno por las larvas en cultivo (200/pg/larva/día). Al realizar un estudio electrofóretico de este antígeno se observa que la mayoría de polipéptidos que se hallan presentes en él reaccionan con IgG presentes en el suero humano inmune (301).

En la Toxocarosis se ha demostrado que dicho antígeno puede tener componentes con carácter protector (N1), factores que estimulan la eosinofilia (21,299), así como carácter alergénico o inmunogénico. Respecto a este último carácter Sugane y Oshima (297) aíslan una glicoproteína con un peso molecular de 35 KD que es tanto inmunogénica como alergénica, la desnaturalización de esta proteína destruye su poder alergénico pero no inmunogénico. Otros estudios realizados demuestran que es capaz de inducir eosinofilia periférica y activar el complemento (299).

La valoración y caracterización de ASE mediante la utilización de técnicas electroforéticas muestra diferencias en cuanto a los resultados. El número de componentes proteicos hallados oscila según los autores entre 4-6, y 20 bandas con distinto peso molecular (18,189,296,302).

Estas discrepancias son atribuibles fundamentalmente a las diferencias en cuanto a la utilización de los métodos, al lote de larvas, edad del cultivo y actividad proteolítica del mismo (18).

Sin embargo las variaciones observadas no afectan a la sensibilidad del ASE en cuanto a su utilización en técnicas serológicas, especialmente las inmunoenzimáticas (18).

Al observar comparativamente ASE y antígeno de superficie larvario se observó la presencia de una serie de bandas

proteicas con pesos moleculares de 32, 55, 70, 120 y 400 KD (189,251). Las bandas de 120 y 32 KD fueron comunes a los 2 antígenos mientras que la banda de 400 KD solo se halló presente en el ASE. También se comprobó que el ASE contiene más de un 40% de carbohidratos de los cuales la mayoría son la N-acetilgalactosamina (58,4%) y la galactosa (24,5%), que son respectivamente unidades terminales de los grupos A y B sanguíneos (199,251).

Los perfiles electroforéticos evidenciados al estudiar comparativamente antígenos de superficie y de secreción-excreción de dos especies tan próximas entre sí como son T. canis y T. cati, mostraron que entre sus antígenos de superficie existen grandes diferencias. No ocurre así con los ASE que presentan considerables analogías tanto fisicoquímicas como inmunológicas. Olson y Hogart-Scott (129,220) hacen referencia a la formación "in vitro" de inmunoprecipitados que se producen en los orificios, oral, excretor y anal de las larvas de T. canis cuando son mantenidas "in vitro" en presencia de suero de animales o pacientes infectados. Al incubar las larvas de T. canis con sueros de conejos infectados por T. canis o T. cati se producían también estos inmunoprecipitados. Al repetir la experiencia, pero con larvas de T. cati el resultado fue el mismo. Sin embargo las larvas de Toxascaris leonina no reaccionaban "in vitro" y no eran capaces de estimular el desarrollo de anticuerpos homólogos que reaccionaran de forma cruzada (132). Es pues imposible de distinguir, utilizando ASE y técnicas serológicas habituales (EIA) si es una u otra especie la responsable de la producción de anticuerpos, con lo que resulta imposible asegurar si el hospedador está parasitado por T. canis o T. cati (160).

### II.5.3.3. Respuesta inmune del hospedador

La efectividad de la respuesta inmune desarrollada por el hospedador paraténico infectado por Toxocara canis, está sujeta a diversos factores, unos intrínsecos al hospedador (estado del sistema inmunitario, raza, factores genéticos) y otros que dependerán de la cantidad de formas infestantes ingeridas (153). Uno de los datos hematológicos más importantes en la infección por T. canis es el aumento del número de leucocitos, debido fundamentalmente a un incremento en el número de eosinófilos en sangre periférica desde las primeras semanas de la infección, y su mantenimiento durante largos periodos de tiempo (8,101,151,152,202).

La eosinofilia, común a numerosas helmintosis, se había considerado hasta hace poco como una manifestación secundaria de alergia de tipo I. Recientemente se ha demostrado que su control e influencia en las reacciones parasitarias es más complejo (20).

Se ha observado que en la membrana externa del eosinófilo hay receptores de superficie para algunas inmunoglobulinas (IgG e IgE) y complemento (C3b), y que estos receptores se hallan aumentados en pacientes con eosinofilia de etiología conocida (helmintosis), si se comparan con los receptores de membrana de los eosinófilos de individuos sanos (20). La existencia de un receptor Fc para IgG, en la superficie de la célula, puede servir de medio por donde el eosinófilo puede envolver el antígeno reconocido por el Fab final de la IgG. Existen evidencias de que los eosinófilos también tienen receptores para IgE aunque de menor afinidad.

La inducción experimental de eosinofilia en ratón así como la acción de los eosinófilos sobre la superficie larvaria de T. canis ha sido ampliamente descrita por diversos autores (75,139,178,228,245,294,295,299,300,302,303).

El eosinófilo, considerado como célula efectora principal de la inmunidad celular frente a infecciones por helmintos, actúa de forma citotóxica para las larvas II de T. canis mediante adherencia a la superficie del parásito y posterior degranulación (253). Aunque carezca de acción fagocítica, por mediación de C3b e IgG antiparasitario la unión de los leucocitos al parásito se intensifica (139). Durante su adherencia y posterior degranulación, los eosinófilos depositan una serie de sustancias en la superficie del parásito, reconocidos como helmintotóxicas, lo que hace comparar su actuación a las células Killer (315). Para que los eosinófilos adquieran esta función de célula Killer, es necesario la presencia de IgG o IgE (42).

Las larvas II de T. canis provocan en el hospedador paraténico una respuesta inmunocelular con aumento de la eosinofilia periférica y formación de granulomas eosinofílicos que rodean las larvas, mediada por los linfocitos T (152), sobre los que el ASE induce blastogénesis (106).

En ratones infectados experimentalmente se observó la existencia de dos formas de eosinofilia, una que dependía de los linfocitos T y otra independiente, si bien se desconoce si esta eosinofilia independiente de la célula T está regulada por linfocitos B o macrófagos (295).

La inducción de la eosinofilia se produce siempre en presencia de complemento (78). Utilizando un modelo experimental murino y previa separación del ASE en cuatro fracciones antigénicas, mediante filtración en gel, se observó en una de ellas propiedades antigénicas y alergénicas, siendo capaz de activar el complemento e inducir eosinofilia, en comparación con las otras fracciones restantes (299). En cambio cuando se utilizan extractos antigénicos de adultos, no se observa un incremento en la

eosinofilia (294). El grado de eosinofilia no siempre correspondía a un incremento en la tasa de IgE y se observó que la eosinofilia variaba según la raza de ratón estudiado. Estas diferencias son debidas a factores genéticos que posiblemente estén regulados por más de un gen (300).

Los estudios histopatológicos realizados en ratones infectados por T. canis indican que la larva provoca en el hospedador una respuesta mediada por células y manifestada por la formación de un granuloma eosinofílico. Sin embargo no hay evidencia de que esta respuesta celular sea efectiva para llegar a conseguir matar la larva. Con respecto al fenómeno ya citado anteriormente de la observación de granulomas vacíos adyacentes a otros ocupados por la larva se ha especulado si la larva, rehuendo la respuesta inmune del huésped, inicia la formación de un primer granuloma para luego escapar y establecerse en otro lugar (155). Mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha podido detectar en el interior del granuloma la presencia de ASE en ausencia de la larva y también presencia de exoantígenos larvarios en el trayecto realizado por la larva.

Los estudios realizados "in vitro" respecto la viabilidad de las larvas en presencia de eosinófilos, complemento e inmunoglobulinas específicas han mostrado que estas no resultan dañadas y que la mayoría de las veces escapan a la unión eosinófilo-parásito (75, 139). "In vivo" es posible que otras células, (macrófagos activados por linfocitos T) de las que se desconoce su toxicidad frente las larvas, sean capaces de dañarlas .

#### II.5.3.4. Pruebas serológicas.

Durante los últimos 20 años se ha realizado un gran progreso en cuanto al desarrollo de procedimientos inmunológicos y ensayos de técnicas para el diagnóstico de la Toxocarosis.

Esto ha incidido de forma directa tanto en el diagnóstico individual de esta parasitosis como en estudios epidemiológicos. La sensibilidad de la técnica empleada y la especificidad de los antígenos utilizados son dos factores importantes para la correcta realización del serodiagnóstico de la Toxocarosis.

Las principales técnicas que se han ensayado tanto en animales de experimentación como en el hombre son: pruebas cutáneas (48, 141, 142, 320-322); pruebas serológicas entre las que podemos destacar la floculación con bentonita (100, 148), hemaglutinación indirecta (7, 100, 148, 167, 179, 262), inmunofluorescencia (30, 166), precipitación en gel de agar (132, 166, 262, 322), test de precipitación larvaria (132, 168, 169, 198), difusión en gel (100, 121, 148, 168, 169, 246), contrainmunolectroforesis (CIE) (121, 179), inmunolectroforesis (185, 254), radioinmunoensayo (RIA) (229, 263), radioinmunoabsorbente (PRIST), radioinmunoalergeno (RAST) (89, 90, 274, 308) y enzoinmunoensayo (EIA y DOT EIA) (58, 86, 100, 117, 165, 181, 192, 264, 267, 270, 326).

La sensibilidad y especificidad de la técnica EIA en la determinación de IgG anti - Toxocara ha sido ampliamente demostrada por diversos autores (100-102, 104, 180, 264, 308) tanto utilizando antígeno de secreción-excreción como antígeno crudo somático a partir de huevos embrionados o larvas II. Sin embargo la sensibilidad de la técnica en la determinación de IgE específicas es baja, debido a la baja concentración de estas inmunoglobulinas en suero, por lo que la técnica que mayor sensibilidad ofrece es RAST (38, 39, 85-88).

#### II.5.3.5. Detección de antígeno e inmunocomplejos circulantes en suero

La Toxocarosis provoca en el hospedador paraténico una respuesta inmune que suele ser muy variable. Debido a ello en

muchas ocasiones la detección de anticuerpos en sangre no soluciona el problema diagnóstico de esta parasitosis.

Las reacciones cruzadas que se pueden producir con otras nematodosis (33,160,208,239,246,277,278,289), según el antígeno empleado, así como las reacciones inespecíficas debidas a la presencia de anti A y anti B de tipo IgG (276) e IgM, anti IgG (Factor reumatoide) (136) y proteína C reactiva (255,298), influyen en que un diagnóstico definitivo de la enfermedad sea difícil a no ser que se recurra a la visualización del parásito en material procedente de biopsia o post-mortem.

Una buena sensibilidad y especificidad de las técnicas utilizadas es particularmente importante en los casos de Toxocarosis ocular, en que las tasas séricas de IgG específicas (267), suelen ser bajas o nulas. El estudio de anticuerpos "in situ", mediante aplicación de las técnicas de inmunodifusión radial, EIA y RAST, en humor acuoso y vítreo, han demostrado una sensibilidad mayor que los estudios serológicos realizados con estas mismas técnicas (28,89,102).

La determinación de inmunocomplejos en humor acuoso podría aportar grandes ventajas en el diagnóstico de LMO, así como la detección de antígeno soluble en el suero del paciente (2).

La detección de antígeno circulante en ratones (36), mediante un EIA directo, indica que existe una relación directa entre el número de huevos ingeridos y la cantidad del antígeno circulante. Matsumura et al (197) detectan antígeno circulante en suero de perros hallando una correlación entre los títulos de IgM y las concentraciones de antígeno circulante obtenidas, lo que podría sugerir que la inmunoestimulación está mantenida debido a la producción de ASE por parte de las larvas, incluso cuando la infección es

crónica, como ocurre en perros mayores de un año. Sin embargo este modelo no puede extrapolarse a la Toxocarosis humana, puesto que estos datos fueron obtenidos en hospedadores en los que el ciclo del parásito es entérico-neumo-enterico, mientras que en el hombre es entérico-neumo-somático (2).

La determinación de inmunocomplejos como monitorización de la quimioterapia de la Toxocarosis experimental ha sido ensayada en conejos (1,55) observando que como resultado del tratamiento con Mebendazol se produce una elevación del título de anticuerpos negativizándose el de inmunocomplejos específicos circulantes.

La aplicación de la técnica EIA sandwich, utilizando un anticuerpo monoclonal, para detectar la presencia de inmunocomplejos, puede también ser válido para estudiar la dinámica de la relación huésped parásito, puesto que la detección de anticuerpos puede presentar títulos residuales durante largos periodos (1).

## II.6. TRATAMIENTO DE LA TOXOCAROSIS

### II.6.1. TOXOCAROSIS HUMANA

La Toxocarosis es una parasitosis que tiene un pronóstico favorable y que la mayoría de las veces no requiere tratamiento. Solamente en casos agudos donde hay afectación de pulmón, miocardio y ojos está indicada la quimioterapia.

#### II.6.1.1. Tratamiento de la larva migrans visceral (LMV)

a) Dietil carbamazina: fármaco a menudo utilizado, en ratón ha dado buenos resultados al reducir el número de larvas en tejidos, pero en el hombre no se ha podido comprobar su efectividad.

b) Tiabendazol: Tiene un efecto larvicida bajo, pero produce una marcada inhibición de la migración larvaria. Hecho este que ya puso de manifiesto Yalçinkaya (327) observando que cuando trataba los ratones con Tiabenzadol antes de la infección, se producían únicamente lesiones hepáticas. La mayoría de las larvas quedan retenidas en el hígado evitando así su posterior migración hacia órganos como ojos, cerebro y musculatura (5). En un sistema murino se observa que después de la administración del fármaco hay un descenso en la actividad metabólica del parásito. Sin embargo se siguen produciendo pequeñas cantidades de sustancias de secreción, y por lo tanto la producción de anticuerpos. No obstante, se observa un brusco descenso en el título de inmunocomplejos circulantes (1).

En estudios realizados en el hombre, al comparar la eficacia terapéutica del mebendazol con el tiabendazol,

los resultados hallados sugieren que no hay diferencia entre ambos fármacos como tampoco se hallan diferencias, antes y después del tratamiento, en el título de eosinofilia, IgE totales, e IgE específicas (188).

c) **Fenbendazol**: Fármaco que es frecuentemente usado en perros debido a su eficacia como larvicida. Sin embargo hay un caso descrito de un niño tratado con Fenbendazol en el que se pudo observar que algunos parámetros sanguíneos (leucocitosis, eosinofilia y VSG) decrecían alcanzando la normalidad al año después del tratamiento (319).

#### II.6.1.2. Tratamiento de la larva migrans ocular (LMO)

En los casos de afectación ocular se suele administrar además de Tiabendazol o dietil-carbamazina un corticosteroide a fin de disminuir la reacción inflamatoria producida por la larva, principal causa de la patología producida. Los esteroides se suelen administrar por vía sistémica o por vía oral.

La Vitrectomía para evitar el desprendimiento de retina está muchas veces indicada.

La Fotocoagulación es un método eficaz en lesiones localizadas y aisladas.

#### II.6.2. **TOXOCAROSIS CANINA**

Si bien todos los fármacos anteriormente señalados mejoran los síntomas de la Toxocarosis, ninguno de ellos llega a eliminar las larvas definitivamente del huésped. Es pues necesario, como medida profiláctica para evitar la infección

en el hombre, eliminar las formas adultas de los perros. Para ello podemos recurrir a dos tipos de fármacos: a) los que van encaminados a eliminar las formas adultas del parásito y b) aquellos que eliminan las larvas somáticas.

a) Fármacos para eliminar formas adultas

- \* Pamoato de pirantel
- \* Levamisol
- \* Mebendazol

Se suelen administrar en cachorros (a las 2 semanas de su nacimiento) y a las madres. También a perros adultos.

b) Fármacos para eliminar formas larvarias somáticas

- \* Fenbendazol

Se administra a perras gestantes (40 días después del embarazo) y 15 días después del parto evitando así la infección transplacentaria y transmamaria.

- \* Albendazol

Que se halla en fase de experimentación (63).

Es importante resaltar que el hecho de eliminar en perras gestantes las formas larvarias, disminuiría mucho la prevalencia de la Toxocarosis en cachorros.

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

### III.1 PUESTA A PUNTO DE UNA TECNICA E.I.A PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE TOXOCAROSIS.

#### III.1.1. PREPARACION DEL ANTIGENO

Para la obtención y preparación del antígeno nos basamos en las técnicas descritas por Fairbairn (74) y De Savigny (4).

##### III.1.1.1 Obtención de los huevos de Toxocara canis

Las formas adultas de T. canis se recogen de las heces de perro infectados previa administración de piperazina (Neox<sup>R</sup>) a una dosis de 8 cc (aproximadamente 0.800 gr de piperazina), o de pamoato de pirantel (Trilombrin<sup>R</sup>) a la dosis de 2,5 cc de suspensión, equivalente a 125 mg de droga, en cachorros de 1 a 3 meses de edad, preferentemente.

En otras ocasiones los helmintos vivos se han extraído directamente del intestino delgado de animales sacrificados en el servicio de zoonosis local.

Una vez extraídos los ascáridos, los machos se desechan y las hembras bien desarrolladas se lavan repetidas veces con solución salina, diseccionandose lo más rápidamente posible; en el caso de que por alguna causa se deba esperar para ello uno o dos días, es conveniente guardarlas en formol al 1% y a 4°C. Seguidamente se procede a realizar la histerectomía de cada hembra, seleccionando solamente el tercio final del útero, donde se hallan los huevos bien desarrollados y fértiles. La viabilidad de los huevos se comprueba observándolos a la lupa binocular, considerándose fértiles aquellos que tienen una célula huevo bien desarrollada o que

ha iniciado ya su división, con escasos blastómeros o en fase de mórula. Se reconocen como huevos no fértiles, aquellos que tienen una forma irregular y que en su interior no tienen una célula huevo diferenciada.

Las fracciones del útero procedentes de las diferentes extracciones se colocan en una placa de Petri con solución salina y se intenta extraer los huevos, que de forma espontánea no han salido al exterior, ejerciendo una ligera presión con la ayuda de una aguja emangada. Si la observación a la lupa muestra que quedan huevos dentro de las fracciones uterinas se puede proceder a una digestión con solución ácido péptica (1% de pepsina + 5% de ácido clorhídrico en agua destilada) a 37°C, en un agitador magnético, durante 2 horas. Una vez los úteros digeridos se diluye la solución al 1/10 con agua destilada y se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 3 minutos. El sedimento se lava otras tres veces, hasta que se eliminan los restos de solución ácido péptica que hayan podido quedar. Después del último lavado los huevos se resuspenden en formalina al 1% y se colocan en una placa de Petri durante 21-28 días a temperatura ambiente.

#### III.1.1.2 Embrionamiento y desarrollo de las larvas II.

Los factores que influyen en el buen desarrollo del huevo hasta la formación de la larva II infestante son diversos.

- a) **Medio de embrionamiento:** Trabajos experimentales realizados por diversos autores muestran que el medio en que embrionan los huevos no influye de forma ostensible en su desarrollo posterior, su función debe ser evitar posibles contaminaciones durante el proceso y no dañar la cubierta del huevo a fin de que el embrión no sufra degeneraciones. Sandars (259) observa que el

formaldehído al 10% no altera el proceso; Oshima (226) utiliza formaldehído al 0,5%; Pitts (237) con huevos de Ascaris suum emplea solución salina; Fairbairn (74) emplea ácido sulfúrico 0.1 N. Los ensayos realizados por González (112) muestran que no existen diferencias significativas entre utilizar solución salina, formaldehído al 0.1%, solución de Ringer-lactato, tampón fosfato (PBS), ácido clorhídrico 1N ó tintura de mertiolato a 1:10000. Por lo general cualquier medio es apto a excepción de glicerol y parafina líquida, citados por Jablonowski et al (143).

- b) **Tiempo y temperatura.** El tiempo de embrionamiento varia según los autores aunque no suele ser superior de los 40 días. Kayes y Oaks (150), Marval y De Marval (191) tardan entre 20 y 40 días. En datos aportados por Olson (220) el embrionamiento se consigue entre 40 a 100 días, González (112) realiza el proceso entre 10 y 20 días a 37°C, Guillen et al (118) alcanza el 100% del embrionamiento en solución salina a los 32 días y a 37°C.

Las temperaturas óptimas del embrionamiento puede variar. Olson (220) lo lleva a cabo a temperatura ambiente durante 40 días, Fairbairn (74) embriona los huevos de Ascaris suum a 30°C en 20 días, Guillen et al (118), Cuellar et al (56), González (112) y Smith (283) obtienen larvas II incubando a 37°C.

En este trabajo se ha realizado todo el proceso de embrionamiento a temperatura ambiente (20-22°C). A esta temperatura a los 20-21 días se obtuvo un 90% de embrionamiento.

- c) **Efecto de la luz.** La luz actúa como factor limitante en el desarrollo larvario. La incubación de huevos viables

de T. canis en solución salina a 37°C, en presencia y ausencia de luz, muestra la importancia de este factor en la correcta evolución del huevo. En ausencia de luz el proceso no se completa, se llega a la fase de mórula pero a partir de este estadio el embrión sufre una degeneración, no llegando a formarse la larva. A los 32 días de incubación y en presencia de luz el 100% de los huevos contienen una larva móvil en su interior (77,118).

### III.1.1.3. Decorticación

Una vez que han embrionado entre el 80-90% de los huevos se procede a la eliminación de la cubierta quitinosa para facilitar la eclosión. La suspensión de huevos embrionados se centrifuga 3 minutos a 3.000 r.p.m., con el fin de eliminar el medio de embrionamiento. El sedimento se lava con agua destilada y centrifuga 3 minutos a 3.000 r.p.m., repitiéndose esta operación de lavado 3 veces más. Después del último lavado se resuspende el sedimento con solución decorticadora (2% NaOH en 1:1 solución de hipoclorito sódico al 6%) a razón de 1 ml de suspensión de huevos en 20 ml de solución, manteniéndose a 37°C, con ligera agitación, durante aproximadamente 20 minutos. Durante este período se controla el proceso al microscopio. Una vez que se observa la decorticación completa, en casi la totalidad de los huevos, se centrifuga la suspensión 3 minutos a 3.000 r.p.m., para eliminar la solución decorticadora y se realizan de 3 a 5 lavados con agua destilada, centrifugándose cada lavado 3 minutos a 3.000 r.p.m.

La decorticación es un proceso que ayuda en la posterior eclosión de las larvas pero que no es indispensable. Fairbairn (F1) estudia en paralelo la eclosión de huevos

decorticados y sin eclosionar, hallando que los huevos sin decorticar también pueden eclosionar "in vitro", pero en un periodo de tiempo mayor.

#### III.1.1.4. Eclosión y aislamiento de larvas II.

La eclosión, "in vivo", se inicia en el estómago de 3 a 8 horas después de ingerir los huevos infestantes y prosigue en el intestino delgado. Se lleva a cabo condicionada por tres factores: físico, mecánico y químico (286). El aumento de la temperatura hasta 37°C o por encima, debido al paso del huevo del medio externo al tubo digestivo, es uno de los primeros factores físicos que actúan. El segundo factor, el mecánico, viene dado por la presión ejercida sobre el huevo a causa del peristaltismo intestinal. En cuanto al tercer factor, el químico, algunos autores estiman que los jugos pancreáticos e intestinales no intervienen en el proceso de la eclosión y sostienen que este se lleva a cabo por desencadenamiento de reacciones enzimáticas (quitinasa, estearasa, proteasa) de las larvas (215). Otros autores como Ibragimov (140) contradicen esta opinión confirmando la acción de los jugos gástricos.

"In vitro", el estímulo para la liberación de quitinasa y probablemente otras enzimas, en el interior del huevo, proviene de factores externos. Es necesario que haya un bajo potencial de óxido-reducción y un abundante suplemento de óxido de carbono fresco. Bajo estas condiciones se digiere un pequeño agujero en la cubierta quitinosa por donde la membrana vitelina produce una pequeña burbuja, donde se inserta la región apical de la larva infestante, rompiéndola por último para salir a través de ella (74).

La técnica descrita por Fairbairn (74) para la eclosión de huevos de Ascaris suum, "in vitro", y utilizada en parte el presente trabajo consiste:

A 0.5 ml de la suspensión de huevos decorticados, procedentes del último lavado, se añade 1 ml de cloruro sódico 0.25 M que contenga 0.0025% Tween 80 y 0.1 M de clorhidrato de cisteína, como agente reductor. Al conjunto se le adiciona 1 ml de solución 0.1 M de bicarbonato sódico, previamente gaseado con una mezcla de N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (95%-5%). Hay que tener la precaución de añadir el agente reductor antes que el bicarbonato sódico.

La suspensión se coloca en un frasco de Gas-pak (Oxoid) a 37°C en atmósfera de N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> durante un par de horas.

Transcurrido este tiempo se agita enérgicamente la suspensión en un "mixer" (Heidolph REAX 2000) durante 30 segundos, se controla, el índice de eclosión mediante observación a la lupa, después de dejar la suspensión en reposo a 37°C durante 15 minutos aproximadamente. Transcurrido este tiempo se vuelve a agitar enérgicamente hasta observar un índice de eclosión de un 60-70%.

La suspensión larvaria obtenida se lava 3 veces con solución salina equilibrada de Hanks adicionada de 100 ui/ml de penicilina y 250 mcg/ml de estreptomina. Seguidamente se procede a separar las larvas vivas de las muertas empleando el método de Baermann.

Sobre el caño de un embudo de vidrio de 12 cm de diámetro se adapta un tubo de goma cerrado por una pinza (de Mohr o Kocher). Se coloca la suspensión larvaria en solución salina de Hanks en un colador metálico tapizado con una capa de gasa y una capa de papel tipo "Kleenex". Se deposita el colador en el embudo que se llena de solución de Hanks a 37°C hasta que el nivel del líquido llegue a contactar con la suspensión.

Transcurrido de 2 a 3 horas, se abre la pinza y se recoge un par de ml de la suspensión, en un tubo de centrífuga, donde se hallan las larvas vivas que han descendido por el tubo, separadas de las muertas, huevos no eclosionados y restos de cubiertas.

El método descrito por Fairbairn (74) se considera estándar en la eclosión de huevos de ascáridos, para la posterior obtención de larvas vivas, sin embargo, nuestra experiencia nos indica que es un proceso de larga ejecución y la eclosión de los huevos es muy irregular de unos lotes a otros, sin que podamos saber la causa, oscilando desde un 5% a un 80%. Como alternativa, para subsanar estas irregularidades, ya señaladas por otros (283), en el proceso de la eclosión se ha ensayado otro método, utilizado por Oaks y Kayes (214) y más recientemente por Smith (283). Este consiste en ejercer sobre los huevos, una vez decorticados, una serie de presiones de tipo mecánico, valiéndose de un homogenizador de tejidos.

Con el último lote de huevos obtenidos se ha ensayado este método de eclosión utilizando 2 homogenizadores distintos, homogenizador I (Afora ref. V.15.445 n°10) y homogenizador II (Anorsa ref. X.4245).

El homogenizador I tiene un tubo esmerilado y una mano esmerilada que se adapta al tubo en toda su longitud (Figura 7A). En cambio el homogenizador II consta de un tubo de fondo redondo y de una mano, de base esmerilada, que encaja únicamente con el fondo del tubo (Figura 7B).

Con el homogenizador I se han practicado 4-5 sacudidas verticales de la mano y con II 10-12 presiones semicirculares.

El índice de eclosión que se ha observado al utilizar tanto uno como otro homogenizador ha oscilado entre un 85-90%.

Se han separado las larvas vivas de las muertas y huevos sin eclosionar mediante el método de Baermann. Las larvas recuperadas se han colocado en tubos con Medio mínimo esencial, (MEM) tal como se indicará en el apartado III.1.1.5., y se han incubado a 37°C y controlado su movilidad y el % de mortalidad.

Se ha observado que las larvas cuya eclosión se ha realizado utilizando el homogenizador I han tenido un gran índice de mortalidad que ha ido creciendo con el transcurso del tiempo hasta llegar a ser del 100% a las 4 horas post-eclosión. Por el contrario, aquellas que han eclosionado al utilizar el homogenizador II se hallaron en buen estado, con índice de mortalidad bajo (inferior al 5%) y buena movilidad.

Se supone que la mayor área esmerilada que presenta el homogenizador I y la mejor adaptación entre el tubo y la mano, lo cual le dota de una mayor eficacia, ha podido dañar a las larvas que mueren al poco tiempo de su eclosión.

#### III.1.1.5 Obtención del antígeno de secreción-excreción (ASE). Cultivo larvario.

Las larvas recogidas por el método de separación de Baermann no requieren nuevos lavados, se colocan directamente en un medio de mantenimiento definido Medio mínimo esencial de Eagle (MEM) con sales de Hanks y 100 ui/ml de penicilina y 250 mcg/ml de estreptomycin. Para ello se han utilizado tubos de rosca de 10x10 y en cada uno se ha colocado 5 ml de MEM, para una concentración larvaria de  $1 \times 10^4$  larvas/ml.

Transcurridos 7 días se ha observado la mortalidad y la posible contaminación. Los cultivos contaminados, normalmente por hongo, se han desechado, así como aquellos que tenían más de un 5% de mortalidad larvaria. A los tubos en buen estado

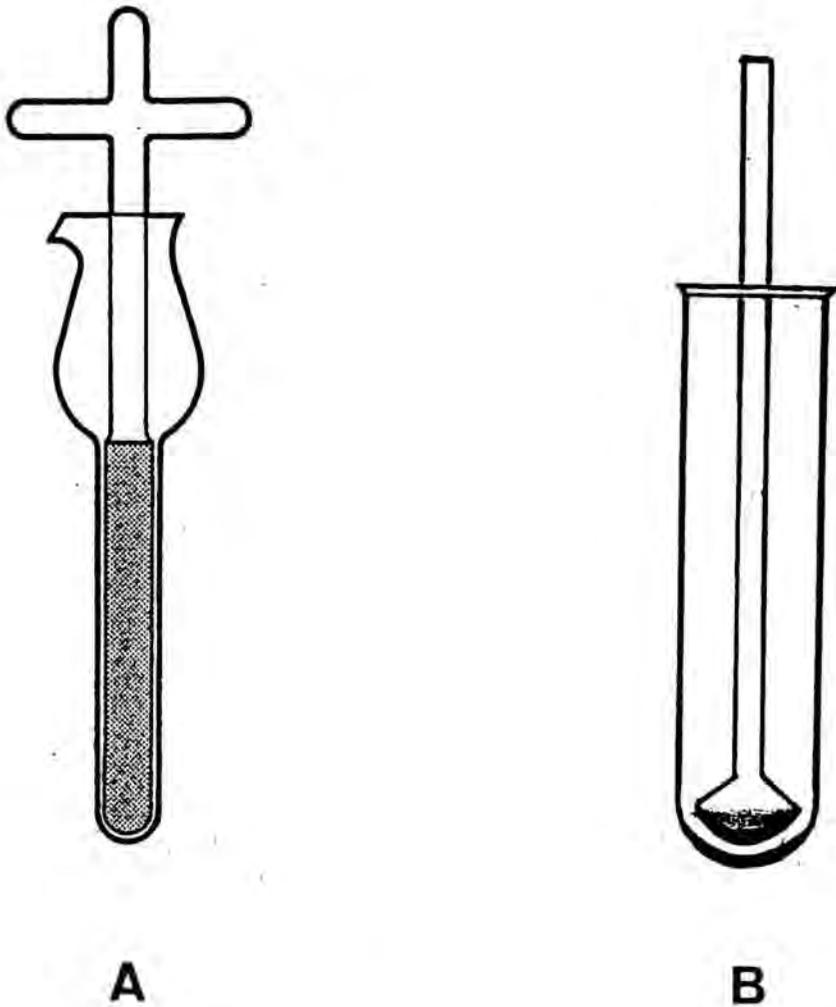


Figura 7. Homogenizadores ensayados en la eclosión de huevos de Toxocara canis.

A. Homogenizador I

B. Homogenizador II

se les ha aspirado el sobrenadante, asépticamente, utilizando una pipeta Pasteur, y remplazado el mismo volumen de medio fresco. El sobrenadante obtenido de todos los cultivos se ha juntado y centrifugado, 3 minutos a 3.000 r.p.m., con el fin de separar las posibles larvas que se hayan podido aspirar y almacenado a -20°C, hasta reunir un volumen suficientemente grande, entre 200 y 300 ml, para dializar y concentrar.

Las larvas se pueden mantener viables en cultivo durante largos periodos de tiempo (261,262). En nuestro estudio se consiguió una supervivencia de las larvas de T. canis en cultivo de hasta 14 meses; Savigny (261) habla de hasta 18 meses.

#### III.1.1.6. Preparación del antígeno.

- A). Diálisis. Los sobrenadantes obtenidos de los cultivos larvarios y almacenados a -20°C se han transferido a un tubo de diálisis de unos 2 cm de ancho y dializado frente a un volumen 5 veces mayor de agua destilada, a 4°C, cambiando el agua 4 o 5 veces a intervalos de tiempo de 8 horas.
- B) Concentración. Con el fin de concentrar el antígeno de secreción-excreción obtenido, para su posterior valoración proteica se ha dializado frente a goma arábica durante 2 días a 4°C, hasta obtener un concentrado de 3 a 4 veces el volumen inicial.
- C) Determinación de la concentración proteica. La concentración proteica se ha determinado mediante el método de Bradford (Bio-Rad protein assay). En este trabajo se han valorado 2 lotes distintos de antígeno, procedentes de distintos cultivos, hallándose las siguientes concentraciones proteicas.

Lote	Concentración proteica mcg/ml
I	6,2
II	25

El antígeno valorado se ha fraccionado en alícuotas y conservado en nitrógeno líquido. Para el desarrollo de la técnica EIA y de todas las determinaciones posteriores se ha utilizado el lote II.

D) Cálculo de la concentración antigénica a fijar en la placa. Una vez el antígeno valorado, se ha procedido a su fijación en la placa. Hay una serie de factores a tener en cuenta, con respecto a la adsorción de proteínas en fase sólida, para el posterior desarrollo de una técnica inmunoenzimática, que son la estabilidad de la unión y la concentración. La fijación del antígeno a la placa se realiza por adsorción física directa mediante fuerzas electrostáticas formándose una monocapa. Su estabilidad depende de la fuerza de esta unión.

Una concentración elevada de antígeno puede producir una ligera interacción proteína-proteína generando el efecto "hook" (232), mientras que una concentración de antígeno insuficiente puede disminuir la sensibilidad del EIA, así como la detección de anticuerpos de baja afinidad (190).

La determinación de la concentración óptima de antígeno a fijar en la placa se ha calculado mediante el método de saturación con peroxidasa (PO) (213). Dicha técnica consiste en la adsorción en la placa de distintas concentraciones de antígeno, incubación frente a un exceso de PO y medición de su actividad enzimática mediante un substrato revelador.

La actividad mide los lugares de la superficie del poliestireno que no han quedado tapizados por el antígeno, lo que permite hacer una valoración del grado de adsorción, y calcular la concentración antigénica adecuada para que no queden huecos.

La técnica de saturación con PO también permite controlar la eficacia del bloqueo con seroalbúmina bovina (BSA) al 1%.

