

## IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES ESPECÍFICOS EN PRODUCTOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN DE LARVAS DE *Toxocara canis*

### IDENTIFICATION OF SPECIFIC IMMUNODOMINANT ANTIGENS IN SECRETION/ EXCRETION PRODUCTS OF *Toxocara canis* LARVAE

SHERLENE MOSQUERA<sup>1</sup>, ORIANA MEDINA<sup>1</sup>, MARÍA LARES<sup>1</sup>, OLINDA DELGADO<sup>3</sup>,  
MARÍA MARTÍNEZ<sup>2</sup>, ELIZABETH FERRER<sup>1,2</sup>

Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Facultad de Ciencias de la Salud, <sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco J. Triana Alonso" (BIOMED), <sup>2</sup>Departamento de Parasitología, Maracay, Venezuela, <sup>3</sup>Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Instituto de Medicina Tropical, Sección de Inmunoparasitología, Caracas, Venezuela. E-mail: elizabeth.ferrer@gmail.com

#### RESUMEN

La toxocariasis es la infección producida por *Toxocara canis* y *T. cati*, parásitos de perros y gatos, respectivamente. El hombre es un hospedador accidental, al infectarse con los huevos de esos parásitos. Las larvas invaden vísceras o el globo ocular, produciéndose dos síndromes: larva *migrans* visceral y larva *migrans* ocular. El diagnóstico presenta dificultades debido a sintomatología inespecífica y que las larvas solamente pueden ser evidenciadas por biopsias. Los métodos inmunológicos son una alternativa, pero puede presentar reacciones cruzadas con otras parasitosis, por lo que en este trabajo se planteó la identificación de antígenos inmunodominantes específicos en productos de excreción/secreción de larvas de *T. canis* mediante la técnica de *Western blotting*. Para ello se estandarizó la técnica determinando diluciones y concentraciones óptimas de antígeno y reactivos y posteriormente se empleó la técnica utilizando sueros de individuos con toxocariasis, de individuos con otras infecciones parasitarias y de individuos sanos. Se obtuvo como concentración óptima de antígeno 10 µg/tira, y las diluciones 1/100 y 1/5.000 para el suero y conjugado, respectivamente. Se observó reconocimiento de bandas inmunodominantes de 26, 40 y 57 kDa sólo por los sueros de individuos con toxocariasis, no observándose reconocimiento ni en los sueros de pacientes con otras enfermedades parasitarias, ni en individuos sanos. Los antígenos de 26 y 57 kDa han sido descritos como específicos para el diagnóstico de toxocariasis, mientras que la banda de 40 kDa no había sido identificada anteriormente. La técnica de *Western blotting* permitió un diagnóstico sensible y específico de la toxocariasis humana.

**PALABRAS CLAVE:** Toxocariasis, larva *migrans* visceral, larva *migrans* ocular, *Western blotting*.

#### ABSTRACT

The toxocariasis is the infection caused by *Toxocara canis* and *T. cati*, parasites of dogs and cats, respectively. Man is an accidental host, when is infected with eggs from these parasites. The larvae invade organs or the eyeball, producing two syndromes, visceral larva migrans and ocular larva migrans. The diagnosis presents difficulties due to non-specific symptoms and the larvae can only be evidenced by biopsies. Immunological methods are an alternative, but may have cross-reactions with other parasites. Due to limitations in the diagnosis of the disease, the main objective of this work was to identify the specific immunodominant antigens in excretion/secretion products of *T. canis* larvae, by *Western blotting* technique. The reaction conditions were standardized, by determining optimal antigen concentration and dilutions of reagents and sera. Subsequently, the standardized technique was performed using sera from individuals with toxocariasis, individuals with other parasitic infections and healthy individuals. The results showed that the optimal concentrations of excretory/secretory antigen was 10 µg/strip, and dilutions of 1/100 and 1/5,000 for serum and conjugate, respectively. Recognition of immunodominant bands of 26, 40 and 57 kDa was observed only by sera from individuals with toxocariasis, while patients with other parasitic diseases and healthy individuals did not recognize any of these bands. Antigens of 26 and 57 kDa have been described as specific for the diagnosis of toxocariasis, while the 40 kDa band had not been previously identified. The *Western blotting* technique allowed a sensitive and specific diagnosis of human toxocariasis.