Otra ventaja de esta técnica es que al no utilizar ningún antisuero control, se evita cualquier dependencia de los artefactos derivados de la afinidad de anticuerpos.

Se han ensayado distintas concentraciones antigénicas, que oscilan entre 8 mcg/ml y 0.25 mcg/ml de proteína. El antígeno se ha diluido en PBS pH 7.2 (BioMerieux) e incubado durante una noche a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se ha añadido 100 mcl/pozo de PO a la concentración de 100 mcg/ml e incubado durante 3 horas en cámara húmeda y a temperatura ambiente. La dilución de PO (Sigma IV, 330 U/mg) se ha realizado a partir de una solución madre de 0.5 mg/ml en PBS, cuya concentración se ha controlado por DO a 403 nm, usando un valor de:

$$E^x_{403} = 17.5$$

Después de descartar los incubados, las placas se han lavado 3 veces con 200 mcl de PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T) y una vez con 200 mcl de PBS. Luego se ha añadido 200 mcl de substrato revelador 3-metil-2 benzotiazolinona hidrazona (MBTH) y ácido 3-(dimetilamino) benzoico (DMAB) (212) e incubado 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción enzimática se ha detenido con  $SO_4H_22N$  y leído la densidad óptica (DO) a 600 nm.

Las DO obtenidas para cada una de las concentraciones utilizadas se expresan en la Tabla 4, en la que también se muestran las DO obtenidas al bloquear con BSA al 1%.

Conc. antígeno mcg/ml	DO <sub>600</sub> sin bloquear	DO <sub>600</sub> bloqueo BSA 1%
0.25	1.139	0.140
0.5	0.741	0.088
1	0.372	0.143
2	0.266	0.154
4	0.310	0.143
8	0.317	0.183

Tabla 4. Técnica de saturación con PO.  
DO<sub>600</sub> obtenidas a las distintas concentraciones antigénicas ensayadas en placas bloqueadas (BSA-1%) y sin bloquear.

Observamos que a medida que aumenta la concentración proteica de la solución antigénica disminuye la DO<sub>600</sub>, llegando a un punto en que se puede considerar constante

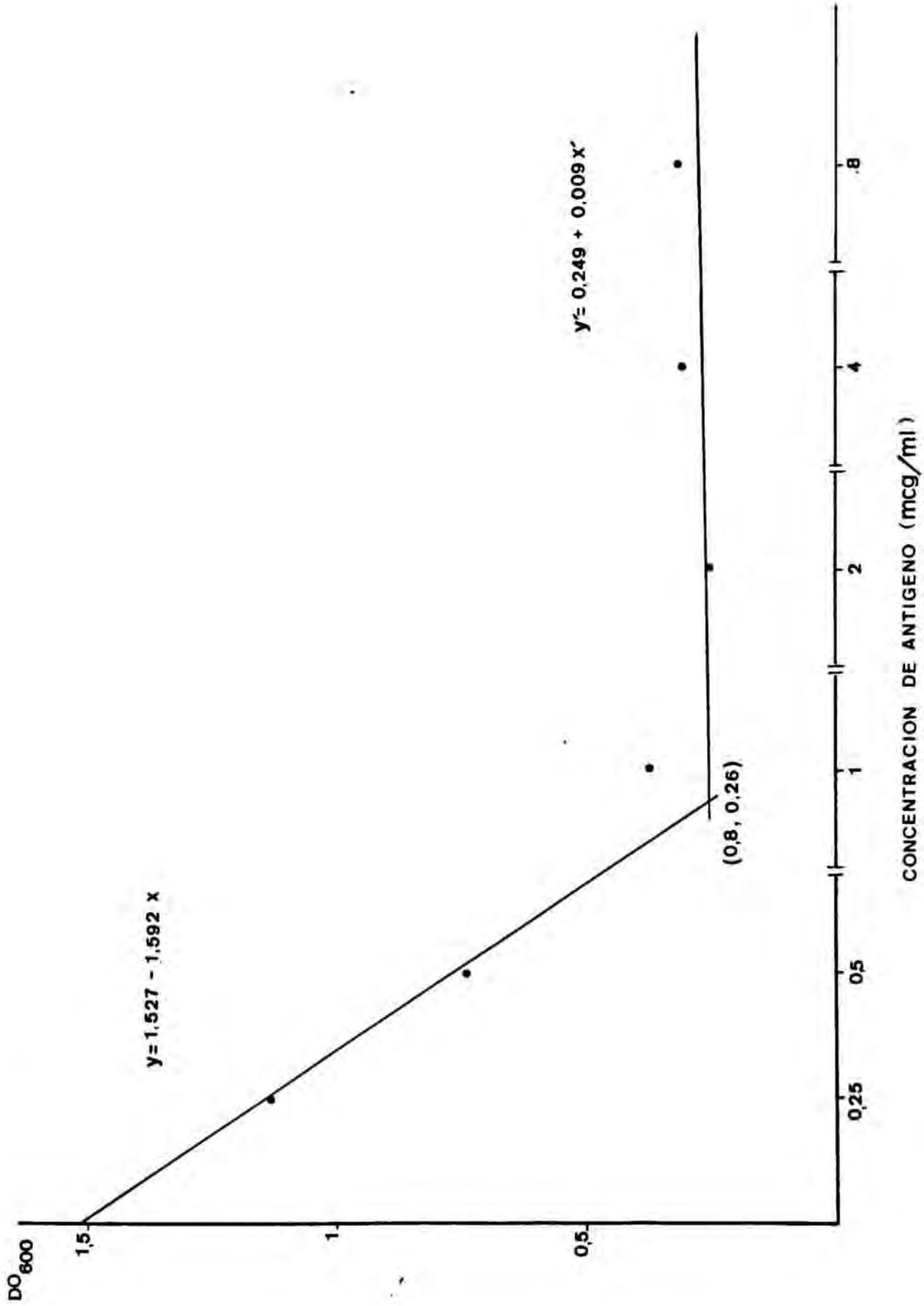


Figura 8. Cálculo de la concentración óptima de ASE a fijar en la placa mediante el método de PO.

al ser mínimas las variaciones de DO observadas. Por otro lado los valores de DO<sub>600</sub> obtenidos en la placa bloqueada son mucho más bajos e independientes con respecto a la concentración antigénica. El bloqueo no ha dejado sitios libres en la superficie de la placa por lo que no habrá riesgo de unión inespecífica al plástico durante EIA.

La concentración exacta de saturación de antígeno se ha determinado mediante las intersecciones de las rectas de regresión correspondientes a las DO obtenidas a bajas y altas concentraciones de antígeno. Como se indica en la Figura 8 las rectas de regresión vienen representadas por las siguientes ecuaciones:

$$y = 1,527 - 1,592x$$

$$y' = 0,249 + 0,009x'$$

Cuya intersección en el punto (0,8;0,26) da una concentración antigénica de 0.8 mcg/ml de proteína, por lo que a efectos prácticos se ha utilizado la de 1 mcg/ml.

#### III.1.1.7 Recuperación y reutilización del ASE en la sensibilización de placas para EIA.

Una vez el antígeno valorado y establecida la concentración antigénica a fijar en la placa (1mcg/ml para el lote II de antígeno) se ha ensayado la pérdida que sufre su capacidad antigénica una vez adsorbido a la placa. Para ello la solución antigénica se ha recuperado y reutilizado cuatro veces consecutivas. Con cada una de las cinco placas así obtenidas se han ensayado dos sueros patrón, a los que nombramos control I y control II, a distintas diluciones, frente a diferentes diluciones de conjugado. La pauta seguida

Dil. Suero 1/400 1/800 1/1600 1/3200 1/6400 1/12800 1/25600 1/51200 1/102400 1/204800 1/409600  
 Conjugado

1/1000	CI	>2	>2	>2	>2	>2	1.776	1.772	1.697	1.431	1.586	1.445
	CII	1.745	1.750	1.738	1.724	1.586	1.449	1.376	1.237	1.072	1.021	1.044
1/2000	CI	>2	>2	>2	>2	>2	>2	1.573	1.248	1.140	1.058	1.014
	CII	>2	>2	>2	1.805	1.329	0.830	0.603	0.603	0.446	0.382	0.281
1/4000	CI	>2	>2	>2	>2	1692	1396	0.910	0.910	0.468	0.473	0.396
	CII	>2	>2	1.733	1.482	1.131	0.708	0.551	0.551	0.405	0.323	0.305
1/8000	CI	1.650	1.659	1.649	1.640	1.559	1.474	1.089	0.671	0.399	0.351	0.250
	CII	1706	1710	1669	1484	0.824	0.693	0.237	0.246	0.136	0.107	0.109
1/16000	CI	1550	1588	1464	1376	1223	1012	0.682	0.444	0.373	0.220	0.193
	CII	1610	1522	1365	0.979	0.662	0.467	0.246	0.164	0.101	0.048	0.020
1/32000	CI	0.987	0.999	0.807	0.696	0.439	0.608	0.475	0.345	0.165	0.135	-0.108
	CII	0.999	0.912	0.706	0.514	0.396	0.286	0.161	0.077	0.044	0.024	0.091
1/64000	CI	0.702	0.695	0.628	0.609	0.594	0.447	0.310	0.261	0.183	0.151	0.059
	CII	0.620	0.552	0.454	0.363	0.266	0.235	0.100	0.055	0.035	0.005	0.067

Tabla 5. DO<sub>600</sub> obtenidos con ASE viregn.  
 CI y CII: sueros control I y II.

Dil. conjugado	suero	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	1/204800	1/409600
1/1000	CI	>2	>2	1997	>2	>2	>2	1.959	1.805	1.524	1.721	1.794
	CII	1.824	1827	1.681	1.542	1.286	1.347	1.043	0.930	0.952	1.138	1.288
1/2000	CI	>2	>2	>2	>2	>2	>2	1.563	0.996	0.597	0.776	0.820
	CII	>2	>2	>2	1.734	1.227	0.804	0.463	0.278	0.158	0.102	0.142
1/4000	CI	1.818	>2	>2	>2	>2	1.681	1.245	0.773	0.515	0.652	0.482
	CII	>2	>2	1.754	1.554	1.087	0.623	0.391	0.229	0.128	0.091	0.129
1/8000	CI	1.733	1.732	1.708	1.681	1.584	1.411	0.965	0.603	0.418	0.446	0.304
	CII	1.715	1.675	1.500	1.173	0.664	0.473	0.305	0.212	0.122	0.067	0.110
1/16000	CI	1.519	1.564	1.475	1.372	1.230	0.960	0.675	0.438	0.275	0.371	0.226
	CII	1.342	1.268	0.955	0.673	0.471	0.333	0.189	0.129	0.060	0.068	0.088
1/32000	CI	0.954	0.964	0.883	0.649	0.617	0.722	0.414	0.276	0.182	0.228	0.156
	CII	0.817	0.032	0.585	0.379	0.292	0.207	0.133	0.079	0.036	0.047	0.066
1/64000	CI	0.512	0.609	0.455	0.444	0.485	0.351	0.232	0.174	0.109	0.143	0.025
	CII	0.539	0.443	0.323	0.258	0.187	0.135	0.062	0.062	0.018	0.016	0.047

Tabla 6. DO<sub>600</sub> obtenidas con ASE de primera recuperación.

CI y CII: sueros control I y II.

Dil. conjugado	suero	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	1/204800	1/409600
1/1000	CI	>2	>2	>2	1.711	>2	1.688	1.516	1.352	1.183	1.230	1.283
	CII	1.689	1.699	1.626	1.776	1.480	1.537	1.285	1.229	1.136	1.143	1.315
1/2000	CI	>2	>2	>2	>2	>2	1.596	1.113	0.666	0.399	0.296	0.303
	CII	>2	>2	1.582	1.189	0.811	0.460	0.125	0.000	0.000	0.000	0.059
1/4000	CI	>2	>2	>2	>2	1.540	1.274	0.694	0.348	0.117	0.059	0.090
	CII	1.606	1.607	1.429	0.952	0.512	0.207	0.052	0.000	0.000	0.000	0.012
1/8000	CI	1.691	1.693	1.670	1.656	1.506	1.129	0.714	0.440	0.242	0.168	0.172
	CII	1.623	1.576	1.289	0.800	0.657	0.320	0.136	0.082	0.028	0.027	0.193
1/16000	CI	1.584	1.575	1.412	1.300	1.024	0.837	0.495	0.308	0.176	0.124	0.116
	CII	1.387	1.280	1.002	0.509	0.327	0.223	0.077	0.067	0.055	0.014	0.079
1/32000	CI	1.141	1.096	0.872	0.747	0.610	0.515	0.327	0.208	0.113	0.178	0.056
	CII	0.703	0.737	0.241	0.290	0.114	0.080	0.039	0.000	0.000	0.000	0.000
1/64000	CI	0.639	0.592	0.522	0.437	0.449	0.291	0.169	0.123	0.157	0.030	0.033
	CII	1.508	0.641	0.0.865	0.341	0.438	0.133	0.015	0.016	0.000	0.000	0.030

Tabla 7. DO<sub>600</sub> obtenidas con ASE de segunda recuperación.

CI y CII: sueros control I y II.

Dil. conjugado	suero	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	1/204800	1/409600
1/1000	CI	1.810	1.813	1.887	1.804	1.787	1.584	1.409	1.125	0.917	0.793	0.756
	CII	1.790	1.786	1.689	1.485	1.301	1.103	0.942	0.886	0.719	0.733	0.973
1/2000	CI	>2	>2	>2	>2	1.751	1.258	0.730	0.444	0.245	0.140	0.107
	CII	>2	>2	1.514	0.971	0.558	0.365	0.173	0.167	0.088	0.049	0.262
1/4000	CI	>2	1.801	1.803	1.763	1.578	1.142	0.635	0.354	0.211	0.091	0.069
	CII	1.810	1.690	1.248	0.789	0.490	0.278	0.136	0.100	0.057	0.040	0.215
1/8000	CI	1.722	1.699	1.668	1.557	1.322	0.841	0.475	0.323	0.174	0.087	0.052
	CII	1.622	1.416	0.994	0.636	0.334	0.217	0.104	0.071	0.030	0.010	0.120
1/16000	CI	1.567	1.590	1.404	1.151	0.863	0.630	0.372	0.221	0.125	0.079	0.064
	CII	1.222	1.138	0.723	0.393	0.249	0.183	0.079	0.046	0.020	0.040	0.086
1/32000	CI	1.002	1.999	0.819	0.680	0.482	0.386	0.235	0.115	0.076	0.038	0.022
	CII	0.678	0.538	0.414	0.266	0.103	0.145	0.050	0.023	0.037	0.012	0.055
1/64000	CI	0.579	0.456	0.461	0.334	0.337	0.218	0.093	0.076	0.048	0.035	0.030
	CII	0.428	0.340	0.235	0.185	0.086	0.101	0.036	0.027	0.007	0.027	0.036

Tabla 8. DO<sub>600</sub> obtenidas con ASE de tercera recuperación.

CI y CII: sueros control I y II.

Dil. suero conjugado

1/1000	CI	1.742	1.727	1.700	1.516	1.408	1.189	0.886	0.659	0.516	0.519	0.685
	CII	1.564	1.380	1.052	0.764	0.530	0.447	0.381	0.286	0.280	0.294	0.361
1/2000	CI	>2	>2	>2	1.318	1.527	0.661	0.499	0.421	0.247	0.160	0.160
	CII	1.731	1.110	0.706	0.441	0.232	0.128	0.070	0.089	0.091	0.076	0.087
1/4000	CI	1.719	>2	1.690	1.482	1.236	0.623	0.452	0.263	0.119	0.080	0.086
	CII	1.518	1.085	0.797	0.463	0.293	0.199	0.119	0.074	0.113	0.056	0.084
1/8000	CI	1.562	1.601	1.502	1.222	1.039	0.709	0.397	0.263	0.130	0.074	0.075
	CII	1.320	0.957	0.561	0.387	0.211	0.130	0.104	0.055	0.094	0.049	0.090
1/16000	CI	1.364	1.222	1.242	0.938	0.780	0.552	0.332	0.192	0.131	0.050	0.039
	CII	1.044	0.754	0.575	0.318	0.175	0.109	0.062	0.109	0.018	0.035	0.090
1/32000	CI	0.835	0.602	0.732	0.558	0.514	0.338	0.222	0.107	0.049	0.026	-0.014
	CII	0.632	0.477	0.334	0.166	0.108	0.092	0.044	0.046	0.028	0.022	0.070
1/64000	CI	0.450	0.168	0.422	0.360	0.319	0.217	0.113	0.083	0.024	0.032	0.027
	CII	0.359	0.343	0.222	0.128	0.109	0.076	0.031	0.055	0.009	0.012	0.078

Tabla 9. DO<sub>600</sub> obtenidas con ASE de cuarta recuperación.

CI y CII: sueros control I y II.

en la marcha de la reacción se describe en el apartado (III.1.2.). Los resultados hallados en las sucesivas recuperaciones del ASE, para los distintos controles, se hallan expresados en las Tablas 5,6,7,8 y 9).

#### III.1.1.8. DISCUSION

En el transcurso de este trabajo el método de Fairbairn (74), considerado como estándar para la eclosión de larva II de T. canis, ha mostrado ser de larga ejecución y proporcionar muy heterogéneos en unos u otros lotes. Los métodos mecánicos han mostrado una mayor eficacia si bien, en su empleo, debe tenerse en cuenta el tipo de homogenizador utilizado para no dañar las larvas eclosionadas.

La producción antigénica de un cultivo larvario puede ser muy variable. Savigny (261) determina que, en el MEM y a una concentración de  $10^4$  larvas/ml, una larva produce alrededor de 8 ng de proteína por día. Badley (18) por su parte, utilizando medio RPMI y concentraciones larvarias inferiores ( $2-5 \times 10^3$  larvas/ml) señala una producción proteica de 4-9 pg por larva y día, si bien señala el autor que a pesar de estas notables diferencias cuantitativas, cualitativamente el antígeno obtenido no difiere en cuanto a su especificidad. Los dos lotes antigénicos preparados en el trabajo que se describe han presentado una concentración proteica distinta (6,2 y 25 mcg de proteína/ml respectivamente), a pesar de haberse mantenido los cultivos bajo las mismas condiciones. La distinta concentración larvaria en ambos ( $2$  y  $5 \times 10^3$  larvas/ml) habría sido, sin duda, una de las causas de tal divergencia; sin embargo, es posible que la edad del cultivo pueda también influir en la producción de exoantígenos por parte de las larvas. Debe señalarse que el antígeno del lote II se recogió de un cultivo mantenido durante 14 meses,

mientras que al antígeno del lote I procedió de uno que tan solo sobrevivió tres meses.

El ASE obtenido ha presentado una alta sensibilidad como se desprende del hecho de que, a pesar de la baja concentración proteica a la que se ha utilizado (1 mcg/ml), ha podido ser recuperado hasta cuatro veces consecutivas sin mostrar manifiestos cambios de sensibilidad al utilizar ciertos controles. Sin embargo, la diferente respuesta al antígeno recuperado de los dos controles estudiados, control I y II, pone de manifiesto la heterogénea composición en anticuerpos específicos de los sueros positivos, lo que llevaría al rápido agotamiento de aquellas fracciones que se hallaran en menor cantidad, permaneciendo aquellas otras cuya presencia fuera más notable.

### III.1.2 DESARROLLO DE UNA TECNICA EIA PARA LA DETERMINACION DE IgG ANTI- Toxocara.

#### III.1.2.1 Descripción de la técnica

- A) Placas utilizadas. Se han utilizado placas de poliestireno de 96 pocillos (Flat.bottom, Dynatech M-129-B, Switzerland). estas placas están esterilizadas con radiaciones que les confiere una cierta carga que permite una mejor fijación del antígeno.
- B) Antígeno. Se ha utilizado ASE (lote II) virgen, a una concentración proteica de un mcg de proteina/ml.
- C) Bloqueo. La probable presencia de huecos en la capa antigénica hace que sea posible la fijación y posterior unión inespecífica de otras proteínas, dando lugar a

falsas reacciones positivas, así como a una importante coloración de fondo. Por lo tanto, es necesario llenar estos huecos con proteína inerte. La solución bloqueante utilizada ha sido PBS adicionado de BSA al 1% (PBS.S).

- D) Adición de la muestra. Se ha adicionado el suero a estudiar a la dilución adecuada (ver apartado III.1.2.3). Dicha dilución se ha realizado con PBS-S adicionado de un 0.05% Tween 20 (PBS-T-S) a fin de evitar fijaciones inespecíficas por parte de anticuerpos de baja afinidad.
- E) Adición del conjugado. Como conjugado enzimático se ha utilizado antiinmunoglobulinas humanas marcadas con peroxidadas a la dilución adecuada (ver apartado III.1.2.3) que se ha realizado con PBS-T-S.
- F) Substrato. Como substrato revelador se ha elegido el recomendado por Ngo y Lenhoff (212). Se trata del MBTH y DMAB adaptado para usarse en placa de EIA por Geoghegan et al (91). MBTH es el donante que después de la oxidación reacciona con el DMAB formando una indamina coloreada, compuesto morado con una absorción máxima a 590 nm. Se ha elegido este substrato fundamentalmente por su alta sensibilidad, baja toxicidad y ausencia de poder oncogénico. Sin embargo puede producir niveles de coloración de fondo algo elevados (307).

#### Preparación del substrato

MBTH: 1,8 mM

3-metil-2benzotiazolinona hidrazona (Sigma Chemical Company N° M-8006).

MBTH..... 210 mg

Tampón fosfato 0.1 M pH=7..... 400 ml

Llevar a pH=6.5 mediante adición de ClH concentrado, ajustar el volumen a 500 ml y filtrar.

DMAB: 180 mM

ácido 3-(dimetilamino) benzoico (Sigma Chemical Company N° D-1643).

DMAB..... 6 g

Tampón fosfato 0.1 M pH=7..... 160 ml

Llevar a pH=7 con NaOH 5M, ajustar a 200 ml con tampón fosfato y filtrar.

Composición teórica del substrato para una placa (Volumen total 21 ml).

DMAB 180 mM	4.7 ml
MBTH 1.8 mM	9.3 ml
Tampón fosfato 0.1 M, pH= 7	7.0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	5 mcl

Debido a la variabilidad que estos productos presentan cuando se hallan en solución, las cantidades a utilizar se deben calcular de acuerdo con su concentración real, calculada espectrofotometricamente.

Conocido el coeficiente de extinción molar del DMAB 0.1 M pH 6.5 a 305 nm (1430) y el del MBTH 0.1 M, pH 6.5 a 285 nm (5160) pueden ajustarse las concentraciones reales a las teóricas, de tal manera que la cantidad de cada uno de los reactantes a mezclar para obtener la concentración adecuada según la formula mencionada anteriormente será:

Absorbancia teórica (1.287)

(A) ml de DMAB necesarios=----- x4,7 ml  
Absorbancia hallada

Absorbancia teórica (0.930)

(B) ml de MBTH necesarios=----- x9,3 ml

Absorbancia hallada

ml de tampón fosfato 0.1 M pH= 7 21- (A+B)

- C) Lectura. Después de parar las reacciones enzimáticas con  $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$  se ha realizado la lectura en un espectrofotómetro Titertek Multiskan (Flow Lab), a la longitud de onda de 600 nm.

La coloración de fondo obtenida se eliminó mediante sustracción de la densidad óptica obtenida en el blanco (pozo al que no se añadió conjugado) de la obtenida en cada una de las diluciones séricas ensayadas.

### III.1.2.2 Marcha de la reacción

#### A. Fijación de antígeno.

El antígeno se ha diluido en tampón carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 9.6, hasta la concentración adecuada, en nuestro caso 1 mcg/ml de proteína.

- A.1. Sensibilización de la placa. Se ha colocado 100 mcl de antígeno en cada pocillo e incubado durante una noche a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- A.2. Bloqueo. Eliminada de los pocillo la solución antigénica se ha añadido 200 mcl por pozo de PBS-S e incubado durante 1 hora a temperatura ambiente y cámara húmeda.
- A.3. Lavado. Se ha eliminado el exceso de PBS-S y lavado 3 veces con PBS-T y una vez con PBS.

B. Adición del suero

Se ha distribuido 100 mcl/pozo del suero diluido con PBS-T-S a la dilución adecuada e incubado 3 horas a temperatura ambiente ó 1 hora a 37°C, en cámara húmeda.

Transcurrido el tiempo de incubación se ha procedido al lavado, 3 veces con PBS-T y una vez con PBS.

C. Adición del conjugado

Después de vaciar los pocillos del PBS del último lavado, se ha añadido 100 mcl/pozo del conjugado diluido con PBS-T-S a la dilución apropiada. Se ha dejado incubar durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se ha procedido al lavado, 3 veces con PBS-T y una vez con PBS.

D. Adición del substrato

Una vez preparado el substrato como se indica en el apartado (III.1.2.1.) se ha añadido 200 mcl/pozo de dicha solución e incubado 20 minutos a temperatura ambiente.

E. Parada de la reacción

La reacción se ha parado añadiendo 50 mcl/pozo de  $\text{SO}_4\text{H}_2\text{2N}$ .

F. Lectura

Se ha realizado en un espectrofotómetro (Titertek Multiskan) a una longitud de onda de 600 nm.

### III.1.2.3 Cálculo de la dilución sérica y de conjugado y cinética de la reacción.

El cálculo de la dilución sérica y de conjugado se ha determinado mediante el sistema de diluciones crecientes.

Para ello se ha realizado un ensayo preliminar con un suero humano perteneciente a un paciente con clínica sospechosa de Toxocarosis y cuya seropositividad fué confirmada por el Center for Disease Control (CDC) de Atlanta, USA. Como conjugado enzimático se ha utilizado una anti-IgG humana peroxidasa (goat peroxidase anti human IgG, H and L chain, Miles-Yedo).

El conjugado se ha ensayado a diluciones dobles, desde 1/1000 a 1/128000 y el suero positivo a diluciones dobles desde de 1/400 hasta 1/409600 (Tabla 10).

Posteriormente se han ensayado diluciones de conjugado de 1/2000, 1/4000, 1/6000, 1/8000 y 1/10000 en 4 sueros: un suero positivo alto, un suero positivo bajo, un suero dudoso y un suero negativo, a las diluciones séricas de 1/400, 1/800 y 1/1600 (Tabla 11).

El estudio cinético de la reacción enzimática se ha realizado con un suero positivo y otro negativo a las diluciones de 1/400, 1/800 y 1/1600, frente a diluciones del conjugado de 1/1000, 1/2000, 1/4000 y 1/8000. La reacción enzimática se ha leído a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos después de la adición del substrato revelador (Figuras 9,10,11 y 12).

Suero 1/400 1/800 1/1600 1/3200 1/6400 1/12800 1/25600 1/51200 1/102400 1/204800 1/409600

Conjugado

1/1000	1.802	1.803	1.786	1.728	1.406	1.010	0.668	0.291	0.162	0.107	0.098
1/2000	1.726	1.730	1.722	1.682	1.384	0.836	0.620	0.291	0.207	0.125	0.066
1/4000	1.659	1.576	1.308	0.921	0.585	0.513	0.239	0.148	0.077	0.049	0.025
1/8000	1.388	1.034	0.851	0.525	0.320	0.256	0.144	0.096	0.054	0.038	0.039
1/16000	0.786	0.579	0.428	0.258	0.142	0.090	0.057	0.039	0.020	0.017	0.014
1/32000	0.451	0.363	0.271	0.193	0.117	0.088	0.059	0.033	0.005	0.006	0.097
1/64000	0.250	0.189	0.154	0.106	0.068	0.050	0.037	0.019	0.010	0.005	0.002
1/128000	0.144	0.104	0.079	0.056	0.045	0.037	0.027	0.018	0.001	0.015	0.036

Tabla 10. Valoración del conjugado. Ensayo en un suero humano positivo.

Diluciones de conjugado

Diluciones séricas		1/2000	1/4000	1/6000	1/8000	1/10000
C. positivo alto	1/400	1.646	1.579	1.547	1.277	1.233
	1/800	1.510	1.485	1.423	1.070	0.954
	1/1600	1.197	1.123	0.957	0.732	0.635
C. positivo bajo	1/400	1.440	1.233	1.021	0.685	0.531
	1/800	0.799	0.647	0.520	0.325	0.285
	1/1600	0.434	0.379	0.244	0.172	0.153
Suero dudoso	1/400	0.332	0.964	0.703	0.377	0.355
	1/800	0.332	0.245	0.166	0.142	0.142
	1/1600	0.235	0.171	0.112	0.083	0.087
Suero negativo	1/400	0.209	0.106	0.147	0.089	0.127
	1/800	0.120	0.055	0.050	0.032	0.029
	1/1600	0.089	0.039	0.013	0.023	0.018

Tabla 11. DO<sub>600</sub> obtenidos al ensayar frente a diferentes diluciones de conjugado un suero positivo alto, un suero positivo bajo, un suero dudoso y un suero negativo.

Los resultados obtenidos se indican en las Figuras 9,10,11,12,13 y 14 y en las tablas 10 y 11. Observamos que la intensidad de la reacción enzimática varía de acuerdo con la concentración sérica, sea cual sea la dilución de conjugado empleado, y que la mayor diferencia entre el suero positivo y negativo se obtuvo al emplear la dilución sérica de 1/800, (figuras 13 y 14) eligiéndose esta para posteriores ensayos.

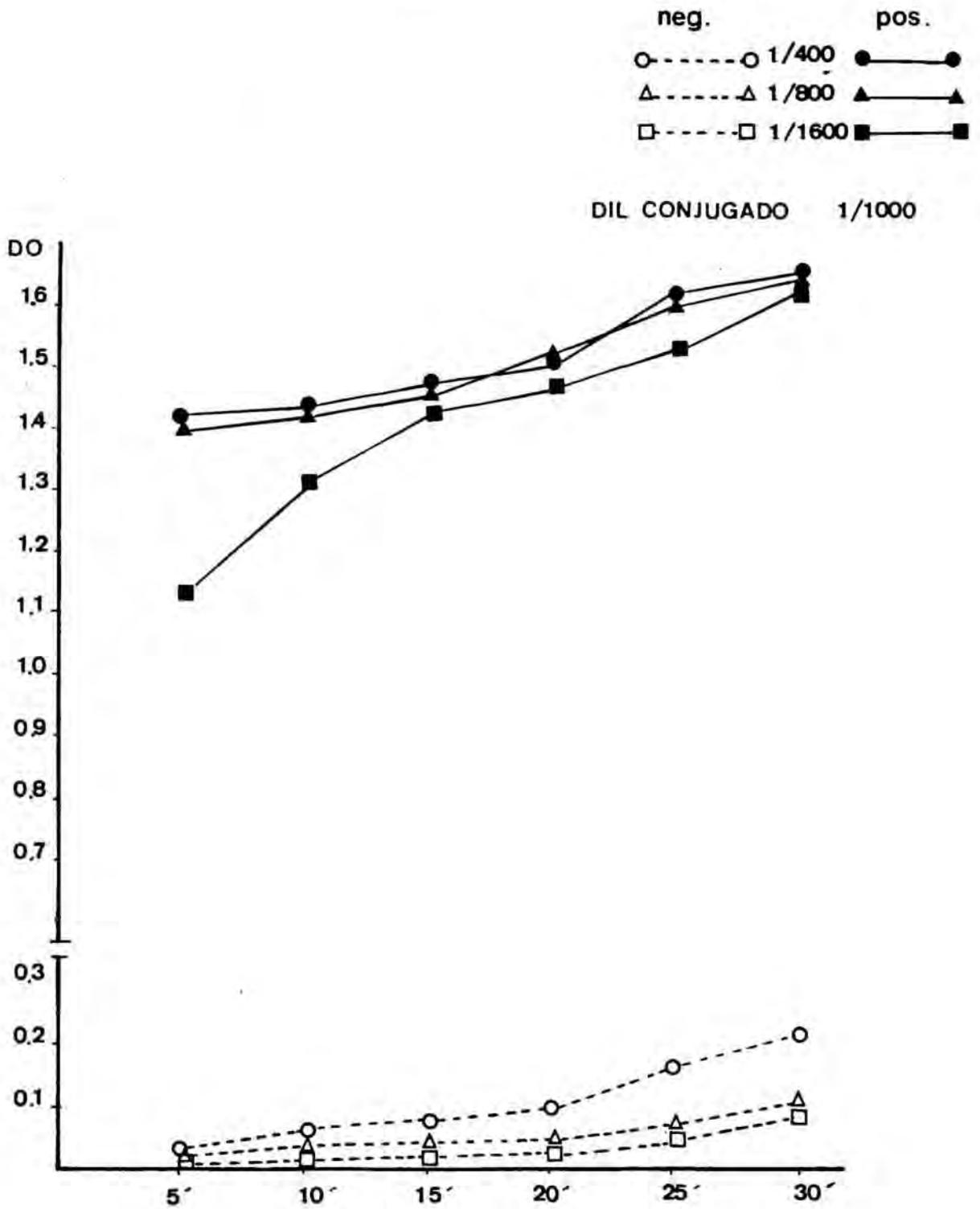


Figura 9. Cinética de la reacción enzimática obtenida con las distintas diluciones séricas del control positivo y negativo al emplear el conjugado a la dilución de 1/1000.

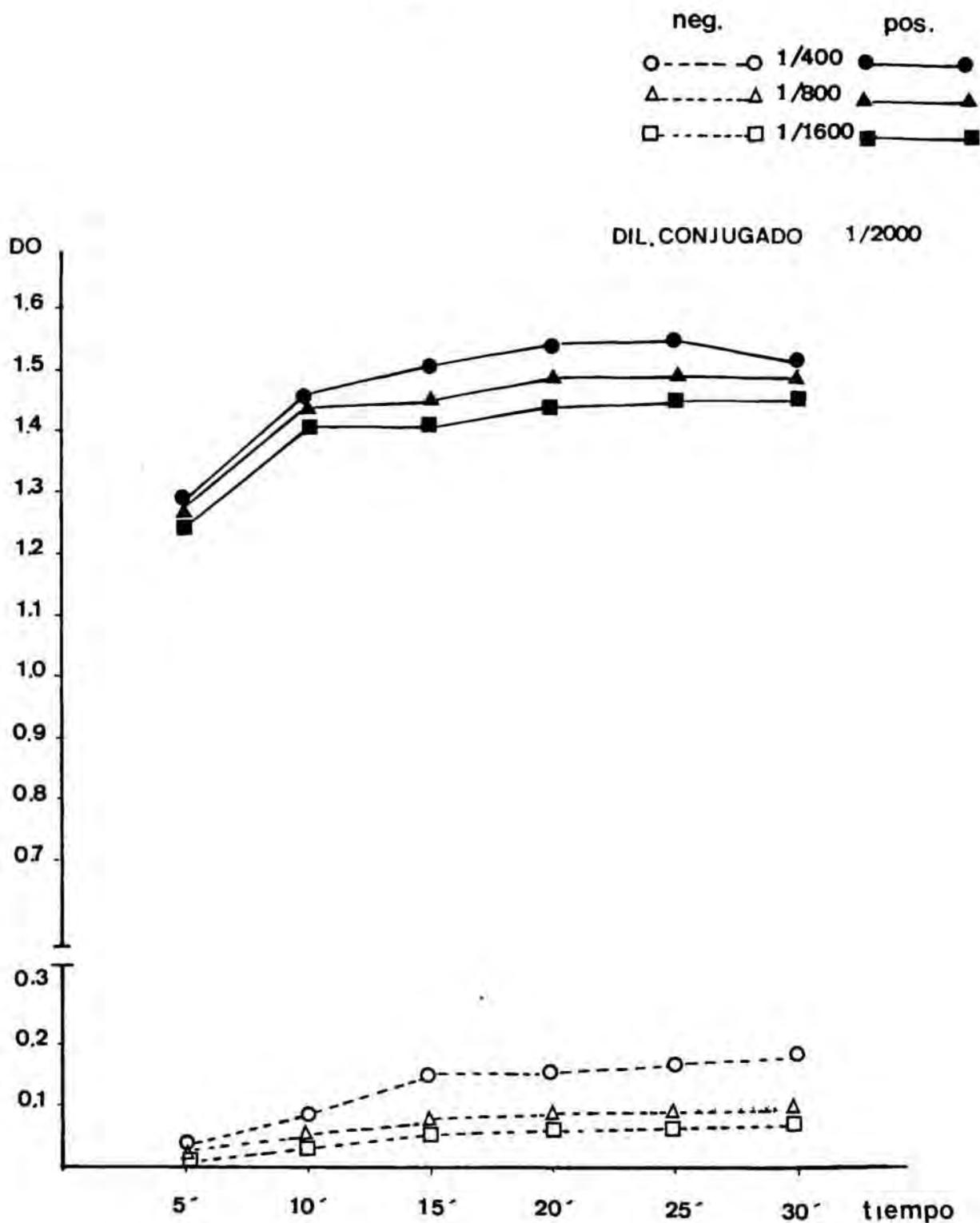


Figura 10. Cinética de la reacción enzimática obtenida con las distintas diluciones séricas del control positivo y negativo al emplear el conjugado a la dilución de 1/2000.