**KEY WORDS:** Toxocariasis, visceral larva *migrans*, ocular larva *migrans*, *Western blotting*.

#### INTRODUCCIÓN

La Toxocarosis es una zoonosis parasitaria producida por los nemátodos *Toxocara canis* y *Toxocara cati*, parásitos del perro y gato respectivamente, siendo la infección por *T. canis* más común e importante. El hombre se infecta de forma accidental al ingerir los huevos de estos parásitos, en el hospedador humano no ocurre el desarrollo completo hasta adulto, solamente sobrevive el

estadio larvario (Manson *et al.* 2003).

La infección ocurre cuando el humano ingiere los huevos embrionados de *Toxocara*. Las larvas invaden la pared intestinal, entran a la circulación y son transportadas principalmente a vísceras y el globo ocular. Estos órganos, son atacados por una reacción celular granulomatosa del hospedador, produciendo el Síndrome de Larva *Migrans* Visceral (SLMV) o Síndrome de Larva

*Migrans* Ocular (SLMO) (Despommier 2003, Delgado y Rodríguez-Morales 2009).

La toxocariasis es una infección cosmopolita, ampliamente distribuida a nivel mundial, siendo endémica en la mayor parte de los países de América, África y Asia (OMS 2005, Macpherson 2013). La prevalencia de esta infección es difícil de establecer por la dificultad en el diagnóstico. La infección por *T. canis* en perros y en humanos tiene tasas de distribución mundial que varían de 0 a 99,4%, y en América Latina varían, de acuerdo a cifras publicadas, de 1,8 a 78% (Agudelo *et al.* 1990, López *et al.* 2005a, Fillaux *et al.* 2007, Rivarola *et al.* 2009, Fillaux y Magnaval 2013).

En Venezuela no se conoce la prevalencia general de la infección, no obstante, se han realizado algunos estudios en varias zonas del país, encontrándose seroprevalencias, en algunas comunidades de diversos estados, del 66,6% en Caracas (Pifano *et al.* 1988), 34,9% en Amazonas (Lynch *et al.* 1988), 9,7% en Zulia (García-Pedrique *et al.* 2004), 21,7% en una comunidad indígena Yucpa de la Sierra de Perijá, estado Zulia (Díaz-Suárez *et al.* 2010), 34,4% en Lara (De Abreu *et al.* 2011) y 25,9% en Yaracuy (Gallardo y Camacho 2012).

El suelo es muy importante en la diseminación de esta parasitosis. Cazorla *et al.* (2004) realizaron un estudio en parques públicos de Coro, encontrando en 63,2% de ellos huevos de *Toxocara* sp. En otro trabajo en Ciudad Bolívar se encontró huevos de *Toxocara* sp. en 55% de las plazas estudiadas (Devera *et al.* 2008). Estos resultados muestran el riesgo potencial de transmisión de esta zoonosis en plazas y parques.

El diagnóstico de la toxocariasis humana resulta difícil porque la sintomatología es poco específica, y el hallazgo de las larvas en los tejidos mediante biopsias de los granulomas es un hecho excepcional. La demostración de los anticuerpos específicos es la herramienta más útil, pero las técnicas utilizadas varían en sensibilidad y especificidad dependiendo del antígeno utilizado. En la actualidad se realiza la determinación de anticuerpos contra antígenos de excreción/secreción de larvas de *T. canis* (TES), utilizando la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay*), lo que le aporta mayor sensibilidad y especificidad al diagnóstico (Delgado y Rodríguez-Morales 2009).

Otras investigaciones proponen que un ELISA positivo debería ser confirmado por *Western blotting* (WB), ya que pueden ocurrir reacciones cruzadas con

infecciones por otros parásitos, principalmente ascáridos. El WB se considera muy específico dado que muestra un patrón de bandas característico que permite diferenciar la toxocariasis de la infección producida por otros parásitos (López *et al.* 2005b, Fillaux y Magnaval 2013).