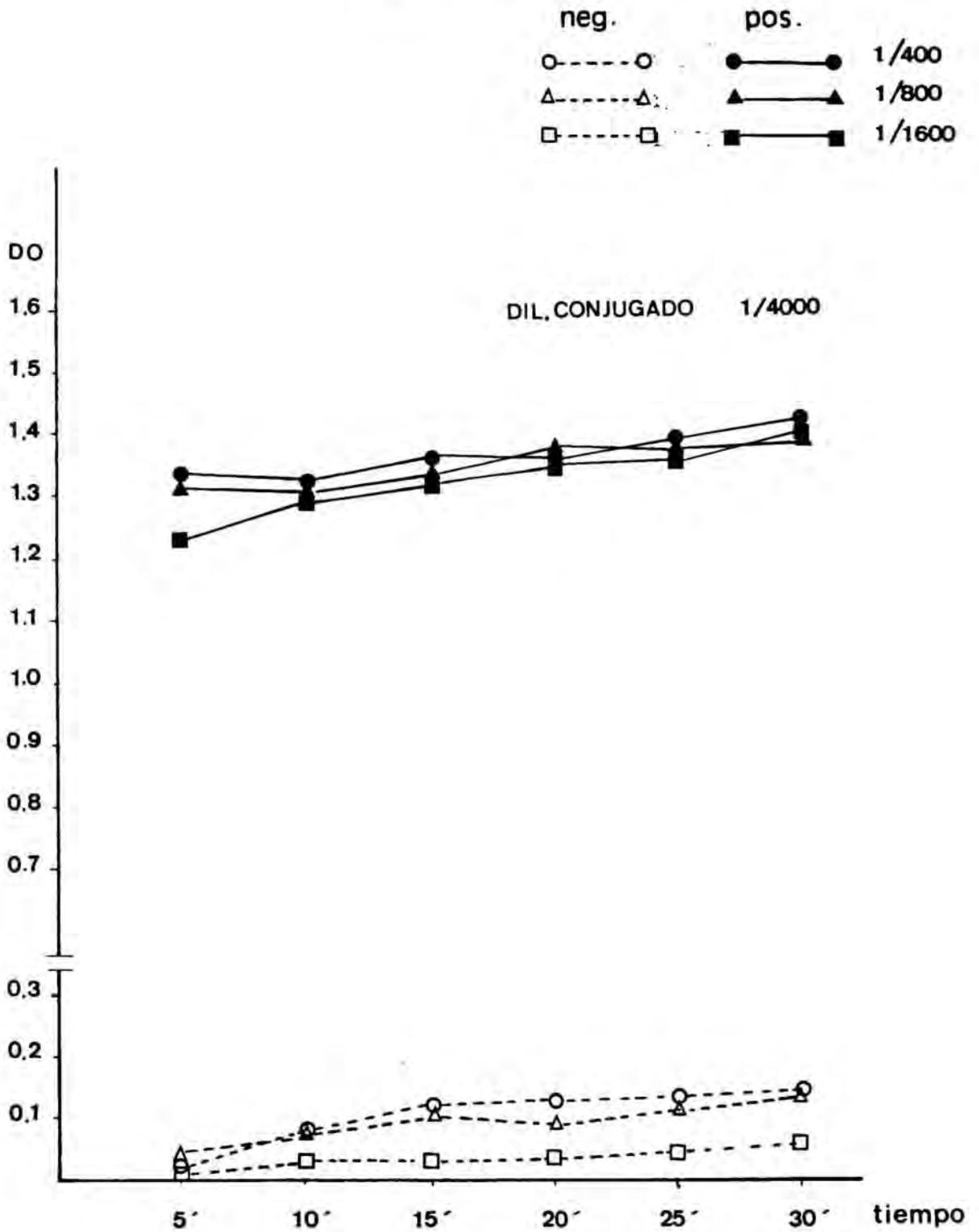


Figura 11. Cinética de la reacción enzimática obtenida con las distintas diluciones séricas del control positivo y negativo al emplear el conjugado a la dilución de 1/4000.

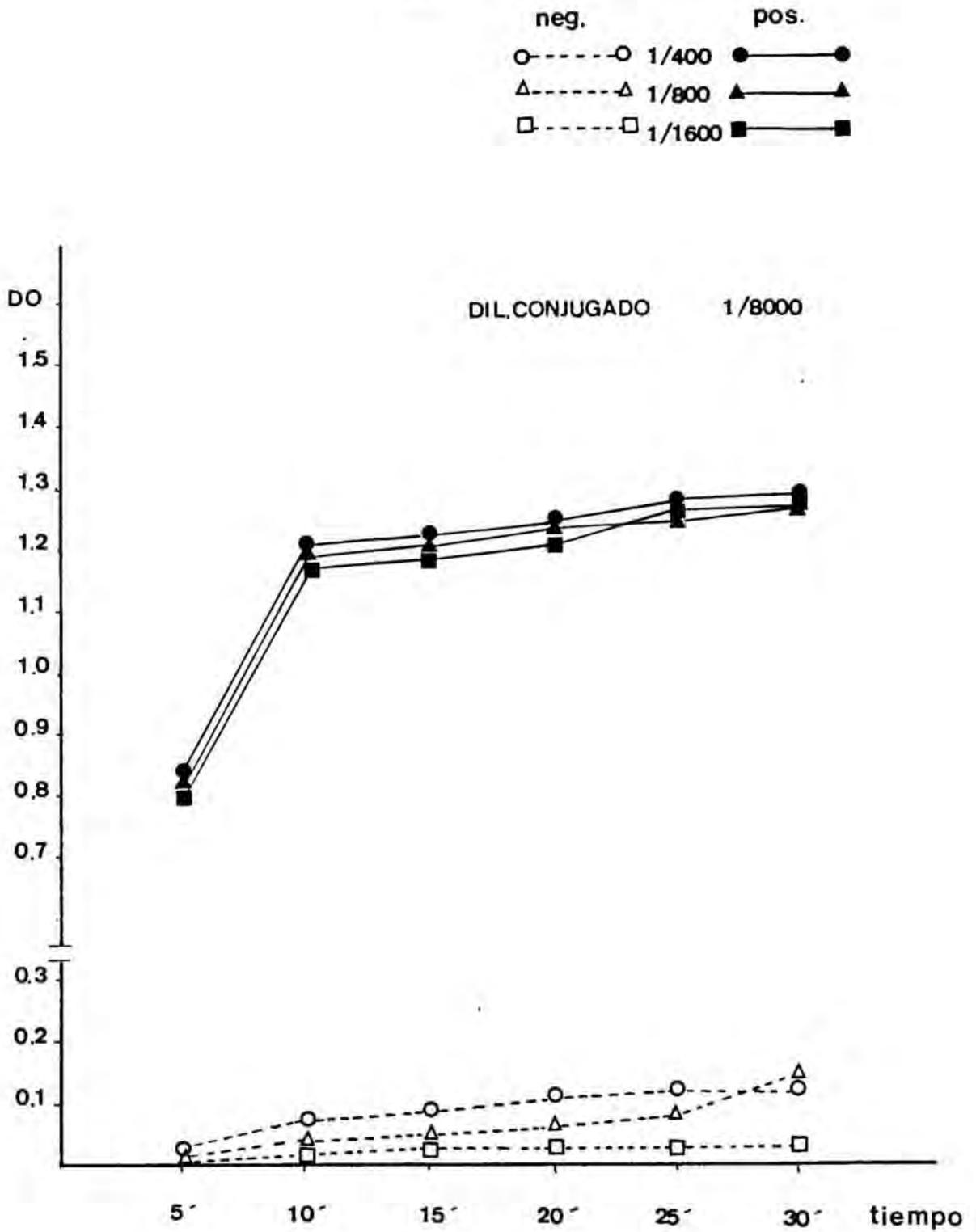


Figura 12. Cinética de la reacción enzimática obtenida con las distintas diluciones séricas del control positivo y negativo al emplear el conjugado a la dilución de 1/8000.

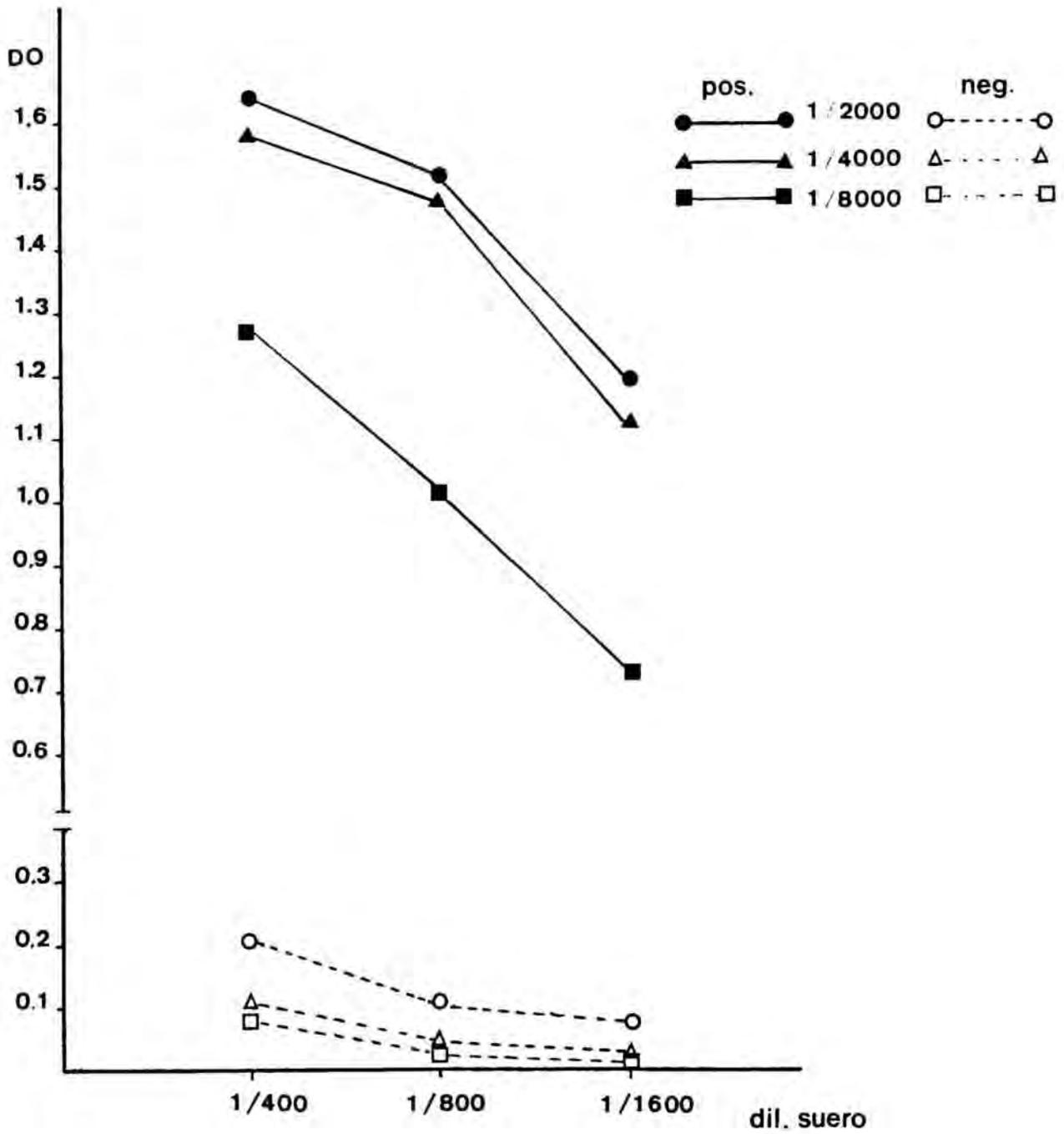


Figura 13. DO obtenidas con el suero control positivo y negativo, al emplear distintas concentraciones del conjugado. Tiempo de reacción enzimática 20 minutos.

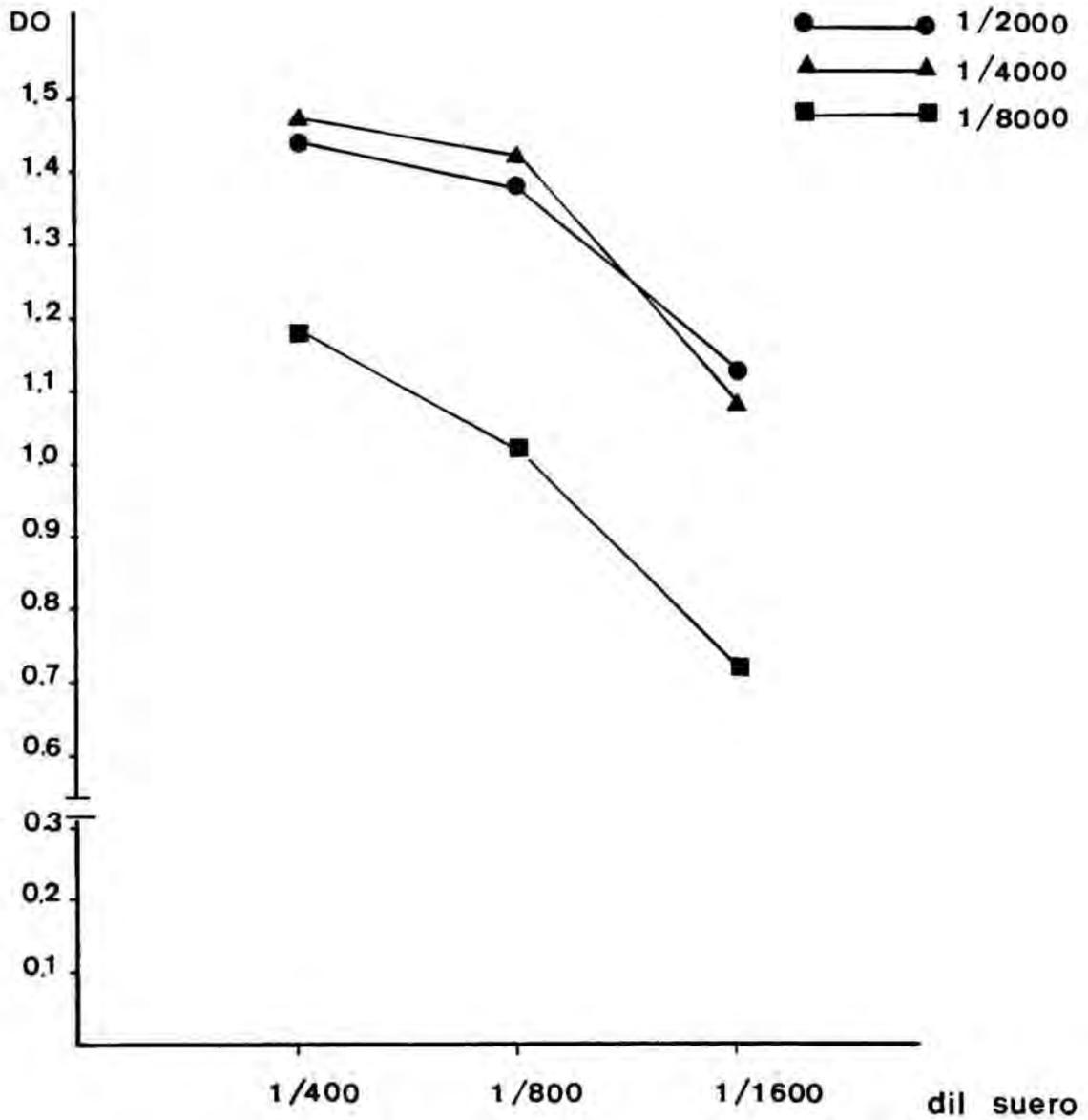


Figura 14. Diferencias entre las DO del suero control positivo y negativo al emplear distintas concentraciones de conjugado. Tiempo de reacción enzimática 20 minutos.

El estudio de la cinética de la reacción mostró que entre los 10-20 minutos de incubación se alcanza la zona de meseta en la curva que relaciona tiempo de incubación - densidad óptica. Por ello se ha considerado que la reacción enzimática se puede parar a los 20 minutos mediante la adición de  $\text{SO}_4\text{H}_2 2\text{N}$ .

Como dilución de trabajo del conjugado enzimático y a partir de los resultados obtenidos (Tablas 10 y 11), se ha elegido la correspondiente a una dilución de 1/5000. Para posteriores lotes se procedió a una nueva valoración del conjugado.

#### III.1.2.4. Controles

En cada placa se ha incluido los siguientes controles.

- A. Control positivo alto: que es el resultado de un "pool" de sueros positivos humanos.
- B. Control positivo bajo o calibrador: que es un "pool" de sueros positivos, intermedios y negativos.
- C. Control negativo: que es el resultado de un "pool" de sueros negativos, pertenecientes a donantes sanos.
- D. Control de conjugado: en lugar de utilizar el suero a ensayar se ha utilizado PBS-T-S con el fin de controlar la coloración de fondo para cada prueba.
- E. Control suero o blanco: el suero se ha utilizado a una dilución de 1/400. En el proceso se ha omitido la adición de conjugado, y en su lugar se ha adicionado PBS-S. De esta manera podemos detectar la posible peroxidasa del suero. Este control se realiza para cada suero.

### III.1.2.5. Criterios de positividad

La gran dificultad que supone el diagnóstico serológico de la Toxocarosis, hace difícil la obtención de sueros positivos y negativos estandarizados. La de sueros positivos puesto que el diagnóstico etiológico de la "larva migrans" pocas veces llega a realizarse, y los criterios de Glickman (100) para su diagnóstico clínico gozan de gran inespecificidad. La de sueros negativos debido a las irregularidades en las manifestaciones clínicas que presenta la enfermedad.

El establecer como límite de positividad un valor absoluto de DO tiene ciertos inconvenientes, debido fundamentalmente a la gran variabilidad de las técnicas inmunoenzimáticas, por esta razón, en la determinación de las IgG específicas, se ha creído conveniente expresar los resultados obtenidos en tanto por ciento de positividad (%p). El tanto por ciento de positividad relaciona la DO<sub>600</sub> obtenida en cada uno de los sueros estudiados, con la DO<sub>600</sub> obtenida al utilizar un "pool" de sueros positivos, intermedios y negativos, a la misma dilución, que se reconoce como calibrador, quedando expresado de la siguiente fórmula:

$$\%p = \frac{\text{DO}_{600} \text{ suero problema}}{\text{DO}_{600} \text{ calibrador}} \times 100$$

Los límites de positividad se han establecido de la siguiente forma:

- a) Se consideran negativos los sueros con un porcentaje de positividad inferior a la media más dos veces la desviación estándar ( $\bar{x} + 2DE$ ) de la población seronegativa.

b) Dudosos aquellos con un porcentaje de positividad comprendido entre la media más dos y cuatro veces la desviación estándar.

c) Positivos los que superaban dichos valores.

El cálculo de la media correspondiente a la población seronegativa se realizó después de eliminar aquellos resultados que superaban a la  $x+2DE$  del conjunto de sueros ensayados (Tabla 12).

De entre los 256 sueros analizados, 30 superaron dichos límites, obteniendo con los 226 restantes una media de 20% y una desviación estándar de 12, por lo que se consideraron negativos aquellos sueros con un %p inferior a 36, dudosos los comprendidos entre 36 y 60 y positivos los que igualaban o superaban dicho valor (Tabla 13).

<b>Negativo</b>	<b>%p &lt; 36%</b>	<b>(%p &lt; <math>\bar{x}+2DE</math>)</b>
<b>Dudosos</b>	<b>36% &lt; %p &lt; 60%</b>	<b>(<math>\bar{x}+2DE &lt; %p &lt; \bar{x}+4DE</math>)</b>
<b>Positivos</b>	<b>%p &gt; 60%</b>	<b>(%p &gt; <math>\bar{x}+4DE</math>)</b>

Tabla 13. Criterios de positividad en la valoración de la IgG específica anti - Toxocara. %p:relaciona la DO del suero problema con la DO del calibrador.

%p	(DO600)	%p	(DO600)	%p	(DO600)	%p	(DO600)	%p	(DO600)	%p	(DO600)
313	(1.878)*	145	(0.870)*	33	(0.205)	31	(0.211)	69	(0.392)*	41	(0.264)*
26	(0.148)	51	(0.348)*	57	(0.344)*	14	(0.086)	36	(0.240)	100	(0.627)*
18	(0.124)	26	(0.174)	54	(0.323)*	31	(0.188)	33	(0.218)	30	(0.179)
8	(0.064)	75	(0.455)*	56	(0.373)*	140	(0.842)*	16	(0.131)	33	(0.223)
8	(0.058)	25	(0.167)	45	(0.292)*	12	(0.071)	86	(0.540)*	23	(0.150)
46	(0.280)*	23	(0.158)	15	(0.114)	18	(0.124)	20	(0.143)	20	(0.143)
5	(0.052)	1	(0.082)	16	(0.116)	33	(0.214)	63	(0.397)*	5	(0.031)
9	(0.036)	9	(0.053)	8	(0.048)	6	(0.039)	8	(0.049)	7	(0.044)
1	(0.008)	9	(0.053)	5	(0.029)	6	(0.040)	5	(0.034)	6	(0.038)
7	(0.044)	10	(0.061)	1	(0.010)	10	(0.063)	5	(0.029)	3	(0.018)
4	(0.028)	5	(0.032)	6	(0.038)	7	(0.042)	5	(0.030)	5	(0.031)
3	(0.020)	7	(0.043)	3	(0.021)	6	(0.036)	2	(0.014)	6	(0.037)
2	(0.015)	6	(0.038)	5	(0.029)	6	(0.035)	7	(0.045)	8	(0.048)
2	(0.016)	9	(0.056)	5	(0.029)	7	(0.043)	4	(0.026)	5	(0.033)
2	(0.022)	6	(0.039)	6	(0.037)	14	(0.085)	8	(0.047)	22	(0.134)
7	(0.041)	15	(0.089)	3	(0.018)	6	(0.040)	6	(0.035)	8	(0.047)
7	(0.042)	7	(0.045)	8	(0.051)	11	(0.069)	3	(0.020)	5	(0.033)
8	(0.048)	8	(0.052)	6	(0.048)	9	(0.058)	8	(0.051)	14	(0.088)
8	(0.052)	10	(0.062)	12	(0.074)	10	(0.062)	9	(0.057)	10	(0.063)
1	(0.008)	6	(0.039)	8	(0.050)	9	(0.054)	8	(0.048)	8	(0.050)
11	(0.071)	20	(0.070)	48	(0.168)*	130	(0.453)*	39	(0.137)*	31	(0.110)
28	(0.096)	1	(0.002)	24	(0.084)	28	(0.099)	34	(0.118)	25	(0.088)
21	(0.073)	19	(0.068)	27	(0.095)	0	(0.001)	24	(0.083)	25	(0.087)
38	(0.111)*	23	(0.233)	23	(0.232)	23	(0.233)	27	(0.096)	31	(0.112)
16	(0.057)	29	(0.105)	48	(0.174)*	33	(0.120)	35	(0.128)	28	(0.100)
89	(0.321)*	32	(0.115)	34	(0.128)	17	(0.061)	40	(0.148)*	38	(0.204)*
42	(0.226)*	21	(0.115)	22	(0.119)	22	(0.121)	30	(0.166)	22	(0.120)
16	(0.090)	3	(0.045)	5	(0.075)	15	(0.225)	1	(0.015)	11	(0.165)
9	(0.135)	41	(0.275)*	31	(0.205)	1	(0.015)	3	(0.023)	6	(0.041)

.../...

...../.....

%p	(DO <sub>600</sub> )	%p	(DO <sub>600</sub> )	%p	(DO <sub>600</sub> )	%p	(DO <sub>600</sub> )	%p	(DO <sub>600</sub> )	%p	(DO <sub>600</sub> )
4	(0.028)	7	(0.047)	2	(0.016)	6	(0.042)	21	(0.108)	11	(0.058)
11	(0.055)	7	(0.036)	24	(0.123)	5	(0.026)	23	(0.115)	13	(0.065)
23	(0.115)	9	(0.047)	0	(0.002)	0	(0.002)	0	(0.003)	0	(0.008)
284	(1.448)*	49	(0.250)*	1	(0.005)	0	(0.001)	0	(0.002)	16	(0.056)
0	(0.001)	0	(0.002)	2	(0.006)	0	(0.001)	5	(0.016)	2	(0.007)
0	(0.003)	0	(0.002)	0	(0.001)	0	(0.003)	0	(0.001)	113	(0.385)*
0	(0.001)	0	(0.003)	0	(0.004)	0	(0.001)	73	(0.453)*	8	(0.051)
6	((0.040)	21	(0.128)	14	(0.090)	7	(0.044)	3	(0.019)	9	(0.056)
6	(0.038)	3	(0.017)	2	(0.013)	3	(0.017)	3	(0.017)	2	(0.012)
4	(0.025)	13	(0.035)	15	(0.044)	16	(0.048)	14	(0.039)	2	(0.006)
1	(0.005)	5	(0.021)	14	(0.054)	18	(0.068)	6	(0.022)	4	(0.016)
4	(0.014)	8	(0.029)	7	(0.027)	8	(0.032)	2	(0.008)	7	(0.027)
14	(0.052)	124	(0.466)*	31	(0.117)	4	(0.015)	3	(0.022)	3	(0.020)
0	(0.003)	0	(0.005)	0	(0.001)	0	(0.001)				

n= 226

$\bar{x}$ = 20

DE= 12

Tabla 12 Determinación de los límites de positividad para IgG específicas.

Valores obtenidos con 256 sueros analizados %p (DO<sub>600</sub>).

\* valores eliminados por aberrantes.

### III.1.2.6 Reacciones cruzadas con otras parasitosis

#### III.1.2.6.1 Material estudiado

Con el fin de estudiar la presencia de posibles reacciones cruzadas entre sueros de enfermos con otras parasitosis y el ASE de T. canis, se ha realizado una determinación de IgG específicas anti-Toxocara en un total de 60 sueros, de los cuales 34 pertenecían a enfermos con otras helmintosis y 26 a enfermos con parasitosis protozoarias.

#### III.1.2.6.2 Resultados

En las tablas 14 y 15 se expresan en %p (DO<sub>600</sub>) los resultados obtenidos para cada una de las parasitosis estudiadas.

Observamos que solamente se han hallado dos sueros positivos en el grupo de las helmintosis. Uno de ellos perteneciente a un enfermo de triquinelosis y el otro a un paciente poliparasitado por diversos nematodos. En el grupo de enfermos parasitados por protozoos no hemos hallado ninguna seropositividad.

#### III.1.2.7. DISCUSION

Como se ha indicado ya en el apartado II.1.2.1, la técnica EIA desarrollada para la determinación de IgG anti-Toxocara se basó en la técnica de Ngo y Lenhoff (212) utilizando peroxidasa como enzima y DMAB y MBTH como substrato revelador. De la utilización de dicha técnica se tenía experiencia suficiente al haber sido empleada para el estudio inmunológico de otras enfermedades infecciosas por lo que la puesta punto de la técnica, anteriormente descrita, no

N° suero	%p	(DO600)	Helmintosis
660	5	(0.029)	<u>Taenia solium</u>
826	16	(0.046)	<u>Taenia solium</u>
887	1	(0.005)	<u>Schistosoma haematobium</u>
935	8	(0.050)	" "
671	5	(0.032)	<u>Fasciola hepática</u>
827	0	(0.000)	" "
852	17	(0.017)	" "
857	4	(0.025)	" "
873	23	(0.115)	" "
876	9	(0.047)	" "
828	0	(0.000)	<u>Hymenolepis nana</u>
933	9	(0.054)	" "
649	33	(0.214)	<u>Trichinella spiralis</u>
650	66	(0.397)	" "
805	15	(0.044)	" "
806	16	(0.058)	" "
807	14	(0.039)	" "
834	0	(0.000)	" "
869	11	(0.055)	" "
913	3	(0.045)	" "
925	10	(0.062)	" "
926	12	(0.074)	" "
927	10	(0.062)	" "
928	9	(0.057)	" "
936	11	(0.071)	<u>Strongyloides stercoralis</u>
804	8	(0.048)	" "
879	0	(0.000)	<u>Dipetalonema perstans</u>
931	6	(0.039)	<u>Trichuris trichiura</u> + <u>Hymenolepis nana</u>
934	8	(0.048)	<u>Necator americanus</u> + <u>Enterobius vermicularis</u>
880	284	(>2.000)	<u>Trichuris trichiura</u> + <u>Necator americanus</u> + <u>Ascaris lumbricoides</u>
872	5	(0.026)	<u>Trichuris trichiura</u>
874	13	(0.065)	" "
930	1	(0.008)	" "
932	8	(0.050)	" "

Tabla 14. %p (DO600) al determinar la presencia de IgG específica en 34 sueros pertenecientes a pacientes con distintas helmintosis.

N° suero	%p (DO <sub>600</sub> )	Protozoosis
35	11 (0.058)	<u>Entamoeba histolytica</u>
34	7 (0.036)	" "
80	24 (0.123)	" "
147	23 (0.115)	" "
84	0 (0.000)	" "
21	0 (0.000)	" "
77	2 (0.007)	" "
105	3 (0.019)	" "
108	9 (0.056)	" "
103	6 (0.038)	" "
32	0 (0.000)	" "
109	21 (0.128)	" "
17	10 (0.063)	<u>Plasmodium vivax</u>
88	0 (0.000)	" "
30	2 (0.006)	" "
31	0 (0.000)	" "
24	0 (0.000)	<u>Plasmodium falciparum</u>
25	6 (0.041)	<u>Leishmania infantum</u>
15	4 (0.028)	" "
22	7 (0.047)	" "
13	2 (0.016)	" "
112	2 (0.013)	" "
68	3 (0.017)	" "
111	3 (0.017)	" "
97	2 (0.010)	" "
83	21 (0.108)	<u>Cryptosporidium sp</u>

Tabla 15. %p (DO<sub>600</sub>) al determinar la presencia de IgG específicas en 26 sueros pertenecientes a pacientes con distintas protozoosis.

revistió más problemas que la determinación de las concentraciones a que debían utilizarse cada uno de los reactivos, para la detección del sistema antígeno-anticuerpo que se intentaba llevar a cabo.

Uno de los principales problemas con el que nos hemos hallado al poner a punto la técnica EIA ha sido elegir el tipo de lectura, criterios de positividad y límite o "cut-off". Asegurar que un individuo con un test positivo tiene una alta probabilidad de sufrir la enfermedad (valor predictivo de un test positivo) y que un individuo con un test negativo no tiene la enfermedad (valor predictivo de un test negativo) es a lo que aspira cualquier prueba diagnóstica, cualidades que varían en función del criterio y límite de positividad establecido.

Cuando el "cut-off" es bajo la sensibilidad de EIA aumenta pero la especificidad y valor predictivo disminuye. Cuando es alto, la sensibilidad disminuye pero la especificidad aumenta, lo mismo que el valor predictivo positivo. Valores predictivos altos, y específicos son esenciales en los casos de Toxocarosis ocular, en los que un falso positivo podría inducir a la no enucleación de un ojo con retinoblastoma maligno. Por otra parte una baja sensibilidad sería perjudicial en estudios seroepidemiológicos y en casos de LMO en donde un falso negativo llevaría a la enucleación innecesaria del ojo afectado (100).

Las tendencias adoptadas para establecer dichos límites varían según los autores.

Algunos realizan múltiples diluciones con el fin de establecer como límite el punto donde la reacción enzimática ya no se detecta, realizando así un estudio cuantitativo de los anticuerpos presentes en los inmunoseros estudiados. Para ello es necesario disponer de un control negativo; el

punto final de la reacción dependerá de este control, y puede variar de un suero control a otro. La definición del título puede ser confusa y la reproductibilidad escasa. El límite de positividad variará lógicamente de acuerdo con la técnica utilizada y cada uno de los reactivos empleados (tipo de soporte, conjugado, enzima, substrato, tiempos de incubación, etc.). Por otra parte, las lecturas de este tipo tienen la ventaja de que la lectura se puede realizar visualmente sin necesidad de espectrofotómetro. Cypess et al (58) y Thompson et al (306), realizan diluciones seriadas y establecen la positividad a partir de la dilución 1/32. Worley et al (326) establecen para la LMV la positividad a partir de la dilución  $\leq 1/32$  y en los casos de LMO  $\leq 1/16$ . Glickman et al (111) consideran como título diagnóstico la dilución  $\leq 1/16$ . La mayoría de los autores cuando se trata de realizar un estudio epidemiológico prefieren trabajar con una única dilución sérica. Esto supone que hay que determinar la dilución apropiada mediante una prueba preliminar utilizando un suero positivo y uno negativo. Mediante este método Guillen et al (120) utiliza un índice diagnóstico el cual relaciona las DO obtenidas en los sueros problema con la del control negativo, estableciendo como positivos aquellos sueros que den un índice superior a 3. Coll et al (47) en el serodiagnóstico de Yersinia utilizan una sola dilución sérica expresando los resultados en U/ml. Para ello se prepara un estándar a partir de un "pool" de sueros positivos y se asigna un valor de 100 U/ml a la dilución del estándar que presente una densidad óptica de 1.000. Posteriormente se realizan diluciones del estándar equivalente a 100, 75, 50 y 25 U/ml, obteniéndose una recta calibradora en la que se extrapolan los valores de DO de los sueros problema y control. Estos dos métodos tienen la ventaja de poder comparar resultados entre laboratorios.