En nuestro país existen escasos trabajos sobre el uso de la técnica de WB para el diagnóstico de la toxocariasis, por lo que el objetivo principal de este trabajo fue la identificación mediante WB de antígenos inmunodominantes específicos en productos de excreción/secreción de larvas de *T. canis* para su posible uso en el diagnóstico de la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras biológicas

#### Antígeno de *Toxocara canis*

Se utilizó antígeno de excreción/secreción de larvas de *T. canis* (TES), preparado según la metodología descrita en un trabajo anterior (Nieves *et al.* 2012).

### Muestras de suero

Para la presente investigación se contaron con: *i*) 30 muestras de suero de pacientes con toxocariasis confirmada, mediante diagnóstico clínico y técnicas inmunológicas (ELISA y WB), 17 de estas muestras fueron cedidas por el Servicio de Parasitología del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España, provenientes de Ecuador (7) Venezuela (5), Colombia (3) y Bolivia (2). Otras 10 muestras fueron cedidas por la Sección de Inmunoparasitología del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela de individuos provenientes de Venezuela (controles positivos). *ii*) 20 muestras de suero de individuos sanos, sin historia de contacto con la parasitosis en estudio y confirmada su seronegatividad por ELISA (controles negativos). *iii*) 20 muestras de suero de pacientes con otras parasitosis, tales como; ascariasis (3), anquilostomiasis (3), strongiloidiasis (3), teniasis (3), cisticercosis (2), himenolepiasis (2), hidatidosis (1), enfermedad de Chagas (1), leishmaniasis visceral (1) y amibiasis (1), confirmadas por técnicas parasitológicas e inmunológicas (controles heterólogos).

Los controles negativos y heterólogos, así como tres controles positivos fueron seleccionados del banco de sueros de la sección de Parasitología Molecular del BIOMED de la Universidad de Carabobo, Sede Aragua.

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

## Procedimiento experimental

### Obtención del antígeno TES

Para la obtención del antígeno, los parásitos adultos expulsados por cachorros infectados se identificaron por microscopía óptica, se hizo la disección extrayendo los úteros de las hembras y se obtuvieron los huevos, los cuales fueron colocados en fiolas de vidrio con formalina al 2% con tapa de algodón, por 45 días a 28°C, agitándolos por lo menos una vez al día. Posteriormente, se recolectaron los huevos embrionados, se lavaron y sometieron a lisis con hipoclorito de sodio al 5% y en agitación con perlas de vidrio, para obtener las larvas, las cuales se colocaron en cultivo en RPMI en estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Después de 7 días, se recolectó el sobrenadante, se liofilizó (para concentrar), se añadieron inhibidores de proteasas y se dializó (Nieves *et al.* 2012). La determinación de la concentración de proteínas del antígeno de E/S se realizó mediante el método de Bradford (Bradford 1976).

### Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y electrotransferencia

Las electroforesis fueron realizadas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) en condiciones desnaturalizantes, según Laemmle (1970). La electroforesis se llevó a cabo en geles de separación al 10% y se separaron las proteínas a 20 miliamperios (mA), por una hora aproximadamente. A los efectos de la estandarización del sistema se realizaron varios geles con diferentes cantidades de muestra (10 y 15 µg por carril, de antígeno TES).

Una vez finalizada la separación de las proteínas mediante electroforesis, éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa siguiendo el método descrito por Towbin *et al.* (1979) utilizando el equipo SartoBlot (Sartorius) a 80 mA durante 1 hora aproximadamente. Después de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA, *Bovine Serum Albumin*) al 3% en tampón fosfato salino (NaCl 0,15 M, KCl 2,7 mM,

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM y MgCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 7,5) (PBS, *Phosphate Buffered Saline*), durante toda la noche. Posteriormente, la membrana se sumergió en PBS por 5 minutos y se colocó luego sobre un soporte para así proceder a cortar las tiras que contenían las proteínas transferidas.