Otros autores prefieren establecer como "cut-off" dos, tres o cuatro veces la media de los resultados hallados en un grupo de sueros negativos.

Matsumura y Endo (192,193) establecen la positividad para una  $DO > 0.2$ . Savigny et al (264) y Maizels et al (189) dan como límite de positividad una  $DO > 0.5$ .

Cuando se dispone de sueros de referencia pertenecientes a una población normal el señalar como límite su media más 2 ó 3 veces su DE es un buen método (164,180,209). Lynch et al (181) mediante este método establece un "cut-off" bajo de 0.178 y un "cut-off" alto de 0.656.

Para escoger el método utilizado en este estudio se han valorado todas las posibilidades. La realización de múltiples diluciones con cada suero tiene como principal inconveniente la necesidad de repetir la determinación para cada una de las diluciones lo que conlleva un gasto notable de tiempo y reactivos. Consideramos que estos métodos suelen ser válidos en estudios clínicos, diagnóstico y control de enfermos sospechosos, pero no son aplicables en estudios epidemiológicos. Por ello se ha creído conveniente escoger un criterio de lectura a partir de una sola dilución. Esto conlleva ciertos riesgos. En primer lugar si se escoge una dilución alta pueden darse como negativos sueros que presentan una tasa baja de anticuerpos específicos, como sería el caso de una LMO. Si se escogen diluciones bajas se incrementan los problemas derivados de la coloración de fondo, reacciones cruzadas, etc. Además de que rápidamente se alcanzarán los límites de lectura del espectrofotómetro, lo que obligará a repetir múltiples determinaciones si se quieren obtener datos cuantitativos. Por otro lado el hacer una sola determinación, a una única dilución sérica, en una técnica tan sensible como es la técnica EIA, comporta el riesgo de dar un falso resultado debido a errores de manipulación. Es por ello que durante la puesta a punto de la técnica, las determinaciones se han realizado tres diluciones séricas distintas (1/400, 1/800, 1/1600). Esto tiene un doble fin:

- a) Detectar errores en la manipulación, puesto que a medida que la dilución aumenta hay que observar una graduación en la reacción enzimática.
- b) Tener un margen amplio de diluciones que nos permita obviar los inconvenientes anteriormente expuestos.

Transcurrida esta primera fase y después de observar que la dilución 1/800 cumplía con los requisitos de sensibilidad y especificidad establecidos, se adoptó esta como dilución única a ensayar. Para evitar la positividad consecuencia de artefactos se repitió la determinación en todos aquellos sueros que resultaron positivos. Dicha dilución es del orden de la utilizada por Nichols et al (209) de 1/100 y por Lynch et al (180) de 1/400, pero discrepa en gran medida de la empleada por Van Knapen (164) 1/20. Si bien lógicamente y como ya se ha indicado anteriormente la sensibilidad de la técnica variará enormemente de acuerdo con la calidad del antígeno, diluciones de conjugado utilizadas, y el sistema revelador (enzima-substrato) utilizado.

La dilución diagnóstica escogida (1/800) es suficientemente alta para eludir muchos de los problemas de coloración de fondo e inespecificidades inherentes a las técnicas inmunoenzimáticas. Por otro lado ha mostrado ser suficientemente sensible para detectar tasas bajas de anticuerpos específicos y poder así diagnosticar toxocarosis oculares.

Para el establecimiento de los criterios de positividad se han escogido unos criterios bastante estrictos, que nos permitieran discernir claramente cuales eran los sueros positivos, junto con unos márgenes de duda suficientemente amplios para no dar como negativos sueros que podrían no serlo. A raíz de ello se ha considerado la media más cuatro

veces su DE como límite de posibles positividades. Los sueros que queden incluidos entre la

media más dos veces su DE y la media más cuatro veces su DE los consideramos como dudosos. Posiblemente algunos de estos sueros deberían considerarse como positivos, pero la dificultad que comporta el establecer un diagnóstico clínico correcto en los pacientes de los cuales procedían no nos permite asegurar tal circunstancia, máxime cuando es probable que la reacción enzimática obtenida fuera consecuencia de anticuerpos residuales procedentes quizás de toxocarosis ya pasadas.

La especificidad del ASE ha sido probada al estudiar un grupo de sueros de enfermos con otras parasitosis. Es sabido que el diagnóstico de ciertas infecciones humanas producidas por nematodos mediante métodos serológicos resulta muchas veces difícil, debido a la existencia de reacciones cruzadas y fracciones antigénicas interespecíficas entre individuos de un mismo grupo taxonómico. La heterogenicidad de los antígenos liberados, su composición química y estructura antigénica influirán en la frecuencia de reacciones cruzadas producidas por nematodos. La existencia de tales reacciones entre otras parásitos y T. canis ha sido puesta de manifiesto por diversos autores (3,4,34,53,54,58,78,79,104,111,125,162,165,180,181,189,208,225,239,246,261,264,277,278,288,289,314,322).

En los últimos años, los estudios de especificidad realizados al valorar técnicas inmunoenzimáticos con diversos antígenos larvarios, en individuos con distintas parasitosis, han mostrado la especificidad y sensibilidad de la técnica EIA cuando se utiliza antígeno de secreción-excreción (104,111,165,180,181,209,264,288,289). Al investigar la existencia de posibles reacciones cruzadas, al enfrentar el ASE de Toxocara canis frente a sueros de enfermos con otras

parasitosis, podemos deducir la gran especificidad de este antígeno.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los hallados por otros autores. Savigny et al (264) al estudiar 62 nematodosis sólo halla positividad en un parasitismo por tricocefalosis (165) uno por uncinariosis y uno por filariosis. Van Knapen et al (165) utilizando un ASE, no halla en EIA reacciones cruzadas con ascariosis, triquinelosis y estrongiloidosis. Maizels et al (189) empleando técnicas de inmunoprecipitación tan sólo halla reacciones cruzadas en enfermos con ascariosis y filariosis. Sin embargo dichos autores se preguntan si son realmente reacciones cruzadas puesto que no logran reproducirlas experimentalmente. Tampoco hallan reacciones cruzadas entre enfermos con otras parasitosis Speiser y Weiss (288) y Lynch et al (180,181). Sin embargo, estos últimos cuando estudian poblaciones tropicales que viven en condiciones hiperendémicas de helmintosis, si dicen hallar cierto grado de reacciones cruzadas con otros helmintos, especialmente Ascaris y proponen un método de inhibición competitiva para obviar estas posibles reacciones.

Infestaciones experimentales en modelo murino realizadas por Nicholas et al (208) indican la existencia de reacciones cruzadas con Toxocara cati, Toxocara pteropodis y Ascaris suum en RIA, pero no con Toxascaris leonina. Estas inespecificidades se siguen manteniendo, aunque en menor grado en EIA. Por el contrario Cuellar et al (52,57) y Fenoy et al (78,79) no hallan positividad al empleo de ASE de T. canis y el suero de ratones inmunizados frente a T. leonina y A. suum. Datos que también confirman cuando utilizan un modelo humano, enfrentando sueros positivos en EIA a ASE de T. canis con extractos de adultos de T. leonina y A. suum. Respecto a la existencia de comunidades antigénicas entre T. canis y T. cati es interesante resaltar que estudios

comparativos realizados con sus respectivos antígenos de secreción-excreción, revelan un marcado grado de homología, tanto fisicoquímica como en relación a la respuesta inmune que generan. Ello implicaría que la probable respuesta inmune frente a T. canis es indistinguible, mediante el uso de técnicas serológicas corrientes, de la producida por T. cati (160).

En este trabajo, al estudiar 34 sueros pertenecientes a pacientes con diversas helmintosis sólo se halló seropositividad en dos de ellos. Uno perteneciente a un paciente diagnosticado serológicamente de triquinelosis (contrainmunolectroforesis) y el otro a una enferma poliparasitada por Necator americanus, Trichuris trichiura y Ascaris lumbricoides.

La seropositividad (66%) hallado en el suero del enfermo con anticuerpos anti-Trichinella, próxima al límite de los sueros considerados dudosos, dificulta su interpretación. La ausencia de positividad en los demás sueros (11 sueros) de pacientes con triquinelosis, consideramos que descarta la posibilidad de reacciones cruzadas entre ambos antígenos (Toxocara y Trichinella). Es posible que la baja seropositividad hallada sea un título de recuerdo de una Toxocarosis antigua.

Un caso distinto es el del suero perteneciente a una paciente poliparasitada, en la cual la positividad fué extremadamente alta (284%). Dicha positividad pensamos que puede ser debida o bien a una fuerte reacción cruzada entre los antígenos de Ascaris y Toxocara o bien a la concomitancia de ambos parásitos en dicha paciente. A partir de los resultados obtenidos y de los datos publicados acerca la especificidad de los antígenos de ambos ascáridos, nosotros nos inclinamos hacia la segunda posibilidad. A pesar de que algunos autores han señalado la existencia de reacciones cruzadas entre

antígenos de Ascaris y Toxocara (111,239,264), ello suele tener lugar al tratarse de antígenos somáticos procedentes de adultos, huevos o larvas. Hogart-Scott (132) considera que los antígenos de secreción-excreción de los nemátodos son específicos de género y que los títulos altos de anticuerpos específicos heterólogos, presumiblemente hallados mediante EIA, fundamentalmente cuando se trata de especies de epidemiología similar, sean consecuencia de infecciones concomitantes. Van Knapen (165) por otro lado, al estudiar un grupo de sueros de pacientes infestados por diversos parásitos tan sólo halla positividad al antígeno de Toxocara en un niño parasitado por Enterobius y dos con giardiosis.

El estudio de un grupo de pacientes parasitados por distintos protozoos, no ha revelado ninguna seropositividad. Estos resultados coinciden con los hallados por algunos autores, que al estudiar diversos enfermos con toxoplasmosis, leishmaniosis y tripanosomosis no ponen en evidencia la existencia de reacciones cruzadas entre protozoos y T. canis (104,165,180,181).

**III.1.3 DETERMINACION DE OTRAS INMUNOGLOBULINAS ESPECIFICAS  
(IgM, IgA, IgE).**

**III.1.3.1 CALCULO DE LA DILUCION SERICA Y DE CONJUGADO**

Al no disponer de un suero control positivo estandarizado, para la determinación de IgM, IgA e IgE, y con el fin de calcular la dilución sérica adecuada, se han ensayado dos controles positivos pertenecientes a pacientes con clínica sospechosa de Toxocarosis y cuya positividad habia sido comprobada por el CDS de Atlanta (USA), y dos sueros controles negativos pertenecientes a donantes sanos.

**A. IgM especificas**

Con los controles positivos y negativos se han realizado tres diluciones 1/100, 1/200 y 1/400. El conjugado anti- $\mu$  peroxidasa se ha utilizado a la dilución recomendada por la casa comercial (Tabla 19).

<hr/>				<hr/>			
Sueros				Sueros			
positivos	1/100	1/200	1/400	negativos	1/100	1/200	1/400
<hr/>				<hr/>			
C 1	1.210	0.760	0.532	C 3	0.230	0.054	0.022
C 2	0.711	0.398	0.323	C 4	0.258	0.093	0.081
<hr/>				<hr/>			

Tabla 16. DO<sub>600</sub> obtenidas al ensayar dos sueros positivos y dos negativos a distintas diluciones con una dilución de anti-IgM<sup>P0</sup> de 1/2000.

Se observa que la DO al pasar la dilución sérica de 1/100 a 1/200 sufre un descenso, que se sigue manteniendo a la dilución de 1/400. Es por ello que en posteriores determinaciones, se ha utilizado como única dilución sérica diagnóstica la de 1/100 (Tabla 16 Y 19).

**B. IgA e IgE específicas**

Se han ensayado dos controles positivos y dos controles negativos a 3 diluciones 1/100, 1/200, 1/400 y como dilución del conjugado se ha utilizado, la recomendada por la casa comercial (Tablas 17,18 Y 19).

Sueros positivos				Sueros negativos			
	1/100	1/200	1/400		1/100	1/200	1/400
C 1	0.285	0.191	0.132	C 3	0.027	0.012	0.009
C 2	0.430	0.272	0.106	C 4	0.046	0.020	0.015

Tabla 17. DO<sub>600</sub> obtenidas al ensayar dos sueros positivos y dos negativos a distintas diluciones con una dilución de anti IgA<sup>PO</sup> de 1/2000.

Sueros positivos				Sueros negativos			
	1/100	1/200	1/400		1/100	1/200	1/400
C 1	0.123	0.086	0.102	C 3	0.034	0.000	0.011
C 2	0.108	0.053	0.042	C 4	0.025	0.000	0.009

Tabla 18. DO<sub>600</sub> obtenidas al ensayar dos sueros positivos y dos negativos a distintas diluciones con una dilución de anti IgE<sup>PO</sup> de 1/1000.

Observamos que tanto para IgA como IgE el paso de la dilución sérica del 1/100 a 1/200 se hace patente con un descenso de la DO. En estudios posteriores se ha escogido como única dilución sérica la de 1/100.

### III.1.3.2 CONTROLES

En cada placa se han incluido los siguientes controles:

- a) **Control positivo y calibrador:** formado por un "pool" de sueros humanos con clínica sospechosa de Toxocarosis y con serología positiva (determinación de IgG específicas), a las diluciones séricas e 1/100, 1/200 y 1/400.
- b) **Control negativo:** formado por un "pool" de sueros de donantes sanos a la dilución sérica de 1/100.
- c) **Control conjugado:** se sustituye el suero a ensayar por PBS-T-S.
- d) **Control suero o blanco:** se omite la adición de conjugado y en su lugar se adiciona PBS-T-S. El suero se utiliza a la dilución sérica 1/50.

Dilución conjugado	Dilución suero
Anti IgM <sup>P0</sup> 1/2000	1/100
Anti IgA <sup>P0</sup> 1/2000	1/100
Anti IgE <sup>P0</sup> 1/1000	1/100

Tabla 19. Diluciones de trabajo de suero y conjugado para la determinación de IgM, IgA e IgE específicas.

III.1.3.3. CRITERIOS DE POSITIVIDAD

A falta de un criterio de positividad generalizado y la de sueros controles estandarizados para usár como referencia en la determinación de IgM, IgA e IgE específicas anti-Toxocara se ha decidido utilizar el criterio señalado en al apartado II.1.2.6, para la determinación de IgG específica.

El hecho de que el suero control positivo alto posea una tasa elevada de IgM, detectada a través de una DO elevada, y el gran número de sueros estudiados nos ha inducido a utilizar como criterio de positividad, al igual que para las IgG, el porcentaje de positividad:

$$\%p = \frac{\text{DO}_{600} \text{ sueros problema}}{\text{DO}_{600} \text{ "pool" sueros positivos}} \times 100$$

Para IgA e IgE donde las DO obtenidas en los sueros control positivos, si bien fueron superiores a las de los negativos no alcanzaron nunca valores de 0.5 y el número de sueros estudiados fue bajo, preferimos expresar la positividad en valores absolutos de DO aún cuando conscientes de los peligros que ello comporta.

Los límites de positividad se calcularon para cada clase de inmunoglobulina a partir de sueros en los cuales se había estudiado previamente la presencia de IgG específicas anti-Toxocara con resultado negativo.

El número de sueros estudiados en cada caso, 129 para IgM y 20 para IgA e IgE, el resultado obtenido para cada uno de

ellos, y el cálculo de los límites de positividad se indican en las tablas 20,21 y 22.

De acuerdo con los resultado obtenidos y los criterios de positividad indicados al principio, los sueros se han distribuido tal como se indica en las tablas 23 y 24.

---

<u>IgM</u>		
Negativos	$\%p < 68\%$	$(\%p < x + 2DE)$
Dudosos	$68\% < \%p < 102\%$	$(x + 2DE < \%p < x + 4DE)$
Positivos	$\%p > 102\%$	$(\%p > x + 4DE)$

---

Tabla 23. Criterios de positividad para IgM específicas

---

	<u>IgA</u>	<u>IgE</u>	
Negativos	$DO_{600} < 0.054$	$Do_{600} < 0.027$	$(DO < x + 2DE)$
Dudosos	$0.054 < DO_{600} < 0.091$	$0.027 < DO_{600} < 0.048$	$(x+2DE < DO < x+4DE)$
Positivos	$DO_{600} > 0.091$	$DO_{600} > 0.048$	$(DO > x + 4DE)$

---

Tabla 24. Criterio de positividad para IgA e IgE específicas.

%p	(DO600)	%p	(DO600)	%p	(DO600)	%p	(DO600)	%p	(DO600)	%p	(DO600)
49	(0.371)	29	(0.220)	31	(0.235)	72	(0.547)*	103	(0.725)*	74	(0.567)*
62	(0.470)	87	(0.666)*	18	(0.139)	33	(0.250)	40	(0.306)	31	(0.237)
43	(0.330)	70	(0.532)*	66	(0.504)	32	(0.247)	33	(0.253)	49	(0.372)
44	(0.335)	14	(0.110)	9	(0.070)	50	(0.385)	24	(0.186)	25	(0.190)
44	(0.339)	32	(0.256)	57	(0.451)	18	(0.138)	24	(0.194)	19	(0.149)
56	(0.436)	42	(0.326)	26	(0.207)	23	(0.179)	58	(0.450)	23	(0.178)
13	(0.105)	64	(0.499)	41	(0.318)	57	(0.443)	42	(0.327)	108	(0.760)*
85	(0.601)*	71	(0.552)*	60	(0.463)	41	(0.318)	42	(0.331)	79	(0.614)*
42	(0.331)	22	(0.171)	4	(0.370)	68	(0.494)	93	(0.674)*	43	(0.312)
21	(0.155)	24	(0.175)	38	(0.275)	132	(0.960)*	72	(0.522)*	122	(0.882)*
22	(0.157)	120	(0.864)*	66	(0.474)	21	(0.158)	47	(0.340)	102	(0.716)*
31	(0.224)	104	(0.730)*	54	(0.393)	60	(0.434)	105	(0.760)*	40	(0.292)*
35	(0.257)	41	(0.299)	32	(0.234)	29	(0.299)	53	(0.552)	53	(0.551)
27	(0.280)	29	(0.300)	35	(0.357)	43	(0.448)	18	(0.189)	46	(0.471)
23	(0.240)	27	(0.275)	27	(0.282)	23	(0.240)	26	(0.266)	28	(0.292)
29	(0.304)	38	(0.388)	15	(0.161)	21	(0.218)	52	(0.540)	20	(0.204)
27	(0.280)	19	(0.194)	20	(0.204)	31	(0.325)	28	(0.293)	49	(0.509)
31	(0.325)	99	(0.697)*	29	(0.201)	51	(0.366)	63	(0.444)	15	(0.107)
16	(0.114)	5	(0.037)	14	(0.100)	10	(0.068)	13	(0.090)	37	(0.258)
17	(0.120)	3	(0.026)	13	(0.096)	124	(0.873)*	0	(0.002)	0	(0.001)
32	(0.230)	36	(0.258)	64	(0.450)	5	(0.008)	12	(0.015)	0	(0.001)
31	(0.222)	71	(0.541)*	44	(0.336)						

n= 109

$\bar{x}$ = 32.7

DE= 17.6

Tabla 20. Determinación de los límites de positividad para IgM específicas.

Valores obtenidos con 129 sueros analizados %p (DO600).

\* valores eliminados por aberrantes.

IgA (DO <sub>600</sub> )	
0.041	0.046
0.015	0.000
0.026	0.003
0.014	0.000
0.009	0.025
0.000	0.000
0.051	0.001
0.044	0.002
0.031	0.000
0.034	0.001

n = 20  
 $\bar{x}$  = 0.0171  
DE = 0.0183

Tabla 21. Determinación de los límites de positividades para IgA específicas.  
Valores obtenidos con 20 sueros analizados (DO<sub>600</sub>).

IgE (DO <sub>600</sub> )	
0.025	0.000
0.018	0.000
0.006	0.000
0.037*	0.000
0.000	0.000
0.010	0.000
0.000	0.000
0.000	0.000
0.019	0.000
0.000	0.000

n = 20  
 $\bar{x}$  = 0.0057  
DE = 0.0106

Tabla 22. Determinación de los límites de positividad para IgE específicas.  
Valores obtenidos con 20 sueros analizados (DO<sub>600</sub>).

\* valores eliminados por aberrantes.

### III.1.3.4 MATERIAL ESTUDIADO Y RESULTADOS

#### A. Estudio de IgM específicas

Se ha estudiado la presencia de IgM anti - Toxocara en un total de 246 sueros de los que 31 fueron positivos para IgG y 215 negativos. Al aplicar los criterios de positividad expuestos anteriormente (apartado II.2.3) los resultados obtenidos han sido los expresados en la tabla 25 y Figura 15.

Sueros estudiados	IgM positivos	IgM dudosos	IgM negativo	Total
IgG positivos	7	1	23	31
IgG negativos	8	13	194	215
Total	15	14	217	246

Tabla 25. Sueros positivos y negativos hallados al estudiar la presencia de anticuerpos IgM específicos.

#### B. Estudio de IgA e IgE específica

El estudio de la presencia de IgA e IgE específica se ha realizado en 41 sueros, 21 de los cuales habían sido

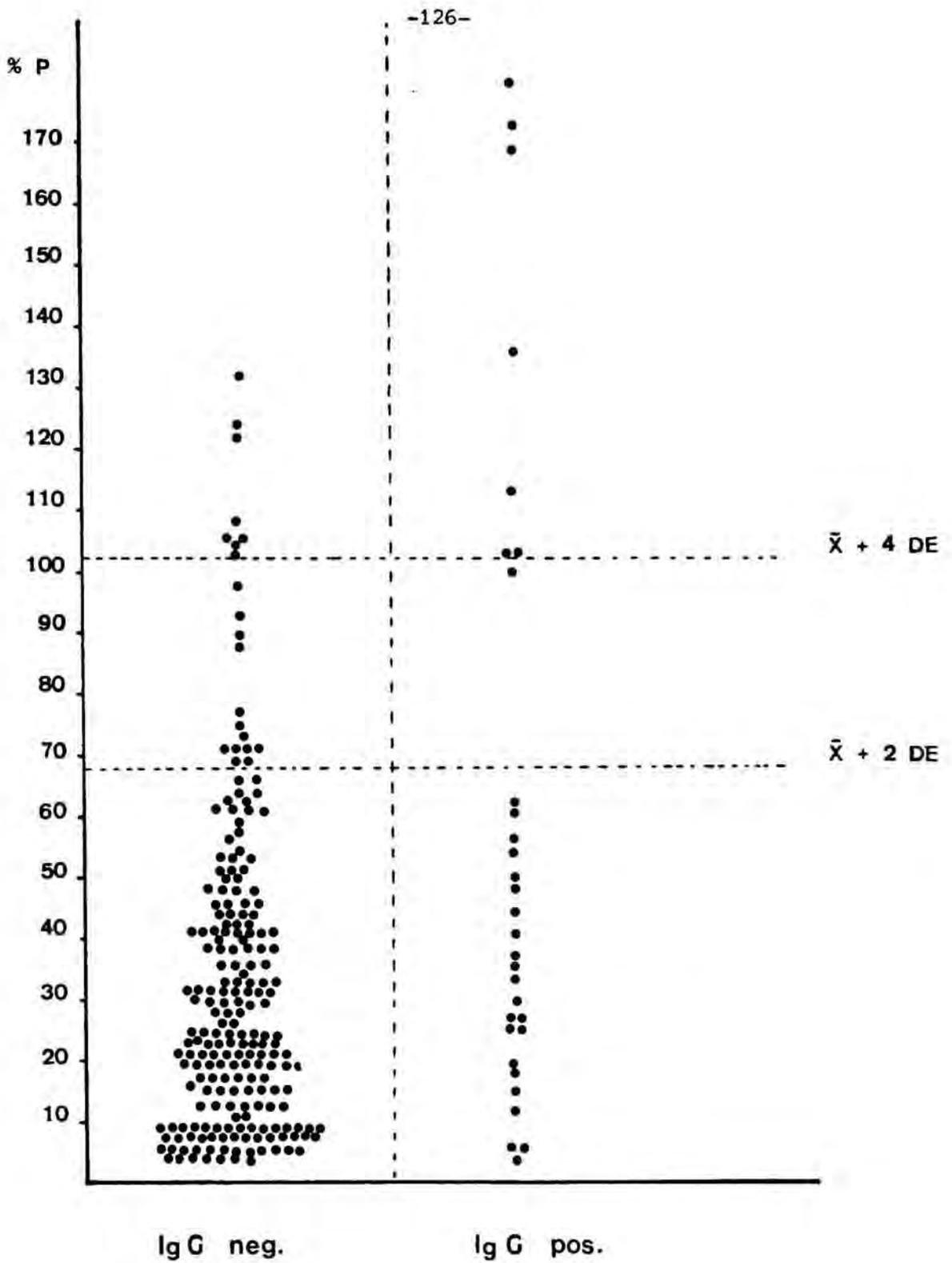


Figura 15. IgM en sueros IgG positivos e IgG negativos.

positivos a IgG y 20 negativos. Al aplicar los criterios de positividad expuestos en el apartado III.1.3.3. se han obtenido los resultados que se expresan en las Tablas 26 y 27 (Figuras 16 y 17).

Sueros estudiados	IgA positivos	IgA dudosos	IgA negativos	Total
IgG positivos	15	-	6	21
IgG negativos	-	-	20	20
Total	15	0	26	41

Tabla 26. Sueros positivos y negativos hallados al estudiar la presencia de anticuerpos IgA específicas.

Sueros estudiados	IgE positivos	IgE dudosos	IgE negativos	Total
IgG positivos	9	9	3	21
IgG negativos	-	4	16	20
Total	9	13	19	41

Tabla 27. Sueros positivos y negativos hallados al estudiar la presencia de anticuerpos IgE anti-Toxocara.

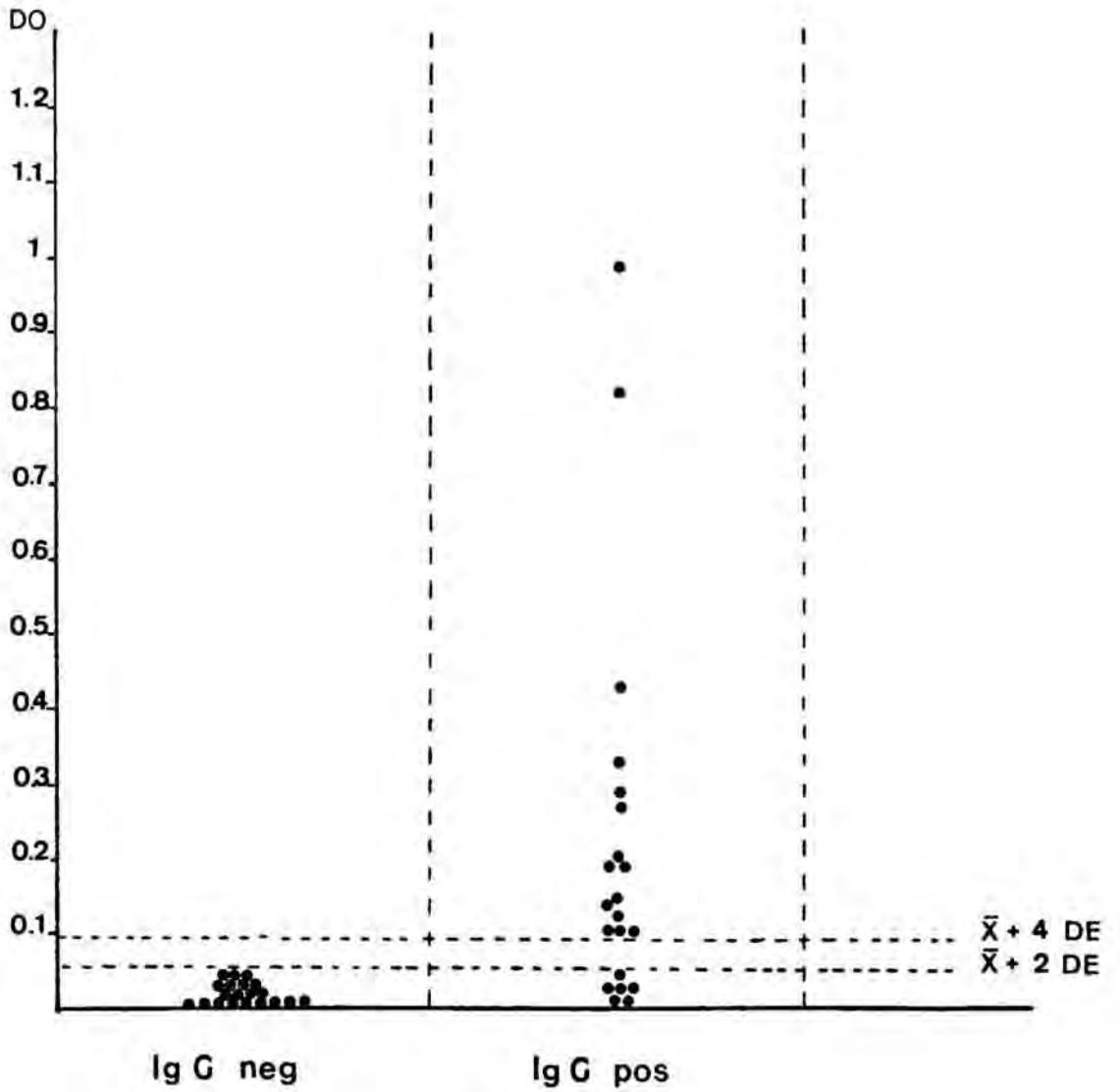


Figura 16. IgA en sueros IgG positivos e IgG negativos.

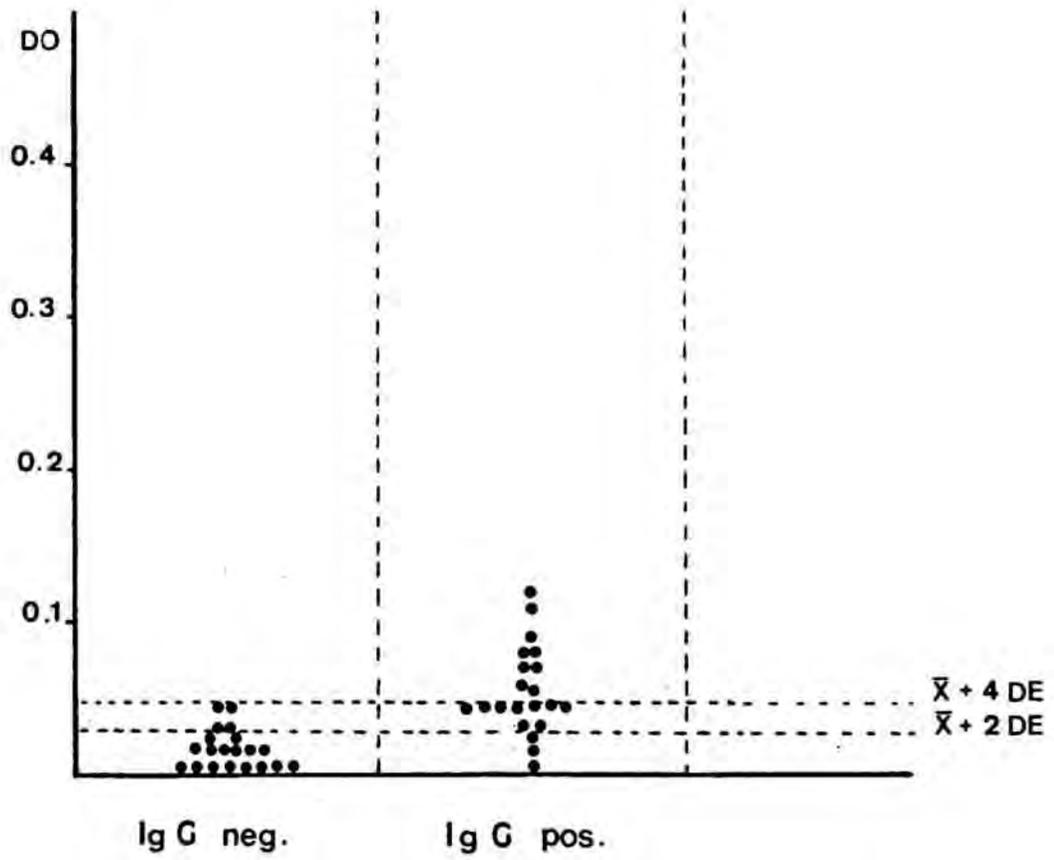


Figura 17. IgE en sueros IgG positivos e IgG negativos.

### III.1.3.5. DISCUSION

En la determinación de IgM específicas tan solo siete de los 31 sueros positivos para IgG anti-Toxocara dieron también positividad. En estos casos esta positividad ha estado asociada a tasas muy elevadas de IgG específicas. En la Figura 18 se representa los resultados obtenidos para IgG e IgM del conjunto de sueros estudiados para ambas inmunoglobulinas. Se observa la existencia de correlación directa ( $r=0.33$ ;  $\alpha < 0.001$ ) entre ambas determinaciones.

Estos resultados coinciden con los hallados por Patterson et al (229) que al estudiar la presencia de anticuerpos anti-Ascaris halla gran correlación entre el título de IgG e IgM específicas. Más recientemente Smith et al (282) al estudiar una población adulta y otra pediátrica de distinta procedencia también hallan, en aquellos sueros de pacientes sospechosos de Toxocarosis, una tasa elevada de IgG e IgM específicas.

Experimentalmente en ratón, se detecta una estrecha relación entre la presencia de antígeno circulante de secreción-excreción y la tasa de IgG e IgM; la aparición de antígeno e IgM específica se evidencia en la primera semana post-infección con un pico a las 3 - 6 semanas para luego decrecer. La presencia de antígeno e IgG específicas aparece a la segunda semana de la infección con un pico a las 6-8 semanas (32).

En ensayos llevados a cabo en perros, también se observa una correlación entre la presencia de antígeno circulante e IgM, sin embargo los títulos de IgM, después de alcanzar un pico pueden permanecer constantes durante toda la vida del animal (194-196).