### Estandarización de la técnica

#### Estandarización de la cantidad de antígeno

Para la estandarización la técnica de WB utilizando antígeno TES, se cortaron las tiras de las diferentes membranas (10 y 15 µg de antígeno), y se colocaron en un soporte en carriles individuales para cada tira. Se añadió en cada canal un volumen de 1.000 µL de una mezcla de las muestras de suero de los diferentes grupos (controles positivos, negativos y heterólogos), a una dilución de 1/100. El sistema se incubó a temperatura ambiente sobre un agitador por 90 minutos. Se lavaron las tiras tres veces con PBS-Tween 20 al 0,05%, durante 10 min en cada lavado. Posteriormente, se incubaron las membranas por una hora, a temperatura ambiente, con el conjugado anti-IgG humana acoplado a fosfatasa alcalina (Pierce), en una dilución de 1/5.000. Posterior a los lavados, se revelaron los complejos antígeno-anticuerpo con el sustrato NBT/BCIP (Sigma), conteniendo 0,33 mg/mL de NBT (nitroazul de tetrazolio) y 0,16 mg/mL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) en solución de la enzima fosfatasa alcalina (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M y MgCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 9,5). Se agitaron suavemente las cubetas por un tiempo aproximado de 3-5 minutos, hasta la aparición de las bandas. Se lavó con agua destilada y las tiras se dejaron secar a temperatura ambiente.

#### Estandarización de la dilución de suero y conjugado

A cada tira de papel de nitrocelulosa se agregó un volumen de 1.000 µL de una mezcla (“pool”) de las diferentes muestras de suero de los distintos grupos (controles positivos, negativos y heterólogos), a las diluciones 1/100, 1/200, 1/400, para cada grupo de muestras, a fin de estandarizar la dilución de suero óptima para la reacción y se realizó la reacción de la misma forma que fue descrita anteriormente. Para la estandarización de la dilución de conjugado se empleó el mismo procedimiento, solo que el conjugado se probó a las diluciones 1/5.000, 1/10.000 y 1/15.000.

Se evaluaron todas las muestras de los diferentes grupos de suero de forma individual, siguiendo el protocolo descrito anteriormente y utilizando las condiciones óptimas determinadas en la estandarización de la técnica

a fin de determinar los patrones inmunodominantes y específicos reconocidos por cada grupo de sueros.

### Análisis de resultados

Se compararon las bandas obtenidas en las diferentes condiciones ensayadas, de forma cualitativa en cuanto a intensidad y se determinaron los índices de diagnóstico; sensibilidad, especificidad y valor predictivo, tanto positivo como negativo, para aquellas bandas que resultaron inmunodominantes según Greenberg *et al.* (2002).

## RESULTADOS

### Estandarización de la técnica

En cuanto a la determinación de la cantidad óptima de antígeno para la reacción, los resultados demostraron que la concentración de 10 µg/carril de antígeno permitió el revelado adecuado de la reacción. Utilizando mayor concentración de antígeno (15 µg/carril), se observaron las bandas como manchas muy extendidas, difíciles de identificar. Por otro lado, las diluciones óptimas de sueros y conjugado resultaron 1/200 y 1/10.000 respectivamente, debido a que estas diluciones de suero y

conjugado permitieron observar la mejor discriminación entre los sueros positivos y negativos para la infección por *T. canis*.

### Evaluación de las muestras

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de trabajo se procedió a evaluar los sueros positivos a toxocariasis, los negativos y los sueros heterólogos. Los resultados obtenidos con las muestras de sueros de individuos con toxocariasis confirmada evidenciaron el reconocimiento mayoritario de tres bandas correspondientes a 26, 40 y 57 kDa. Específicamente el patrón se observó en 28 de las 30 muestras estudiadas. Por otro lado, se observaron bandas minoritarias de 85, 98 y 120 kDa, presentes en 15 de las 30 muestras analizadas (Fig. 1), siendo las bandas de menor peso molecular las más frecuentemente reconocidas.