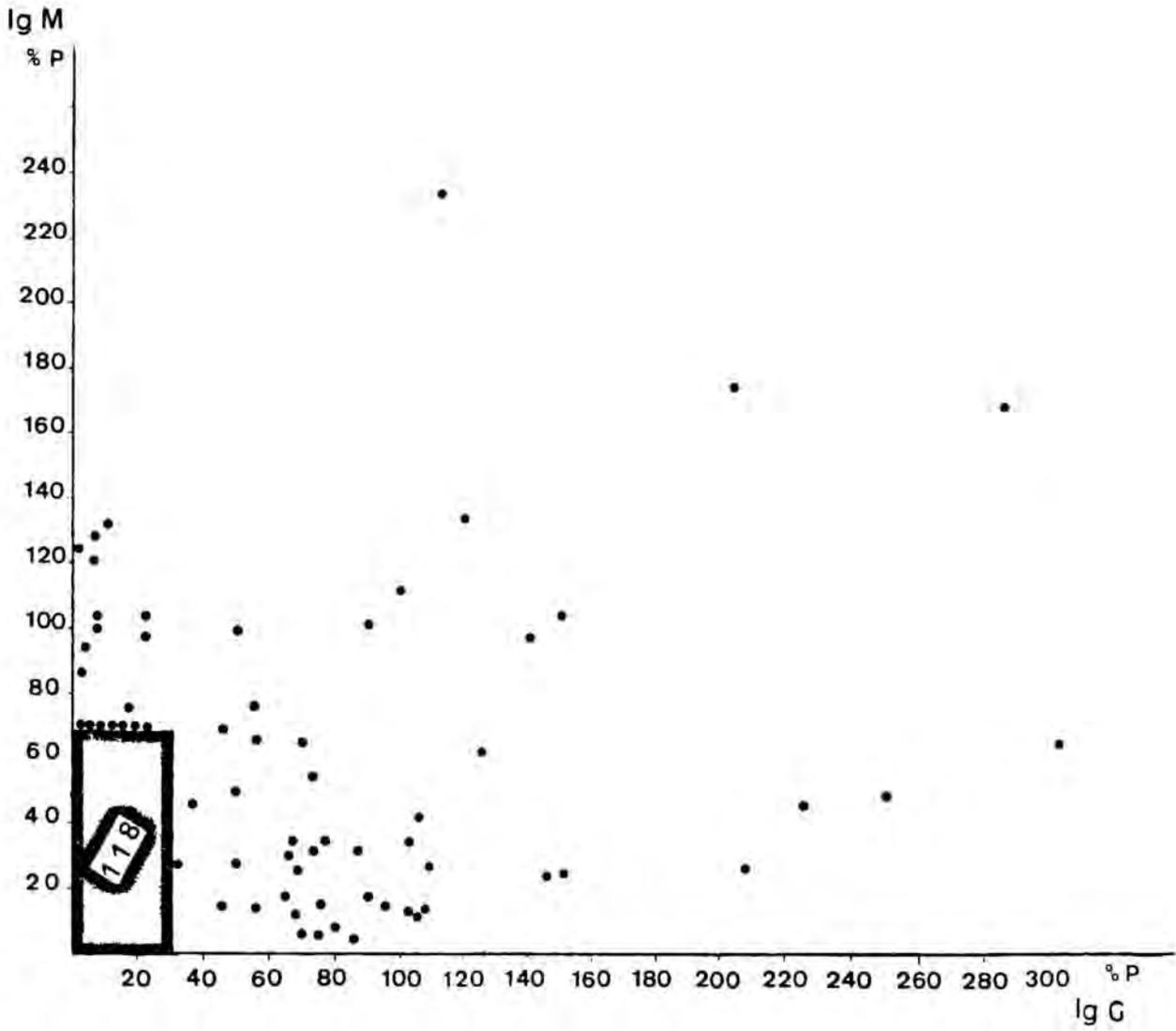


Figura 18. Correlación entre la determinación de IgM e IgG anti-Toxocara ( $r=0,33$ ;  $\alpha < 0,001$ ).

Es posible que la distinta cinética de la tasa de IgM específicas en animales de experimentación, huéspedes no habituales del parásito (conejos, ratones) y en el perro, hospedador natural de T. canis, sea consecuencia del distinto comportamiento del parásito en ambos hospedadores. En el perro, la presencia de una cierta tasa de IgM específicas durante toda la vida del animal parasitado, puede estar relacionado con la alternancia de estados de quiescencia y reactivaciones que sufre el parásito. La poca información con que contamos acerca la posible actividad del parásito en los pacientes a los que se les detectó IgG específicas anti-Toxocara dificulta la discusión de los resultados obtenidos.

En la mayoría de los casos estudiados se trata de estudios retrospectivos (Capítulo III.3) y de sueros procedentes del criobanco. En otros casos se trata del estudio continuado de pacientes con sospecha o diagnóstico de Toxocarosis. A pesar de ello en la mayoría de los casos, la anamnesis del paciente recoge que alguno de los síntomas (eosinofilia, dolor abdominal, etc), llevaban meses o años de evolución. Es difícil por lo tanto conocer en que fase de la infección nos hallamos en cada uno de los casos. En algunos de los pacientes a los que se detectó una Toxocarosis que por la clínica consideramos en curso (Tablas 38 y 39), se detectó la presencia de IgM en las muestras iniciales si bien esta presencia pudo prolongarse hasta cuatro años después de la primera determinación.

En cuanto a la validez de la técnica desarrollada para la determinación de esta clase de inmunoglobulinas podemos indicar su notable sensibilidad, acompañada a nuestro entender de una notable inespecificidad; puesto que es difícil de aceptar la existencia de IgM específicas, con una frecuencia tan elevada (Tabla 25), entre pacientes IgG

negativos. Las causas de tal inespecificidad se estudian en los capítulos subsiguientes.

La inmunoglobulina de la clase IgA se ha detectado en la mayoría de pacientes positivos, observándose también una notable correlación (Figura 19), ( $r=0.7$  y  $\alpha < 0.001$ ) entre la tasa de IgG e IgA específicas presentes en el suero.

Estudios realizados en perros por Matsumura et al (195,196) indican la presencia de títulos elevados de IgA durante el primer mes de vida de estos animales sugiriendo los autores la posibilidad de que fuera consecuencia del estímulo inmunitario realizado por los adultos al llegar al intestino.

La inexistencia de fase entérica en el ciclo de Toxocara en el hombre, descarta este razonamiento en nuestro caso. No acertamos a dar una explicación plausible al incremento de IgA específicas observado en pacientes seropositivos. Es posible que dicha presencia esté relacionada con la migración pulmonar del parásito, ya que la relación entre hábitat pulmonar e incremento de esta clase de inmunoglobulina ha sido denunciado para otras helmintosis (207,235,236).

La presencia de IgE específicas en pacientes afectos de Toxocarosis ha sido repetidamente denunciada en la bibliografía especializada (100,133,229,282). Algunos autores como Caucanas et al (43) señalan la presencia de IgE específicas en dos tercios de los pacientes con sintomatología de Toxocarosis. Brunello et al (39) señalan que no hallan correlación entre los incrementos de IgE totales hallados en pacientes con Toxocarosis y las de IgE específicas. Patterson et al (229) mediante radioinmunoensayo detectan la presencia de IgG e IgM específicas pero no la de IgE.

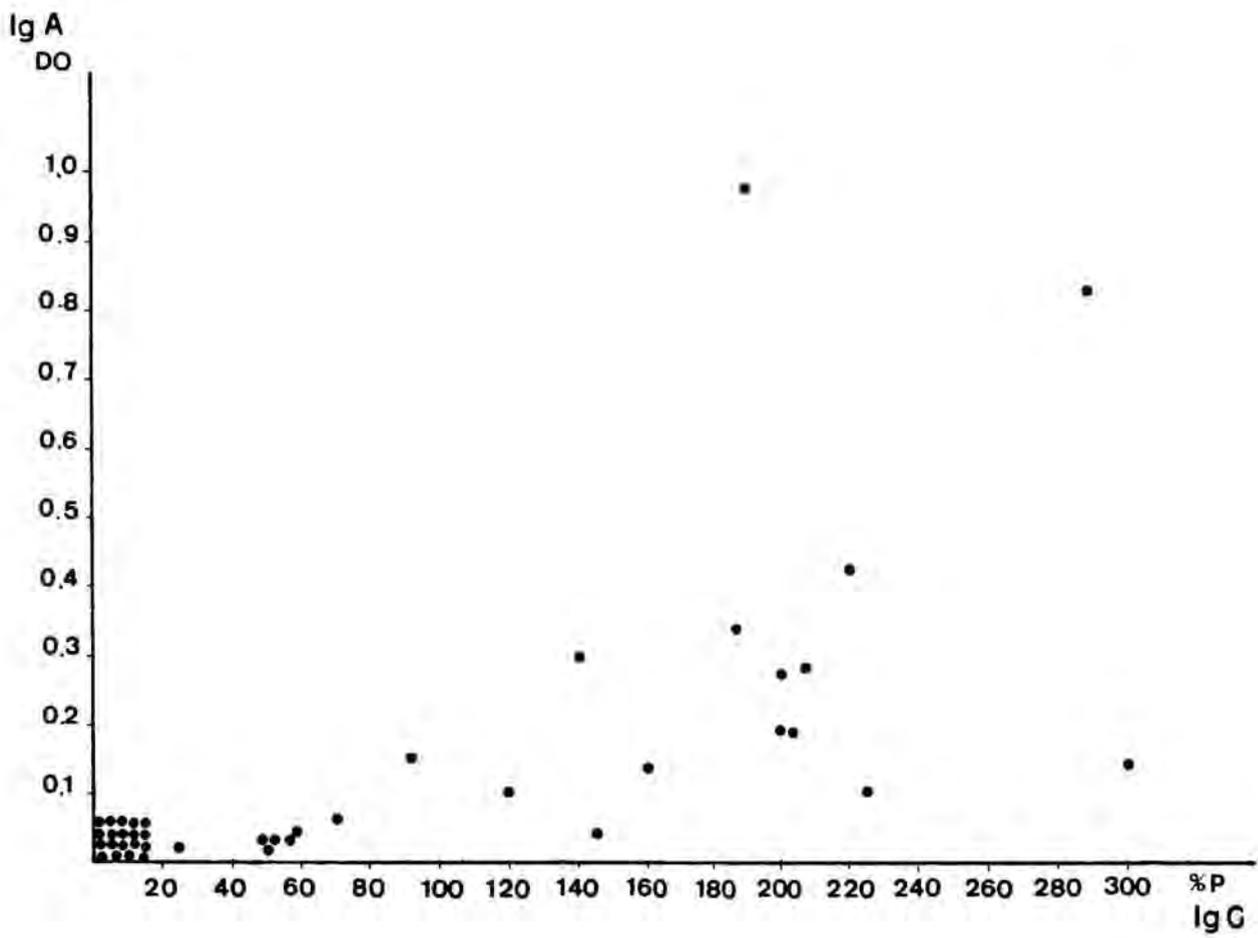


Figura 19. Correlación entre la determinación de IgA e IgG anti-Toxocara ( $r=0,7$ ;  $\alpha < 0,001$ ).

En nuestros pacientes se observa un incremento de las IgE específicas en todos aquellos casos en que se detectó también la presencia de IgG, sin embargo las bajas densidades ópticas obtenidas, tanto en los sueros consideradas positivos como negativos dificulta la interpretación de los resultados. Pensamos que, al igual que con los resultados de Patterson et al (229) nos hallamos frente a un problema de sensibilidad de la técnica debido a la competición que sin duda realizarán las IgG presentes en el suero por ocupar los determinantes antigénicos de la placa. Estudios comparativos realizados por diversos autores han mostrado que si bien la utilización de técnicas de radioinmunoensayo o enzimoimunoensayo no supone variaciones notables en cuanto a la sensibilidad (38,308), esta si se ve notablemente aumentada en cualquiera de ellas después de eliminar la presencia de IgG. Otras técnicas como el EIA de captura y variaciones de la misma (45), podrían incrementar la sensibilidad de la técnica en la detección de IgE específicas.

La detección de IgA e IgE específicas puede ser útil en la evaluación del curso de la enfermedad. Así Smith et al (281) recomienda la determinación e IgE específicas para evitar falsos positivos debido a la interferencias que pueden producir tasas altas de isohemaglutininas.

### III.1.4 INESPECIFICIDAD DEBIDA A LA PRESENCIA DE FACTOR REUMATOIDE

La presencia en el suero de anticuerpos naturales anti IgG de tipo factor reumatoide (RF), así como la alta sensibilidad de la técnica EIA, responsable a veces de una elevada coloración de fondo, puede disminuir la especificidad de la prueba, principalmente cuando el conjugado utilizado es una anti IgM<sup>P0</sup>.

Es por ello que se ha estudiado la implicación que el RF puede tener en la determinación de IgM anti - Toxocara

#### III.1.4.1. Material estudiado

De entre los sueros que habían resultado negativos en la determinación de IgG anti-Toxocara, y no en cambio en la de IgM, se seleccionaron ocho considerados como positivos y 5 como dudosos para esta clase de inmunoglobulina. En ellos se ha determinado la presencia de RF mediante la técnica de látex (Rapid Tex<sup>R</sup>, RF Behring). Aquellos sueros que han resultado positivos han sido absorbidos con una anti-IgG humana comercializada (Absorbant RF Behring) con el fin de eliminar las IgG e inmunocomplejos IgG-IgM (RF) presentes.

Después de la absorción se ha realizado un EIA, como se ha descrito en el apartado III.1.3, en paralelo con el suero sin absorber.

#### III.1.4.2 Resultados

En las tablas 28 y 29 se expresa el %p (DO<sub>600</sub>) de los sueros IgM dudosos e IgM positivos, antes y después de la absorción,

así como los resultados obtenidos al efectuar el látex RF.

N° suero	%p (DO <sub>600</sub> )		Látex RF		
	<u>S.Abs</u>		<u>Abs.RF</u>		
L-85	85	(0.601)	31	(0.219)	+
1812-QH	78	(0.547)	11	(0.077)	+
33197	95	(0.666)	45	(0.315)	--
184-A	96	(0.674)	16	(0.125)	++
160-A	81	(0.567)	31	(0.215)	+

Tabla 28. Sueros IgM dudosos e IgG negativos. %p (DO<sub>600</sub>) obtenidos en la determinación de IgM específicas al absorber los sueros con Absorbent RF (Abs RF) y sin absorber (S.Abs). Dudosos: 68% < %p < 102%

N° suero	%p (DO <sub>600</sub> )		Látex RF		
	<u>S.Abs</u>		<u>Abs.RF</u>		
1804-QH	103	(0.725)	76	(0.536)	+
190-A	102	(0.716)	17	(0.119)	+++
193-A	104	(0.730)	21	(0.145)	+++
196-A	108	(0.760)	45	(0.319)	+
1832-QH	108	(0.760)	57	(0.397)	+
L-91	126	(0.882)	46	(0.325)	+
L-92	123	(0.864)	15	(0.108)	+++
3353-T	137	(0.960)	75	(0.527)	--

Tabla 29. Sueros IgM positivos e IgG negativos. %p (DO<sub>600</sub>) obtenidos en la determinación de IgM específica al absorber los sueros con Absorbant RF (Abs RF) y sin absorber (S.Abs). Positivos: %p > 102%.

Junto a los sueros anteriormente citados y como control de absorción incluyeron 3 sueros de pacientes IgG positivos cuyo cuadro clínico era sospechoso de una LMV o LMO, obteniéndose los resultados que figura en la Tabla 30.

Suero	S.Abs	Abs.RF	
1	131 (0.923)	125 (0.877)	LMV
2	130 (0.915)	136 (0.956)	LMV
3	86 (0.603)	91 (0.637)	LMO

Tabla 30. %p (DO<sub>600</sub>) obtenidos en la determinación de IgM específicas de 3 sueros de pacientes IgG positivos después de ser absorbidos con RF Absorbant.

Después de la absorción tanto en los sueros dudosos como en los positivos se observa un descenso en la reacción enzimática llegando a negativizar todos ellos. No ocurre lo mismo con los sueros IgG positivos, los cuales se mantienen positivos para IgM después de la absorción con RF.

El descenso de positividad anteriormente citado es mucho más notable en los sueros que el test de látex fué ++ o +++.

#### III.1.4.3. DISCUSION

El factor reumatoide (RF) se halla normalmente en pacientes con artritis reumatoide clínica, aunque suele hallarse también en aquellos que sufren inflamaciones crónicas e incluso en individuos sanos. La mayoría de los RF son el tipo IgM, aunque algunos pueden ser de tipo IgG o IgA.

El RF posee la capacidad de formar inmunocomplejos "in vivo", al unirse al Fc de las IgG propias, que al hallarse unidas al antígeno específico son la causa de reacciones inespecíficas. Además pueden formar reacción cruzada con IgG de otras especies.

Estos RF son a menudo heterogéneos, pero pueden hacerse monoclonales, después de una prolongada enfermedad. En sueros hiperinmunes es frecuente hallar la presencia de RF; su función no está del todo clara, aunque es posible que liberen el plasma de inmunocomplejos circulantes.

Los resultados obtenidos en un grupo de sueros RF positivos revela su importancia en la determinación de IgM específicas. Son conocidas las falsas reacciones positivas debidas a la presencia de RF en suero, no sólo en EIA sino también en otras técnicas serológicas.

El hecho de que en ninguno de ellos se hubieran detectado IgG específicas dificulta el explicar de que forma el RF puede interferir, por lo que podemos considerar que las causas pueden ser varias.

- A) La baja dilución sérica empleada en la determinación de las IgM (1/100), si la comparamos con la utilizada en la determinación de las IgG específicas (1/800), aumentaría la concentración de IgG séricas del ensayo, de tal manera que algunas, que no tienen porque ser específicos, reconocerían algunos de los determinantes antigénicos del ASE. El RF se unirá al Fc de estas IgG heteroespecíficas revelándose al añadir el conjugado anti IgM<sup>P0</sup>.
  
- B) La mayoría de sueros estudiados pertenecían al grupo O (Tabla 31). Este grupo difiere de los A y B en que las isohemaglutininas de tipo natural son tanto de tipo IgG como IgM y que la tasa media de anticuerpos anti-A y anti-B es mucho más elevada, tal como hemos podido comprobar por los resultados obtenidos al determinar el título de isohemaglutininas de estos sueros (Tabla 31).

Este dato junto con el conocimiento de la composición bioquímica del ASE, podría explicar la causa de falsos positivos debida a RF.

Estudios electroforéticos realizados últimamente han revelado que el antígeno de superficie larvario y de secreción-excreción, está formado en un 40% por carbohidratos, de los que el 58.4% corresponde a la N-acetil galactosamina y el 24.5% a la galactosa, unidades terminales, respectivamente, de los grupos sanguíneos A y B (M13, R8).

Probablemente estos azúcares pueden ser reconocidos por anticuerpos inespecíficos, anti-A o anti-B, de tipo IgG, presentes en tasas elevadas en la mayoría de individuos O, y la presencia de RF ayudaría a revelar esta unión.

Por ello creemos que en aquellos casos en que se estén determinando IgM específicas y se detecte la presencia de FR, sería aconsejable separar o eliminar de dichos sueros las inmunoglobulinas de la clase IgG e inmunocomplejos IgG-IgM.

III.1.5. INESPECIFICIDAD DEBIDA A LA PRESENCIA DE ISOHEMAGLUTININAS

III.1.5.1 **Sueros de pacientes IgG negativas**

A los sueros IgG negativos, IgM positivos o dudosos estudiados en el capítulo anterior se les determinó el grupo sanguíneo al que pertenecían y la presencia de isohemaglutininas (Tabla 31).

N° suero	G.S.	Isohemaglutininas		IgM %p (DO <sub>600</sub> )
		Anti A	Anti B	
L-85	O	1/25600	1/25600	85 (0.601)
1812-QH	O	1/51200	1/51200	78 (0.547)
33197	-	-	-	95 (0.666)
184-A	O	1/6400	1/12800	96 (0.674)
160-A	AB	-	-	81 (0.567)
1804-QH	O	1/2800	1/6400	103 (0.725)
190-A	O	1/3200	1/1600	102 (0.716)
193-A	O	1/1600	1/6400	104 (0.730)
196-A	O	1/25600	1/25600	108 (0.760)
1832-QH	A	1/1600	-	108 (0.760)
L-91	O	1/25600	1/25600	126 (0.882)
L-92	O	1/800	1/12800	123 (0.864)
3353-T	-	-	-	137 (0.960)

Tabla 31. Determinación del grupo sanguíneo y título de isohemaglutininas en aquellos sueros IgG negativas, e IgM positivos o dudosos.  
GS: grupo sanguíneo.

Cabe destacar que casi la totalidad pertenecían al grupo O y presentaban una alta tasa de isohemaglutininas.

### III.1.5.2. Sueros de donantes de sangre

Para detectar las posibles interferencias debidas a la presencia de isohemaglutininas en sangre se han estudiado 118 sueros pertenecientes a donantes del Banco de Sangre del Hospital de la Sta. Creu i St. Pau. De estos 30 eran del grupo A, 30 del grupo B, 28 del grupo AB y 30 del grupo O.

Se ha determinado en todos ellos la presencia de IgG e IgM anti-Toxocara, obteniéndose las distribuciones que se muestran en las Figuras 20 y 21). Los seropositivos para IgG o IgM han sido sometidos a una absorción con hematies AB y O.

**Absorción:** Los hematies se lavan 4 o 5 veces con solución salina y se llevan a la concentración de 2%-3%. A 0.2 ml del sedimento del último lavado se le añaden 0.2 ml del suero a absorber, dejándose en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Se centrifuga la muestra a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos, y se recupera el sobrenadante. Paralelamente a la absorción con hematies AB, se ha realizado una absorción con hematies O como control.

Una vez el suero absorbido se ha realizado un EIA tal como se ha descrito en el apartado III.1.2.

En las tablas 32 y 33 se incluyen los resultados obtenidas en los sueros que fueron positivos para IgG. En la tabla 34 los aportados por el único suero hallado positivo para IgM en este lote de donantes sanos.

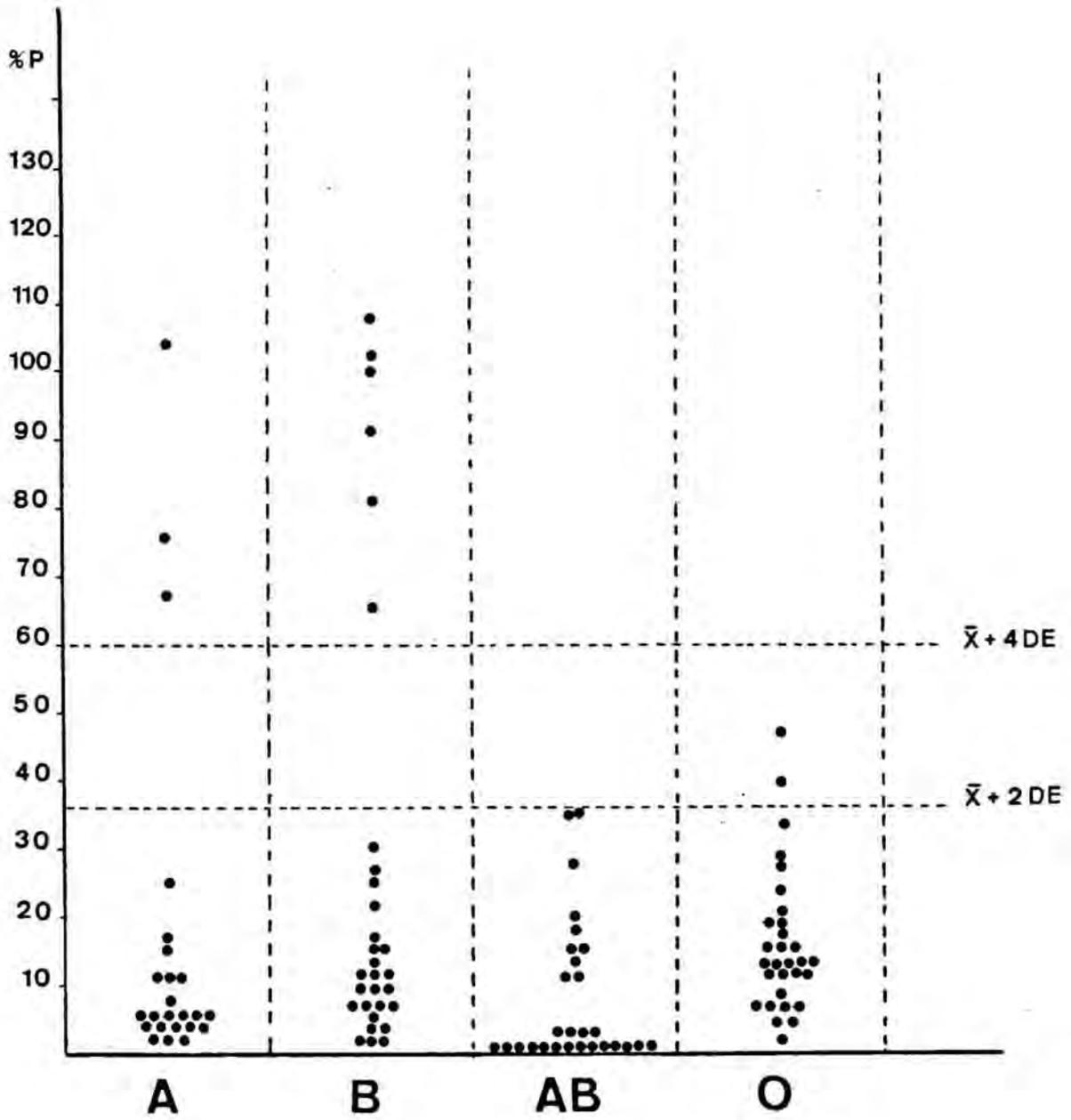


Figura 20. Determinación de IgG específicas en sueros de donantes de sangre, distribuidos según el grupo sanguíneo.

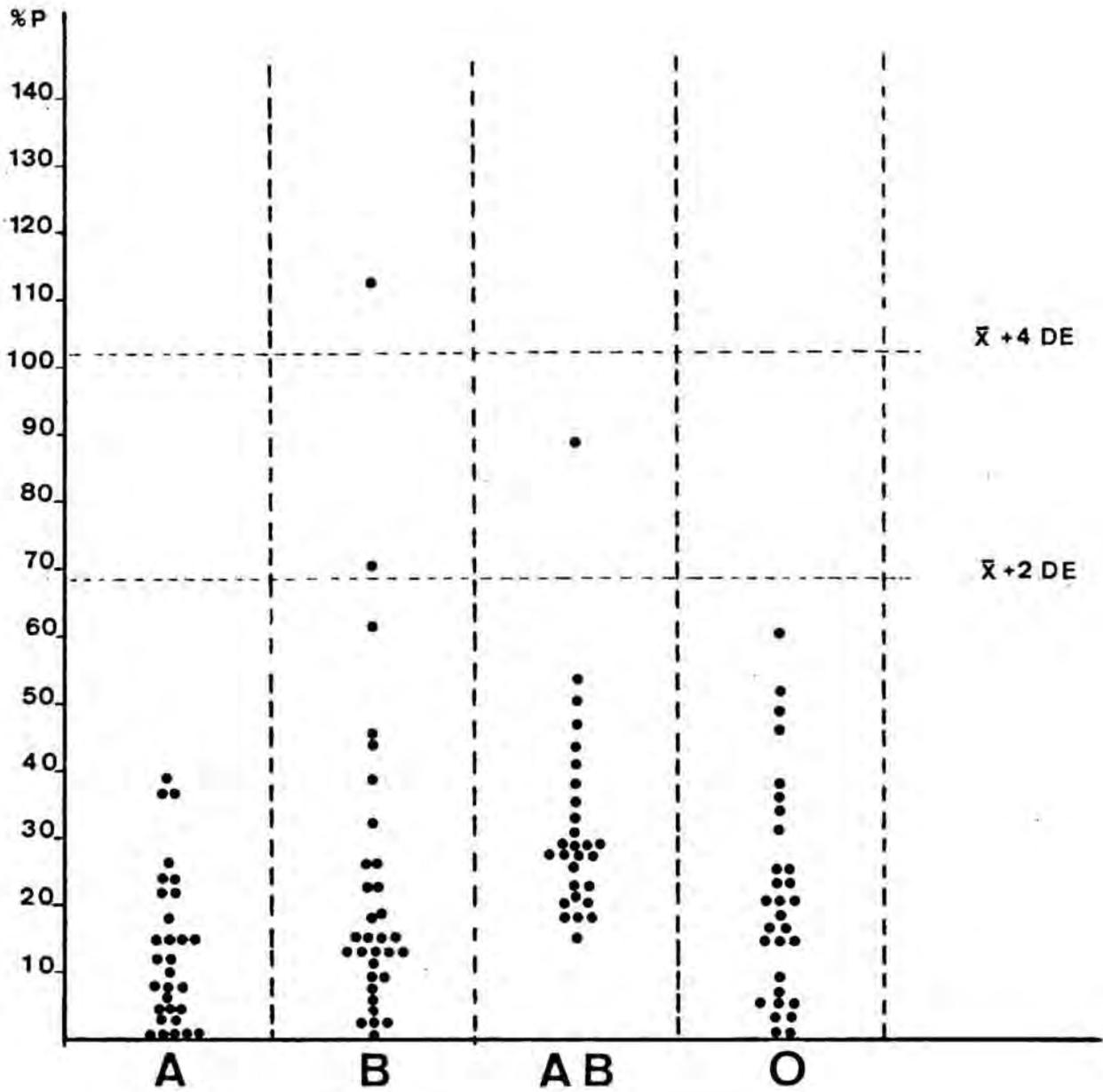


Figura 21. Determinación de IgM específicas en sueros de donantes de sangre distribuidos según el grupo sanguíneo.

Grupo A		%p (DO <sub>600</sub> )			Isohemaglutininas
N° suero					
	<u>S.Abs</u>	<u>Abs.AB</u>	<u>Abs.O</u>		<u>Anti B</u>
6	94 (0.316)	128 (0.430)	186 (0.625)		1/400
19	110 (0.370)	108 (0.365)	115 (0.386)		1/100
28	104 (0.351)	50 (0.167)	91 (0.305)		1/400

Tabla 32. Sueros grupo sanguíneo A.

%p (DO<sub>600</sub>) obtenidos en la determinación de IgG específicas al absorber los sueros con hematies AB (Abs.AB), hematies O (Abs.O) y sin absorber (S.Abs).

Grupo B		%p (DO <sub>600</sub> )			Isohemaglutininas
N° suero					
	<u>S.Abs</u>	<u>Abs.AB</u>	<u>Abs.O</u>		<u>Anti A</u>
6	136 (0.458)	153 (0.514)	161 (0.541)		1/800
8	87 (0.293)	86 (0.289)	109 (0.367)		1/100
9	110 (0.372)	107 (0.361)	124 (0.417)		<1/100
13	98 (0.328)	94 (0.317)	92 (0.310)		<1/100
24	64 (0.216)	79 (0.264)	72 (0.241)		1/400
25	76 (0.254)	84 (0.282)	82 (0.296)		<1/100

Tabla 33. Grupo Sanguíneo B

%p (DO<sub>600</sub>) obtenidos en la determinación de IgG específicas al absorber los sueros con hematies AB (Abs.AB), con hematies O (Abs.O) y sin absorber (S.Abs).

Grupo B		%p (DO <sub>600</sub> )				Isohemaglutininas
N° suero						
	<u>S.Abs</u>	<u>Abs.AB</u>	<u>Abs.O</u>	<u>Abs.RF</u>		<u>Anti A</u>
6	107 (0.751)	31 (0.219)	108 (0.762)	87 (0.607)		1/800

Tabla 34. %p (DO<sub>600</sub>) obtenido en la determinación de IgM específicas al absorber el suero n°6 del grupo B con hematies AB (Abs.B), hematies O (Abs.O), RF Absorbant (Abs.RF) y sin absorber (S.Abs).

II.1.5.3. Sueros IgG positivos

Se han estudiado un grupo de sueros pertenecientes a 28 pacientes seropositivos. Con el fin de asegurar que dicha positividad no viene interferida por la posible presencia de isohemaglutininas, se les ha sometido a una absorción con hematies AB y O. En todos los casos que ello ha sido posible se ha determinado el grupo sanguíneo y el título de isohemaglutininas.

Los resultados obtenidos, con los sueros de estos pacientes seropositivos, después de la absorción con hematies AB y O se hallan en la Tabla 35.

N° suero	%p (DO <sub>600</sub> )			GS	Isohemaglutininas	
	S.Abs	Abs.AB	Abs.O		Anti A	Anti B
91-G	331 (1.943)	226 (1409)	200 (1.444)	B	1/800	-
1796-QH	93 (0.579)	103 (0.642)	101 (0.633)	A	-	1/1600
59-LM	129 (0.808)	122 (0.763)	124 (0.776)	B	1/800	-
52-LM	200 (1.271)	194 (1.212)	187 (1.170)	A	-	<1/100
1770-QH	81 (0.507)	77 (0.483)	65 (0.407)	A	-	<1/800
67-LM	77 (0.483)	69 (0.433)	73 (0.458)	-	-	-
64-LM	71 (0.447)	76 (0.474)	58 (0.363)	B	1/1600	-
2814-T	86 (0.537)	79 (0.494)	77 (0.482)	A	-	1/3200
1765-QH	264 (1.648)	291 (1.816)	249 (1.552)	A	-	1/200
1414-QH	79 (0.440)	72 (0.449)	69 (0.320)	O	1/12800	1/1600
1436-QH	87 (0.545)	84 (0.524)	71 (0.446)	A	-	<1/100
16-AG	181 (1.129)	210 (1.310)	156 (0.972)	O	1/25600	1/25600
1918-QH	100 (0.626)	148 (0.927)	85 (0.531)	-	-	-
1302-QH	67 (0.418)	64 (0.402)	76 (0.475)	O	1/12800	1/12800
37-AG	66 (0.411)	68 (0.423)	86 (0.541)	O	1/6400	1/6400
1848-QH	80 (0.499)	68 (0.425)	65 (0.404)	-	-	-
1950-QH	70 (0.439)	76 (0.477)	66 (0.410)	AB	-	-
3963-T	110 (0.686)	98 (0.616)	87 (0.546)	A	-	1/400
2002-QH	108 (0.673)	160 (0.997)	176 (1.100)	-	-	-
200 -QH	155 (0.971)	157 (0.980)	229 (1.428)	-	-	-
109-LM	268 (1.670)	260 (1.626)	257 (1.603)	A	-	1/1600
4411-T	68 (0.426)	29 (0.183)	42 (0.267)	B	<1/100	-
4342-T	114 (0.715)	40 (0.252)	20 (0.127)	O	1/12800	1/12800
4543-T	71 (0.445)	48 (0.302)	79 (0.496)	A	-	1/400
1398-QH	107 (0.660)	84 (0.526)	111 (0.694)	-	-	-
1892-QH	68 (0.427)	109 (0.685)	139 (0.868)	-	-	-
1845-QH	109 (0.685)	92 (0.577)	101 (0.633)	O	1/3200	1/1600
2133-QH	110 (0.743)	134 (0.838)	147 (0.918)	-	-	-

Tabla 35. DO<sub>600</sub> y %p de 28 sueros positivos para IgG, absorbidos con hematies AB (Abs.AB), con hematies grupo O (Abs.O) y sin absorber (S.Abs). GS: grupo sanguíneo.

#### III.1.5.4 DISCUSION

La presencia de sustancias parecidas a los grupos sanguíneos A y B en helmintos parásitos fué puesta de manifiesto por primera vez por Oliver González (218,219).

Estos antígenos pueden dar lugar a reacciones cruzadas y a falsos positivos en el diagnóstico de la LMV causada por T. canis cuando los títulos de anti-A y anti-B se hallan elevados.

Huntley et al (137,138) señala la relación existente entre LMV y aumento del título de isohemaglutininas. Glickman et al (101) al estudiar 118 pacientes con LMV halla en un 85% una elevación del título de anti-A (>1/400).

Al hablar de isohemaglutininas cabe diferenciar las anti-A y anti-B de tipo natural, llamados también anticuerpos incompletos, de las de tipo inmune o anticuerpos completos. Las primeras, en los individuos A y B son de tipo IgM, y en los individuos grupo O pueden ser tanto IgM como IgG. Las segundas son anticuerpos formados en respuesta a un estímulo antigénico intenso por sustancias A y B y son del tipo IgG ó IgA. Estos anticuerpos inmunes en los individuos O suelen hallarse en tasas mucho más elevadas (114,147,204).

Aunque debido a la parasitación por T. canis suele haber un incremento en el título de isohemaglutininas, en un momento determinado esta elevación puede ser debida a otras causas. Las sustancias A y B están ampliamente repartidas en la naturaleza, hallándose presente en un gran número de bacterias intestinales y alimentos. También es normal que durante el embarazo haya un incremento de estos anticuerpos.

Estudios realizados por Smith et al (276) han revelado la existencia de epítomos, en la superficie larvaria y en sus productos de secreción-excreción, que reaccionan de forma

cruzada con los anticuerpos de los grupos sanguíneos A y B humanos. Estos epítomos pueden interferir en el diagnóstico serológico de la Toxocarosis humana (280-282).

Nuestros resultados, al estudiar la implicación de las isohemaglutininas en la especificidad de la técnica EIA, revelan la existencia de posibles reacciones cruzadas. Estos datos difieren de los hallados por otros autores. Glickman y Schantz (109), después de absorber los sueros con hematies A y B, observan que no hay variaciones en los títulos de anticuerpos en EIA, al utilizar como antígeno huevos embrionados de T. canis. Tampoco hallan en pacientes con títulos elevados de isohemaglutininas anti-A y anti-B, y sin clínica aparente de Toxocarosis, falsos positivos. Ellos opinan que el hecho de utilizar un antígeno crudo a partir de huevos embrionados, en el que existen componentes tanto del huevo como larvarios, podría, de alguna forma, disminuir la concentración de sustancias A y B por lo que disminuirá la posibilidad de que estas pudieran ser reconocidas.

Las experiencias llevadas a cabo por Smith et al (275,276) en este sentido muestran que al mantener a 2°C el cultivo larvario y la realización posterior de inmunofluorescencia con suero anti-A y anti-B, se produce una reacción positiva a todo lo largo de la larva, no en cambio cuando el cultivo ha sido mantenido a 37°C. Concluyen los autores que la mayor actividad fisiológica que presentan las larvas mantenidas a 37°C es la principal causa de la ausencia de ciertas fracciones antigénicas en su cutícula al haber sido transferidas activamente al medio.

Fenoy et al (F7), por otro lado, observan la presencia de fracciones A y B en el ASE al desaparecer la positividad de sueros previamente positivos después de absorber el antígeno con inmunosueros anti-A y anti-B. No ocurre lo mismo en sentido contrario, no observando negativización en estos sueros, previa absorción con hematies A y B, al ser enfrentados con el ASE completo.

Se ha señalado en el apartado III.1.5.2, que se procedió al estudio de 118 sueros control del Banco de Sangre del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Nueve de ellos dieron resultado positivo a las IgG y uno a las IgM. La absorción de dichos sueros con hematies AB permitió detectar un descenso notable de positividad a IgG para un suero del grupo A (n° 28) y de las IgM para un suero del grupo B (n° 6), que también había resultado positivo a las IgG. Debemos destacar que si bien la absorción con hematies AB negativizó la presencia de IgM no ocurrió lo mismo con las IgG. Consideramos que es posible que en dicho suero se hallaron anticuerpos anti-Toxocara del tipo IgG e isohemaglutininas anti-A (título de anti-A 1800/ de tipo IgM, puesto que la absorción con RF Absorbant, produjo un descenso moderado de la positividad. Vemos por lo tanto que si bien la presencia de isohemaglutininas puede ser causa de falsos positivos, ello es poco frecuente.

Corroboran estos datos los obtenidos después de la absorción con hematies AB de todos aquellos sueros de pacientes que habían resultado positivos a las IgG anti-Toxocara (Tabla 22); tan sólo en tres casos negativizaron después de dicha absorción, aún cuando en algunos de ellos el título de isohemaglutininas fuera notablemente elevado. Debe señalarse, además, que dos de estos pacientes también negativizaron al ser absorbido su suero con hematies O, por lo que no podemos considerar, que el descenso del título fuera debido a la presencia de isohemaglutininas. Por lo tanto, tan sólo se observó una reducción clara del título en un solo caso (4543-T) pertenecientes a un paciente HIV (+).

Por otro lado resultaron negativos a las IgG anti-Toxocara los sueros de pacientes con elevados títulos de anti-A y anti-B, a los que se había detectado la presencia de RF. Vemos por lo tanto que si bien la presencia de isohemaglutinas en suero puede interferir en el diagnóstico

serológico de la Toxocarosis, ello ocurre tan sólo de forma muy esporádica, tanto para los anticuerpos IgG como IgM.



### III.2 ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO

#### III.2.1. SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS IGG ANTI-Toxocara EN LA POBLACION HOSPITALARIA DE BARCELONA

##### III.2.1.1 Material estudiado

Se han estudiado 1018 sueros remitidos al Servicio de Microbiología del Hospital de la Sta. Creu i St. Pau.

Agrupados de acuerdo con la patología que presentaba el paciente a su ingreso, indicada en la petición de análisis o confirmada por el laboratorio, se establecieron 6 grupos:

A. Hipereosinofilia	99
B. Patología ocular	116
C. Hidatidosis	97
D. Otras parasitosis	60
E. Otras patologías	442
F. Donantes sanos	204
Total	1.018

- A. **Hipereosinofilia:** Se incluyen en este grupo todos aquellos pacientes con eosinofilia superior al 10%. En algunos casos la hipereosinofilia se acompañaba de un incremento de la IgE junto a una leucocitosis superior a 10.000 células/mm<sup>3</sup>.
- B. **Patología ocular:** Pacientes con síntomas de pérdida de visión unilateral y diagnóstico de retinopatías (uveítis, corioretinitis, coroidoretinitis, iriditis, lesiones maculares y retinoblastoma).

- C. **Hidatidosis:** Pacientes con quiste hidatídico de diversa localización, diagnosticado mediante radiología, cirugía y serología.
- D. **Otras parasitosis:** Pacientes cuya parasitación se confirmó por identificación del parásito o mediante serología específica. La enumeración de los diversos parásitos estudiados se encuentra en el apartado III.1.3.
- E. **Otras patologías:** Agrupa un total de 442 pacientes con patologías diversas que podemos dividir según el cuadro clínico que presenta en:

<b>a) Hemopatías</b>	<b>(33)</b>
Pancitopenia	2
Neutropenia	2
Talasemia	3
Leucosis	4
Leucemias	
LMC	1
LMA	7
LLA	8
Anemia aplásica	2
Aplasia medular	4
<b>b) Linfopatías</b>	<b>(90)</b>
Linfocitosis atípica	3
Linfoma	7
E. Hodgkin	4
Adenopatías inespecíficas	76
<b>c) Visceromegalias inespecíficas</b>	<b>(22)</b>
Hepatomegalia	8
Esplenomegalia	14
<b>d) Cardio-vasculopatias</b>	<b>(18)</b>
Insuficiencia cardíaca congénita	1
Miocardopatía	6
Pericarditis	8
Vasculopatias periféricas	2
Endocarditis	1

<b>e) Patología del sistema nervioso</b>	<b>(39)</b>
Meningitis	1
Mielitis	1
Síndrome confusional	1
Tetraplejía	1
Epilepsia	2
Retraso mental	2
Síndrome convulsivo	1
Guillen Barré	1
Demencia	1
Mielopatía	2
Enfermedad de Parkinson	4
Meningoencefalitis	1
Esquizofrenia	3
Lesión del tronco cerebral	1
Mielofibrosis	2
Encefalitis	8
Hematoma subdural	2
Neuroblastoma	5
<b>f) Gastro-enteropatías</b>	<b>(27)</b>
Síndrome diarreico	15
Colitis	1
Enfermedad de Crohn	1
Gastroenteritis	4
Dolor abdominal inespecífico	6
<b>g) Hepatopatías</b>	<b>(48)</b>
Ictericia	2
Hepatitis	8
Hepatopatía crónica	14
Tumor hepático	24
<b>h) Nefropatías</b>	<b>(5)</b>
Insuficiencia renal crónica	5
<b>i) Transplante de órganos</b>	<b>(8)</b>
Transplante renal	1
Transplante cardíaco	7
<b>j) Neumopatías</b>	<b>(16)</b>
Nódulo pulmonar inespecífico	1
Tumor pulmonar inespecífico	1
Quiste pulmonar inespecífico	3

Infiltrado pulmonar	1
Bronquitis	5
Neumonías	1
Asma bronquial	3
Insuficiencia respiratoria	1
<b>k) Síndrome de inmunodeficiencia adquirida</b>	<b>(25)</b>
Portador asintomático	23
SIDA	2
<b>l) Miscelánea-Patología diversa</b>	<b>(111)</b>
Quiste de bazo	2
Diabetes	2
Melanoma	5
Retraso crecimiento	1
Osteosarcomas	2
Mononucleosis	39
Dermopatías varias	4
Patología ginecológica	7
Politraumatismos	3
Rabdomiosarcomas	2
Síndrome febril	44

F. Donantes sanos: Grupo de donantes sanos, con un total de 204 sueros estudiados pertenecientes a gestantes, personal sanitario y donantes de órganos.

### III.2.1.2. Resultados

Los resultados obtenidos tanto en población adulta como pediátrica se expresan en la Tabla 36 y Figura 22.

La prevalencia de la Toxocarosis en los distintos sueros estudiados de población hospitalaria se halla en la Tabla 36.

En el grupo F de donantes sanos, hallamos solamente 2 sueros positivos, de estos uno corresponde a un niño, de entre 46 estudiados, (2,2%) y el otro a un adulto, de entre 158 estudiados, donante de médula ósea (0.6%).

	Adultos	Pediatricos	Total	
A. Hipereosinofilia	9/82 (11.0%)	5/17 (29.4%)	14/99 (14.1%)	$\alpha < 0.001$
B. Transtornos oculares	7/115 (6.1%)	0/1	7/116 (6.0%)	$0.025 > \alpha > 0.01$
C. Hidatidosis	3/95 (3.2%)	0/2	3/97 (3.1%)	no significativo
D. Otras parasitosis	2/51 (3.9%)	0/9	2/60 (3.3%)	no significativo
E. Otras patologías	6/292 (2.0%)	3/150 (2.0%)	9/442 (2.0%)	no significativo
F. Donantes sanos	1/158 (0.6%)	1/46 (2.2%)	2/204 (1.0%)	
Total	28/793 (3.5%)	9/225 (4.0%)	37/1018 (3.6%)	

Tabla 36. Número de sueros positivos (DO>60% del calibrador) entre los pacientes con diferente patología clínica y donantes sanos.  
 positivos/analizados (prevalencia)  
 (1)  $\chi^2$  test  
 (2)  $\chi^2$  test (corrección de Yates)  
 (3) Test exacto de Fisher

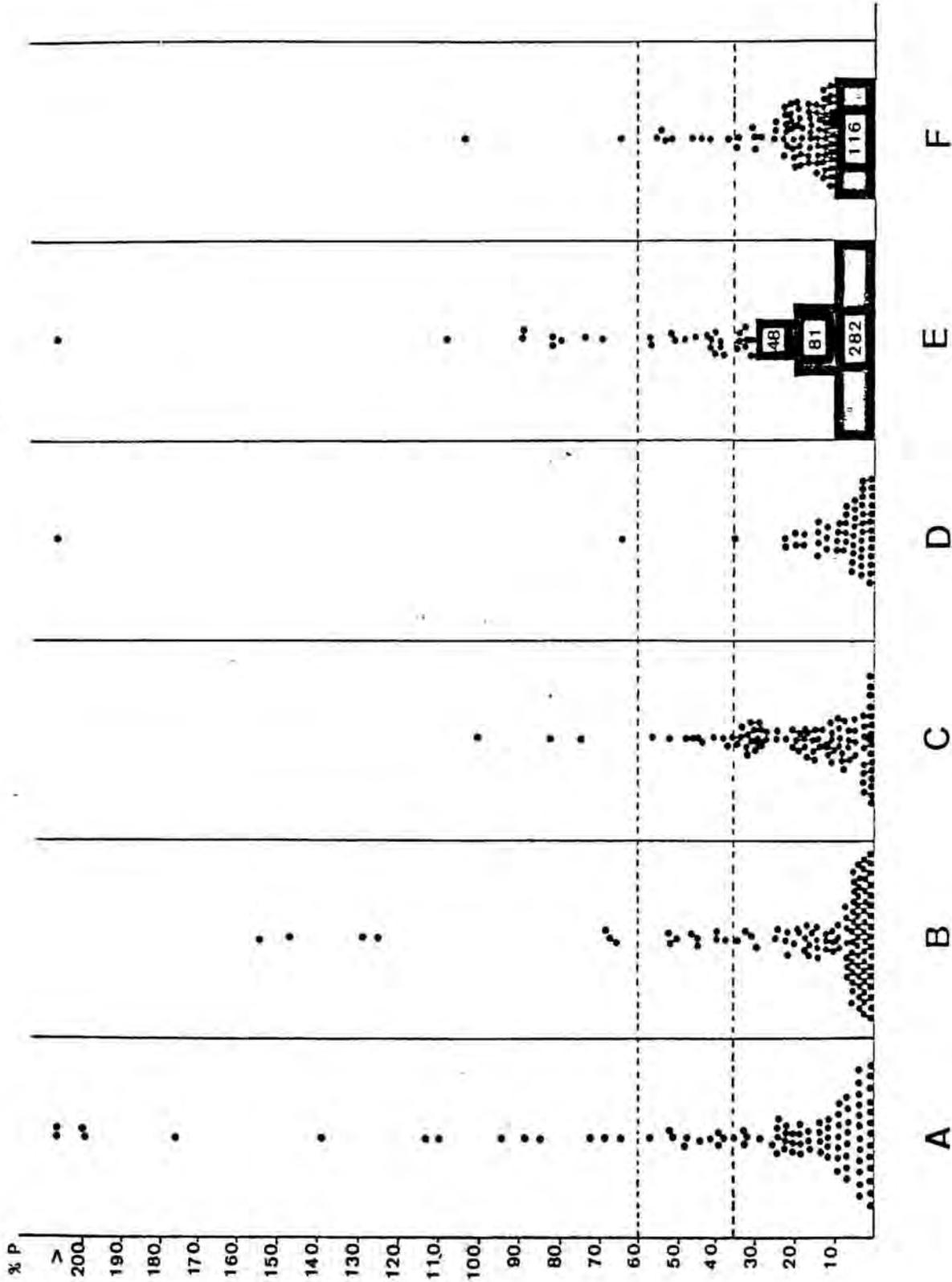


Figura 22. Determinación de las IgG específicas para los distintos grupos de sueros estudiados.

A. Hipereosinofilia, B. Patología ocular, C. Hidatidosis, D. Otras parasitosis,

E. Otras patologías, F. Donantes sanos.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en el grupo de pacientes con diagnóstico de hipereosinofilia, en que la prevalencia en la población pediátrica estudiada es muy superior (29,4%) a la adulta (11,0%). La positividad que se halla en este grupo, tanto en niños como en adultos, resulta ser la más elevada del estudio con una prevalencia del 14,1%.

En el grupo B de pacientes con trastornos oculares no se detecta ninguna positividad en niños y si en adultos en los que de 115 sueros estudiados, 7 han sido positivos (6,1%).

Los sueros de los pacientes de los grupos C (Hidatidosis), D (Otras parasitosis) y E (Otras patologías) no difieren significativamente del grupo F de donantes sanos.

El estudio de la presencia de anticuerpos IgG anti- Toxocara, mediante EIA en los 1018 sueros, muestra que no existe diferencia en cuanto a la prevalencia entre población adulta y pediátrica.

### III.2.1.3. DISCUSION

Los múltiples factores que pueden incidir en la transmisión de la Toxocarosis, en un determinado núcleo poblacional, así como la selección llevada a cabo al realizar un estudio epidemiológico, son variables que puede afectar directamente los resultados de prevalencia hallados.

La prevalencia hallada en la población pediátrica durante este trabajo ha sido baja, sobretodo si la comparamos con otros datos obtenidos en el resto de España y otros países: 33% en Galicia (11); 8.5% en Salamanca (49); 7% en Holanda (164,165); 23% en Estados Unidos (326); 7% en Australia (209); 14.3% (146) y 19% (97) en Inglaterra; un 86% en el

Caribe (306); 16% en Canadá (72); 13.8% en Alemania (243); 12.1% en Italia (14). Sin embargo nuestros resultados se asemejan más al 2% obtenido en Madrid por Guillen et al (120) y el 3.6% hallado en Japón por Matsumura y Endo (193).

Esta prevalencia que en población pediátrica sana se muestra tan baja, aumenta cuando estudiamos niños con eosinofilia, en los que se obtienen valores de casi un 30% (29.4%) comparables con el 21% hallado en Inglaterra por Rée et al (248).

La prevalencia hallada por diversos autores en población adulta sana oscila entre un 0 y un 10% (49,108,120,129,156,176,183,209,264,265,315). Nuestros resultados se sitúan entre los más bajos de esta gama (0.6%) superando tan solo a la prevalencia obtenida por Lysenko et al (183) en diversas regiones e la URSS que oscila entre 0.5 a 8.2%.

Al igual que ocurre con la población pediátrica, al estudiar sueros de individuos adultos con eosinofilia, un 11% resultaron seropositivos, valor intermedio entre el obtenido por Rée et al (248) de 3.6% y el hallado por Ljungström y Van Knapen (176) de un 25%.

Se observa por lo tanto una diferencia notable entre las dos prevalencias en adultos y niños con hiperosinofilia. Si tenemos en cuenta que ésta es una de las principales manifestaciones clínicas de la LMV (100,101,104), y que se presenta con mayor frecuencia en niños que en adultos, es lógica la diferencia hallada.

La positividad hallada en pacientes con hidatidosis no es significativamente alta con respecto al total de la población sana estudiada. Sin embargo estos datos son contradictorios con los obtenidos en otro estudio en que, al utilizar un antígeno larvario total, se obtuvieron un gran número de

sueros positivos en pacientes con hidatidosis (350). El hecho de que algunos de los sueros, en aquel momento hallados positivos, no los fueran al utilizar el ASE corrobora la mayor especificidad que éste presenta frente al antígeno somático. De todas formas, a pesar de no existir diferencia estadística entre las dos prevalencias halladas en este lote de sueros y el de donantes sanos, el hecho de que en tres pacientes con hidatidosis se detecte anticuerpos anti-Toxocara pensamos que es muy lógico, dada la similitud epidemiológica que existe entre ambas parasitosis, por lo que es muy posible su concomitancia. Un hecho similar, ya descrito anteriormente (apartado III.1.2.6), ocurre con los pacientes con otras helmintosis.

En el grupo B, perteneciente a pacientes con trastornos oculares compatibles con una Toxocarosis ocular, como uveítis, corioretinitis y otras patologías de retina, la prevalencia hallada (6%) es una de las más elevadas del estudio junto con la de los pacientes con eosinofilia. Los sueros con patología ocular pediátrica fueron escasos, por lo que tan sólo se pudo estudiar uno.

La prevalencia hallada en el total de la población hospitalaria de Barcelona, tanto pediátrica como adulta es de un 3.6%, tanto por ciento de positividad muy similar al hallado recientemente en Tenerife por Jiménez et al (86), que al estudiar una población muy similar, perteneciente a hospitales y ambulatorios, halla una prevalencia de un 3.3%. La prevalencia hallada en el grupo de donantes sanos, ha sido de tan solo un 1%.

En el capítulo II.1.5, se ha incluido el estudio de un grupo de sueros del Banco de Sangre del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. La procedencia de dichos sueros era rural (Comarca del Vallés), en contraposición a la procedencia urbana de la gran mayoría de donantes sanos incluidos en el grupo F. Al

observar la seropositividad de dichos grupos se observa una notable diferencia tal como se representa en la Tabla 37.

---

Población hospitalaria (urbana)	2/204 (1.0%)
Donantes de sangre (rural)	9/118 (7.6%) 0.001>a>0.001

---

Tabla 37. Prevalencias obtenidas en los dos grupos de población sana.  
positivos/analizados (prevalencia)  
(1)  $\chi^2$  test (corrección de Yates).

Ello corrobora por lo tanto, los datos ya citados por otros autores (43,72,108,243,306,326) sobre la mayor prevalencia de la Toxocarosis en medio rural que en medio urbano.

Inicialmente era quizás de esperar una prevalencia más elevada en la ciudad de Barcelona, si tenemos en cuenta su censo canino, la contaminación fecal de sus calles, parques y jardines públicos y el clima templado y la alta prevalencia de la Toxocarosis canina. Es posible, sin embargo, que a pesar de ser la contaminación telúrica tan elevada los huevos pierdan rápidamente su capacidad infestante. En ello incide, sin duda, tanto la elevada tasa de insolación que soporta Barcelona como la escasez de zonas verdes y arbolado, donde pueda crearse un microclima idóneo de humedad, temperatura, luz y ausencia de radiación solar directa, para el desarrollo de la larva II infestante.

La seropositividad hallada en el total de grupo de donantes de sangre se compara con el total de individuos sanos estudiados resultado significativa para  $0.01 > \alpha > 0.001$ .

El estudiar por separado los distintos grupos observamos que la seropositividad hallada en el grupo de sangre B difiere significativamente del grupo de donantes sanos ( $\alpha < 0.001$ ).

### III.3 ESPECTRO PATOLOGICO DE LOS INDIVIDUOS SEROPOSITIVOS

La Toxocarosis puede cursar con manifestaciones clínicas diversas que son fundamentalmente de afectación visceral (LMV) y ocular (LMO).

La variedad de síntomas que aparecen debido a la reacción inflamatoria que se produce alrededor de la larva, dependerá tanto de la localización como del órgano afectado.

Glickman et al (100) establecieron unos criterios en los que tuvieron en cuenta datos de laboratorio y manifestaciones clínicas, con el fin de poder diagnosticar una Toxocarosis clínicamente. Algunos de estos parámetros habían ya sido citados por Huntley et al (137). Taylor et al (305) en un reciente estudio amplia el espectro patológico de pacientes seropositivos al antígeno de Toxocara.

Por ello, hemos creído conveniente realizar una revisión de historias clínicas de los pacientes seropositivos. De un total de 37, en solamente 21 se ha podido obtener suficiente información para realizar el estudio (Tabla 38).

El obtener los parámetros que figuran en la Tabla 38 ha sido difícil, puesto que para la mayoría de pacientes seropositivos el clínico no había sospechado una Toxocarosis y su estudio se realizó de forma retrospectiva a partir de sueros del criobanco del Servicio de Microbiología del Hospital de la Sta. Creu i Sant Pau. Ello ha dificultado enormemente su estudio debido a la heterogenidad de los datos recogidos en las historias clínicas, en las que faltaba, muchas veces, algunos de los parámetros que se consideran fundamentales para el diagnóstico clínico de esta zoonosis.

A partir de los resultados recogidos de las historias clínicas de los distintos pacientes puede observarse la

Paciente	Sexo	Edad	Hepatomegalia	Leucocitosis n° /mm <sup>3</sup>	Eosinofilos %	Gammaglobulinemia	Hiper	Ige	Isohemaglutinas		EIA %
									Anti-A	Anti-B	
J.E.V	M	44a	SI	6.300	60 - 43	NO	SI	B	1/800	-	255
M.R.M	V	9a	NO	8.000	14	NO	NO	A	-	1/1600	111
R.P.P	V	38a	SI	9.200	9,4-13	SI (IgM)	SI	A	-	<1/100	200
O.D.B	V	4a	NO	8.100	38	SI (IgG)	NO	A	-	1/800	313
I.S.B	M	56a	NO	6.900	9	NO	NO	A	-	1/800	90
E.S.V	M	26a	NO	7.400	3	NO	NO	A	-	1/3200	113
F.L.B	V	66a	NO	6.560	5	NC	NC	NC	NC	NC	100
C.G.Q	M	34a	NO	7.800	7	NC	NC	O	1/12800	1/1600	75
J.P.M	V	34a	NO	8.100	11	NO	NC	A	-	<1/100	226
M.T	M	50a	NC	8.700	42	NC	SI	O	1/25600	1/25600	284
S.R.F	M	10a	NC	NC	12	NC	NC	NC	NC	NC	66
J.C.C.M	V	12a	NC	9.500	40	NC	NC	O	1/12800	1/12800	69
E.G.H	M	15a	NC	7.300	9	SI	SI	NC	NC	NC	95
E.D.M	M	42a	NO	6.900	9	SI	SI	NC	NC	NC	177
A.G.O	V	3a	NO	21.900	22	NO	NO	A	-	1/1600	250
M.G.P	V	13a	NO	5.700	2	NO	NO	NC	NC	NC	82
J.T.T	V	66a	SI	NC	NC	NO	NO	O	1/3200	1/1600	107
F.S.M	V	57a	NO	4.500	1	NO	NC	NC	NC	NC	74
G.Q.F	M	55a	NO	7.200	4	SI (IgG)	NO	B	1/800	-	130
J.F.LL	V	39a	NC	10.200	2	NO	NO	O	1/12800	1/400	124
A.L.G.	V	27a	NC	10.750	1	NO	NO	NC	NC	NC	67

Tabla 38. Clínica y datos de laboratorio en 21 pacientes seropositivos sospechosos ed una LMV o Toxocarosis ocular.

M: mujer; V: varón; NC: no consta.

GS: grupo sanguíneo.

incostancia con que aparecen las alteraciones que Glickamn et al consideran indicativas de una Toxocarosis, de tal manera que al aplicar rigurosamente sus criterios (100), ya indicados en el apartado II.5.1, a ninguno de los pacientes seropositivos, se les podría haber diagnosticado clínicamente una LMV.

La migración de las larvas de Toxocara en el hombre es poco conocida, así como el tiempo que pueden permanecer enquistada y viables, posibles reactivaciones y la implicación que ello puede tener en las manifestaciones clínicas y en la valoración de la tasa de anticuerpos específicos.

A raíz de ello hemos considerado oportuno mencionar algunos casos en que por diversas causas se ha podido realizar un seguimiento clínico y serológico. De entre las posibles LMV, cabe destacar el caso de la paciente J.E.V. de 44 años, en cuyos antecedentes epidemiológicos destaca el haber estado en contacto con perros hacía varios años. Dos años antes (1982) de haberse realizado la primera serología, la paciente aqueja astenia, episodios frecuentes de rinorrea acuosa con estornudos, hiperemia conjuntival, así como prurito generalizado, con predominio facial y sin lesiones cutáneas. Los datos de laboratorio indican una elevada eosinofilia (60%), con unas IgE totales también elevadas. También se le observó una imagen quística esplénica, así como hipereactividad bronquial. Transcurridos dos años (1984), la eosinofilia seguía elevada (43%), la gammagrafía mostraba una hepatomegalia y un bazo discretamente agrandado y la enferma se quejaba de dolor abdominal difuso sin síndrome diarreico.

Esta paciente fue seguida serológicamente durante el periodo comprendido entre 1984 a 1990. Los resultados obtenidos en la determinación de IgG e IgM específicas durante dicho periodo figuran en la Tabla 39.

Fecha	IgG %p	IgM %p
23.XI.84	255	173
22.I.85	257	105
17.I.86	219	148
04.XI.88	203	75
25.XI.88	153	51
21.VIII.89	128	68
31.I.90	94	44

Tabla 39. Variaciones halladas en las tasas de IgG e IgM específicas, durante el periodo de 1984-1990, en los sueros del paciente J.E.V.

Como puede observarse la tasa de IgG específicas se ha mantenido elevada aunque con un ligero decrecimiento en los últimos años. La tasa de IgM específicas se mostró elevada en las primeras determinaciones decreciendo paulatinamente.

Otras historia clínica que creemos interesante, es la perteneciente a R.P.P., paciente de 38 años que ingresa con un cuadro de astenia, anorexia, pérdida de peso, intensas poliartromialgias de varios años de evolución, antecedentes de hepatopatía crónica, de probable etiología enólica y transtornos de conducta. El examen laparoscópico revela la presencia a nivel de hipocondrio derecho de pequeños engrosamientos fibrosos, lineales, de discreto relieve en serosa peritoneal de 5-6 mm de longitud aislados, sin

hiperemia. Se tomó muestra par anatomía patológica con resultado dentro de límites normales. El E.C.G. mostró una extrasístole supraventricular aislada. De los datos de laboratorio destacan las alteraciones en las pruebas funcionales hepáticas, elevación en los títulos de IgG e IgE totales, así como una eosinofilia persistente no excesivamente alta que a lo largo de dos años fué oscilando entre un 13% inicial a un 9% en el último estudio que se le realizó.

Tan sólo nueve de los 21 pacientes seropositivos presentaban un número de eosinófilos en sangre superior al 10%. En la mayoría puede observarse una relación directa entre las tasas de eosinofilia y de IgG específicas. Estos resultados distan de los hallados por Glickman et al (100) quienes afirman que el 95% de los pacientes con serología positiva para Toxocara tienen una eosinofilia alta. Nuestros resultados estarían más de acuerdo con los hallados por Taylor et al (305) y Caucanas et al (43), quienes detectan una elevación en la eosinofilia en un 44% y 59% respectivamente, de los individuos seropositivos.

El recuento de leucocitos se ha mantenido dentro de la normalidad en 21 pacientes, de los cuales ocho presentaban una elevada eosinofilia. En solo un enfermo, se pudo observar una leucocitosis de 21900/mm<sup>3</sup>, acompañada de un 22% de eosinofilia. Se trata de un niño (A.G.O), con una historia clínica con fiebre, tos, anemia, astenia, perdida de peso y cuyos datos epidemiológicos indicaban procedencia rural y contacto con perros, geofagia y pica. La serología reveló una elevada tasa de IgG específicas (225%) por lo que, se le diagnosticó una LMV. En este caso, es curioso hacer notar que, al cabo de un mes, cuando alguno de los síntomas arriba mencionados (fiebre, tos, anemia, perdida de peso) habían remitido, sin tratamiento previo, se observó un incremento de más del doble en el número de eosinófilos, pasando de un 22% a un 46%. Transcurridos 9 meses de la primera serología se

realizó otro control manteniéndose aún elevada la tasa de IgG específicas (245%).

Los incrementos en la tasa de inmunoglobulinas totales IgG e IgM, han sido poco frecuentes en todos los individuos estudiados. Unicamente 14 de los 21 pacientes seropositivos constaban en su historia la determinación de gammaglobulinas. Dos de ellos mostraban incremento de IgG y uno de IgM. Estos datos son diferentes a los aportados por Glickman et al (100), así como a los aportados por Taylor et al (305) que hallan un incremento de IgM en el 45% de pacientes seropositivos frente a un 10% y 6% para IgG e IgA respectivamente.

La presencia de una elevación en el título de IgE sólo se ha presentado en tres pacientes, dos de ellos con tasas de eosinofilia muy elevadas, a pesar de que el aumento de la tasa de IgE ha sido considerado por algunos autores como un dato importante para el diagnóstico de una Toxocarosis (101,133).

La hepatomegalia, es una manifestación poco frecuente en nuestros pacientes seropositivos. Hunylet et al (137), lo hallan en un 65% y Taylor et al (305) en un 43% de los individuos seropositivos, frecuencia inferior a la de otros trastornos somáticos.

El resto de signos clínicos que se hallan expresados en la tabla 40, debido al escaso número de pacientes controlados, en ningún momento pueden ser significativos, pero si que indican la variedad de sintomatología y afectación que puede acompañar a una Toxocarosis.

Huntley et al (137) hallan en población infantil pica presente en 90% de los niños seropositivos. La fiebre se halla presente en el 80%, coincidiendo con los síntomas respiratorios. El 28% presentan en su historia episodios de

convulsiones, el 65% presentan hepatomegalia, y el 80% tos.

<u>Alteraciones somáticas</u> <u>y Síntomas</u>	N° casos
Pica	1
Dolor abdominal	3
Anorexia	2
Astenia	2
Tos	3
Picor garganta	1
Rinitis	1
Broncoespasmos	1
Fiebre	6
Cefaleas	2
Artralgias	2
Mialgias	2
Transtornos de conducta	1
Anemia	2
Retraso en el crecimiento	1
Lesiones de la piel	1
Problemas cardíacos	4
Calcificaciones craneales	1
Lesiones fondo ojo	3

Tabla 40. Síntomas y alteraciones somáticas en 21 pacientes seropositivos sospechosos de una LMV o Toxocarosis ocular.

Taylor et al (305) en población tanto adulta como pediátrica, halla el dolor abdominal como el síntoma más frecuente (80%) en individuos seropositivos; así como náuseas (66%) y vómitos en un 41%. El aletargamiento se presenta en el 73% y la

adenitis cervical en un 78%. También la faringitis es un síntoma frecuente en el 63% y la tos en un 83%. La elevada frecuencia de los síntomas respiratorios no es extraña, considerando que la larva sufre una migración por los pulmones, en donde la presencia de sus productos de secreción-excreción puede producir durante largos periodos persistencia de estos síntomas.

El seguimiento de la evolución de una Toxocarosis mediante métodos serológicos, suele ser poco satisfactorio. El empleo de técnicas sensibles como EIA, hacen que las tasas de anticuerpos específicos puedan ser detectados, durante largos periodos de tiempo. En LMV pueden incluso llegar a ser de varios años.

Nuestra experiencia al realizar un seguimiento de seis años en una paciente con una LMV, ha demostrado una persistencia en la tasa de anticuerpos, así como en las manifestaciones clínicas y datos de laboratorio, especialmente la eosinofilia. Solamente en un caso de LMO (J.F.LL), después del tratamiento y coincidiendo con la remisión de los síntomas la tasa de IgG específica disminuyó hasta negativizar.

#### **IV. CONCLUSIONES**



A partir de los resultados anteriormente expuestos y de la revisión crítica de la bibliografía, se han obtenido una serie de conclusiones que pasamos a comentar.

Con relación a la tecnología diagnóstica desarrollada destacamos:

1. La alta supervivencia de las larvas II de Toxocara en cultivos "in vitro", lo que da una gran efectividad a este método en la obtención de antígenos de secreción-excreción. El antígeno así obtenido es muy sensible, como ha quedado demostrado en el presente trabajo, tanto por la baja concentración proteica a que puede utilizarse en EIA, como por la posibilidad de su reutilización.
2. La técnica desarrollada para la determinación de IgG anti-Toxocara es sensible y específica. En ello intervienen las bajas concentraciones antigénicas utilizadas y las altas diluciones de suero y conjugado, lo que evita la aparición de coloración de fondo inespecífica.
3. Los criterios de positividad establecidos consideramos que son correctos al haber permitido detectar incluso casos de LMO. En el amplio margen de valores que consideramos dudosos podrá incluirse sueros de pacientes con títulos de recuerdo de Toxocarosis antiguas, quizás alguna Toxocarosis ocular y sin duda aquellos otros cuya reacción frente al antígeno de Toxocara fué debida a afinidades inespecíficas. En estos casos de valores dudosos o positivos muy próximos al "cut-off", los resultados serológicos deben ser interpretados con

gran cautela, siempre en función de la clínica del paciente, y acompañarse de otras pruebas tales como la absorción del suero con antígenos heterólogos de diversa procedencia.