En el caso de las 20 muestras de sueros de individuos sanos y de las 20 muestras de suero de individuos con otras enfermedades parasitarias no se observó la formación de ninguna banda, evidenciando la especificidad y ausencia de reactividad cruzada con el antígeno TES utilizado (Fig. 1).

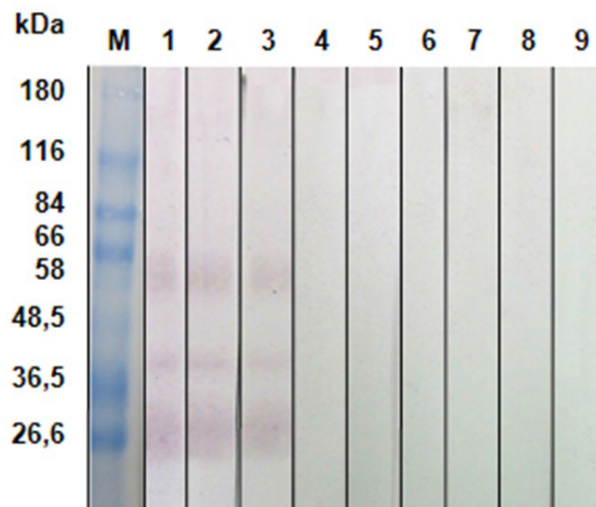


Figura 1. Patrón de bandas de antígenos TES reconocidos por algunos sueros evaluados mediante la técnica de WB. (M) Marcador de Peso Molecular (SigmaMarker). Sueros de pacientes con toxocariasis confirmada (1-3), sueros de individuos sanos (4-6) y sueros de pacientes con otras parasitosis (7-9).

Posteriormente, con base en estos resultados, se procedió a determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo para las diferentes bandas reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con toxocariasis evaluados en la prueba de WB estandarizada, los cuales se resumen en la Tabla 1.

Se puede observar que la sensibilidad obtenida en las tres bandas mayoritarias (26, 40 y 57 kDa) fue elevada (93,3%), mientras que la especificidad en todos los casos fue excelente (100%). En las otras bandas minoritarias la sensibilidad sólo alcanzó el 50%, mientras que la especificidad se mantuvo.

Tabla 1. Índices diagnósticos de las bandas reconocidas por los sueros de pacientes con toxocariasis.

Índice	Peso molecular de las bandas reconocidas por Western blotting					
	26 kDa	40 kDa	57 kDa	85 kDa	98 kDa	120 kDa
Sensibilidad	28/30	28/30	28/30	15/30	15/30	15/30
	93,3%	93,3%	93,3%	50,0%	50,0%	50,0%
	IC 95% (89,1-99,5%)			IC 95% (31,7-68,3%)		
Especificidad	40/40	40/40	40/40	40/40	40/40	40/40
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	IC 95% (89,1-99,8%)			IC 95% (89,1-99,8%)		
VPP	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	IC 95% (82,6-99,2%)			IC 95% (74,7-99,4%)		
VPN	95,2%	95,2 %	95,2 %	72,7 %	72,7%	72,7%
	IC 95% (82,6-99,2%)			IC 95% (58,8-83,5%)		

VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, IC (intervalo de confianza) al 95%.

## DISCUSIÓN

En Venezuela, actualmente, el diagnóstico de la toxocariasis se realiza a través de sospecha clínica y epidemiológica y mediante la técnica de ELISA que se emplea, en pocos laboratorios, principalmente de investigación. En nuestro laboratorio estandarizamos una técnica de ELISA con antígenos TES, la cual presentó una sensibilidad de 100% y una especificidad de 98,9%, observándose algunas reacciones cruzadas (Nieves *et al.* 2012). Por lo que en este trabajo se realizó la estandarización de la técnica de WB a fin de disponer de un procedimiento confirmatorio para el diagnóstico inmunológico de la toxocariasis.

En el proceso de estandarización de la técnica de WB se observó un ahorro en cuanto a la cantidad de antígeno a utilizar, así como también se requirió poca cantidad de suero y conjugado. Este aspecto resulta favorable, particularmente tomando en cuenta que la mayor parte de los pacientes son niños, en los que la obtención de la muestra sanguínea resulta más complicada.

Con la técnica de WB estandarizada, se observó que los sueros de pacientes con diagnóstico confirmado de toxocariasis reconocieron patrones de banda de 26, 40 y 58 kDa principalmente. El péptido de 26 kDa, se corresponde con una de las glicoproteínas TES descritas y caracterizadas por Maizels *et al.* (2000), designada de acuerdo a su peso molecular como TES 26 y que ha sido descrita por otros autores como banda diagnóstica (López

*et al.* 2005b); incluso el gen de TES 26 ha sido clonado y su producto utilizado como antígeno recombinante, con buenos resultados en el diagnóstico de la enfermedad (Mohamad *et al.* 2009).

El péptido de 40 kDa identificado, no había sido descrito anteriormente, lo que pudiera indicar la existencia de una nueva banda diagnóstica, presente en los antígenos TES en nuestro país. El hecho de no haberse detectado anteriormente podría obedecer al fenómeno de variabilidad antigénica del parásito; sin embargo, no podría descartarse el que sea producto de variaciones en el patrón de glicosilación de los antígenos, ya que es conocido que la mayoría de los antígenos TES son glicoproteínas tipo mucinas, y se han descrito por otros autores bandas de 35, 38, 43 y 45 kDa (Nuñez *et al.* 1997, Maizels *et al.* 2000, López *et al.* 2005b). Por otro lado, también debe considerarse que con esta metodología resulta difícil estimar los pesos moleculares exactos, ya que las bandas glicoproteicas con epítomos glicosídicos son difusas y no bien definidas, por lo que no demuestran una buena resolución en estos sistemas.

La banda de 58 kDa identificada en el presente trabajo, pudiera corresponder a TcES57 descrito por Iddawela *et al.* (2007), el cual es un antígeno TES que mostró buenos resultados en el diagnóstico de toxocariasis. También podría corresponder a la glicoproteína TES 55 caracterizada por Nuñez *et al.* (1997) y López *et al.* (2005b) considerando la posibilidad de un cambio

en su patrón de glicosilación, como ha sido descrito anteriormente.

Por otro lado, Maizels *et al.* (2000), detectaron siete bandas clasificadas en dos grupos: uno correspondiente a las bandas de bajo PM (28-30 y 45 kDa) y otro correspondiente a las de alto peso (132-147 y 200 kDa), habiéndose señalado que estas últimas serían responsables de la reactividad cruzada, mientras que las primeras serían específicas del género *Toxocara*. Las bandas inmunodominantes identificadas con las condiciones estandarizadas en este trabajo pudieran corresponder a las de bajo peso molecular específicas para *T. canis*.

En el sistema de WB el número de bandas, así como el tamaño exacto de las mismas varía de un trabajo a otro, lo cual puede atribuirse a las condiciones de la separación electroforética, a los antígenos de excreción/secreción del parásito utilizado, a las larvas empleadas para la recolección de antígeno, a la posible degradación de dicho antígeno, entre otros factores durante el ensayo, como lo refiere Nuñez *et al.* (1997), en un trabajo donde identificaron cinco componentes principales; mayores a 205 kDa, alrededor de 205 kDa, 116-97 kDa, 55-50 kDa, y 35-29 kDa que si se comparan estos patrones de banda obtenidos con las del trabajo realizado, las de 29 kDa y 55 kDa son cercanas a las bandas de 26 kDa y 58 kDa. Por otro lado, Magnaval *et al.* (1991) y López *et al.* (2005b), demostraron que el ensayo de WB se correspondía bien con el test de ELISA, pero resulta más específico para el patrón de bandas correspondiente a las fracciones de bajo peso molecular, evitándose así problemas de reactividad cruzada con otras infecciones helmínticas.