4. La detección de IgM anti-Toxocara, para el diagnóstico de la "larva migrans", ha presentando una notable inespecificidad, de la cual parece ser principal responsable el factor reumatoide. Su eliminación del suero es, por lo tanto, requisito previo cuando quiera determinarse este tipo de inmunoglobulina.
5. Las interferencias debidas a la presencia de isohemaglutininas al determinar IgG e IgM anti-Toxocara con antígeno de secreción-excreción son muy escasas. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, tan sólo pueden responsabilizarse a las anti-B de la detección de IgG específicas en dos casos, y a las anti-A de la detección de IgM en otro, de entre los 46 y 15 sueros positivos para cada una de las clases de inmunoglobulinas respectivamente.
6. La presencia de IgA específica anti-Toxocara, ha estado relacionada con la de IgG, aún cuando la tasa con la que se han detectado haya sido siempre mucho más baja. También las inmunoglobulinas de la clase E han estado presentes en los sueros de pacientes con las IgG específicas elevadas, a pesar de que la técnica desarrollada para su detección muestra una baja sensibilidad. Consideramos, por lo tanto, que la detección de estas inmunoglobulinas, lo mismo que las de la clase M, puede suponer una herramienta estimable para el diagnóstico de la Toxocarosis.

Con relación al estudio seroepidemiológico y espectro patológico concluimos:

1. La baja prevalencia con que se presenta la Toxocarosis en la población hospitalaria barcelonesa (3.5% en población adulta y 4,0% en pediátrica), prevalencia que desciende todavía más cuando se trata de una población sana (0,6% en adultos y 2,2% en niños), sin que se observe diferencia significativa con relación a la edad.
2. Cuando se trata de pacientes afectos de hipereosinofilia, la prevalencia incrementa significativamente ( $\alpha < 0,001$ ), tanto en población pediátrica como adulta, si bien en la primera de forma mucho más notable.
3. La prevalencia de sueros positivos en el grupo de pacientes con patología ocular fué también significativamente superior a la de la población sana. No así la de los pacientes con hidatidosis, otras parasitosis y otras patologías.
4. Entre las poblaciones sanas estudiadas, una de ellas de origen hospitalario y presumiblemente urbana, y la otra, compuesta por donantes de sangre de procedencia rural, existe una diferencia significativa en cuanto a la seroprevalencia de anticuerpos específicos anti-Toxocara, mayor en esta última, lo que confirma, una vez más, el carácter rural de esta zoonosis.
5. Al analizar el espectro patológico de los pacientes seropositivos se observa una heterogénea distribución en cuanto a signos y síntomas, de tal manera que, al aplicar de forma estricta los criterios de Glickman et al (100) para la

determinación clínica de la Toxocarosis, ninguno de los pacientes seropositivos podía ser diagnosticado como tal. La eosinofilia, considerada por la mayoría como una de las principales alteraciones fisiológicas presentes en esta helmintosis, tan sólo se detectó en un 45% de los pacientes. A tenor de nuestros resultados y de la información recogida a través del estudio bibliográfico consideramos que las alteraciones digestivas, respiratorias y neurológicas son frecuentes en esta parasitosis.

6. Concluimos finalmente que la Toxocarosis es una zoonosis frecuente en nuestro entorno, de cuya existencia y prevalencia debería darse mayor información a nivel médico y veterinario. A nivel veterinario, para incidir en la educación sanitaria de la población, sin duda la medida más eficaz para su control, y a nivel médico para proceder a su búsqueda y por lo tanto a su correcto diagnóstico. Es preciso también incidir en la necesidad de realizar estudios clínicos bien documentados, en pacientes seleccionados según su patología, para conocer de forma más correcta el espectro patológico de esta parasitosis.

## V. BIBLIOGRAFIA

1. Aguila, C.; Cuellar, C; Fenoy, S.; Guillen, J.C.(1987). Evaluation of Chemotherapy in Experimental Toxocariasis by immunocomplex determination.. Resumenes del Third Mediterranean Conference of Parasitology. Israel, 26.
2. Aguila, C.; Cuellar, C.; Fenoy, S. y Guillen, J.C. (1987). Comparative study of assays detecting circulating immune complexes and specific antibodies in patients infected with Toxocara canis. Journal of Helminthology, 61:192-202.
3. Aguila, C.; Cuellar, C.; Fenoy, S. y Guillen, J.L. (1987). Dinámica de la respuesta inmune y estudio de posibles reacciones cruzadas en ratones inóculados con huevos embrionados de Toxascaris leonina. Resumenes del V Congreso Nacional de Parasitología. Salamaca, 403.
4. Aguila, C.; Fenoy, S.; Cuellar, C. y Guillen, J.L. (1987). Dinámica de la respuesta inmune y estudio de posibles reacciones cruzadas en ratones inóculados con antígeno total de Toxascaris leonina. Resumenes de V Congreso Nacional de Parasitología. Salamana, 405.
5. Ahmen Awad Abdel, H. (1984). Effect of thiabendazoles on the migration of Toxocara canis larvae in the mouse. Journal of Parasitology. 70 (2):226-231.
6. Akao, N. (1985). Immune response to excretory-secretory products of second stage larvae of Toxocara canis: humoral immune response relating to larval trapping in the livers of reinfected mice. Japanese Journal of Parasitology, 34 (4):293-300.
7. Aljeboori, T.I. y Ivey, M.H. (1970). An improved hemagglutination technique for detecting antibody against Toxocara canis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 10 n°2:244-248.

8. Aljeboori, T.I. y Ivey, M.H. (1970). Toxocara canis infections in baboons. Antibody, white cell and serum protein. Responses following Infection The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 19:249-254.
9. Ambroise-Thomas, P. (1918). Mécanismes d'évitement à la réponse immune dans les affections parasitaires. II Conferencia Mediterránea de Parasitología. Granada.
10. Angulo, R.; Aguila, C. y Guillen, J.L. (1985). Contaminación de suelos de parques públicos por Toxocara canis. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Parasitología, Tenerife. 226.
11. Ares, M.E.; Perez, M.L.; Villacorta, M.I.; Fandiño, M.L. y Bajo, M.T. (1987). Seroepidemiología de la toxocariasis humana mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. APE. Resúmenes del V Congreso Nacional de Parasitología. Salamanca, 233-234.
12. Armone; Laranti; Batelli. (1979). Citado por Gallego J. (1982) Discurso Inagural. Real Academia de Farmacia de Barcelona. 26.
13. Arnaud, J.P. (1976). Toxocariasis. *Pediatría práctica*. 14:33-36.
15. Ash, L.R. y Orihel, T.C. (1980). Atlas of human Parasitology. American Society of Clinical Pathologist. Chicago.
16. Ashton, N. (1960). Communications larval granulomatosis of the retina due to Toxocara. British Journal of Ophthalmology, 44:129-148.

17. Badley, J.E.; Grieve, R.B.; Rockey, J.H. y Glickman, L.T. (1987). Immune-mediated adherence of eosinophils to Toxocara canis infective larvae: the role of excretory-secretory antigens. *Parasite Immunology*, 9: 133-143.
18. Badley, J.E.; Grieve, R.N.; Bowman, D.D.; Glickman, L.T. y Rockey, J.H. (1987) Analysis of Toxocara canis larval excretory-secretory antigens: physicochemical characterization and antibody recognition. *Journal of Parasitology*, 73 (3): 593-600.
19. Barrier, J.; Barre, P.; Dupas, B.; Lerat, F. y Marjolet, M. (1985). Pseudo-metastatic appearance of echographic and tomodensitometric hepatic during a case of "larva migrans" *Presse Médicale*, 14 (15): 847.
20. Barriga, O.O. (1981). The immunology of parasitic infections. Department of Veterinary Pathobiology. The Ohio State University. Univeristy Park Press. Baltimore.
21. Bartelmez, S.H. (1979). Mechanisms of eosiophil and neutrophil macrophage production in Trichinella spiralis (Nematoda) infected mice. Doctoral Thesis. University of Glasgow. U.K. (Citado por Kennedy et al 1987).
22. Beaver, P.C. (1952). Observations on the epidemiology of ascariasis in a region of high hokworm endemicity. *Journal of Parasitology*. 38:445-453.
23. Beaver, P.C. (1956). Larva migrans. *Experimental Parasitology*. 5, 587-621.
24. Beaver, P.C. (1962). Toxocariosis (visceral larva migrans) in relation to tropical eosinophilia. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et des ses Filiales*. 55: 555-576.

25. Beaver, P.C. (1975). Biology of soil transmitted helminths: the massive infection. Health Laboratory Science, 12:116-25.
26. Beautyman, W. y Wool, A. (1951). An Ascaris larva in the brain in association with acute anterior poliomyelitis. Journal of Pathology and Bacteriology, 63: 635-647.
26. Belmont, J.B.; Irvine, A.; Benson, W. y O'Connor, G.R. (1982). Vitrectomy in ocular toxocariasis. Archives of Ophthalmology, 100 (12) 1912-1915.
28. Biglan, A.W.; Glickman, L.T.y Lobes, L.A. Jr. (1979). Serum and vitreous Toxocara antibody in nematode endophthalmitis. American Journal of Ophthalmology, 88 (55):898-901.
29. Bisseru, B.; Woodruff, A. y Hutchinson, R.I. (1966). Infection with adult Toxocara canis. British Medical Journal, 1:1583-1584.
30. Bisseru, B. y Woodruff, A.W. (1968). The detection of circulating antibody in human Toxocara infections using the indirect fluorescent antibody test. Journal of Clinical Pathology, 21:449-455.
31. Borg, O.A. y Woodruff, A.W. (1973). Prevalence of Infective Ova of Toxocara species in Public Places. British Medical Journal, 4:470-472.
32. Bowman, D.D.; Mika-Grieve, M. y Grieve, R.B. (1987). Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with Toxocara canis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 36 (1): 78-82.

33. Boyce, W.M.; Branstetter, B.A y Kazacos, K.R. (1988). In vitro culture of Baylisascaris procyonis and initial analysis of larval excretory-secretory antigens. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 55 (1) 15-18.
34. Boyce, W.M., Branstetter, B.A.y Kazacos, KR. (1988). Comparative analysis of larval excretory-secretory antigens of Baylisascaris procyonis, Toxocara canis and Ascaris suum by Western blotting and enzyme immunoassay. International Journal for Parasitology, 18 1: 109-113.
35. Bozděch, V. (1981). Human infection with Toxocara larvae. I. Findings of eggs in parks in Prague. Angewandte Parasitologie, 22 (2): 71-77.
36. Brain, L y Allan B. (1964). Encefalitis due to infection with Toxocara canis. Lancet 1:1355-1357.
37. Brown, G.C. y Tasman, W.S. (1981). Retinal arterial obstruction in association with presumed Toxocara canis neuroretinitis. Annals of Ophthalmology, 13 (12) 1385-1387.
38. Brunello, F.; Genchi, C. y Falagiani, P. (1983). Detection of larva specific IgE in human toxocariasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene., vol 77 n°2: 279-280.
39. Brunello, F.; Falagiani, P.; Almaviva, M.; Sioli, C y Genchi, C. (1983). Toxocariasis umana: seroprevalencia di IgE larva-specifiche in popolazioni donatori di sangue del Nord Italia. Parassitologia, 25:216.
40. Brushi, F; Moretti, A; Tassi, C y Piergilifioretti, D. (1990). Reliability of amplified ELISA to detect specific IgE in human nematode infections. Resumenes del VII International Congress of Parasitology. Paris, 949.

41. Byers, B y Kimura, S.L. (1974). Uveitis after death of a larva in the vitreous cavity. American Journal Ophthalmology, 77: 63-66.
42. Capron, M. y Capron, A. (1980). Schistosomes and eosinophils. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 74, suppl. 44.
43. Caucanas, J.P.; Magnaval, J.F. y Pascal, J.P. (1988). Prevalencia of Toxocaral disease. The Lancet, May 7, 1049.
44. Cheng, T.C. (1973). General Parasitologia. 18:646-647.
- 45 Childs, J.E. (1985). The prevalence of Toxocara species ova in backyards and gardens of Baltimore, Maryland. American Journal of Public Health. 75 (9):1092-1095.
- 46 Christensson, D. (1988). High-latitude Toxocara Parasitology Today. 4 (11) 322.
47. Coll, P.; Rosell, R.; Gaya, A. y Prats, G. (1986). Enzimoimmunoanálisis para la detección de anticuerpos séricos específicos de Y. enterocolitica 0:3. Comparación de varios métodos para la expresión de resultados. Inmunología, vol. 5, n°4.
48. Collins, R.F. y Ivey, M.H. (1975). Specificity and Sensitivity of skin test reactions to extracts of Toxocara canis and Ascaris suum. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 24, n°3 455-459.
49. Conde, L.; Muro, A. y Simón, F. (1989). Epidemiological studies on Toxocariasis and visceral larva migrans in a zone of Western Spain. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 83 (6) 615-620.

50. Crane, T.B. y Christensen, G.R. (1981). Presumed subretinal nematode infestation with visual recovery. *Annals of Ophthalmology*, 13(3) 345-348.
51. Cuadrado, P.; Camarero, C.; Sanjurjo, P.; Martin, L. y Soriano, Z.J. (1974). Larva migrans visceral. Aportación de una observación y respuesta terapéutica al tiabendazol. *Boletín Vasco-Navarro Pediátrico*. 9:89-110.
52. Cuellar, C. (1988). Toxocariosis experimental: Dinámica de la respuesta inmune, reacciones cruzadas e inmunocomplejos específicos. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense, 326.
53. Cuellar, C.; Fenoy, S. y Guillen, J.L. (1987). Dinámica de la respuesta inmune y estudio de posibles reacciones cruzadas en ratones inóculados con huevos embrionados de Toxocara canis. resúmenes del V Congreso Nacional ed Parasitología. Salamanca, 407.
54. Cuellar, C.; Fenoy, S. y Guillen, J.L. (1987). Dinámica de la respuesta inmune y estudio de posibles reacciones cruzadas en ratones inóculados con antígeno total de Toxocara canis. Resúmenes del V Congreso Nacional de Parasitología. Salamanca, 409.
55. Cuellar, C.; Fenoy, S.; Aguila, C y Guillen, J.L. (1989). Detección de inmunocomplejos específicos como monitorización de la quimioterapia de lla Toxocarosis experimental. Resúmenes del VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología. Cáceres, 292.
56. Cuellar, C.; Fenoy, S.; Aguila, C. y Guillen, J.L. (1986). Nuevos satos sobre la forodependencia del desarrollo embrionario de Toxocara canis. *Revista Ibérica de Parasitología*. 46 (4) 409-417.

57. Cuellar, C.; Aguila, C. y Guillen, J.L. (1985). Estudio de la especificidad del antígeno excretor-secretor larvario de Toxocara canis en método ELISA. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Parasitología. Tenerife, 129.
58. Cypess, R.H.; Karol, M.H.; Zidian, J.L.; Glickman, L.T. y Gitlin, D. (1977). Larva-specific antibodies in patients with visceral larva migrans. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 135, n°4, 633-640.
59. Dada, B.J.O. (1978). A new technique for the recovery of Toxocara eggs from soil. Journal of Helminthology. 141-144.
60. Dada, B.J.O. y Lindquist, W.D. (1979). Prevalence of Toxocara spp eggs in some public grounds and highway test areas in Kansas. Journal of Helminthology. 53, 145-146.
61. Davidyants, V.A. y Chobanyan, A.G. (1981). Some aspects of the epizootiology and epidemiology of toxocariasis. Meditsnskoï Parazitologii i Tropicheckoï Meditsiny im. S.M. Kirova. 83-84.
62. Davidyants, V.A. (1982). Investigation of environmental objects for Toxocara ova. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni. N° 3 67-70.
63. Delgado, O.; Botto, C.; Mattei, R. y Escalante, A. (1989). A. Effect of albendazole in experimental toxocariasis of mice. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 83. (6). 621-624.
64. Dent, J.M.; Nichols, R.L.; Beaver, P.C.; Carrera, G.M. y Staggers, R.J. (1956). Visceral larva migrans with case report. American Journal of Pathology, 32 777-803.

65. Dubin, S.; Segall, S. y Martindale, J. (1975). Contamination of soil in two city parks with canine nematode ova including Toxocara canis, a preliminary study. American Journal of Public Health. 65 (11) 1242-1245.
66. Duguid, I.M. (1961). I. Chronic endophthalmitis due to Toxocara. British Journal Ophthalmology. 45:705
67. Duguid, I.M. (1961). II Features of ocular infestation by Toxocara. British Journal Ophthalmology. 45:789.
68. Dunsmore, J.D.; Thompson, R.C.A. y Bates, I.A. (1983). The accumulation of Toxocara canis larvae in the brains of mice. International Journal for Parasitology, 13 (5):517-521.
69. Dupas, B.; Barrier, J, y Barre, P. (1986). Detection of Toxocara by computed tomography. British Journal of Radiology, 59 (701):518-519.
70. Düwel, D. (1984). The prevalence of Toxocara eggs in the sand in children's playgrounds in Frankfurt/M. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 78 (6) 633-636.
71. Ehrhard, T y Kernbaum, S. (1979). Toxocara canis et Toxocarose humaine. Bulletin de l'Institut Pasteur, 77:225-227.
72. Embril, J.A.; Tanner, C.E.; Pereira, L.H.; Staudt, M.; Morrison, E.G. y Gualazzi, D.A. (1988). Seroepidemiology survey of Toxocara canis infection in urban and rural children, 102 (2): 129-133.
73. Euzéby, J. (1963). Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine. Tome premier. Maladies dues aux Némathelminthes. Fascicule deuxième. 483-625. Ed. Vigot Frères Editeurs.

74. Fairbairn, D. (1961). The in vitro hatching of Ascaris lumbricoides eggs. Canadian Journal of Zoology. Vol 39.
75. Fattah, D.I.; Maizels, R.M.; McLaren, D.J. y Spry, C.J.F. (1986). Interreaction of human blood eosinophils with the infective larvae. Experimental Parasitology, 61 (3) 421-431.
76. Felberg, N.T.; Shields, J.A. y Federman, J.L. (1981). Antibody to Toxocara canis in the aqueous humour. Archives of Ophthalmology, 99 (9) 1563-1564.
77. Fenoy, S.; Cuellar, C. y Guillen, J.L. (1987). Estudio comparativo de la influencia de la luz en el embrionamiento experimental de huevos de Toxocara canis, Toxascaris leonina y Ascaris suum. Resúmenes del V Congreso Nacional de Parasitología. Salamanca, 397.
78. Fenoy, S.; Cuellar, C. y Guillen, J.L. (1987). Estudio de posibles reacciones cruzadas del antígeno excretor-secretor de Toxocara canis frente a otros ascáridos y proteína C-reactiva. Resúmenes del V Congreso Nacional de Parasitología. Salamanca, 401.
79. Fenoy, S.; Cuellar, C.; Aguila, C. y Guillen, J.L. (1989). Posibles reacciones cruzadas del antígeno excretor-secretor de Toxocara canis en ELISA, con antígenos de otros ascáridos y proteína C-reactiva. Revista Ibérica de Parasitología, Vol 49., Fas. 2, 185-192.
80. Fitzgerald, P.R. y Ashley, R.F. (1977). Differential survival of Ascaris one in wastewater sludge. Journal Water Pollution Control Federation. 1722-1724.
81. Gallego, J. (1982). Discurso Inaugural. Real Academia de Farmacia de Barcelona. Introducción 13-18:24-30.

82. Garrow, D. (1981). Arthritis and arthralgia associated with toxocaral infestation. *British Medical Journal*, **283** (6290) 560.
83. Genchi, C.; Gili, G. y Maraschin, R. (1974). Indagine sul-l'incidenza delle elmintiasi intestinali del carre in alcune zone della Lombardia. *La Clinica Veterinaria*, **97**:177-186.
84. Genchi, C y Locatelli, A. (1974). Incidenza di nova di alcune specie di elminti intestinali del carre nei parchi public della citta di Milano. *Atti dilla societa Italiane delle Scienze Veterinaria*, **28**:862-863.
85. Genchi, C.; Falagiani, P. y Brunello, F. (1982). Toxocariasis: detection of larva-specific IgE by RAST in healthy blood donors and patients (preliminary results). *Acta Mediterranea di Patologia Infettiva e Tropicale*, **1** (1 suppl): 141-143.
86. Genchi, C.; Brunello, F.; Falagiani, P.; Sioli, C. y Almaviva, M. (1983). Larva specific IgE against Toxocara batched larvae antigens in sera of Toxocaral syndromes patients and healthy blood donors. Report of a Conference sponsored by the first European Congress of Clinical Microbiology. Bologna.
87. Genchi, C.; Almaviva, M.; Crocchiolo, P.; Brunello, F. Falagiani, P.; Riva, G.; Simonelli, E.; Sioli, C.; Vigevani, G.M. (1983). IgE antibodies to Toxocara canis in high risk populations. *Giornale di Malattie Infettive e Parassitarie*, **35** (12):1479-1481.
88. Genchi, C.; Tinelli, M.; Brunello, F. y Falagiani, P. (1986). Serodiagnosis of ocular toxocariasis: a comparison of specific IgE and IgG. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **80** (6)993-994.

89. Genchi, C.; Falagiani, P.; Riva, G. y Sioli, C. (1987). Ocular Toxocariasis: Role of IgE in the pathogenesis of the syndrome and diagnostic implications. Helminth Zoonoses. Edited by S. Geerts, V. Kumar and Brandt, 175-182.
90. Genchi, C.; Falagiani, P.; Riva, C.; Tinelli, M.; Brunello, F.; Boero, M. y Almaviva, M. IgE and IgG antibodies in Toxocara canis infection. A clicanal evaluation. Annals of Allergy, 61 (1) 43-46.
91. Geoghegan, W.D.; Struve, M.F. y Jordon, R.E. (1983). Adaptation of the Ngo-Lenhoff peroxidase assay for solid phase ELISA. Journal Immunology Method, 60, 61.
92. Gerin, G.; Pecheur, M. y Gianfreda, H. (1980). Frequency of intestinal parasites among domestic carnivores. Annals de Médecie Vétérinaire, 124 (2) 133-136.
93. Georgi, Jay, R. (1969). Parasitology for Veterinarians. W.B. Saunders Company.
94. Ghadirian, E.; Viens, P.; Strykowski, E.; et al. (1976). Prevalence of Toxocara and other helminth ova in dogs and soil in the Montreal Metroplitan area. Canadian Journal Public Health, 67:495-496 (Citado po Glickman y Schants, 1981).
95. Gibbons, Lynda, M. (1986). Sem. Guide of the morfology of nematode parasites of vertebrates. Commonwealth Institute of Parasitology.
96. Giles, C.L. (1989). Uveitis in children. Part. III. Annals Ophthalmology, 21 (1), 23-28.
97. Gill, D.; Dunne, K y Kenney, V. (1988). Toxocariasis in children. The Lancet, May 21, 1172.

98. Gillespie, S.H. (1988). The epidemiology of Toxocara canis. *Parasitology Today*, 4 (6):180-182.
99. Girwood, R.W.A.; Quinn, R.G.; Bruce R.G. y Smith, H.V. (1978). The incidence of Toxocara canis in dogs, Faeces and Soils and the Diagnosis of Infections in Human. *Parasitology* vol 77 (3), XIX.
100. Glickman, L.; Schantz, P.; Dombroske, R. y Cypess, R. (1978). Evaluation of serodiagnostic test for visceral larva migrans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27 (3):492-498.
101. Glickman, L.T.; Schantz, P.M. y Cypess, R.H. (1979). Epidemiological characteristics and clinical findings in patients with serologically proven toxocariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73 (3):254-258.
102. Glickman, L.; Cypess, R.; Hiles, D. y Gessner, T. (1979). Toxocara-specific antibody in the serum and aqueous humor of a patient with presumed ocular and visceral toxocariasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 28 (1)29-35.
103. Glickman, L.T.; Cypess, R.H.; Crumrine, P.K. et al. (1979). Toxocara infection and epilepsy in children. *Journal of Pediatric*, 1:75-78. (Citado por Glickman y Schantz, 1981).
104. Glickman, L.T. y Schantz, P.M. (1981). Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiologic Reviews*. Vol3.
105. Glickman, L.T. y Summers, B.A. (1983). Experimental Toxocara canis infections in cynomolgus macaques (Macaca fascicularis). *American Journal of Veterinary Research*, 44 (12):2347-2354.

106. Glickman, L.T.; Grieve, R.B.; DeGregory, K.T.; Friedman, H.S. y Stockman, J.A. III. (1984). Toxocara antigens and mitogen-induced lymphocyte blastogenesis for diagnosis of visceral larva migrans: clinical and experimental findings in macaques and human beings. *American Journal of Veterinary Research*, 45 (6):1235-1237.
107. Glickman, L.T.; Grieve, R.B.; Lauria, S.S. y Jones, D.L. (1985). Serodiagnosis of ocular toxocariasis: a comparison of two antigens. *Journal of Clinical Pathology*, 38 (1):103-107.
108. Glickman, L.T.; Magnaval, J.F. y Brochier, B. (1985). Seroprévalence des larva migrans viscérales dans la region Midi-Pyrénées. *Presse Médicale*, 14:1094.
109. Glickman, L.T. y Schantz, P.M. (1985). Do Toxocara canis larval antigen used in enzyme-linked immunosobent assay for visceral larva migrans cross-react with AB isohemagglutinins and give false positive results?. *Zeirschrift für Parasitenkunde*, 71 (3):395-400.
110. Glickman, L.T.; Schantz, P.M. y Grieve, RB. (1986). Toxocariasis. In *Immunodiagnosis of parasitic diseases Volume 1: helminthic diseases*. (edited by Walls, K.W.; Schantz, P.M.).Orlando, Academic Press, 201-231.
111. Glickman, L.T.; Magnaval, J.F., Domanski, L.M. et al. (1987) Visceral larva migrans in French adults: a new disease syndrome?. *American Journal of Epidemiology*, vol. 125, 1019-1034.
112. González, S. (1983). Estudio experimental de Toxocara canis en fase larvaria. Tesina de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Madrid. (Citado por Guillen et al, 1986)

113. Gorash, V.R. y Alekseeva, M.I. (1985). The results of a 3 years study of the contamination with Toxocara eggs of the soil at Kishinev. *Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*, n°1, 77-80.
114. Goudemand, M. y Delmas, Y. (1974). *Eléments d'immuno-hématologie*, 45-52 Flammarion Médecine Sciences, 3<sup>e</sup> édition.
115. Gould, I.M.; Newell, S.; Green, S.H. y George, R.H. (1985). Toxocariasis and eosinophilic meningitis. *British Medical Journal*, 291 (6504), 1239-1240.
116. Gross, E.M.; Zeitan, R. y Tork, V. (1984). Research note: Toxocara canis infection in dogs in Beersheba Israel. *Journal of Helminthology*, 58:139-141.
117. Guillen, J.L.; Aguila, C. y Cuellar, C. (1985). Immunodiagnosis of visceral larva migrans by ELISA). *Revista Ibérica de Parasitología*, 45 (1):93-94.
118. Guillen, J.L.; Hoyo, C. y Puente, C.A. (1986) Fotodependencia del desarrollo embrionario de Toxocara canis. *Revista Ibérica de Parasitología*, 46 (1):67-74.
119. Guillen, J.L.; Cuellar, C y Aguila, C. (1986). Determination of circulating anti-Toxocara immune complexes in human serum by means of monoclonal antibodies. Resúmenes del Sixth International Congress of Parasitology, Brisbane. **Abstract 269.**
120. Guillen, J.L., Fenoy, S.; Cuellar, C. y Aguila, C. (1987). Seroprevalencia of anti-Toxocara antibodies in Spain. Resúmenes del Third Mediterranean Conference of Parasitology. Israel, 94.

121. Gunaseelan, L.; Ramadass, P. y Raghavan N. (1986). Serological diagnosis of Toxocara canis infection in children. Indian Veterinary Journal, 63 (10):828-832.
122. Gupta, A.K. y Pavri, K.M. (1987). Alteration in immunoresponse of mice with dual infection of Toxocara canis and Japanese encephalitis virus. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 81 (5)835-840.
123. Hagler, W.S.; Pollard, Z.F.; Jarret, W.H. y Donnelly, E.H. (1981) Results of surgery for ocular Toxocara canis. Ophthalmology, 88 (10):1081-1086.
124. Hartwich, G. (1974). Keys to genera of the Ascaridoidea. En C.I.H. Keys to the nematode parasites of vertebrates. Ed: by Roy C. Anderson; Alain G.Charbaud y Willmonth, S. n°2.
125. Haque, R. y Komandarev, S. (1988). Immunological analysis of antigens of Toxocara canis and Ascaris lumbricoides and attempt to obtain species-specific antiserum agains these helminths. Khelmitologiya, N°26, 67-71.
126. Hay, J.; Kendall, A.T.; Aitken, P.P. y Arnott, M.A. (1986). Toxocara canis infection and hyperactivity. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 80 (5):531-533.
127. Hay, J.; Arnott, M.A.; Aitken, P.P. y Kendall, A.T. (1986). Experimental toxocariasis and hyperactivity in mice. Zeitschrift für Parasitenkunde, 72 (1):115-120.

128. Herrmann, N.; Glickman, L.; Schantz, P.M.; Weston, M.G. y Domanski, L.M. (1985). Seroprevalence of zoonotic toxocariasis in the United States:1971-1973. American Journal of Epidemiology, 122 (5):890-896.
129. Herskovic, P. y Astorga, B. (1985). Human toxocariasis in Chile. Revista Médica de Chile, 113 (1):18-21.
130. Hertkorn, V. y Lamina, J. (1981). Larva migrans visceralis - success in the control of a zoonosis?. Praktische Tierarzt, 62 (12):1039-1040.
131. Hill, I.R.; Denham, D.A y Scholtz, C.L.(1985). Toxocara canis larvae in the brain of a British child. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 79:351-354.
132. Hogart-Scott. R.S. (1966). Visceral larva migrans an immunofluorescent examination of rabbit and human sera for antibodies to the E.S. antigens of the second stage larvae of Toxocara canis, Toxocara cati and Toxascaris leonina. Immunology, 10:217-223.
133. Hogart-Scott. R.S.; Johansson, S.G.O y Bennich, A. (1969). Antibodies to Toxocara in the sera of visceral larva migrans patients: the significance of raised level of IgE. Clinical and Experimental Immunology, 5:619-625.
134. Huisman, H. (1977). Solitary granuloma in ocular Toxocara canis infection. Ophthalmologica, 174 (1):10-13.
135. Huisman, H. (1977). Acute intraocular Toxocara canis infection; similar clinical picture to juxtapapillary chorioretinitis. Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde, 170 (1):39-42.

136. Huntley, C.C.; Costas, M.C.; Williams, R.C.; Lyerly, A.D. y Watson, R.C. (1966). Antigammaglobulin factors in visceral larva migrans. Journal American Medicine Association, 197, 124.
137. Huntley, C.C.; Costas, M.C. y Lyerly, A.D. (1965). Visceral larva migrans syndrome: Clinical characteristic and immunologic studies in 51 patients. Pediatrics, vol. 36.n°4
138. Huntley, C.C.; Lyerly, A.D. y Patterson. M.V. (1969). Isohemagglutinins in Parasitic Infections. Jama, Vol 208. n°7:1145-1148.
139. Huwer, M.; Sanft, S. y Ahmed, J.S. (1989). Enhancement of neutrophil adherence to Toxocara canis larvae by the C<sub>3</sub> componente of complement and IgG antibodies. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, A, 270, (3):418-423.
140. Ibraginov, M. (1957). En Enzéby, J. (1963). Les maladies verminenses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine. Tome premier:Maladies dues aux Némathelminthes, Fascicule deuxième, 507. Ed. Vigot Frères Editeurs.
141. Ivey, M.H. (1965). Immediate hypersensitivity and serological responses in guinea pigs infected with Toxocara canis or Trichnella spiralis. American Journal Tropical Medicine and Hygiene, 141:1044-101.
142. Ivey, M.H. (1967). Quantitative aspects of Toxocara antigen-antibody reactions with a modified passive cutaneous anaphylactic procedure. American Journal Tropical Medicine and Hygiene, 16:315-320.

143. Jablonoswski, Z.; Zebrowska, T. y Dziekonska, J. (1961). Wpleyw gliceryny, parafyny deju rzepakowego oraz roztworow wodnych na rozwojjaj Ascaris suum. GOEZE. Wiad Parazytology, 27:17-23.(Citado por Guillen et al, 1986)
144. James, D.G. (1978). Uveitis a systemic disorders. American Journal of Medicine, 65 (4):567-568.
145. Jimenez, J.F.; Valladares, B. y López, R. (1990). Prévalence de la Toxocarosis humaine sur l'île de Tenerife. Resumenes del VII International Congress of Parasitology. Paris, 991.
146. Josephs, D.S.; Bhinder, P y Thompson, A.R. (1981). The prevalence of Toxocara infection in a child population. Public Health, UK, 95 (5):273-275.
147. Jouvenceaus, A. (1978). Immunohématologie, 34-43 SIMEP. Editions.
148. Kagan, I.G.; Norman, L. y Allain, D.S. (1959). Studie on the serology of visceral larva migrans. Journal of Immunology, 83:297-301.
149. Kaszás, T.; Katona, M.; Timár, L. y Budai, J. (1984). Juvenile eosinocytic meningo-encephalitis (Toxocara infection?). Orvosi Hetilap, 125 (47): 2871-2873.
150. Kayes, S. y Oaks, J.A. (1976). Effect of inoculum size and length of infection on the distribution of Toxocara canis larvae in the mouse. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 25:573-580.
151. Kayes, S.G. y Oaks, J.A. (1978). Development of the granulomatous response in murine toxocariasis. American Journal of Pathology, 93:277-294.

152. Kayes, S.G. y Oaks, J.A. (1980). Toxocara canis: T lymphocyte function in murine visceral larva migrans and eosinophilia onset. *Experimental Parasitology*, 49 (1):47-55.
153. Kayes, G.; Omholt, P.E. y Grieve, R.B. (1985). Immune reponses of CBA/J mice to graded infections with Toxocara canis. *Infection and Immunity*, 48 (3):697-703.
154. Kayes, S.G.; Jones, R.E. y Omholt, P.E. (1987). Use of Bronchoalveolar lavage to compare local pulmonary immunity with the systemic immune response of Toxocara canis infected mice. *Infection and Immunity*, 2132-2136.
155. Kayes, G.S.; Jones, R.E. y Omholt, P.E. (1988). Pulmonary granuloma formation in murine Toxocariasis: transfer of granulomatous hypersensitivity using bronchoalveolar lavage cells. *Journal of Parasitology*, 74 (6):950-956.
156. Khalil, H.M.; Arafa, M.S.; Abdel Aal, T.M.; Khaled, M.L.; El Reidi, A.M.S.; Hifny, N. y Beiparas, M. (1978). Ascariasis and toxocariasis as revealed by precipitin absorption test in Egypt. In 4th International Congress of Parasitology, 19-26 August, Warsaw. Short communications Section E.
157. Khalil, H.M.; Khaled, M.L.M.; Olfat Farag Ali.; Nabila Hifny, M. y Bebars, M. (1978). Examination of soil for Toxocara canis eggs in different Governorates of Egypt. *Journal of the Egyptian Public Health Association*, 53 (5/6):295-302.
158. Kennedy, J.J., Defeo, E. (1981). Ocular toxocariasis demonstrated by ultrasound. *Annals of Ophthalmology*, 13 (12) 1357-1358.