En el presente trabajo encontramos como bandas inmunodominantes las de bajo peso molecular, no obstante, se observaron también bandas minoritarias muy tenues que van desde 85 a 120 kDa. La banda de 120 kDa podría corresponder al producto del gen TES 120, el cual ha sido clonado y la proteína recombinante ha dado buenos resultados en diagnóstico de la enfermedad (Mohamad *et al.* 2009), a pesar que otros autores reportan que los componentes de alto peso molecular son más inespecíficos (Magnaval *et al.* 1991, Nuñez *et al.* 1997, Maizels *et al.* 2000).

Por otro lado, los sueros de individuos sanos y con otras parasitosis no reconocieron los antígenos TES en la prueba de WB estandarizada, lo que indica el alto grado de especificidad de la mezcla de antígenos empleada, tal

como ha sido referido por otros autores (López *et al.* 2005b) y mejora la especificidad de la técnica de ELISA descrita anteriormente (Nieves *et al.* 2012), empleando el mismo antígeno, en la cual la especificidad obtenida fue de 98,9%, mientras que por WB en este trabajo se obtuvo 100%.

Los índices diagnósticos obtenidos para las tres bandas mayoritarias son adecuados para una técnica de inmunodiagnóstico, por lo que se propone que podría utilizarse el WB estandarizado para la confirmación de los casos sospechosos y positivos por otras técnicas, de modo de ofrecer un diagnóstico certero de la toxocariasis.

## CONCLUSIONES

Las condiciones óptimas de reacción para la técnica de WB determinadas permitieron la evaluación de las muestras en estudio. Las bandas inmunodominantes obtenidas en los sueros de pacientes con toxocariasis confirmada fueron las de 26, 40 y 58 kDa, en donde es primera vez que se reporta la banda de 40 kDa. La técnica demostró 100% de especificidad de las bandas identificadas. Los índices diagnóstico obtenidos con las bandas inmunodominantes sugieren que la técnica podría usarse para la confirmación del diagnóstico inmunológico de la toxocariasis.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento a las Dras. Teresa Gárate y Esperanza Rodríguez del Servicio de Parasitología del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España, por ceder algunas de las muestras de suero utilizadas en la investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUDELO C, VILLAREAL E, CÁCERES E, LÓPEZ C, ELJACH I, RAMÍREZ N, HERNÁNDEZ C, CORREDOR A. 1990. Human and Dog *Toxocara canis* infection a poor neighborhood in Bogota. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85(1):75-78.
- BRADFORD M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann. Biochem. 72:248-254.
- CAZORLA D, MORALES P, ACOSTA M. 2004. Contaminación de suelos con huevos de *Toxocara* spp. (Nematoda, Ascaridida) en parques públicos de la ciudad de Coro, estado Falcón, Venezuela.

- Rev. Cient. FCV-LUZ. 17(2):117-122.
- DE ABREU A, DELGADO R, DÍAZ D, GARRIDO N, LÓPEZ Y, MEDINA Z, TORRES M, CÁRDENAS E, PÉREZ D, VIDAL A, SÁNCHEZ J. 2011. Seroprevalencia contra *Toxocara canis* en niños de 1 a 6 años con y sin síntomas respiratorios de Barquisimeto, Venezuela. Arch. Venez. Puer. Ped. 74(3):100-104.
- DELGADO O, RODRÍGUEZ-MORALES A. 2009. Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariasis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina. Bol. Mal. Salud Amb. 49(1):1-33.
- DESPOMMIER D. 2003. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. Clin. Microbiol. Rev. 16(2):265-272.
- DEVERA R, BLANCO Y, HERNÁNDEZ H, SIMOES D. 2008. *Toxocara* y otros helmintos en plazas y parques de Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 26(1):23-26.
- DÍAZ-SUÁREZ O, GARCÍA M, MELÉNDEZ F, ESTÉVEZ J. 2010. Seroepidemiología de la toxocariasis en una comunidad indígena Yucpa de la Sierra de Perijá al occidente de Venezuela. Kasmera. 38(2):138-146.
- FILLAUX J, MAGNAVAL JF. 2013. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. Vet. Parasitol. 193(4):327-336.
- FILLAUX J, SANTILLAN G, MAGNAVAL J, JENSEN O, LARRIEU E, SOBRINO-BECARIA C. 2007. Epidemiology of toxocariasis in steppe environment: The Patagonia study. Am. J. Trop. Med. Hyg. 76(6):1144-1147.
- GALLARDO J, CAMACHO S. 2012. Infección por *Toxocara canis* y factores de riesgo en niños de la comunidad Agua Azul, estado Yaracuy. Salud, Arte y Cuidado. 5(1):21-27.
- GARCÍA-PEDRIQUE ME, DÍAZ-SUÁREZ O, ESTEVEZ J, CHENG-NG R, ARAUJO-FERNÁNDEZ M, CASTELLANO J. 2004. Prevalencia de infección por *Toxocara* en pre-escolares de una comunidad educativa de El Moján, estado Zulia, Venezuela. Resultados preliminares. Inv. Clin. 45(4):347-354.
- GREENBERG RS, DANIELS SR, FLANDERS WD, BORING JR, ELEY JW. 2002. Estudios diagnósticos. En: Epidemiología Médica. Manual Moderno, México DF, México, pp. 81-95.
- IDDAWELA R, RAJAPAKSE R, PERERA N, AGATSUMA T. 2007. Characterization of a *Toxocara canis* species-specific excretory-secretory antigen (TeES-57) and development of a double sandwich ELISA for diagnosis of visceral larva migrans. Korean J. Parasitol. 45(1):19-26.
- LAEMMLE UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227(5259):680-685.
- LYNCH N, EDDY K, HOGDEN A, LÓPEZ R, TURNER K. 1988. Seroprevalence of *Toxocara canis* in tropical Venezuela. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82(2):275-281.
- LÓPEZ M, MARTIN G, CHAMORRO M, ALONSO J. 2005a. Toxocariosis en niños de una región subtropical. Medicina. 65 (3):226-230.
- LÓPEZ M, BOJANCHI M, ALONSO M, ALONSO J. 2005b. Immunoblotting para diagnóstico de toxocariasis humana en un área subtropical. Parasitol. Latinoam. 60(3-4):127-131.
- MACPHERSON CN. 2013. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. Int. J. Parasitol. 43(12-13):999-1008.
- MAGNAVAL JF, FABRE R, MAURIÈRES P, CHARLET JP, DE LARRARD B. 1991. Application of the Western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. Parasitol. Res. 77(8):697-702.
- MAIZELS RM, TETTEH KK, LOUKAS A. 2000. *Toxocara canis*: Genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. Int. J. Parasitol. 30(4):495-508.
- MANSON P, COOK GC, ZUMLA A. 2003. Manson's tropical diseases. Elsevier, London, UK, pp. 776-794.
- MOHAMAD S, CHEAZMI N, NOORDIN R. 2009. Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human Toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM,

- and TES-120). *J. Clin. Microbiol.* 47(6):1-6.
- NIEVES A, ORTEGA B, MARTÍNEZ M, CASTEJÓN O, LARES M, FERRER E. 2012. Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico inmunológico de toxocariasis humana. *Bol. Mal. Salud Amb.* 52(1):39-50.
- NUÑES C, TUNDISI R, GARCÍA J. 1997. Cross-reactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by Western blotting technique. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 39(5):253-256.
- OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD). 2005. 14<sup>ta</sup> Reunión Interamericana a Nivel Ministerial en Salud y Agricultura. Organización Mundial de la Salud [Documento]. México.
- PIFANO F, ORIHUELA R, DELGADO O, CORTEZ R, ABDUL-HADI S, DALE M, GARMENDIA J. 1988. La Toxocariasis humana en Venezuela, especialmente en el Valle de Caracas. *Gac. Med. Caracas.* 97(1/3):31-41.
- RIVAROLA ME, VUYK I, RIVEROS M, CANESE A, MICÓ G. 2009. *Toxocara canis* en población pediátrica rural. *Pediatría.* 36(2):118-122.
- TOWBIN H, STAEBELIN T, GORDON J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76(9):4350-4354.