159. Kennedy, M.W.; Foley, M.; Kuo, Y.M.; Kusel, J.R. y Garland, P.B. (1987). Biophysical properties of the surface lipid of parasitic nematodes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 22(2/3):233-240.
160. Kennedy, M.W.; Maizels, R.M.; Megji, M.; Young, L.; Qureshi, F. y Smith, H.V. (1987). Specic-specific and common epitopes on the secreted and surface antigens of Toxocara cati and Toxocara canis infective larvae. *Parasite Immunology*, 9:407-420.
161. Kennedy, M.W.; Tierney, J.; Ye, P.; McMonagle, F.A.; McIntosh, A.; McLaughlin, D. y Smith, J.W. (1988). The secreted and somatic antigens of the third stage larva of Anisakis simplex, and antigen relationship with Ascaris suum, Ascaris lumbricoides, and Toxocara canis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 31 (1):35-46.
162. Kennedy, M.W.; Qureshi, F.; Fraser, E.M.; Haswell-Elkins, M.R.; Elkins, D.B. y Smith, H.V. (1989). Antigenic relationships between the surface-exposed, secreted and somatic materials of the nematode parasites Ascaris lumbricoides, Ascaris suum and Toxocara canis. *Clinical and Experimental Immunology*, 75 (3):493-500.
163. Kielar, R.A. (1983). Toxocara canis endophthalmitis with low ELISA titer. *Annals of Ophthalmology*, 15 (5):447-449.
164. Knapen, F. van (1983). Toxocaral larva migrans; diagnosis and prevalence in The Netherlands. *Information Abo Akademi Finland*, 17:8-9.
165. Knapen, F. van.; Leusden, J. van y Polderman. A.M. (1983). Visceral larva migrans: Examinations by means of enzyme-linked immunosorbent assay of human sera for antibodies to excretor-secretor antigens of the second stage larvae of Toxocara canis. *Parasitenkd*, 69:113-118.

166. Kondo, J.; Akao, N.; Konishi, Y. y Yoshimura, H. (1984). Experimental studies on visceral larva migrans. 4 Examinations of immunoglobulins in sera on infected rabbits with Toxocara canis by means of indirect fluorescent antibody (IFA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Japanese Journal of Parasitology, 33 (2):99-104.
167. Krupp. I.M. (1974). Hemagglutination test for the detection of antibodies specific por Ascaris and Toxocara antigens in patients with suspected visceral larva migrans. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 23 n°3.
168. Lamina, J. (1974). Immunological diagnosis of larva migrans visceralis infection caused by the dogs ascarid Toxocara canis (Werner, 1782). Deutsche Medizinische Wochenschrift, 99 (20):1070-1073.
169. Lamina, L. (1980). Visceral larva mirans infections caused by Toxocara species. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 105 (22):796-798.
170. Lamina, J. von. (1986). Toxocariasis: -an important zoonosis in Germany?. Tierärztliche Umschau, 41:872-878.
171. Lapage, G. (1971). Parasitologia veterinaria, 68-69. Primera edición en español de la segunda edición en inglés. Compañía Editoria Continental S.A.
172. Lapierre, J. y Holler, C. (1917). Le syndrome de larva migrans viscerale. A propos de treize observations chez l'adulte. La Presse Médical, 79 (48):2163-2166.
173. Hong Fang Lee. (1960). Effects of superinfection on the behavior of Toxocara canis larvae in mice. Journal of Parasitology, 583-588.

174. Leibetseder, F. (1981). Eosinophilia on many years' durations in a patient with antibodies against visceral larva migrans. Wiener Medizinische Wochenschrift, 131 (7):185-188.
175. Lengyel, A. (1984). Serodiagnostic studies in human cases of suspected toxocariasis. Parasitologia Hungarica, 17:5-11.
176. Ljungström, I. y Knapen, F. van (1989). An epidemiological and serological study of Toxocara infection in Sweden. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 21 (1):87-93.
177. Ludlam, K.E. y Platt, T.L. (1989). The relationship of park maintenance and accessibility to dogs to the presence of Toxocara spp ova in the soil. American Journal of Public Health, 79 (5):633-634.
178. Lukes, S. (1985). Changes in the white blood picture during experimental larval ascariasis, toxocariasis and toxascariasis. Folia Parasitologica, 32 (3):237-245.
179. Lukes, S. y Prokopic, J. (1984). Comparison of counterimmunoelectrophoresis with indirect hemagglutination test in the detection of antibodies in rabbits experimentally infected with various species of ascarids. Folia Parasitologica, 31:157-162.
180. Lynch, N.R.; Wilkes, L.K.; Hodgen, A.N. y Turner, K.J. (1988). Specificity of Toxocara ELISA in Tropical populations. Parasite Immunology, 10:323-337.
181. Lynch, N.R.; Eddy, K.; Hodgen, A.N.; Lopez, R.I. y Turner, K.J. Seroprevalence of Toxocara canis infection in tropical Venezuela. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 82 (2):275-281.

182. Lyness, R.W; Earley, O.E; Logan, W.C. y Archer, D.B. (1987). Ocular larva migrans: a case report. British Journal of Ophthalmology, 71:396-401.
183. Lysenko, A.Y.; Alekseeva, M.I. y Avdyukhina, T.I.; Kupriyanova, N.Yu.; Tsutskiridze, N.P. y Sokol'Skaya, G.M. (1988). Geography of toxocariasis in the USSR. Communication 2. Nosogenic area. Medistsinkaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni, n°4:78-80.
184. Mackenzie, C.D.; Preston, P.M. y Ogilvie, B.M. (1978). Immunological properties of the a surface of parasitic nematodes. Nature, vol. 276 21/28:826-828.
185. Magnaval, J.F.; Glickman, L.T.; Grieve, R.B.; Carrière, G. y Dubly, E. (1986). Immuno-electrophoresis using genital organ extracts of Ascaris suum for the diagnosis of toxocariasis. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales, 79 (5,1):634-641.
186. Mafee, M.F.; Goldberg, M.F.; Cohen, S.B.; Gotsis, E.D.; Safran, M.; Chekuri, L.; y Raofi, B. (1989). Magnetic resonance imaging versus computed tomography of leukocoria eyes and use of in vitro proton magnetic resonances spectroscopy of retinoblastoma. International Ophthalmology, 96 (7) :965-975.
187. Magnaval, J.F.(1987). New data on the symptomatology of visceral "larva migrans". Presse Médicale, 16(4):151-154.
188. Magnaval, J.F. y Charlet, J.P. (1987). Comparative efficiency of thiabendazole and mebendazole in the therapy of toxocariasis. Thérapie, 42 (6):541-544.

189. Maizels, R.M.; De Savigny, D.; Ogilvie, B.M. (1984). Characterization of surface and excretory-secretory antigens of Toxocara canis infective larvae. *Parasite Immunology*, 6 (1):23-27.
190. Makela, O. y Peterfi, F. (1983). Standar sera in solid phase immunoassays. *European Journal Immunology*, 13:815-819.
191. Marval, F. y De Marval, M.J.(1979). Experimental toxocariasis (larva migrans) in C57/BL mice. *Revista Ibérica de Parasitología*, 39 (1-4):191-201.
192. Matsumura, K. y Endo, R. Enzyme-linked immunosorbent assay for toxocariasis, its application to the sera of children. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene 1. Abteilung, Originale A*, 253 (3):402-406.
193. Matsumura, K y Endo, R. (1983). Seroepidemiological study on toxocaral infection in man by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Hygiene*, 90:61-65.
194. Matsumara, K.; Kazuta, Y.; Endo, R.; Tanaka, K. (1983). The IgM antibody activities in relation to the parasitological status of Toxocara canis in dogs. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobilologie und Hygiene 1. Abt. Originale, A*, 255 (2/3):402-405.
195. Matsumura, K, Kazuta, Y,; Endo, R. Tanaka, K. (1983). The IgA antibody activities in relation to the parasitologic status of Toxocara canis in dogs. *Zy entralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene, A*, 256 (2):239-243.



196. Matsumura, K.; Kazuta, Y.; Endo, R. y Tanaka, K. (1983). Preliminary study on the follow-up observation of the antibodies and circulating antigens in canine toxocariasis. Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene A, 256 (2)244-248.
197. Matsumura, K.; Kazuta, Y.; Endo, R. y Tanaka, K. (1984). Detection of circulating toxocaral antigens in dogs by sandwich enzyme-immunoassay. Immunology, 51 (3):609-613.
198. Matthes, H.F. y Buchwalder, R. (1982). Investigation of the larval precipitation test with Ascaris suum and Toxocara canis larvae. Angewandte Parasitologie, 23 (2):1-8.
199. Meghji, M. y Maizels, R.M. (1986). Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode Toxocara canis. Molecular and Biochemical Parasitology, 18 (2):155-170.
200. Min, H.K. (1982). Migratory behaviour of Toxocara canis larvae in the brain of mice with special reference to distribution. Ewha Medical Journal, 5 (4):201-206.
201. Mochizuki, M.; Tomimura, T. y Oka, T. (1954). Cerebrospinal nematodiasis as a provoking factor in Japanese B encephalitis an experimental approach. Journal of Infectious Diseases, 95:260-266. (Citado por Woodruff W10)
202. Mok, C.H. (1980). Visceral larva migrans. Clinical Pediatric, 7:565-573.
203. Molk, R. (1982). Treatment of toxocaral optic neuritis. Journal of Clinical Neuro-Ophthalmology, 2 (2):109-112.

204. Mollinson, P.L.; Engelfryiet, C.P. y Contreras, M. (1987) Blood transfusion in clinical Medicine, 280-297. Blacwell Scientific Publications. Oxford. London. Edinburgh. Boston. Palo Alto. Melbourne. Eight editon.
205. Moore, M.T. (1962). Human Toxocara canis encephalitis with lead encephalopaty. Journal of Neurophatology and Experimental Neurology, 21:201-218.
206. Moreno, M.P.; Bonilla, M.T; Luera, R. y Orduña, M.T. (1985). Estudi sobre la parasitació intestinal en gossos de Barcelona i Provincia. Febrer-Juliol,1984. Gaseta Sanitaria de Barcelona, 56-60.
207. Nassir, J.K. y Thewaini, A.J. (1982). Some immunological findings in patients with hydatidosis or schistosomiasis. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 76 (1):71-76.
208. Nicholas, W.L.; Stewart, A.C. y Mitchell, G.F. (1984). Antibody responses to Toxocara canis using sera from parasiteinfected mice and protection from toxocariasis by immunisation with ES antigens. Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science, 62 (5):619-626.
209. Nicholas, W.L.; Stewart, A.C.; Walker, J.C. (1986). Toxocariasis: a serological survey of blood donors in the Australian Capital Territory together with observation on the risk of infection. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 80 (2):217-221.
210. Nichols, R.L. (1956). The etiology of visceral larva migrans I. Diagnostic morphologyc of infective second-stage Toxocara larvae. Journal of Parasitology, 42:349-362.

211. Nichols, R.L.(1956). The etiology of viseral larva migrans II. Comparative larvae morphology of Ascaris lumbricoides, Necator americanus, Strongyloides stercoralis and Ancylostoma caninum. Journal of Parasitology, 42:363-399.
212. Ngo, T.T y Lenhoff, H.M. (1980). A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidasa and peroxidase compled reactions. Analytic Biochemical. 105:389-397.
213. Nieto, A.; Gaya, A.; Moreno, C. y Vives. J. (1984). Nuevo método para determianr la adsorción de proteínas a las placas de poliestireno usadas en ELISA. Inmunología, vol.3 n°1.
214. Oaks, J.A. y Kayes, S.G. (1979). Artificial hatching and culture of Toxocara canis second stage larvae. Journal of Parasitology, 65 (6):969-970.
215. O'Connor. (1951). En Enzéby (1960) Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine. Tome premier: Maladies dues aux Némathelminthes, Fascicule deuxième, 507. Ed. Vigot Frères Editeurs.
216. Ogilvie, B.M. y De Savigny, D. (1982). Immune response to nematodes. In Immunology of Parasitic Infections. (Edited by: Cohen, S.; Warren, K.S) 2nd. Edition. Oxford, UK; Blackwell Scientific Publication Ltd, 715-757.
217. Okoshi, S. y Usui, M. (1968). Experimental studies on Toxascaris leonina. Japanese Journal of Veterinary Science, 30:29-38.

218. Oliver, J. y González, L.M. (1949). Release of the A<sub>2</sub> isoagglutinin-like substances of infectious organism into human blood serum. *Journal Infections Diseases*, **85**:66-71.
219. Oliver, J y Torregrosa, M.V. (1944). A substance in animal parasites related to the human isoagglutinogens. *Journal Infections Diseases*, **74**:173-177.
220. Olson, L.J. (1960). Serology of visceral larva migrans: in vitro larvae precipitate test. *Texas Reports on Biology and Medicine* **18**:473-479.
221. Olson, L.J.; Izzat, N.N.; Petteway, M.B. y Reinhart, J.A. (1970). Ocular toxocariasis in mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol 9 n°2:238-243.
222. Olson, L.J. y Petteway, M.B. (1971). Ocular nematodiasis: Results with Toxocara cati infected mice. *Journal of Parasitology*, vol 57 n°6.
223. Olson, L.J. (1976). Ocular toxocariasis in mice: Distribution of larvae and lesions. *Journal of Parasitology*, vol. 6:247-251.
224. Oppenheim, S.; Rogell, G. y Peyser, R. Diffuse unilateral subacute neuroretinitis. *Annals of Ophthalmology*, **17** (6):336-338.
225. Ott, R.A.; Staples, M.; Weekley, M y Maggio, E.T. (1985). Demonstration of both immunologically unique and common antigenic determinants in Dirofilaria immitis and Toxocara canis using monoclonal antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **10** (2/3):147-153.

226. Oshima, T. (1960). Standarization of techniques for infecting mice with Toxocara canis and observations on the normal migrations routes of the larvae. Journal of Parasitology, 47:652-656.
227. Owen, W.B. (1930). Factors that influence the developement of the ova of an ascarid roundworm. Toxocara canis (Werner, 1782). Stile 1905, under field conditions. St. Pau University of Minnesota Agricultural Experimental Station. Techn. Bull, 71:25. (Tomado de Glickamn y Schantz, 1981)
228. Parsons, J.C.; Bowman, D.D, y Grieve, R.B. Tissue localization of excretory-secretory antigens of larval Toxocara canis in acuted chronic murine toxocariasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 35 (5):974-981.
229. Patterson, R.; Huntley, C.C.; Roberts, M. e Irons. J.S. (1975). Visceral larva migrans: immunoglobulins, precipitating antibodies and detection of IgG and IgM antibodies against Ascaris antigens. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol 24 n°3:465-470.
230. Pegg, E.J. (1975). Dog round worms and public health. Veterinary Record, 97 (4):78.
231. Peppersack, T. (1981). The pathogenicity of larvae of Toxocara canis in mice. Inagural-Dissertation Tierärztliche Hoschschule, Hannover, GFR, 59
232. Pesce, A.J., Ford, D.J. y Makler, M.T. (1981). Properties of enzyme inmunoassays. In enzyme immunoassay Igaku-Shoin. Tokyo, New York, 27-39.

233. Petithory, J.C.; Derouin, F.; Rousseau, M.; Luffau, M. y Quedoc, M. (1987). Serological arguments for multiple etiology of visceral larva migrans. In Helminth zoonoses (edited by Geerts, S.; Kumar, V.; Brandt, J.) Dordrecht, Netherlands; Martinus Nijhoff Publisher, 183-191.
234. Philipp, M.; Parkhouse, R.M.E. y Ogilvie, B.M. (1980). Changing proteins on the surface of a parasitic nematode. *Nature*, vol 287:538-539.
235. Pinon, J.M. y Dropsy, G. (1977). Enzyme-linked immuno electro-diffusion assay: aplication of a combined immunoelectrodifusion and immunoenzyme method to the study of immune response in parasitic infections. *Journal Helminthology Methodes*, 16 (1):15-22.
236. Pinon, J.M.; Sulahiam, A.; Remy, G. y Dropsy, G. (1979). Immunological study of hydatidosis I. Evaluation of immunoelectrodifusion test and enzyme-linked immunoelectrodifusion assay (ELIEDA) in human hidatidosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 28 (2):318-324.
237. Pitts, T.D. (1948). Experimental hatching of the eggs of *Ascaris suum*. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 69:348-351. (Citado por Guillen et al, 1986).
238. Podsedlovskis, T.S.; Baiorinene, D.V. (Bajoriniene, D.); Federene, M.F. (Federiene, M.); Rochkene, A.A. (Röckiene, A.). (1983). Immunodiagnosis of the visceral larva migrans syndrome. *Acta Parasitologica Lituanica*, 20:89-92.
239. Polderman, A.M., Vries, H. de.; Water, T.P.M. van de. (1980). Serological diganosis of toxocariasis: the use of larval antigens in the ELISA. *Acta Leidensia*, 48:37-42.

240. Pollard, Z.F.; Jarret, W.H.; Hagler, W.S.; Allain, D.S. y Schantz, P.M. (1979). ELISA for diagnosis of ocular toxocariasis. *Ophthalmology*, **86** (5):743-749.
241. Pollard, Z.F. (1979). Ocular Toxocara in siblings of 2 families. Diagnosis confirmed by ELISA test. *Archives of Ophthalmology*, **97** (12):2319-2320.
242. Pinon, J.M. y Dropsy, G. (1977). Enzyme - linked - immuno - electo - diffusion assay: application of a combined immunoelectrodifusion and immunoenzyme method to the study of immune in parasitix infections. *Journal Helminthology Methods*, **16** (1):15-22
243. Preisshogen, L. y Lamina, L. (1977). Human visceral larva migrans infections with Toxocara in the German Federal Republic: serological investigations. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, **119** (45):1471-1474.
244. Prokopic, J. y Figallova, V. (1982). Eosinophilia in white mice infected experimentally with Toxocara and subsequently with Ascaris. *Veterinarni Medicina*, **27** (6):359-362.
245. Quinn, B.R.; Smith, H.V.; Bruce, R.G. y Girdwood, R.W.A. (1980). Studies on the incidence of Toxocara and Toxascaris spp ova in the environment 1. A comparison of flotation procedures for recovering Toxocara spp ova from soil. *Journal of Hygiene*, **84**:83.
246. Rahman, K.M. y Summers, W.A. (1979). Serologic differentiation of larval Toxocara and Ascaris. *Bangladesh Medical Research Council Bulletin*, **5** (1):38-45.
247. Randall, E.L. (1982). Visceral larva migrans. *Clinical Microbiology. Newsletter*, vol. 4 n°6.

248. Rée, G.H.; Voller, A.; Rowland, H.A.K. (1984). Toxocariasis in the British Isles 1982-3. British Medical Journal, **288** (6417):682-629.
249. Reimers, R.S.; Little, M.D.; Englande, A.J. et al. Parasites in southern sludges and disinfection by standard sludge treatment. Municipal Environmental Research Laboratory Office of Research and Development, US EPA, Cincinnati, Ohio (Manuscript). (Citado por de Glickman y Schantz 1981)
250. Riera, C.; Muñoz, C.; Portus, M. y Prats, G. Puesta a punto de una técnica EIA para la detección de anticuerpos anti-Toxocara. Ensayo en modelo experimental murino y su aplicación en el diagnóstico serológico de la "larva migrans" visceral humana. Revista Ibérica de Parasitologica. Vol extra, 219-224.
251. Robertson, B.D.; Rathaur, S.; Maizels, R.M. (1987). Antigenic and biochemical analyses of the excretory-secretory molecules of Toxocara canis infective larvae. In Helminth zoonoses (edite by Geerts, S.; Kumar, V.; Brandt, J). Dordrecht, Netherlands; Martinus Nijhoff Publishers, 167-174.
252. Robertson, B.D.; Burkot, T.R.; Gillespie, S.H.; Kennedy, M.W.; Wambai, Z. y Maizels, R.M. (1988). Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in Toxocara canis infections. Clinical and Experimental Immunology, **74** (2):236-241.
253. Rockey, J.H.; Donnelly, J.J.; Stromberg, B.E. y Soulsby, E.J.L. (1979). Immunopathology of Toxocara canis and Ascaris suum infections of the eye: the role of the eosinophil. Investigative Ophthalmology and Visual Science, **18** (11):1172-1184.

254. Rodriguez, M.; Gomez, V.; Granados, M.D. (1987). Human toxocariasis in the city of Granada. *Revista Ibérica de Parasitología*, **47** (1):79-80.
255. Rose, N.E. y Friedman, M. (1980). *Manual of Clinical Immunology*. American Society for Microbiology.
256. Rozman, C.; Pumarola, A.; Costa, E.M. y Vives, J. (1976). Larva migrans visceral otra causa de hipereosinofilia, *Medicina Clinica*, **66**:337-340.
257. Ruiz-Bravo, A.; Vega, D.; Garcia, P. (1977). Larva migrans visceral y su diagnóstico inmunológico. "Laboratorio" Año XXXII. Tomo LXII n°378.
258. Salinas, P.; Reyes, L.; Sotomayor, M.T.; Letonja, T. (1987). Prevalence of eggs of Toxocara in some public playgrounds in the metropolitan region of Santiago, Chile. *Boletín Chileno de Parasitología*, **42** (1-2):33-36.
259. Sandars, D.F. (1951). Viability of Ascaris lumbricoides eggs "preserved" in formalin. *Nature*, **167**, 730.
260. Savel, J. (1981). *Parasitologia*. Documentación Científica SEMAR, **30**:132-136.
261. de Savigny, D.H. (1975). In vitro maintenance of Toxocara canis larvae and a simple method for the production of Toxocara ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migras. *Journal of Parasitology*, vol 61. n°4, 781-782.
262. de Savigny, D.H. y Tizard, J.R. (1977). Toxocaral larva migrans. The use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **71**:501-507.

263. de Savigny, D.H. y Voller, A. (1979). Comparison of isotopic and non-isotopic methods in a model system for parasite serology. *Internacional Journal of Nuclear Medicine and Biology*, 7 (2):165-170.
264. de Savigny, D.H.; Voller, A. y Woodruff, A.W. (1979). Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Pathology*, 32 (3):284-288.
265. Scaglia, M.; Gatti, S.; Sangalli, G.; Manfredi, M.T.; Vigaño, T.; Bruno, A. y Genchi, C. (1988). L'infezione da Toxocara spp i sero-epidemiologia in una coorte di donatori di sangue a valutazione critica dei fattori di rischio. *Giornale di Malattie infettive e parassitarie*. (Estratto del n°9, vol 40:915-920.
266. Schantz, P.M. y Glickman, L.T. (1978). Toxocaral visceral larva migrans. *The New England Journal of Medicine*, vol. 298, n°8:436-439.
267. Schantz, P.M.; Meyer, D. y Glickman, L.T. (1979). Clinical serologic and epidemiologic characteristics of ocular toxocariasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 28 (1):24-28.
268. Schoucet, S.S. (1967). Human Toxocara canis encephalopathy in a case of visceral larva migrans. *Neurology*, 17:227-229.
269. Searl, S.S.; Kambiz Moazed; Albert, D.M. y Marcus, L.C. (1981). Ocular toxocariasis presenting as leukocoria in a patient with low ELISA titer to Toxocara canis. *Ophthalmology*, 88(12):1302-1306.

270. Shields, J.A.; Felberg, N.T.; Federman, J.L. (1979). Discussion of presentation by Dr. Zane F. Pollard et al. Ophthalmology, **86** (5):750-752.
271. Simon, M.F. y Conde, G.L.(1987). Datos epidemiológicos sobre la Toxocariasis y larva visceral emigrante en la provincia de Salamanca. Resúmenes del V. Congreso Nacional de Parasitología. Salamanca, 237-238.
272. Sin, J.M.; Barrasa, F.J.; Bustos, J.M.; De Juan, F. y Casado, E.A. (1974). A propósito de un caso de larva migrans visceral. Boletín Sociedad Aragonesa Pediátrica, 271-291.
273. Small, K.W.; McCuen, B.W.; Juan, E. de, Jr. y Machermer, R. (1989). Surgical management of retinal traction caused by toxocariasis. American Journal of Ophthalmology, **108** (1):10-14.
274. Smith, H.V.; Quinn, R.; Bruce, R.G. y Girdwood, R.W.A. (1980). A paper radioimmunosorbent test (PRIST) for the detection of larva-specific antibodies to Toxocara canis in human sera. Journal of Immunological Methods, **37** (1):47-55.
275. Smith, H.V.; Quinn, R.; Kusel, J.R. y Girdwood, R.W.A. (1981). The effect of temperature and antimetabolites on antibody binding to the outer surface of second stage Toxocara canis larvae. Molecular and Biochemical Parasitology, **4** (3/4):183-193.
276. Smith, H.V.; Kusel, J.R. y Girdwood, R.W.A. (1983). The productions of human A and B blood group like substances by "in vitro" maintained second stage Toxocara canis larvae: their presence on the outer larval surfaces and in their excretions/secretions. Clinical and Experimental Immunology, **54** (3):625-633.

277. Smith, H.V.; Quinn, R.; Bruce, R.G. y Girdwood, R.W.A. Antigenic heterogeneity in some Ascaroidea (Nematoda) of medical importance I. Analysis of adult nematodes. Acta Parasitologica Polonia, 28 (38/42):459-465.
278. Smith, H.V.; Quinn, R.; Bruce, R.G. y Girdwood, R.W.A. (1983). Antigenic heterogeneity in some Ascaroidea (Nematoda) of medical importance. II. Analysis of development stages. Acta Parasitologica Polonia, 28 (38/42):467-476.
279. Smith, R.E.; Hagstad, H.V. y Beard, G.B. (1984). Visceral larva migrans a risk assessment in Baton Rouge, Louisiana. International Journal of Zoonoses, 11 (2):189-194.
280. Smith, H.V.; Girdwood, R.W.A. y Kusel, J.R. (1984). Misinterpretation of toxocaral serodiagnostic tests. British Medical Journal, 288:1235.
281. Smith, H.V.; Hainson, A. y Girdwood, R.W.A. (1987). Serodiagnosis of human toxocariasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 81 (3):516.
282. Smith, H.V.; Hinson, A.R.; Girdwood, R.W.A. y Taylor, M.R.H. (1988). Variation in antibody isotope responses in clinically covert toxocariasis. Lancet, 2 (8603):167.
283. Smith, H.J. (1989). A rapid method of hatching infective eggs of Toxocara canis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 83:215.
284. Smithers, S.R.; McLaren, D.J. y Ramalho-Pinto, R.F. (1977). Immunity to schistosomes: the target. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 26 n°6:11-19.

285. Snow, K.R.; Ball, S.J.; Bewick, J.A. (1987). Prevalence of *Toxocara* species eggs in the soil of five east London parks. *Veterinary Record*, **120** (3):66-67.
286. Soresco, A et. al (1957). En Enzéby, J. (1963): Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine. Tome premier. Maladies due aux Némathelminthes, Fascicule deuxième, 507. Ed. Vigot Frères Editeurs.
287. Soulsby, E.J.L. (1981). Evasion of the immune response by parasites. II Conferencia Mediterránea de Parasitología. Granada.
288. Speiser, F.; Weiss, N. (1979). Comparative evaluation of 7 helminth antigens in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Experientia*, **35** (11):1512-1514.
289. Speiser. F.; Gottstein, B. (1984). A collaborative study on larval excretory-secretory antigens of *Toxoacara canis* for the immunodiagnosis of human toxocariasis with ELISA. *Acta Tropica*, **41** (4):361-372.
290. Sprent, J.F (1952). On the migratory behaviour of larvae of various *Ascaris* species in white mice II. Longevity of encapsulated larvae and their resistance to freezing and putrefaction. *Journal of Infections Diseases*, **92**:114-117.
291. Sprent, J.F.A. (1955). On the invasion of the central nervous system by nematodes I. The incidence and pathological significance of nematodes in the central nervous system. *Parasitology*, **45**:31-40. (Citado por Woodruff, A.W,1970)

292. Sprent, J.F.A. (1955). On the invasion of the central nervous system by nematodes II. Invasion of the nervous system in ascariasis. *Parasitology*, 45:41-55. (Citado por Woodruff, A.W. 1970)
293. Sprent, J.F.A. (1958). Observations on the development of Toxocara canis (Werner, 1782) in the dog. *Parasitology*, 48:184-209.
294. Sugane, K. y Oshima, T. (1980). Recovery of large numbers of eosinophils from mice infected with Toxocara canis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29 (5):799-802.
295. Sugane, K. y Oshima, T. (1982). Eosinophilia, granuloma formation and migratory behaviour of larvae in the congenitally athymic mouse infected with Toxocara canis. *Parasite Immunology*, 4 (5):307-318.
296. Sugane, K. y Oshima, T. (1983). Trapping of large numbers of larvae in the livers of Toxocara canis reinfected mice. *Journal of Helminthology*, 57:95-99.
297. Sugane, K. y Oshima, T. (1983). Purification and characterization of excretory-secretory antigen of Toxocara canis larvae. *Immunology*, 50:113-120.
298. Sugane, K.; Oshima, T. (1983). Activation of complement in C-reactive protein positive sera by phosphoryl-choline bearing component isolated from parasite extract. *Parasite Immunology*, 5:385-395.
299. Sugane, K. y Oshima, T. (1984). Induction of peripheral blood eosinophilia in mice by excretor and secretory antigen of Toxocara canis larvae. *Journal of Helminthology*, 58:143-147.

300. Sugane, K. y Oshima, T. (1984). Interrrelationship of eosinophilia and IgE anti-body production to larval ES antigen in Toxocara canis infected mice. Parasite Immunology, 6:409-420.
301. Sugane, K.; Howell, M.J. y Nicholas, W.L. (1985). Biosynthetic labelling of the excretory and secretory antigens of Toxocara canis larvae. Journal of Helminthology, 59:147-151.
302. Sugane, K. y Oshima, T. (1985). Induction of a marked eosinophilia by cyclophosphamide in Toxocara canis infected SJL.mice. Parasite Immunology, 7:255-263.
303. Sugane, K., Matsumura, T. (1987). Eosinophilia in chimeric mice infected with Toxocara canis. Journal of Helminthology, 61 (2):157-162.
304. Summers, B.; Cypess, R.H.; Dolinsky, Z.S., Burrig, R.G. y Donovan, P.J. (1983). Neuropathological studies of experimental toxocariasis in lead exposed mice. Brain Research Bulletin, 10 (4):547-550.
305. Taylor, M.R.H.; Keane, C.T.; O'connor, P.; Mulvihill, E. y Holland, C. The expanded spectrum of Toxocaral disease. The Lancet, March 26, 692-694.
306. Thompson, D.E.; Bundy, D.A.P.; Cooper, E.S. y Schantz, P.M. Epidemiological characteristic of Toxocara canis zoonotic infection of children in a Caribbean community. Bulletin of the World Health Organization, 64 (2):283-290.
307. Tijssen, P. (1985). Practice and theory of enzyme immunoassays. En. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 15. Edited by R.H. Burdon y P.H. van Knippenberg.

308. Tinelli, M.; Falagiani, P.; Riva, G. y Genchi, C. (1987). Rast and ELISA in three autochthonous parasitic infections in Italy: Toxocariasis hydatidosis and fasciolosis. *Bollettino Istituto Sieroterapico Milanese*, 66 (1):38-45.
309. Upadhyay, M.,P. y Rai, N..C. (1980). Toxocara granuloma of the retina. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 24(3):278-281.
310. Viens, P.; Milot, J.; Jacob, J.l.; Little, J.; Simard, M.; Claveau, R.; Deschênes, A.; Panisset, A.; Portnoy, J.; Brouillette, G. y Dagenais, R. (1981). Parasitic uveitis in Quebec. *Union Médicale du Canada*, 110 (10):893-894.
311. Voller, A.; Bidwell, D.E. y Bartleti, A. (1976). Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections. *Manual of Clinical Immunology* edited by N.R. Rose and M. Friedman, 69 506-512. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
312. Walsh, S.S. Robson, W.J.y Hart, C.A. (1988). Acute transient myositis due to Toxocara. *Archives of Diseases in Chilhood*, 63 (9):1087-1088.
313. Watze, R.C.; Oaks, J.A.; Folk, J.C. (1984). Toxocara canis infection in the eye. Correlation of clinical observations with developing pathology in the primate model. *Archives of Ophthalmology*, 102 (2):282-291.
314. Welch, J.S.; Symons, M.H.; Dobson, C. (1983). Immunodiagnosis of parasitic zoonoses purification of Toxocara canis antigens by affinity chromatography. *International Journal for Parasitology*, 13 (2):171-178.

315. Weller, P.F. (1984). Eosinophilia. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 73:1-10.
316. Wilder, M.C. (1950). Nematode endophthalmitis. *Transactions of American Academy of Ophthalmology Otolaryngolog*, 55:99-109.
317. Wilkinson, C.P. y Welch, R.B. (1971). Intraocular Toxocara. *American Journal of Ophthalmology*, vol 71:921-930.
318. Williams, D. y Roy, S. (1981). Arthritis and arthralgia associated with toxocaral infestation. *British Medical Journal*, 283 (6285):192.
319. Wolff, C. (1982). Visceral larva migrans: successful treatment with fenbendazole. *Immunität und Infektion*, 10(3):87-89.
320. Woodruff, A.W.; Thacker, C.K. y Shah, A.J. (1964). Infection with animal helminths. *British Medical Journal*, 1:1001-1005.
321. Woodruff, A.W.; Bisseru, B. y Bowe, J.C. (1966). Infection with animal helminths as a factors in cansing poliomyelitis and epilepsy. *British Medical Journal*, 1:1576-1579.
322. Woodruff, A.W. (1970). Toxocariasis. *British Medical Journal*, 3: 663-669.
323. Woodruff, A.W. (1976). Toxocariasis as a public health problem. *Environmental Health*, 84 (2):29-31.
324. Woodruff, A.W.; De Savigny, A. y Jacobd, D.E. (1978). Study of Toxocaral infection in dog breedors. *British Medical Journal*, 2 :1747-1748.



325. Woodruff, A.; Watson, J.; Shikara, I.; Al Azzi, N.S.; Al Hadithi, T.S.; Al Adhami, S.B.H.; Woodruff, P.W.R. (1981). *Toxocara* ova in soil in the Mosul Distric, Iraq, and their relevance to public health measures in the Middle East. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 75 (5):555-557.
326. Worley, G.; Green, H.A.; Frothingham, T.E.; Sturner, R.A.; Walls, K.W.; Pakalnis, V.A.; Ellis. G.S. Jr. (1984). Toxocara canis infection: clinical and epidemiological associations with seropositivity in kindergarten children. *Journal of Infectious Diseases*, 149 (4):591-597.
327. Yalçinkaya, F. (1977). Experimental investigations on the treatment of larva migrans with thiabendazole. *Türk Hijiyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 37 (3):253-261.
328. Yang, Y.; Keystone, J.S.; Mcintyre, L. y Spence, H. (1982). *Toxocara* antibodies in veterinary personnel. *Canadian Veterinary Journal*, 23 (4):126-128.